



HAL
open science

Etude chimique et microbiologique des exopolymères de boues activées : éléments de compréhension du fonctionnement des stations d'épuration

Christophe Garnier

► To cite this version:

Christophe Garnier. Etude chimique et microbiologique des exopolymères de boues activées : éléments de compréhension du fonctionnement des stations d'épuration. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2005. Français. NNT : 2005INPL053N . tel-01752533

HAL Id: tel-01752533

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752533v1>

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>



Ecole Doctorale RP2E
(Ressources, Produits, Procédés
et Environnement)

Laboratoire Environnement
et Minéralurgie
UMR INPL-CNRS 7569

Thèse

présentée à

l'Institut National Polytechnique de Lorraine

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'I.N.P.L.
Spécialité : Géosciences

par

Christophe Garnier

Etude chimique et microbiologique des exopolymères de boues activées : Eléments de compréhension du fonctionnement des stations d'épuration

Soutenue publiquement le 29 juin 2005 devant la commission d'examen

| | | |
|---------------------------|--|-------------------------------|
| Jean-Yves BOTTERO | CEREGE Univ. Aix Marseille III | Rapporteur |
| Etienne PAUL | INSA Toulouse | Rapporteur |
| Marie-Noëlle PONS | L.S.G.C CNRS-ENSIC-INPL Nancy | Examinatrice |
| Pascal CHAPPE | IUT de Nancy Brabois UHP Nancy | Examineur |
| Tatiana GORNER | LEM Vandoeuvre-lès-Nancy | Co-directrice de Thèse |
| Philippe de DONATO | LEM Vandoeuvre-lès-Nancy | Directeur de Thèse |
| M. CORTEYN | Communauté Urbaine du Grand Nancy | Invité |

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire Environnement et Minéralurgie. Je remercie Messieurs Jacques Yvon, directeur, et Mr Fabien Thomas, sous-directeur du L.E.M., de m'y avoir accueilli.

Merci à Philippe de Donato et à Tatiana Görner qui ont tout deux dirigé cette thèse et qui ont su me transmettre leur compétences si complémentaires pour mener à bien mes recherches. Je remercie également Tatiana d'avoir relu avec tant d'attention mon manuscrit.

Je remercie vivement Monsieur Chappe et Madame Guinot-Thomas, microbiologistes à l'IUT Montet-Brabois, pour leurs interventions pendant cette thèse. Cette collaboration avec notre équipe a permis d'obtenir des résultats originaux et attrayants qui ne sont sans doute que les premiers.

Merci également aux responsables des stations d'épurations qui m'ont permis de venir prélever des échantillons à tout moment et m'ont reçu avec beaucoup de gentillesse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Pons pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse et je remercie de même Messieurs Bottero et Paul d'en avoir été les rapporteurs. Merci également à Monsieur Chappe d'avoir examiné ma thèse et Monsieur Corteyn, représentant de la Communauté Urbaine du Grand Nancy, d'avoir participé à ce jury.

Un immense merci à Bruno Lartigues et à Frédéric Villiéras dont les interventions pendant cette thèse n'ont pas forcément d'applications visibles mais dont le rôle a souvent été déterminant et tellement important que quelques lignes ne peuvent évidemment être suffisantes pour parfaitement exprimer ma reconnaissance. Merci également à Karine Devineau pour sa clairvoyance, sa complicité et ses bons conseils que tout thésard devrait suivre (mais que de toute façon on ne suit jamais).

Merci à Odile Barrès qui m'a appris à me servir du spectromètre infrarouge et dont la disponibilité n'a jamais été mise en défaut. Merci également à Manuel Pelletier et à Angelina Razafitianamaharavo pour leurs expériences « top qualité » sur mes charbons

Merci à Louis, Claire, Jérôme, Christelle, Elodie, Estelle, Céline et Nadège, mes stagiaires dont les manips m'ont grandement apporté, qu'elles soient sur la thématique « charbon » ou sur la thématique « boue ».

Merci à l'indispensable Solange pour ses attentions, sa gentillesse et son aide pendant... ben, tout le temps !

Merci, à Guillaume, Sophie et Amel, toujours là au bon moment. Je n'oublierai jamais les excellentes et réconfortantes soirées passées ensemble. À Jonas, Raphaël, Emolo (Bernard), Joseph pour leur bonne humeur et leurs éclats de rire. À Stéphanie qui m'a beaucoup aidé pendant ces derniers mois.

Merci aux lemmiens et aux lemmiennes...

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Introduction et objectifs de ce travail..... | 6 |
| 1 Partie bibliographique – l'état de l'art | 9 |
| 1.1 Les procédés industriels d'épuration des eaux usées : tour d'horizon | 9 |
| 1.1.1 Epuration des eaux usées par processus biologique..... | 10 |
| 1.1.2 Epuration des eaux usées par procédés physico-chimiques | 13 |
| 1.1.3 Les techniques membranaires (nano ou microfiltration)..... | 13 |
| 1.2 Problématique des boues..... | 14 |
| 1.2.1 Traitement des boues avant la valorisation | 15 |
| 1.2.2 Les différentes filières de valorisation des boues..... | 18 |
| 1.3 Coagulation – floculation | 22 |
| 1.3.1 Flocs de boues activées et leurs modèles | 25 |
| 1.3.2 Différents composants du floc..... | 29 |
| 1.3.2.1 Microorganismes des boues activées..... | 29 |
| 1.3.2.1.1 Bactéries épuratrices : les décomposeurs..... | 30 |
| 1.3.2.1.2 Microfaune : les prédateurs..... | 31 |
| 1.3.2.1.3 Autres microorganismes : bactéries filamenteuses et engainées..... | 33 |
| 1.3.2.2 Les exopolymères, leurs rôles et leurs natures chimiques. | 35 |
| 1.3.2.2.1 Rôle des exopolymères | 36 |
| 1.3.2.2.2 Nature chimique des principaux exopolymères | 38 |
| 1.3.2.3 Intérêt économique des exopolymères et autres hydrocolloïdes..... | 42 |
| 1.3.2.4 L'eau | 43 |
| 1.3.2.5 Rôle des cations dans les liaisons inter-polymériques | 43 |
| 1.3.2.6 Eléments de déséquilibre au sein du floc..... | 47 |
| 1.3.2.7 Exopolymères : leurs tailles et étude chromatographique de leurs tailles | 48 |
| 1.3.2.8 L'extraction des exopolymères | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | Matériel et méthodes | 55 |
| 2.1 | Stations étudiées | 55 |
| 2.2 | Caractérisations physico-chimiques des échantillons..... | 57 |
| 2.3 | Extraction des exopolymères | 59 |
| 2.4 | Chromatographie liquide haute pression (HPLC) par exclusion stérique | 61 |
| 2.4.1 | Principe..... | 61 |
| 2.4.2 | Appareillage chromatographique | 63 |
| 2.5 | Micro-spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier μ FT-IR en mode transmission | 66 |
| 2.5.1 | Rappel théorique | 68 |
| 2.5.2 | Aspect instrumental..... | 70 |
| 2.5.3 | Utilisation de la microspectrométrie infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse des exopolymères..... | 70 |
| 2.6 | Protocoles de microbiologie | 72 |
| 2.6.1 | Numération des populations bactériennes..... | 72 |
| 2.6.2 | Milieux de culture | 73 |
| 2.6.3 | Isolement et purification..... | 74 |
| 2.6.4 | Coloration et identification des souches..... | 74 |
| 2.6.5 | Méthode de mesure | 76 |
| 2.6.6 | Préparation des souches purifiées pour la culture | 76 |
| 3 | Résultats et discussion | 79 |
| 3.1 | Validation de l'approche méthodologique : HPLC | 80 |
| 3.1.1 | Interactions hydrophobes dans la colonne | 80 |
| 3.1.2 | Fidélité de la méthode et répétabilité du prélèvement..... | 81 |
| 3.1.3 | Evolution des échantillons sur 8 jours..... | 84 |
| 3.2 | Etude des exopolymères issus des différentes stations de traitement des eaux usées : vers une signature spécifique ? | 87 |
| 3.2.1 | Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined Size Exclusion Chromatography and Infrared Microscopy study..... | 88 |
| 1. | Introduction..... | 88 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 2. | Materials and Methods | 90 |
| 2.1. | Sample preparation and characterization: | 90 |
| 2.2. | Size exclusion chromatography | 91 |
| 2.3. | Infrared micro-spectroscopy (μ FTIR) | 92 |
| 3. | Results and discussion | 92 |
| 3.1. | Chromatographic study of exopolymers | 92 |
| 3.1.1. | <i>Study of EPS from one municipal WWTP</i> | 94 |
| 3.1.2. | <i>EPS from different municipal wastewater treatment plants: towards a EPS chromatographic fingerprint</i> | 96 |
| 3.1.3. | <i>EPS from two industrial wastewater treatment facilities</i> | 97 |
| 3.1.4. | <i>Crisis situation</i> | 97 |
| 3.2. | Chemical investigation of EPS by infrared micro-spectroscopy (μ FTIR) | 99 |
| 3.2.1. | <i>Toward a chemical database</i> | 99 |
| 3.2.2. | <i>Chemical fingerprint of EPS from various municipal and industrial wastewater installations</i> | 102 |
| 4. | Conclusion | 106 |
| 3.2.2 | Base de données IR relative aux exopolymères | 109 |
| 3.2.2.1 | Conception de la base de données | 109 |
| 3.2.2.2 | Système de gestion de la base de données | 111 |
| 3.2.2.3 | Caractéristiques des spectres IR | 111 |

3.3 Approche microbiologique des boues : éléments d'information sur les productions d'exopolymères des souches *Klebsiella* et *Enterobacter* .120

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.3.1 | Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry | 121 |
| 1. | Introduction | 121 |
| 2. | Materials and methods | 123 |
| 2.1. | Sludge sample preparation | 123 |
| 2.2. | Microbial analysis | 124 |
| 2.2.1. | <i>Numerations</i> | 124 |
| 2.2.2. | <i>Purification of strains</i> | 124 |
| 2.2.3. | <i>Morphological and biochemical characterisation of bacteria</i> | 125 |
| 2.2.4. | <i>Preparation of culture in Erlenmeyers</i> | 125 |
| 2.2.5. | <i>Kinetic of the growth bacteria</i> | 125 |
| 2.3. | Chromatographic analysis | 125 |
| 3. | Results and discussion | 126 |
| 3.1. | Chromatographic profile of the EPS extracted from the industrial sludge | 126 |
| 3.2. | Isolation and identification of the most representative strains | 127 |
| 3.3. | Pure individual strains E1 and E2 | 128 |
| 3.3.1. | <i>Kinetics of bacterial strains growth</i> | 128 |
| 3.3.2. | <i>Chromatographic profiles of the EPS produced by pure strains E1 and E2</i> | 129 |
| 3.4. | Mixture 50/50 of E1 and E2 bacterial strains | 131 |
| 3.4.1. | <i>Bacterial strains mixture and growth kinetics</i> | 131 |
| 3.4.2. | <i>Chromatographic study of EPS produced by a mixture of strains E1 and E2 (50/50)</i> | 131 |
| 4. | Conclusion | 134 |

4 Conclusion137

Introduction et objectifs de ce travail

Même si cela est difficile à calculer, on estime que la consommation moyenne d'eau dans le monde est de 40 L/hab./j. Ce chiffre cache d'énormes disparités : en effet, un agriculteur malgache consomme en moyenne 10 L/j alors qu'un habitant de Sydney par exemple consomme en moyenne plus de 1000 litres d'eau potable par jour, un Américain de 300 à 400 litres, et un Européen de 100 à 200 litres¹... En France les prélèvements d'eau représentent 24% de la ressource annuelle disponible soit 40 milliards de m³ sur les 170 milliards de m³ disponibles. Ces prélèvements correspondent à divers besoins :

- 43% servent à l'agriculture (irrigation).
- 42% couvrent les besoins en eau potable des collectivités.
- 7% couvrent les besoins des activités industrielles (métallurgie, chimie agroalimentaire, raffinerie, et industrie de pâte à papier).
- 8% sont consommée par la production d'électricité. Toutefois, dans ce cas la grande majorité de l'eau prélevée est restituée dans le milieu.

Cette situation est comparable à celle d'autres pays européens : 25% pour l'Allemagne ; 29% pour l'Espagne ; 32% pour l'Italie. En revanche l'Irlande, la Norvège et la Suède ne prélèvent que 2% de leurs ressources disponibles.

Ces eaux, souillées par l'activité humaine, ne doivent pas être directement rejetées dans le milieu naturel. En effet, bien que les rivières soient capables d'éliminer naturellement une certaine quantité de pollution, un grand volume d'eaux usées pourrait fortement perturber l'équilibre du milieu naturel, engendrant de ce fait, des phénomènes d'eutrophisation (développement d'algues), d'appauvrissement de la biodiversité des biotopes touchés, ainsi que compromettre ou augmenter le coût du traitement nécessaire à l'obtention d'une eau potable. En milieu urbanisé, il faut donc les collecter pour les épurer, avant de les rejeter dans le milieu naturel. Cet assainissement se pratique essentiellement dans les stations d'épuration.

Dans les stations d'épuration de type boues activées, des bactéries sont utilisées pour la dégradation de la matière organique présente dans des eaux usées. Ce genre de traitement biologique est le plus fréquemment utilisé. En France, il concerne 65% des stations d'épuration et environ 85% des habitants². Le procédé par boues activées est généralement

¹ <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/accueil.html>

² <http://www.environnement.gouv.fr/dossiers/eau/PAGES/POLITIQUE/CONNAITRE/12.htm2002>

efficace et produit des effluents de haute qualité. Cependant, 25% des stations d'épuration sont concernées par des problèmes de décantation (Urbain *et al.*, 1993), qui provoquent des difficultés de conduite des stations et des difficultés écologiques. Par exemple, la prolifération de bactéries filamenteuses peut modifier considérablement les propriétés du floc et donc altérer ses capacités à décanter. De plus, les exopolymères, qui sont des biomacromolécules, produits par les microorganismes et qui sont en contact avec le milieu environnant, sont impliqués dans des mécanismes physico-chimiques aux interfaces et donc dans la formation, la stabilité et la décantation des boues.

L'efficacité d'une station de ce type dépend donc simultanément de deux facteurs, d'une part de la fixation et la dégradation des éléments polluants par une population bactérienne adaptée, suffisante et constante et d'autre part de la bonne séparation des floccs de boues biologiques et de l'eau épurée en contact avec cette biomasse. On peut considérer que l'épuration de l'eau et la décantation sont d'autant plus efficaces que les floccs de boues activées sont cohésifs et denses.

La gestion des boues est aussi un enjeu considérable pour nos sociétés. Nos stations d'épuration produisent chaque année 850000 T de boues, dont 60% sont valorisées comme fertilisant agricole, par l'épandage. Le reste est incinéré, mis en décharge ou valorisé selon des filières spécifiques. La gestion et la valorisation des boues a un coût ; toute réduction de volume par réduction de la siccité réduit ce coût.

Des recherches récentes montrent qu'une séparation solide-liquide efficace dépend de la nature des exopolymères présents. Une meilleure connaissance de ceux-ci permettra de réduire les coûts de traitement des eaux usées et de la valorisation des boues. L'amélioration des procédés industriels passe par une approche globale des phénomènes de coagulation/floculation dans un système biologique. Ceci impose de prendre en compte l'ensemble des constituants du système et des liens qui les unissent : les bactéries composant le floc, les exopolymères produits par ces bactéries, le substrat (matière organique à dégrader), les ions et les particules minérales capables d'interagir avec les autres composants.

Les modèles présentés jusqu'à maintenant s'appuient sur l'étude des propriétés de décantation du floc bactérien en corrélation avec la composition des exopolymères du floc (protéines, polysaccharides, ADN, *etc.*). La communauté scientifique s'accorde sur le rôle des EPS comme "colle" assurant la cohésion du floc : toutes les molécules étudiées semblent jouer un rôle dans la cohésion des floccs. Par contre, les auteurs ne s'accordent pas sur le rôle prédominant d'une de ces familles chimiques. De plus, peu d'informations

existent concernant les propriétés chimiques (taille, nature chimique détaillée, *etc.*) des exopolymères.

Les chapitres suivants permettront d'exposer les résultats et les interprétations obtenus sur les exopolymères extraits à partir des boues biologiques des différentes stations étudiées. Les boues sont un mélange très complexe et les exopolymères n'en sont qu'une partie. Pour les étudier, il est nécessaire d'abord de procéder à leur extraction mais les EPS extraits forment toujours un mélange trop complexe, ce qui limite les méthodes d'investigation utilisables. Dans la majorité des études sur la structure des floccs, la composition des exopolymères (notamment des protéines et des polysaccharides) a été étudiée par des méthodes globales qui donnent un renseignement sur la quantité totale de protéines ou de polysaccharides sans information sur leurs tailles ou sur la nature de leurs fonctionnalités. Dans notre étude, nous avons utilisé une nouvelle approche basée sur l'HPSEC³ qui permet de séparer un mélange complexe des EPS en des fractions plus simples qui peuvent ensuite être étudiées par microspectrométrie infrarouge (μ FT-IR). Nous avons obtenu ainsi des connaissances absolument nouvelles et originales sur la nature chimique des EPS.

Les objectifs de ce travail étaient donc de :

- Choisir une méthode d'extraction la plus adaptée à notre étude.
- Mettre au point la méthode chromatographique de séparation par taille des polymères afin d'obtenir les fractions de mélanges moins complexes pour l'identification IR.
- Déterminer s'il existe ou non une signature chromatographique spécifique pour chaque station à partir des exopolymères présents.
- Identifier par μ FT-IR la nature chimique des EPS.
- Etablir une base de données spectrochimiques des EPS.
- Etudier les principales souches bactériennes d'une station d'épuration et les interactions possibles entre ces souches.
- Enfin, au sein de cet ensemble bio-organo-minéral complexe, existe-t-il des classes ou familles d'EPS plus efficaces vis-à-vis du phénomène de coagulation-décantation ?

Il a donc été nécessaire de mettre en oeuvre une méthodologie nouvelle et des outils d'observation et de description des ces divers composants aux échelles adaptées (macroscopique, microscopique, moléculaire voire atomique).

³ High Pressure Size Exclusion Chromatography

1 Partie bibliographique – l'état de l'art

1.1 Les procédés industriels d'épuration des eaux usées : tour d'horizon

La problématique des exopolymères se place dans un contexte général lié au cycle urbain de l'eau et plus particulièrement des traitements industriels des eaux usées. Il a semblé pertinent de faire un rappel bibliographique sur deux éléments clefs de cette filière eau que sont :

- Les procédés d'épuration des eaux usées et la notion de boue.
- Les aspects de la floculation et de la décantation et la notion de floc.

Les techniques les plus utilisées pour traiter les eaux usées sont des procédés intensifs. Le principe de ces procédés est de localiser et d'intensifier sur des surfaces réduites les phénomènes de transformation et de destruction des matières organiques que l'on peut observer dans le milieu naturel. Pour cela il est couramment fait appel à trois types de procédés d'épuration :

- Les processus biologiques aérobie et anaérobie à culture fixe ou libre.
- Les processus physico-chimiques.
- Les processus de filtration.

En 2000, l'agence de l'eau Rhin-Meuse recensait dans le bassin du même nom 484 stations. Sur ces stations, 84% utilisent les processus des boues activées, 15% des lagunes et 1% le traitement physico-chimique (Fig. 1). Nous présentons ici, les techniques les plus couramment mise en place dans les collectivités et leur présence dans le bassin Rhin-Meuse.

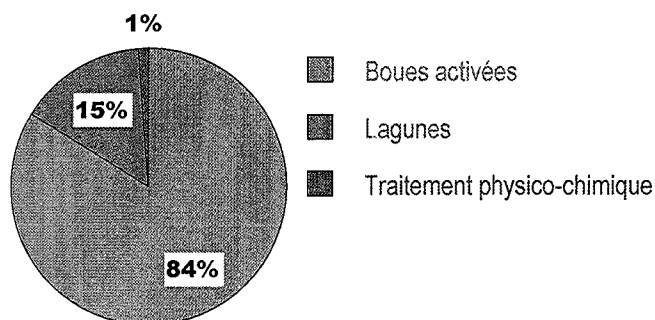


Figure 1 : Proportion des divers processus utilisés sur 484 stations du bassin Rhin-Meuse. Source : recensement de l'agence de l'eau Rhin-Meuse en 2000.

1.1.1 Épuration des eaux usées par processus biologique

Le traitement biologique est utilisé pour détruire les composés organiques contenus dans l'eau par les bactéries qui métabolisent la matière organique présente dans les eaux usées. On distingue deux types de traitements : le traitement aérobie et le traitement anaérobie. Le traitement aérobie consiste à apporter de l'oxygène pour favoriser la culture bactérienne de la dégradation de la matière organique présente dans les eaux usées. Il peut s'agir d'un procédé passif comme dans le cas des lagunes ou d'un procédé actif dans le cas des boues activées. Pour permettre les phénomènes de nitrification et de dénitrification, aux conditions optimales respectives contradictoires, les concepteurs ont basé leur procédé sur l'alternance spatiale et/ou temporelle des phases d'aération et d'anoxie. Les procédés strictement anaérobies sont beaucoup moins répandus mais semblent, selon Cardot (1999), particulièrement adaptés pour l'épuration des eaux très riches en matière organique, pour la stabilisation des boues et pour la déphosphatation.

Les boues activées

Les boues activées peuvent être assimilées à une intensification des processus d'autoépuration présents dans le milieu naturel. Ce processus, dit intensif, permet de réduire la surface nécessaire à l'épuration en brassant les effluents afin de garantir un apport en oxygène suffisant aux bactéries aérobies présentes dans le milieu afin d'activer la dégradation et la minéralisation de la matière organique dissoute ou colloïdale, en dioxyde de carbone, en eau, en matières minérales et en oxydes d'azote. Les bactéries peuvent être cultivées sous forme de cultures libres ou fixées sur des matériaux poreux (lit bactérien) ou disques biologiques.

Dans notre étude, les stations de traitement des eaux usées domestiques et industrielles échantillonnées (Maxéville, Toul, Golbey-Epinal, Etival-Clairefontaine) utilisent ce procédé où des microorganismes consomment la matière organique.

L'ensemble du procédé par boues activées est représenté sur le schéma suivant (Fig. 2).

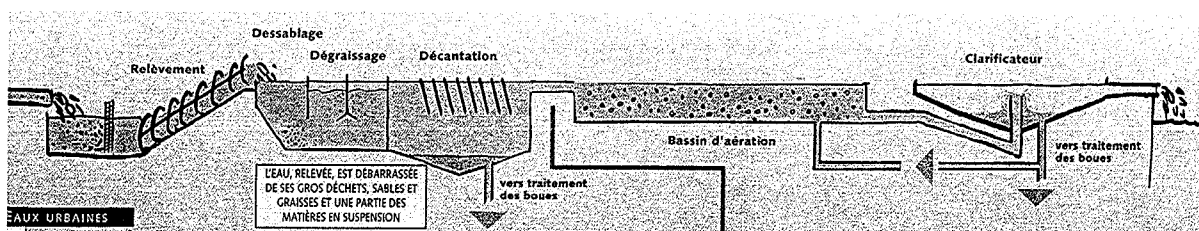


Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une station de type "boues activées"

Les eaux usées en entrée de la station d'épuration sont dégrillées pour enlever les gros déchets transportés par le réseau d'assainissement. Elles sont ensuite dirigées vers une étape de dessablage, déshuilage et décantation laminaire : les particules lourdes (sable, terre) vont au fond des bacs, tandis que les matières grasses et les hydrocarbures sont amenés en surface par l'injection de bulles d'air (flottation) et récupérés par raclage. Les eaux décantées sont acheminées vers les bassins d'aération. Une régulation permet de contrôler le débit d'eau, et de stocker le flux excédentaire dans des bassins extérieurs pour un traitement ultérieur. Ceci s'appelle le traitement primaire.

Dans les bassins d'aération, par brassage ou insufflation d'air, une biomasse bactérienne métabolise la matière organique présente dans l'eau. L'eau est ensuite introduite dans les clarificateurs où les boues activées sont séparées de l'eau traitée par décantation. L'eau épurée est ensuite rejetée dans le milieu naturel. Les boues accumulées dans le fond du clarificateur sont alors récupérées par succion. Une partie des boues produites dans les bassins d'aération et provenant du clarificateur sert à réensemencer les bassins d'aération en colonies bactériennes (Fig. 2). Ceci s'appelle le traitement secondaire. Dans les trois stations urbaines (Maxéville, Toul, Golbey-Epinal), traitement tertiaire, dénitrification par traitement anoxique ou autres traitements spécifiques, peuvent être réalisés.

Les boues extraites du décanteur ont une teneur en eau voisine de 97-99% et sont très fermentescibles. En fonction de leur destination, elles font l'objet d'un traitement et d'un conditionnement ayant comme objectif de réduire leur volume et, le cas échéant, de les stabiliser pour réduire leurs nuisances potentielles. En les épaisissant, par élimination d'une partie de leur eau, on obtient une boue contenant 4 à 10% de matière sèche se comportant comme du lisier. Entre 10 et 30% de matière sèche, les boues forment une pâte difficile à manipuler et nécessitant un équipement spécifique pour son épandage. Au-delà de 30% les boues solides sont manipulables comme du fumier. On parle souvent de la siccité des boues qui définit le pourcentage de matière sèche (MS) contenue dans celles-ci.

Dans le cas de la station de Maxéville (Fig. 3), les eaux épurées sont ensuite rejetées dans la Meurthe. Les boues produites sont acheminées dans des digesteurs anaérobies chauffés à 36°C, où s'effectue la transformation de la matière organique en biogaz, par l'action de microorganismes⁴. Les boues ainsi stabilisées sont épaisies gravitairement et

⁴ Techniques de l'Ingénieur, F 1 501

déshydratées par centrifugation avant d'être séchées afin de réduire le volume des boues à évacuer. Ces boues sont évacuées vers des filières de valorisation agricole.

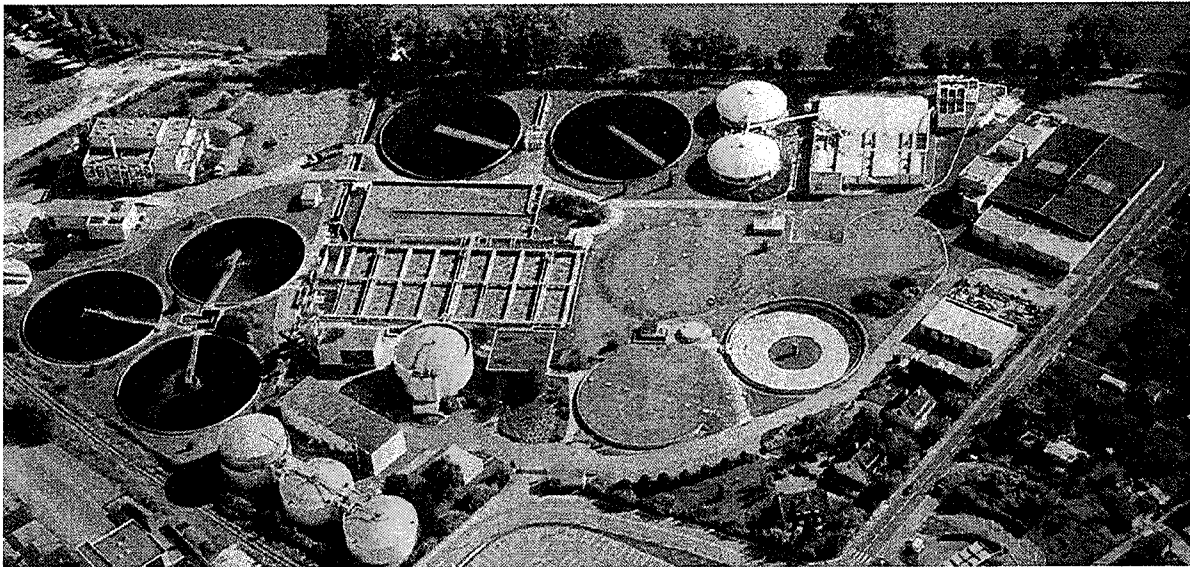


Figure 3 : Photo de la station d'épuration de Maxéville

Les principes du lit bactérien et des disques biologiques

Dans ces deux méthodes, les bactéries se développent sur des supports. Le principe du lit bactérien consiste à faire circuler les eaux usées à travers une masse de matériaux caverneux servant de support aux bactéries. La partie supérieure du système est alimentée par de l'oxygène alors que la partie inférieure en est dépourvue. On trouvera donc une biocénose adaptée aux conditions aérobies dans la partie supérieure du dispositif et une biocénose adaptée aux conditions anaérobies dans le fond du dispositif.

La méthode des disques biologiques consiste à faire ruisseler les eaux usées sur des disques recouverts d'un biofilm. Les disques étant fixés sur un axe de rotation, les bactéries du biofilm sont alternativement immergées dans un bassin contenant les eaux à épurer et exposées à l'air.

Le lagunage

Le lagunage utilise les mêmes types de processus biologiques naturels mais nécessite un temps de séjour plus long et un espace plus important. Les organismes participant aux processus d'épuration sont en particulier les bactéries et les algues. Dans les lagunes sans aération ni brassage artificiel, l'oxygène est principalement fourni par les phénomènes suivants : apport d'oxygène provenant de l'air qui se trouve au-dessus de la surface de l'eau, apport d'oxygène par mélange avec des eaux de surface de bonne qualité, saturées en

oxygène, alimentation en oxygène libérée par les algues lors de la photosynthèse. Les bactéries anaérobies essentiellement méthanogènes, se développent au niveau des sédiments du premier bassin appelé bassin de décantation car les substances toxiques non dégradables tels que les phénols, hydrocarbures, détergents et métaux lourds s'y déposent par sédimentation et ne risquent plus de s'accumuler dans la chaîne trophique. Ce système nécessite une profondeur d'eau importante facilitant les processus anaérobies et une charge en matière organique élevée.

1.1.2 Epuration des eaux usées par procédés physico-chimiques

Les processus physico-chimiques (Cardot, 1999) utilisent les phénomènes de coagulation et de floculation. Un coagulant, le chlorure ferrique ou l'alun, est ajouté pour déstabiliser les particules colloïdales. Ensuite un polymère anionique, permet d'agglomérer ainsi les particules déstabilisées pour en faire des floes, qui sédimenteront rapidement dans les décanteurs. Ce processus d'agrégation physico-chimique peut être ajouté au traitement primaire conventionnel (constitué du dessablage déshuilage et de la décantation primaire). Cela permet, sans modifier les structures de la station, une augmentation très appréciable de son efficacité. En effet, le polymère anionique va augmenter la taille des particules présentes en permettant leur agrégation, augmentant la vitesse de décantation (V_0) de celle-ci comme le montre la loi de Stock (Eq. 1).

$$V_0 = g(\rho_s - \rho_l)d^2 / 18\eta \quad (1)$$

Où ρ_s est la masse volumique de la particule, d le diamètre apparent de la particule, η la viscosité dynamique de l'eau, ρ_l masse volumique du liquide et g l'accélération de la pesanteur (Cardot, 1999).

1.1.3 Les techniques membranaires (nano ou microfiltration)

Aujourd'hui, ces techniques se généralisent essentiellement pour l'épuration des eaux industrielles (papeterie, mécanique, agroalimentaire). Réservées tout d'abord au dessalement et aux eaux de procédés, les membranes s'intègrent depuis une dizaine d'années de plus en plus dans les filières de traitement des eaux douces et depuis quelques années dans celles des eaux usées. Constituées de fibres creuses assemblées en éléments généralement cylindriques, les membranes permettent de retenir des éléments de très faible taille. Ces procédés se distinguent par la taille et le type des espèces qu'ils peuvent séparer. Selon la taille des pores de la membrane on parle de microfiltration (la taille des

pores est de l'ordre de 0.1 à 1 μm), l'ultrafiltration (de 10 nm à 100 nm), la nanofiltration (permet de retenir de molécules allant de 1 à 10 nm) et l'osmose inverse (< 1 nm)⁵. Au-delà de 1 μm et jusqu'à environ 100 μm on parlera de filtration liquide. La qualité des eaux obtenues permet d'envisager une réutilisation par ces industries, au cœur même du procédé, et ainsi de réduire la consommation d'eau, de recycler et de réutiliser des matières premières (produits chimiques, biomasse...) et en bout de chaîne, par exemple, de limiter leur volume dans le cas d'effluents toxiques.

Le diamètre de coupure de ces membranes est suffisant pour éliminer les bactéries, les particules colloïdales et certains oxydes métalliques associés à la matière organique (Madwar et Tarazi, 2002). L'utilisation de ces membranes peut également être envisagée après un traitement secondaire de type boues activées. Le principal obstacle est alors le colmatage de pores de ces membranes et donc leur régénération et leur réutilisation. Pour décoller les gâteaux de boues, Lim et Bai (2004) proposent d'associer des ultrasons au lavage chimique et à la recirculation d'eau afin de nettoyer ces membranes.

1.2 Problématique des boues

Tout traitement d'épuration de l'eau usée conduit à la production de déchets. Ceux-ci sont collectés au niveau du prétraitement (refus de dégrillage, déchets du dégraissage et du dessablage et au niveau des décanteurs primaires, secondaires, voire tertiaires : il s'agit alors des boues).

Les boues, au regard de la loi du 15 juillet 1975, sont considérées comme des déchets et doivent être gérées dans le respect de la réglementation particulière à ces produits. En particulier la loi du 13 juillet 1992 (modifiant la loi 15 juillet 1975) interdit la mise en décharge des déchets non ultimes à partir du 1^{er} juillet 2002. Compte tenu de leur caractère fermentescible et combustible, les boues ne pourront *a priori* plus être acceptées en décharge. Depuis de très nombreuses années, la plupart des boues urbaines issues des stations d'épuration en France sont épandues sur des terres agricoles (60%), le reste étant soit incinéré soit déposé en centre d'enfouissement technique (JO AN du 17/02/2004 page 1221). Toutefois, avant d'envisager leur valorisation, il convient de traiter les boues. L'une des actions de traitement possible est de diminuer la teneur en eau. La diminution de la teneur en eau permet de réduire le volume des boues : le coût de transport ou ceux liés à l'énergie dépensée lors de l'évaporation de cette eau (avant incinération par

⁵ Techniques de l'Ingénieur, C 5 200

exemple) s'en trouve réduit également. Cette opération est de toute façon une étape dévoreuse d'énergie qui, d'un point de vue physico-chimique, est liée au problème de la structure du floc bactérien et de son hydratation.

1.2.1 Traitement des boues avant la valorisation

De nombreuses techniques sont disponibles pour réduire le taux d'humidité de ces boues:

- Epaissement.
- Déshydratation.
- Séchage thermique (filtration, centrifugation, évaporation, *etc.*).
- Dégradation des matières organiques de la boue par des procédés biologiques (digestion, compostage, plantes) ou thermiques (incinération, thermolyse).

Ces techniques seront succinctement détaillées dans les paragraphes suivants.

L'épaississement⁶ : une étape indispensable

Cette opération peut être réalisée par simple décantation gravitaire dans un ouvrage cylindrique ou par flottation moyennant l'ajout d'un polymère organique à charge cationique ou encore mécaniquement : par table d'égouttage, tambour d'égouttage ou centrifugation. C'est une étape indispensable pour réduire à faible coût le volume des boues à traiter.

La déshydratation

La déshydratation⁷ permet de poursuivre l'opération d'épaississement jusqu'à un état pâteux soit 15 à 35% de siccité selon le type de boue et l'appareillage sélectionné : décanteuse centrifugeuse, filtre à bande ou filtre à plateaux. Ces techniques exigent l'ajout de polymères ou encore de chaux et de chlorure ferrique dans le cas des filtres à plateaux. L'ajout de chaux à hauteur de 200 à 500 kg de Ca(OH)_2 par tonne de matière sèche⁸ permet une stabilisation de la boue déshydratée. Lorsque la teneur en eau atteint 70%, (siccité = 30%) la boue est dite "pelletable" ; elle est solide lorsque la teneur en eau descend en dessous de 60% (siccité = 40%).

⁶ <http://www.ademe.fr/partenaires/Boues/Pages/f15.htm>

⁷ <http://www.ademe.fr/partenaires/Boues/Pages/f15.htm>

⁸ Technique de l'Ingénieur, G 1 450

Le séchage

Le séchage (Arlabosse, 2002) permet de poursuivre la déshydratation mais la valeur élevée de l'enthalpie de vaporisation de l'eau, qui représente l'énergie à fournir par unité de masse, grève le coût énergétique de cette opération si elle est unique. C'est pourquoi une séparation solide/liquide par épaissement ou par voie mécanique se doit d'être réalisée avant toute opération de séchage. Il permet une réduction de volume par 5 pour une déshydratation mécanique jusqu'à 25% de matière sèche et une réduction par 21 si cette même boue subit un séchage jusqu'à 90% de matière sèche.

Le séchage naturel

Le principe général consiste (Fig. 4) à se mettre sous serre afin de s'affranchir des intempéries et de confiner les odeurs. L'augmentation de la surface d'échange et son renouvellement se font par un outil mécanisé. Ce type d'unité permet de sécher les boues jusqu'à 80 % de siccité.

Le bilan énergétique doit être nul : les apports solaires, les apports par renouvellement d'air, les apports par conduction et chauffage naturel (serres) doivent être égales aux déperditions par les sols et les parois, aux déperditions par renouvellement d'air et à l'énergie consommée (vaporisation).

Le bilan de matière qui équivaut à la quantité d'eau évaporée doit être égal au débit du renouvellement d'air multiplié par la capacité de l'air à se charger d'humidité lorsque l'on augmente sa température de quelques degrés.

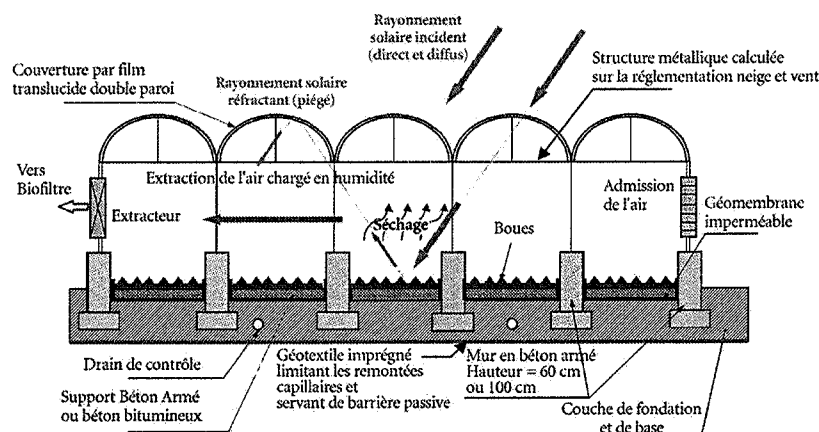


Figure 4 : Schéma d'une installation par séchage naturel des boues de station d'épuration⁹.

⁹ <http://www.prorecyclage.com/>

Le procédé Rhyzophyte

Le procédé Rhyzophyte (Bonino, 2002), est un système de traitement des boues d'épuration par les plantes qui associe en un seul ouvrage les fonctions d'épaississement, de minéralisation et de stockage. Les boues produites par la station sont pompées dans le bassin d'aération et transférées sur le lit de roseaux (*Phragmites communis*). En période estivale, 90% du volume d'une bâchée percole en 24 heures seulement. De plus, l'évapotranspiration des macrophytes contribue à déshydrater le massif filtrant. Selon les chiffres fournis par Bonino (2002), 1 m² de lit de Rhyzophyte évapotranspire environ 10 L/jour. Les eaux de percolation retournent en tête de station pour y être à nouveau traitées.

L'oxydation humide et "l'oxydation humide assistée par plasma"¹⁰

Elles consistent à chauffer à haute température (250 à 300°C) un effluent en phase liquide (siccité 4 à 7%) pressurisé (70 à 150 bars), en présence d'un gaz oxydant, dans le but de transformer par oxydation les composés organiques en un rejet gazeux propre, un liquide organique biodégradable et un solide essentiellement minéral. Cette technique permet à tous les constituants de la boue d'être recyclés, valorisés ou réintroduits dans le milieu naturel¹¹. Une variante consiste à assister le procédé d'oxydation en voie humide d'une torche à plasma pour la destruction de la matière organique contenue dans les boues d'épuration.

Exemple de la Communauté Urbaine du Grand Nancy : séchage alimenté par biogaz issu des boues produites par la station. (Gay, 2002)

La station d'épuration de Nancy dispose de trois digesteurs anaérobies moyenne charge (deux de 3200 m³ et un de 5200 m³). Ils sont brassés par recirculation du biogaz et chauffés par un système particulier de récupération de chaleur. Le biogaz produit (entre 16000 et 20000 m³/j) est temporairement stocké dans un gazomètre de 2600 m³. Le biogaz est immédiatement valorisé dans une chaudière produisant de la vapeur (35000 m³/j).

La totalité de la vapeur est utilisée pour le séchage des boues. Il s'agit d'un séchage thermique de type indirect à deux étages qui permet d'augmenter la siccité des boues de 30% à 95% après déshydratation. Les besoins en chaleur pour le séchage sont

¹⁰ <http://www.waternunc.com/assets/duplic1/fiches%20OHAP.pdf>

¹¹ http://www.waternunc.com/fr/dosboues_VE01_082002.htm

intégralement couverts par la production de biogaz. En effet, une récupération de l'énergie de condensation des buées pour le chauffage des digesteurs permet d'économiser le biogaz pour le séchage des boues. L'optimisation des flux énergétiques permet une valorisation maximale du biogaz sans consommation de combustibles fossiles. Les boues sèches font l'objet d'une valorisation agronomique sous forme de granulés.

1.2.2 Les différentes filières de valorisation des boues

L'incinération

L'incinération¹² réduit la quantité de boues aux seules matières minérales mais la quantité d'air nécessaire à l'entretien de la combustion génère fumée et gaz à effet de serre tel que le CO₂. La siccité des boues incinérées doit de plus être supérieure à 30% pour satisfaire aux conditions d'autocombustion. Elles doivent donc subir systématiquement une opération de séchage préalable pour atteindre cette siccité. Le coût de cette technologie est de l'ordre de 100 €/tonne¹³.

La thermolyse

Le procédé de thermolyse¹⁴ repose sur la décomposition de la matière organique par l'utilisation de la chaleur (450 à 750°C) en absence d'oxygène. Contrairement à l'incinération il n'y a pas de combustion de la matière, mais seulement une décomposition de celle-ci, ce qui permet de réduire notablement le volume des fumées générées et de produire moins d'éléments volatils nuisibles. Le volume de fumées est environ deux fois inférieur à celui d'un incinérateur de capacité équivalente. Le réacteur doit être alimenté en boues sèches ; l'absence de vapeur d'eau pendant la phase de thermolyse permet une captation plus performante des polluants (HCl notamment). Le chlore, impliqué dans la formation des dioxines et furannes, est piégé dans le lit carboné (Thide Environment, 2002). De plus, la valeur énergétique du gaz produit est largement suffisante pour suffire aux besoins énergétiques de la thermolyse. Une récupération énergétique sur la partie excédentaire de ce gaz ainsi que sur les fumées de combustion issues de l'enceinte chauffante du four permet d'assurer la production de vapeur nécessaire aux besoins énergétiques d'un sécheur placé en amont de la thermolyse. Les différents développements européens de cette technologie sont recensés dans l'article de Malkow (2004).

¹² <http://www.ademe.fr/partenaires/Boues/Pages/f53.htm>

¹³ Donnée Agence de l'Eau Rhin-Meuse (AERM). 2000

¹⁴ <http://www.promethee.be/thermo1.htm>

Transformation en charbon actif

De nombreux brevets ont été déposés à cet effet : dès 1976 Nickerson et Nessman déposent pour Combustion Eng. et Sutherland pour Hercules Inc. des méthodes pour fabriquer des charbons actifs à partir des boues. Ces boues riches en matière organique peuvent être carbonisées par les méthodes de pyrolyse puis activées par des méthodes chimiques ou physiques. Les adsorbants ainsi obtenus à partir des boues ont une relativement haute surface spécifique. Elle peut atteindre, selon Bagreev *et al.* (2001), 100 à 200 m²/g par activation physique et jusqu'à 400 m²/g par activation chimique. Ces charbons actifs sont alors utilisés en tant qu'adsorbants et supports bactériens. L'addition de ces charbons actifs permet d'accroître l'efficacité de l'épuration. Selon Martin *et al.* (2004) la synergie apparente de l'activité biologique et de l'adsorption est due à la régénération de la surface par les bactéries. En outre, il semble que les particules de charbon servent de nucleus et d'aide à la formation du floc et auraient de ce fait un effet positif sur la décantation (Çeçen *et al.*; 2003).

La valorisation agricole des boues urbaines : épandage, compostage, etc.

Les composés tels que le carbone, l'azote, le phosphore, le potassium présents dans les boues peuvent faire l'objet d'une valorisation agricole. Ces éléments fertilisants sont alors recyclés et valorisés par la végétation en place. Cette filière impose de s'entendre avec des agriculteurs ouverts à ce type d'expérience et d'être en mesure de leur proposer un produit intéressant et de qualité. Chacune des deux parties (producteur de boues et exploitant agricole) doivent alors respecter quelques règles. Ces règles sont stipulées dans le décret du 8 décembre 1997 et son arrêté du 8 janvier 1998 pris en application de la loi sur l'eau du 3 janvier 1992. Le producteur doit garantir l'innocuité et la qualité des boues (salmonelles, *Escherichia coli*, métaux lourds, HAP, etc.), en est responsable jusqu'à leur élimination et doit respecté le principe de traçabilité des boues. L'épandage des boues ne peut se faire que sur un sol préalablement étudié. L'agriculteur doit respecter un cahier des charges imposant des limites temporelles, géographiques et météorologiques au stockage et à l'épandage. Les boues doivent être suivies par le producteur et par un organisme indépendant. Enfin, un contrôle est assuré par le préfet. Le coût de l'épandage est de seulement 20 €/tonne environ.

La destination des boues en Lorraine

La production annuelle de boues d'épuration du bassin Rhin Meuse est actuellement de 0.32 million de tonnes (Tab. 1). Ces chiffres concernent à la fois la production de boues

émanant des stations d'épuration traitant les eaux usées des collectivités et les boues produites par l'activité industrielle. L'industrie de ce bassin a produit, à elle seule 236000 tonnes de boues dont 84% en provenance des papeteries. Les destinations des 82500 tonnes produites par les stations raccordées aux collectivités, varie fortement d'un département à l'autre, même au sein de la région lorraine (Fig. 5).

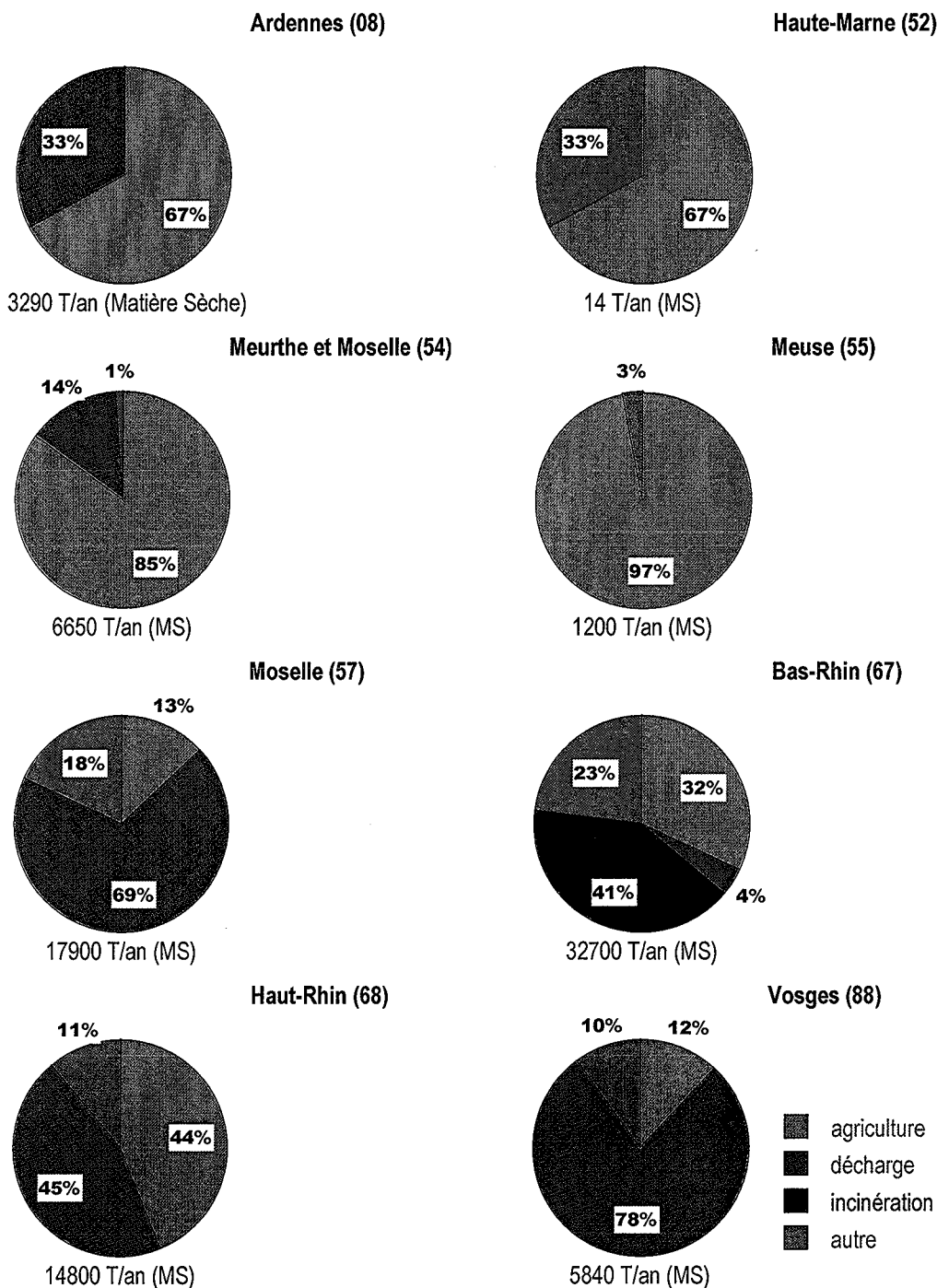


Figure 5 : Destination des boues dans le bassin Rhin-Meuse. Source : AERM 2000.

La figure 5 suscite quelques commentaires :

- Seules les boues de la communauté urbaine de Strasbourg (Bas-Rhin) sont actuellement incinérées. L'incinérateur permet d'éliminer 41% des boues produites par ce département.
- Le faible tonnage de boues produites dans les départements des Ardennes, de la Haute Marne, de la Meurthe et Moselle et de la Meuse, semble permettre une utilisation ou une valorisation d'une majorité ou de la totalité de ces boues. Au sein de la filière "agriculture", on devrait assister dans l'avenir à une augmentation des quantités de compost produit en raison de l'ouverture d'une plate-forme de compostage dans les Vosges.
- La Moselle, le Haut Rhin et les Vosges sont les trois départements qui mettent majoritairement leurs boues en décharge. Cette filière onéreuse est peu à peu délaissée en vertu de la législation européenne.
- Enfin, plus de 50% de la destination "autre" est constituée par des stations d'épuration qui envoient leurs boues vers d'autres stations.

On voit donc que les voies de valorisation de traitement des boues varient fortement au sein d'une même région, notamment sous l'influence de paramètres socio-économiques.

Tableau 1 : Production des boues en tonne de matière sèche par an (tonnes MS/an)¹⁵.

| Production des boues d'épuration en matière sèche par an (tonnes MS/an) | | | |
|---|------------------------------|---------------------|----------------------|
| Union Européenne et Suisse : | France à l'horizon 2000-2010 | Bassin Rhin-Meuse : | Etats Unis et Canada |
| 7 millions | 1.3 à 1.5 millions | 0.32 million | 8 millions |

Quatre destinations sont actuellement possibles pour les boues d'épuration. Les choix de ces filières dépendent des politiques de valorisation, de la dotation du département, de la balance entre les secteurs industriels et agricoles, *etc.* Ces destinations sont :

- L'épandage agricole.
- L'incinération pour quelques grosses unités ou lorsqu'une installation locale existe déjà pour les ordures ménagères.
- La mise en décharge (solution devant être progressivement abandonnée).
- Autres (unité de valorisation des huiles, séchage naturel, minéralisation par biomasse végétale, gestion des boues produites par une autre station, *etc.*).

¹⁵ Données ADEME 2004 ; <http://www.ademe.fr/htdocs/actualite/dossier/boues.htm#2>

1.3 Coagulation – floculation

La description des mécanismes intervenant dans les phénomènes de floculation/défloculation, ainsi que les modèles descriptifs de la structure des floes, présentent un intérêt considérable dans l'optique d'une meilleure compréhension et maîtrise du procédé de séparation solide/liquide. La caractérisation des floes passe nécessairement par l'identification des divers composants du floe et par l'identification des souches bactériennes ainsi que de leurs interactions et des conséquences de leur métabolisme.

Les eaux à épurer contiennent de la matière organique et minérale sous différentes formes et diverses tailles allant du macro-déchet à la molécule. Le dégrillage permet d'éliminer les déchets les plus gros. La décantation primaire permet de retirer une grande partie des particules solides. Reste alors à éliminer les particules colloïdales et la matière dissoute.

Pour des particules d'une taille inférieure à 1 μm , la loi de Stokes (Eq. 1) en régime laminaire, montre que leur vitesse de décantation est très faible. Si l'on considère (Eq. 1) on obtient, pour une particule de 0.1 μm dans une eau à 20°C ($\eta = 1 \text{ cP}$; $\rho_l = 1$), une vitesse d'environ 2 m.an^{-1} . Cette vitesse est bien trop lente pour l'épuration de grands volumes. La coagulation et la floculation vont permettre d'éliminer beaucoup plus rapidement ces particules.

Coagulation

Les charges de surface des particules vont engendrer une répartition particulière des ions présents dans l'eau. En effet, des charges de signes opposés vont être attirées par les charges de surface. L'accumulation des charges de signes opposés face aux charges de surface des particules forment une première couche dite de "Stern" (Fig. 6). Les ions de cette couche sont liés au colloïde et suivent le mouvement de la particule. Cette couche attire à son tour des contre-ions. Ici, anions et cations sont présents et ne sont pas fixés à la surface. On parle alors de couche diffuse ou couche de "Gouy" (Gouy, 1917). Cette double couche ionique est présente sur tous les colloïdes en solution. Entre ces deux couches se forme un plan de cisaillement. Au niveau de ce plan le potentiel électrostatique, engendré par les charges de surface, est non nul : c'est le potentiel Zêta (ζ). Le début de la couche diffuse est définie par le plan externe de Helmholtz (ψ_δ). Il est classiquement admis que le plan de coupure hydrodynamique au niveau duquel s'établit le potentiel zêta est confondu avec le plan correspondant au début de la couche diffuse. On a

alors la relation $\zeta = \psi_\delta$. Le signe du potentiel au niveau de ce plan est de même signe que les charges de surfaces puisque toutes les charges ne sont pas compensées. Il caractérise donc la charge de surface.

Les exopolymères édifiant la surface du floc vont engendrer des charges par ionisation de groupements carboxyliques et phosphates. Ces groupes fonctionnels vont conférer au colloïde une charge généralement négative. Les valeurs du potentiel zêta peuvent atteindre -35 mV ; Magara *et al.* (1976) obtiennent des valeurs comprises entre -21.15 et -35.25 mV ; Forster (1968) entre -11.68 et -15.51 mV, Higgins et Novak (1997) entre -15.7 et -21 mV ; Nielsen et Kieding (1998) -15 mV et Lee *et al.* (2003) entre -12.9 et -19.5 mV pour des boues activées. Tous les colloïdes étant dans le même état de surface dans une eau donnée, ils vont se repousser grâce au jeu de répulsions électrostatiques. Ces répulsions électrostatiques et l'épaisseur de la double couche vont donc avoir tendance à stabiliser les colloïdes, en empêchant ainsi la formation de floes plus gros plus facilement décantables.

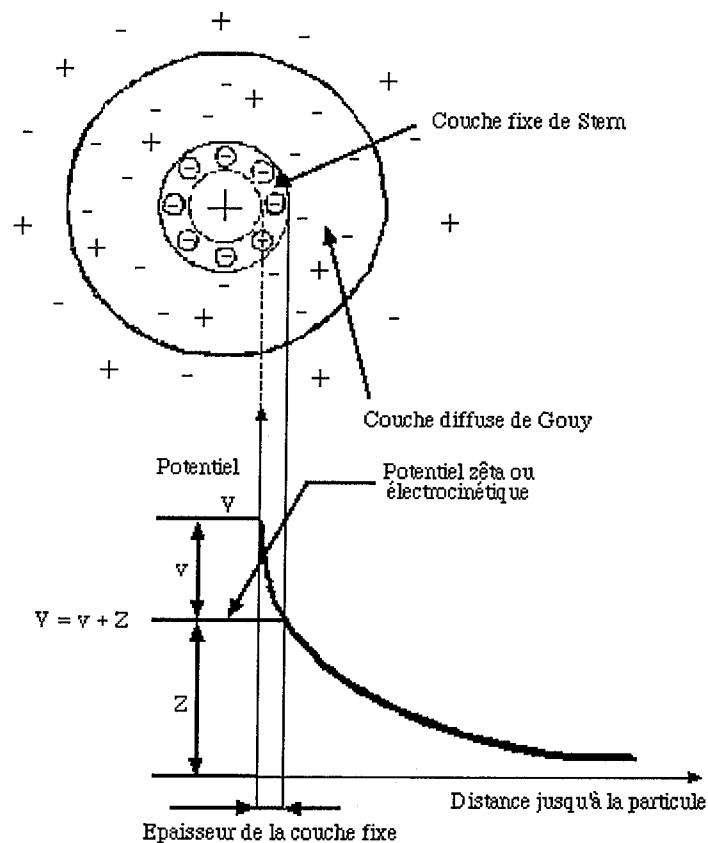


Figure 6 : Distribution ionique autour d'un colloïde. Couche de Stern et couche diffuse ou couche de Gouy d'après Tardat-Henry & Beaudry (1992)

Le rôle du coagulant va donc être de déstabiliser cette suspension. Les particules de la suspension s'agglutineront pour former un floc qu'on pourra facilement éliminer par décantation. Pour cela, il existe plusieurs possibilités :

- Ajustement du pH pour atteindre le point isoélectrique des groupements fonctionnels.
- Augmentation de la salinité pour obtenir une compression de la couche diffuse.
- Neutralisation de la charge par des cations polyvalents ou des polymères.
- Piégeage dans des précipités de type $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou $\text{Fe}(\text{OH})_3$.
- Adsorption par pontage par des polymères chargés et à longue chaîne.

Wiese et Healy (1975) montrent expérimentalement que la coagulation rapide d'une suspension colloïdale est obtenue lorsque la valeur du potentiel zêta des particules est abaissée au-dessous d'un seuil de $|\zeta| \leq 14 \pm 4 \text{ mV}$.

Floculation

La floculation est le mécanisme par lequel des particules en suspension s'agrègent suite à leur déstabilisation.

L'équation de Smoluchowski (1917), Eq. (2) a été à la base de nombreux modèles descriptifs de la floculation. Les principales avancées de cette théorie ont été faites grâce à la prise en compte des interactions à courte distance comme les forces d'origine électrostatique, les forces de Van der Waals (théorie DLVO, Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948), l'existence simultanée d'un phénomène de rupture des floes (Valentas et Admundson, 1966) ou encore des forces hydrodynamiques (description du coefficient cinétique $\beta(i,j)$ par mouvement brownien ou écoulement laminaire (von Smoluchowski en 1917), par sédimentation différentielle et mouvement moléculaire par Friedlander (1977) et diffusion turbulente Saffman et Turner (1956) dont les expressions analytiques sont recensées par Lartiges (1994).

$$\frac{dn_k}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i+j=k} \beta(i,j)n_i n_j - \sum_{i=1}^{\infty} \beta(i,k)n_i n_k \quad (2)$$

La variation du nombre de particules de taille k au cours du temps est égale à la somme de deux termes. Le premier terme de l'équation définit l'augmentation de la taille des particules k par floculation de deux particules dont le volume total vaut celui de k , le second terme décrit la perte de particules de taille k en raison de son agrégation avec d'autres particules de tailles différentes. Lorsque deux particules, telles que i et j , ou un

nombre supérieur de particules sont liées par une macromolécule on peut parler de floculation.

Ces macromolécules, parfois utilisées sous le nom de flocculant, sont capables de s'adsorber aux surfaces par un nombre limité de contacts. La description usuelle des conformations d'une chaîne adsorbée (Lartiges ; 1994) distingue trois sous unités (Fig. 7):

- - les **trains**, qui ont tous leurs segments en contact direct avec la surface ;
- - les **boucles** qui n'ont pas de contact avec la surface et connectent deux trains ;
- - les **queues** qui sont des bouts de chaînes non-adsorbés qui s'étendent plus ou moins dans la solution.

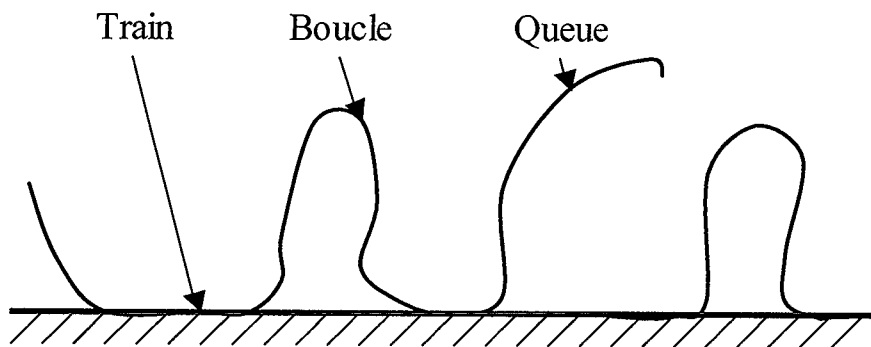


Figure 7 : Définition et schémas des différents segments d'une macromolécule adsorbée à l'interface solide-liquide.

Bien qu'il semble évident que la longueur facilite le pontage interparticulaire, l'efficacité de la floculation dépend en premier lieu de la présence de sites d'adsorption demeurés vacants sur les colloïdes à agréger. A partir d'un certain degré de recouvrement, les chaînes adsorbées sur les deux particules tendent à s'exclure mutuellement de la surface voisine, ce qui diminue fortement la probabilité de pontage. Il est donc possible de mettre en évidence pour ce type de système une concentration optimale du flocculant au-delà de laquelle on observe la restabilisation d'une partie de la suspension (Healy et La Mer, 1962 ; Slater et Kitchener, 1966 ; Lartigue, 1994).

1.3.1 Floccs de boues activées et leurs modèles

Une simple inspection microscopique (Fig. 8) montre que les floccs de boues activées, résultant de l'agrégation selon un processus d'organisation complexe, sont formés d'un matériel hétérogène tel que bactéries, matières minérales (silicates, carbonates de calcium, phosphates et oxydes de fer) et d'une matière mucilagineuse (Andreadakis, 1993). Selon de nombreuses études, il existe des interactions physico-chimiques entre ces composants

du floc et les cations multivalents. (Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1995 ; Keiding et Nielsen, 1997 ; Nielsen et Keiding, 1998).

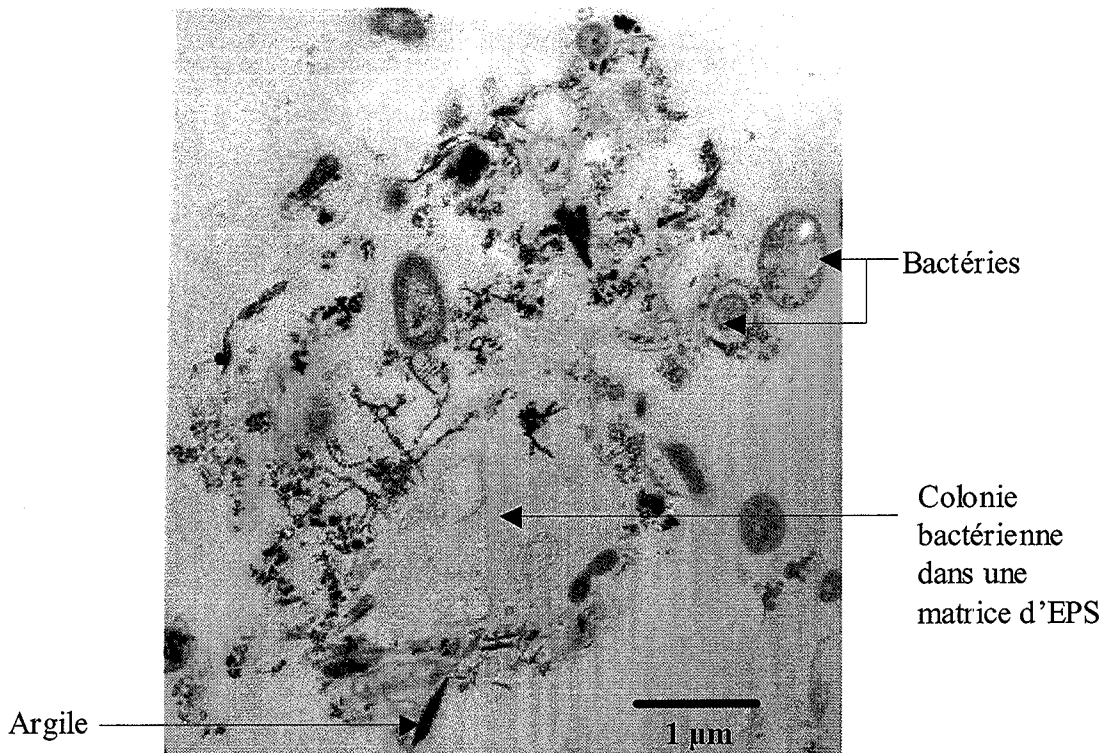


Figure 8 : Photo légendée d'une coupe ultrafine d'un floc de boues activées (MEB \times 16000)

La stabilité, la structure et la morphologie des floes dépendent des forces liant les différents composants du floc ensemble dans une matrice tridimensionnelle. La cinétique d'agrégation, la dispersion et la décantation découleront de la relation entre ces divers composants. Pour décrire l'organisation de ces composants, la théorie fractale est souvent utilisée : Zartarian *et al.*, (1997) précisent que les contours (2 dimensions) du floc ont une dimension fractale de 1.3. Afin d'en décrire la morphologie en 3 dimensions Zartarian *et al.*, (1997) ont modélisé un floc de boue activée. Cette modélisation nécessite de piéger un floc dans une résine époxy (Zartarian *et al.*, 1994 et 1997). Le floc est reconstitué grâce à la numérisation des plans de coupes ultraminces successives et à leur interpolation afin d'obtenir un volume cohérent grâce au logiciel GOCAD. Cette représentation a permis de visualiser la complexité de la surface, ces nombreuses excroissances et ces pores. Ces pores forment des canaux permettant la circulation de l'eau au sein du floc. la dimension fractale permet de caractériser la rugosité de cette surface et d'améliorer la compréhension de la genèse et de la structure d'un floc (Fig. 9). Les surfaces décrites ont une dimension fractale de 2.4.

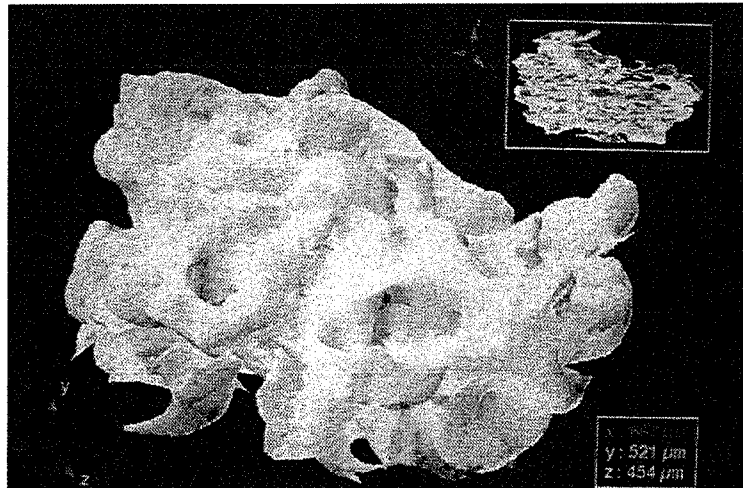


Figure 9 : Reconstitution numérique en 3D d'un floc à partir d'images de microscopie confocale de plans parallèles dans ce floc (Zartarian, 1997)

L'agrégation des boues activées est un procédé actif car les cellules sont initialement dispersées (Urbain *et al.*, 1993). Les expressions souvent utilisées pour décrire les flocs (surface du floc, noyau du floc, région centrale et externe du floc) suggèrent des réarrangements partiels du floc. Chaignon *et al.* (2002) ont mis en évidence que la taille des flocs est régie par un équilibre entre floculation et défloculation et que cet équilibre implique des échanges entre les agrégats microbiens constituant les flocs de boues. Cette interprétation confirme celle de Mikkelsen et Keiding (1999) : la structure des flocs est dynamique.

Keiding et Nielsen (1997) présumant qu'un floc typique a une taille de 80 à 120 μm . Li et Ganczarczyk (1991) montrent que la fraction qui constitue la majeure partie du volume des boues activées est celle supérieure à 10 μm même si les flocs de diamètres inférieurs sont plus nombreux. Snidaro *et al.* (1997) utilisent une loi log-normale pour décrire la distribution de la taille des particules de boues. Ils précisent que la distribution est asymétrique et décalée vers les plus faibles valeurs de tailles de flocs (diamètre moyen représentatif : 125 μm). Après 30 secondes de sonication à 50 W, les flocs sont dispersés et les classes de tailles dominantes deviennent alors 13 μm et 2,5 μm Jorand *et al.* (1995).

Une partie de la structure des flocs est due aux interactions spécifiques entre des biopolymères impliquant souvent des interactions protéines/polysaccharides, hydrophobes, hydrogènes, ioniques, *etc.* D'une façon générale tous les modèles de flocs décrits dans la littérature ont une base commune de structure incluant des EPS chargés

négativement, des cations multivalents et la présence de particules inorganiques généralement des phases minérales (argiles, carbonates).

On trouve dans tous les modèles une structure générale, incluant les cellules et les exopolymères chargés négativement, des cations multivalents, ainsi que des particules inorganiques (Urbain *et al.*, 1993) où les exopolymères jouent un rôle primordial (Decho, 1990 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Frølund *et al.* 1996). Cette conception est schématisée sur la figure suivante (Fig. 10).

Decho (1990) conçoit la structure des floccs comme une matrice de polymères bactériens dans lesquels se développent des colonies bactériennes. Ces polymères qui entourent les bactéries sont dit capsulaires (Fig. 10a).

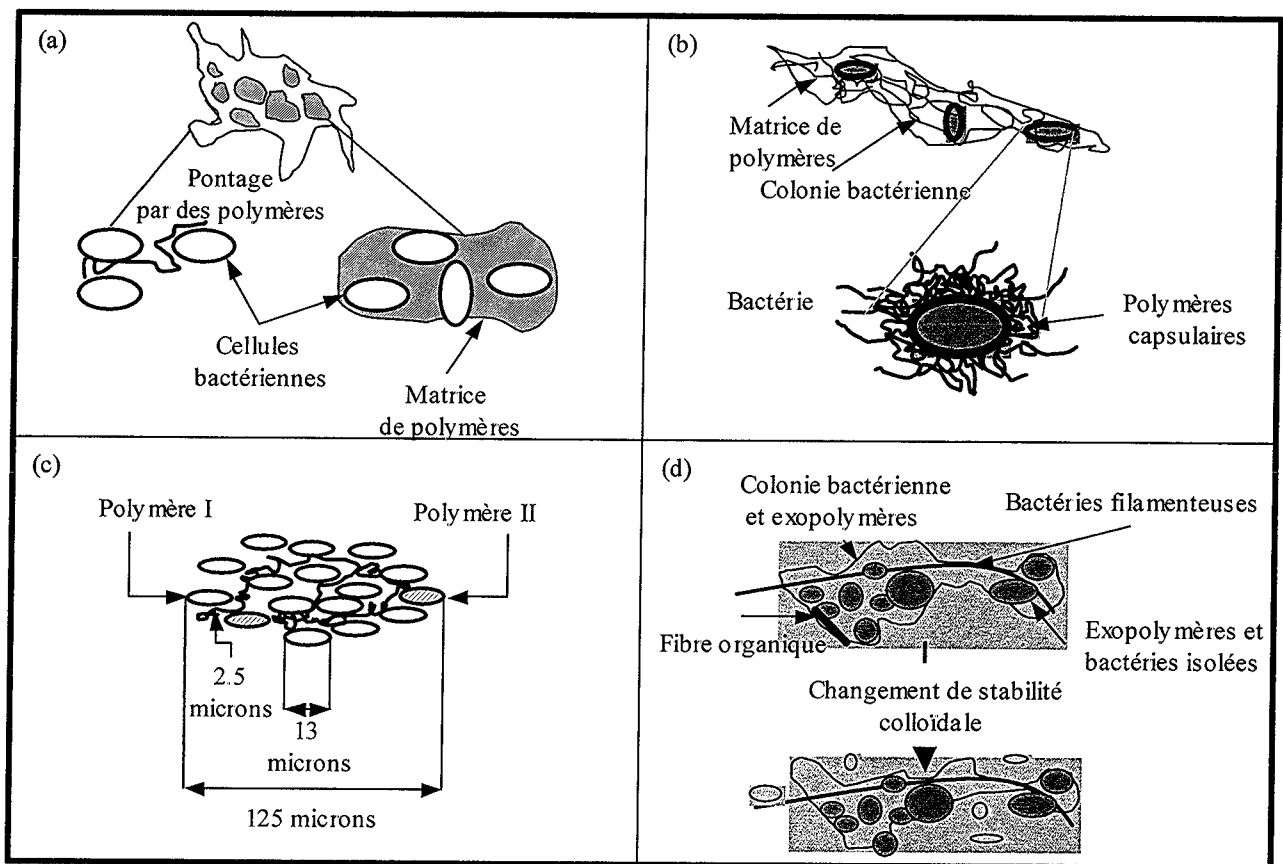


Figure 10 : Représentation schématique d'un flocc de boue activée selon (a) Decho (1990), (b) Eriksson *et al.* (1992), (c) Jorand *et al.* (1995) et (d) Kieding et Nielsen (1997).

Eriksson *et al.* (1992) (Fig. 10b) pensent que la différenciation du flocc est fonction de l'âge des boues et de la teneur en matière organique. Ils supposent aussi que les bactéries se situent dans un environnement d'EPS abondant à l'intérieur des floccs, alors qu'elles sont connectées entre elles par quelques ponts d'EPS vers l'extérieur du flocc.

Jorand *et al.* (1995) (Fig. 10c) suggèrent une structure à trois niveaux : des particules primaires de 2.5 μm , des particules secondaires de taille de 13 μm , formant elles-mêmes une structure tertiaire de 125 μm . Les particules de 13 μm et celles de 2.5 μm isolées sont liées entre elles par des exopolymères de type I et des polymères de type II lient les microorganismes dans les particules de 2.5 μm et de 13 μm .

Higgins et Novak (1997) proposent un modèle où interviennent des lectines. Ces lectines sont des protéines non enzymatiques qui lient les résidus de sucres et jouent un rôle dans l'attachement et la colonisation des bactéries chez les animaux et les plantes. Elles sont synthétisées par une grande variété de virus, plantes et microorganismes. Les lectines relient les polysaccharides qui sont également liés aux protéines adjacentes. Des cations divalents forment des ponts entre les sites de charges négatives des EPS. Ces deux types de pontage stabilisent le réseau de biopolymères. Les cations divalents peuvent également être impliqués dans l'activité des lectines.

Keiding et Nielsen (1997) (Fig. 10d) suggèrent qu'un équilibre, entre colloïdes associés aux floccs et colloïdes en suspension, soit activé lors de modifications physico-chimiques (par exemple l'augmentation de la concentration en ions monovalents). Dans ce cas, l'association, entre les colonies bactériennes et les structures fibreuses, reste intacte alors que les bactéries libres et les exopolymères se dispersent autour des floccs. Ils ont ainsi mis en évidence que certains EPS sont fortement liés et jouent un rôle important dans la stabilité colloïdale du flocc.

Cependant, il n'y a pas de technique unique permettant une bonne description de la structure complexe des floccs. L'une des difficultés est d'analyser la nature chimique des constituants exopolymériques (Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1995). Cependant l'efficacité de la décantation et donc de la qualité de la séparation solide/liquide dépend directement de la taille, la densité et la structure des floccs. Cette relation taille, densité, structure et nature des composants du flocc est donc essentielle pour optimiser la séparation biphasique solide/liquide lors de la décantation dans le clarificateur.

1.3.2 Différents composants du flocc

1.3.2.1 Microorganismes des boues activées

Wanner (1994), a montré que les microorganismes de boues activées peuvent se diviser en deux groupes microbiologiques majeurs :

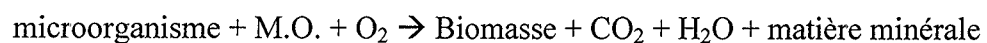
- Les décomposeurs responsables de la dégradation biochimique des substances polluantes des eaux usées.
- Les prédateurs qui utilisent les bactéries et les autres cellules microbiennes comme substrat. Ce groupe forme la microfaune (protozoaire, métazoaire) de la boue activée.

Environ 95% des populations microbiologiques des boues activées sont composées de décomposeurs et plus spécifiquement de bactéries, reléguant ainsi à un rôle marginal la microfaune dans l'épuration biologique.

1.3.2.1.1 Bactéries épuratrices : les décomposeurs

Les populations microbiennes complexes sont donc directement responsables de l'efficacité du processus de traitement des eaux usées (élimination de la matière organique, de l'azote et du phosphore) (Madoni et Davoli, 2000) ainsi que de la bonne qualité de la séparation solide/liquide pendant la phase de clarification. Leur nombre varie selon la méthode expérimentale de mesure entre 2 et $12 \cdot 10^{12} \text{ L}^{-1}$ (Urbain *et al.*, 1993).

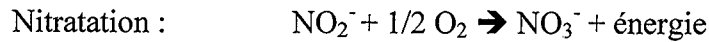
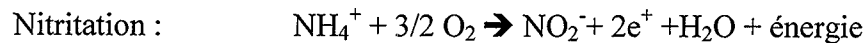
L'essentiel de l'épuration est due à des bactéries Gram négatif, mobiles, parmi lesquelles : *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacter*, *Alcaligenes* (Boëglin, 1998). Les microorganismes dégradent la matière polluante, soit en l'adsorbant et en la transformant en matière cellulaire pour assurer leur croissance, soit en l'oxydant en CO_2 et H_2O ce qui produit l'énergie nécessaire pour la fabrication et le fonctionnement de nouveaux matériaux cellulaires.



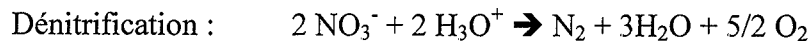
Ce procédé, permet, si la floculation et la décantation s'effectuent correctement, d'éliminer environ 90% de la charge organique. Cependant, des problèmes dus aux bactéries filamenteuses comme le moussage (= écume), peuvent intervenir et diminuer la qualité des eaux rejetées en rivière.

Certains systèmes utilisent les capacités de nitrification de certaines bactéries. Deux types de bactéries sont responsables de la conversion de l'ammonium en nitrate dans les boues activées : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* pour l'oxydation de l'ammoniaque et *Nitrobacter* et *Nitrococcus* pour l'oxydation des nitrites en nitrates (Wanner, 1994 ; Cardot, 1999). La réaction de nitrification n'est possible que grâce à l'activité de deux enzymes (ammonium mono-oxygénase et l'hydroxylamine oxydase) et comporte le composé hydroxylamine comme intermédiaire. L'enzyme impliquée dans le système d'oxydation du nitrite est la nitrite oxydoréductase (Féray, 2000).

La nitrification se décompose en deux étapes pendant lesquelles de l'énergie est dégagée. Ce dégagement de chaleur est utilisé pour resynthétiser de l'ATP.



La dénitrification a lieu lors d'un stress anoxique. L'ion NO_3^- est alors utilisé en tant qu'accepteur d'électrons. Cette réaction produit des oxydes nitriques et nitreux ainsi que du diazote lorsque la dénitrification est complète. L'équation globale de la dénitrification s'écrit :



Cette dénitrification complète nécessite l'intervention de quatre enzymes (nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrite réductase, oxyde nitreux réductase) adaptées à la réduction du réactif ou de chaque produit intermédiaire (Cardot, 1999).

Ces deux étapes (nitrification/dénitrification) nécessitent des conditions optimales antagonistes. Il faut donc mettre en place dans le circuit d'épuration des zones aérées et d'autres anoxiques.

1.3.2.1.2 Microfaune : les prédateurs

Parmi la microfaune, on peut citer : les protozoaires et les métazoaires. Les protozoaires, par leur activité bactériophage peuvent avoir un impact positif sur les boues. Les métazoaires peuvent être de bons indicateurs de boues activées très stables.

Les protozoaires

La microfaune est représentée surtout par des protozoaires, organismes prédateurs de taille comprise entre 20 et 200 μm . Les protozoaires peuvent être divisés en quatre groupes : ciliés, flagellés, amibes et héliozoa (Higgins et Novak, 1997). Les espèces de protozoaires ciliés recensés par Curds et Cockburn en 1970 dans des installations de types "boues activées" sont au nombre de 67 espèces appartenant aux genres *Aspidisca* (Fig. 11), *Carchesium*, *Chilodonella*, *Opercularia*, *Trachelophyllum*, *Vorticella*, etc. La plupart des protozoaires des boues activées semblent présenter une certaine spécificité et ne se nourrissent que de bactéries libres, c'est-à-dire non flocculées, en suspension ou à la surface du floc. De ce fait, ils peuvent jouer un rôle important dans la clarification des effluents (Boëglin, 1998) et dans la réduction du volume de boue. Ils sont également un bon indicateur de décantation : Curds et Cockburn en 1970 ont constaté que les

installations à boues activées qui délivraient des effluents de haute qualité, contenaient une grande variété de protozoaires ciliés en grand nombre alors que les installations qui donnaient des effluents de qualité inférieure et troublés, ne contenaient pas des protozoaires ciliés ou contenaient seulement quelques espèces et en petit nombre (Higgins et Novak, 1997).

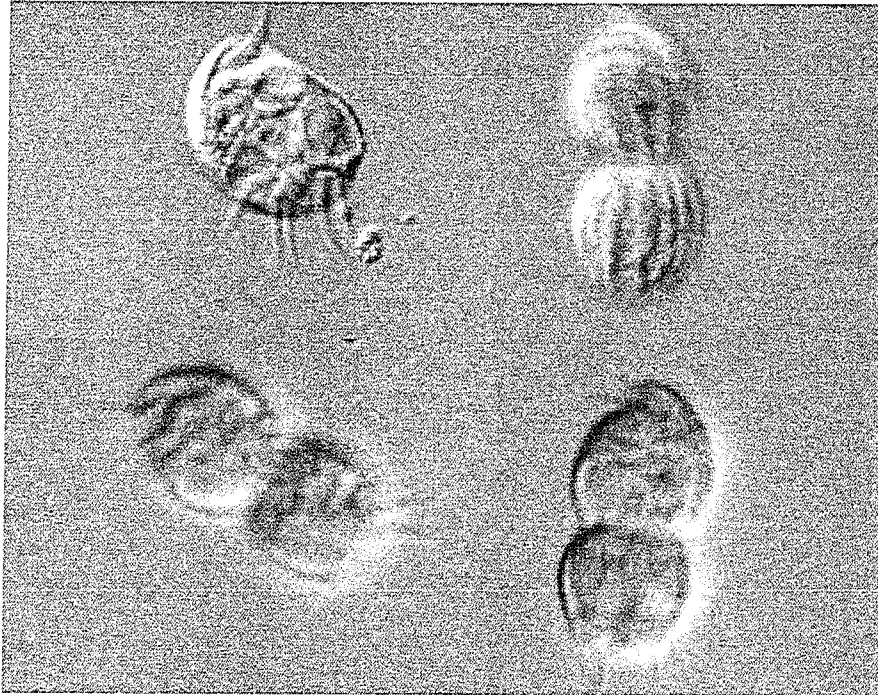


Figure 11 : Photo de *Apidisca cicada*¹⁶ cette espèce peut avoir une longueur de 45 μm .

Les métazoaires

Les métazoaires, de taille supérieure (100 à 150 μm) sont peu représentés ; ce sont surtout des rotifères (Fig. 12), parfois des nématodes et des vers oligochètes. (Boëglin, 1998). Comme les protozoaires, les métazoaires sont strictement aérobies et sont plus sensibles aux conditions toxiques de leur environnement que les bactéries. Les rotifères ne se trouvent que dans les systèmes à boues activées très stables.

¹⁶ <http://130.158.208.53/WWW/PDB/Images/Ciliophora/Aspidisca/cicada3.html>

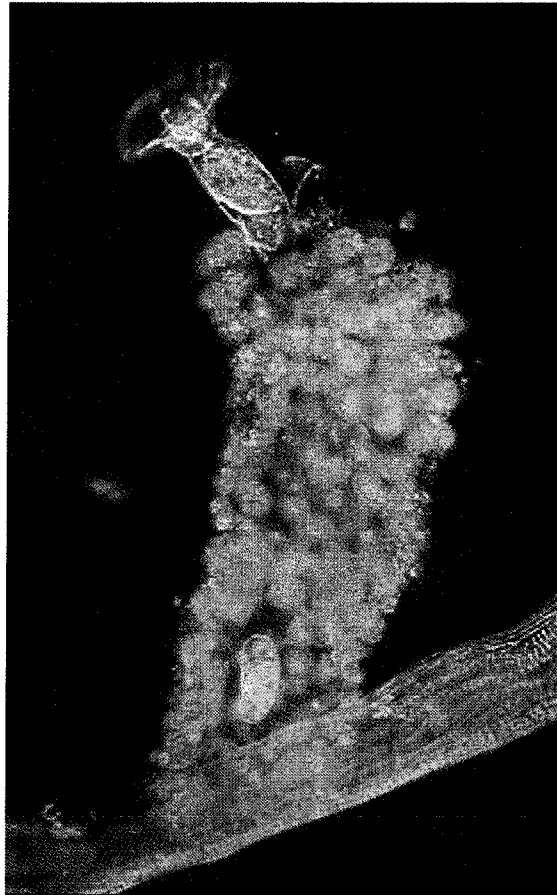


Figure 12 : Photo de *Ptygura*¹⁷. Ce métazoaire construit un tube avec ces propres excréments. Il est localisé au sommet de ce tube.

1.3.2.1.3 Autres microorganismes : bactéries filamenteuses et engainées

Leur influence va dépendre de leur nombre au sein du floc. En effet, la prolifération de bactéries filamenteuses provoque la formation d'une écume stable à la surface du bassin pouvant, si elle persiste, être à l'origine d'une véritable couche de mousse. Ce phénomène, appelé "foaming", est souvent dû à l'emprisonnement de bulles de gaz et de floc dans le réseau et dans les ramifications, formés par ces microorganismes (Madoni et Davoli, 2000) dont *Sphaerotilus natans* (Fig. 13), *Nocardia* Sp. ou *Microthrix parvicella* (Fig. 14-15). Kämpfer (1997) recense 26 types de bactéries filamenteuses classées en 7 groupes. Ces bactéries se développent souvent dans les milieux déséquilibrés en azote et riches en éléments facilement assimilables (cas des rejets de laiteries, de sucreries) (Boëglin, 1998). Cependant, les travaux de Pernelle (2000) ont montré que l'entrée massive de nutriments facilement assimilables ne peut suffire à induire le phénomène de bulking. Il en va de

même lors d'une déficience en oxygène dissous seule. Mais la combinaison de ces deux facteurs peut faciliter sa manifestation. Toutefois la chloration est un moyen efficace pour réduire cette prolifération. Lorsqu'elles sont en faible quantité, ces bactéries filamenteuses peuvent pourtant participer à la formation et à la stabilité des floes en servant de squelette aux microcolonies présentes (Parker *et al.*, 1972 ; Cenens *et al.*, 2000).

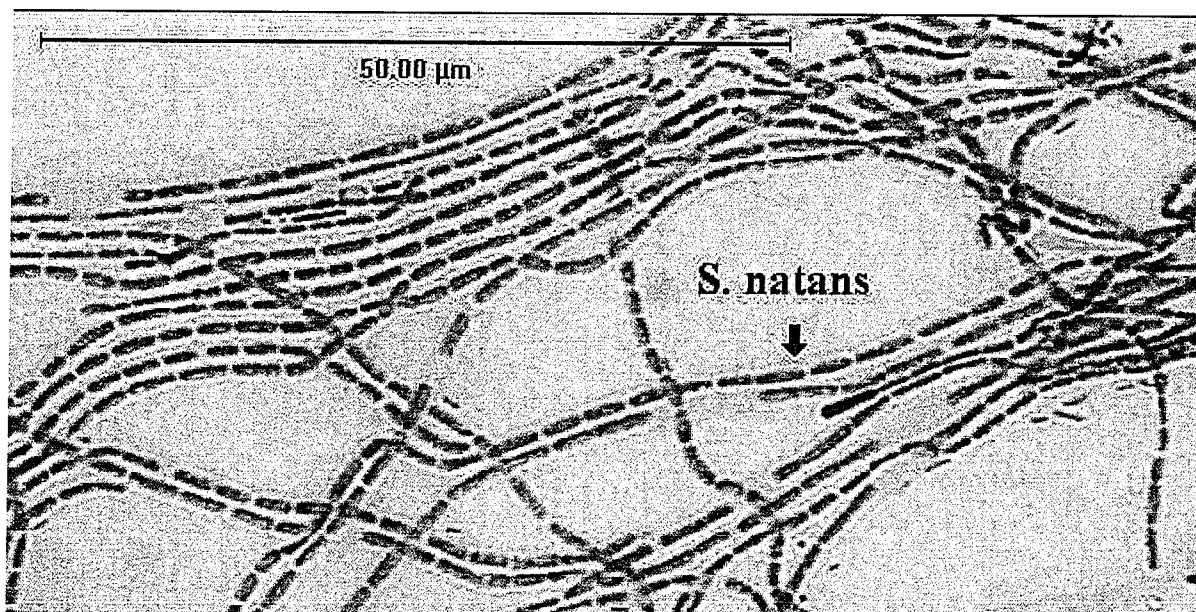


Figure 13 : Photo¹⁸ de *Sphaerotilus natans* dont les filaments peuvent atteindre 100 à 1000 µm.

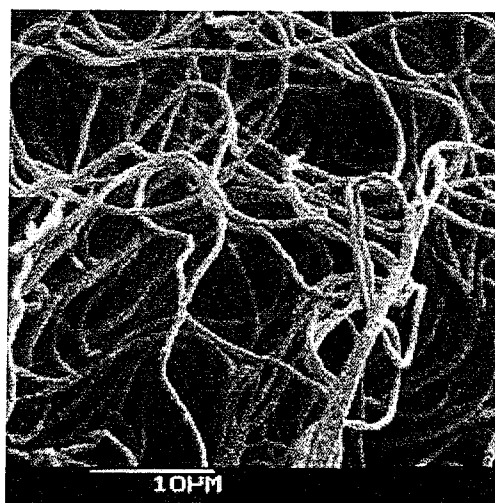


Figure 14 : Photo de microscopie électronique à balayage de *Microthrix parvicella*.

¹⁷ <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/wimsmall/extra/rotif10.html>

¹⁸ http://www.environmentallevage.com/sphaerotilus_natans.htm



Figure 15 : Mousse engendrée par *Microthrix parvicella* dans un bassin d'aération.

1.3.2.2 Les exopolymères, leurs rôles et leurs natures chimiques.

Dans cette matrice biocomplexe du floc bactérien l'activité microbienne va générer des sous-produits réunis sous le vocable d'EPS. Par définition, les EPS sont localisés sur ou au-delà de la surface de la cellule (Wingender *et al.*, 1999 ; Laspidou et Rittmann, 2002)

Leur localisation et leur composition peuvent être le résultat de divers processus : sécrétion active, éléments de la surface cellulaire, lyse cellulaire et sorption de matière provenant du milieu (Wingender *et al.*, 1999). Certains sont dans le cytoplasme cellulaire où ils sont utilisés comme source d'énergie et sont libérés lors de la lyse de cellules. La paroi cellulaire contient également des polymères dont les peptidoglycannes et les acides techoïques. Les microorganismes peuvent également excréter des polymères libres ou fixés sur la surface de cellule. Comme l'indique Urbain (1992) ces macromolécules en contact avec l'eau sont principalement de nature saccharidique (lipopolysaccharides) et protéique. La majorité des groupements ionisables sont des fonctions carboxyliques $2.7 < pK_a < 6.4$ qui engendrent *a fortiori* une charge de surface des floccs négative au pH des boues qui est généralement voisin de 7.

1.3.2.2.1 Rôle des exopolymères

L'un des rôles souvent attribué aux exopolymères est celui de barrière de protection contre les agressions extérieures (phagocytose, anticorps, radicaux libres, désinfectant, antibiotique, action délétère de l'oxygène, *etc.*) et contre la déshydratation en cas de stress hydrique. Les EPS sont également le lieu d'interactions entre les enzymes libérées par les cellules et les nutriments adsorbés ou stockés dans cette matrice mucilagineuse. Enfin la détoxification par la sorption de matières organiques xénobiotiques et /ou d'ions métalliques toxiques est l'une des fonctions possibles des EPS (Wilkinson, 1958 ; Wingender *et al.*, 1999). Toutes ces fonctions ont pour but de les maintenir en vie dans leur milieu.

Ces exopolymères ont également en commun de favoriser d'une manière ou d'une autre l'adhésion au substratum. Selon Dubeau et Sanssouci (2002), la formation de microcolonies se fait généralement en quatre étapes :

1. L'adsorption initiale et réversible au substratum (pouvant être une autre bactérie) par les interactions engendrées par les EPS.
2. Multiplication des cellules dans la matrice exopolymérique.
3. Formation de microcolonies.
4. Recrutement de nouveaux types de bactériens provenant du liquide.

Cependant, le rôle des exopolymères ne se limite pas à l'adhésion sur des surfaces, au recrutement de nouvelles bactéries et de particules inorganiques pour la formation de floccs ou de biofilms. Ils servent également à la reconnaissance cellule/cellule permettant la réalisation de symbioses ou à l'initiation des processus pathogéniques (Wingender *et al.*, 1999).

Parmi les différents EPS, on peut en distinguer un certain nombre qui possèdent des fonctions particulières au sein de la boue : le glycocalix, la capsule, la *fimbriae* ou *pilus* et les exopolymères libres.

Le glycocalix

Le glycocalix est un enrobage d'exopolymères peu organisés de la surface des bactéries formant une couche peu organisée de 10 à 100 nanomètres d'épaisseur entourant la bactérie et reposant sur la membrane lipidique. Chez certaines espèces bactériennes, des quantités importantes de glycocalix sont synthétisées (*Pseudomonas aeruginosa* ; *Streptococcus mutans*) et engluent les cellules bactériennes. Le glycocalix est alors appelé « slime ». La production de glycocalix favorise l'adhésion de la bactérie. Celui produit par

S. mutans est responsable de la formation de la plaque dentaire, indirectement responsable des caries.

La capsule

La capsule est une structure extérieure non constante qui peut entourer une ou plusieurs bactéries. Sa constitution est le plus souvent polysaccharidique, parfois protéique. Elle n'est pas colorable par les techniques bactériologiques. Pour la mettre en évidence au microscope, on réalise une suspension des bactéries dans une goutte d'encre de Chine recouverte d'une lamelle : on observe la capsule sous forme d'un halo clair et réfringent (Fig. 16). La capsule joue un rôle important dans la défense des bactéries, d'abord contre la dessiccation, mais aussi contre les prédateurs (protozoaires) ou les parasites (les bactériophages sont incapables de se fixer sur une bactérie capsulée). La capsule évite aux bactéries d'être phagocytées (Fig. 17) ainsi ces bactéries vont plus facilement pouvoir exercer leur pouvoir pathogène. De plus, la capsule est un facteur d'adhésion important et contient de nombreux antigènes.

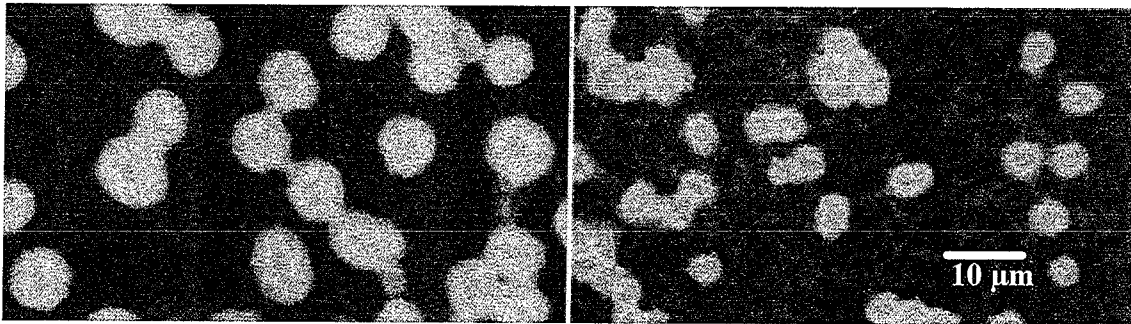


Figure 16 : Photos de capsules de souches de *Klebsiella aerogenes* observées au microscope optique ($\times 1000$) et agrandies 3 fois. Photo de gauche : grosse capsule ; photo de droite : capsule fine (d'après Wilkinson, 1958).



Figure 17 : Photo MEB ($\times 75000$) coupe d'un floc inclus en résine montrant une capsule protégeant 3 bactéries.

Pili ou Fimbriae

Certaines structures sont plus grosses, protéiques, fibrillaires et rigides (*fimbriae* ou pili) qui permettent l'attachement spécifique des bactéries sur les cellules, phase essentielle dans certains pouvoirs pathogènes (*Escherichia coli* responsable de certaines infections urinaires (Choudhury *et al.*, 1999)).

Exopolymères libres :

Ce sont des polymères solubles (Nielsen et Jahn, 1999). Dans le milieu naturel et les bioréacteurs, ils servent aussi de médiateur dans l'attachement des bactéries sur le substratum, qui peut être d'autres agrégats bactériens, mais aussi de la matière organique et inorganique.

1.3.2.2 Nature chimique des principaux exopolymères

Les EPS dont l'origine provient du métabolisme bactérien, sont essentiellement des protéines, des polysaccharides et lipides que nous allons définir dans ce paragraphe. Ce sont souvent des polymères très purs qui peuvent interagir entre eux formant aussi des complexes organo-organiques qui joueront un rôle important dans les formations de la structure des gels. Ils peuvent également, une fois purifiés, trouver des applications industrielles ou agronomiques.

Les polysaccharides et protéines possèdent des atomes électronégatifs engagés dans des fonctionnalités amines, alcools ou acides (de type $R-NH_2$ lorsqu'il s'agit de liaisons peptidiques, $R-OH$ fonction alcool et $R-COOH$ fonction carboxylique). Ces molécules sont capables de se lier grâce à la réactivité propre de ces fonctions chimiques aux autres

molécules. L'électronégativité des atomes d'azote et d'oxygène va permettre la création de charges partielles autour de certains atomes. Une partie des groupements acides et amines peuvent s'ioniser, formant COO^- et NH_3^+ et permettant ainsi des liaisons ioniques. Ces molécules peuvent également se lier à l'eau ou entre elles par des ponts hydrogènes. Les fonctions chimiques vont conditionner les réactivités vis-à-vis des autres molécules : des liaisons covalentes, ioniques ou forces de van der Waals pourront alors intervenir. L'énergie déployée lors des liaisons covalentes est de 10 fois supérieure aux forces de van der Waals qui résultent de légères variations des charges électriques.

Les polysaccharides

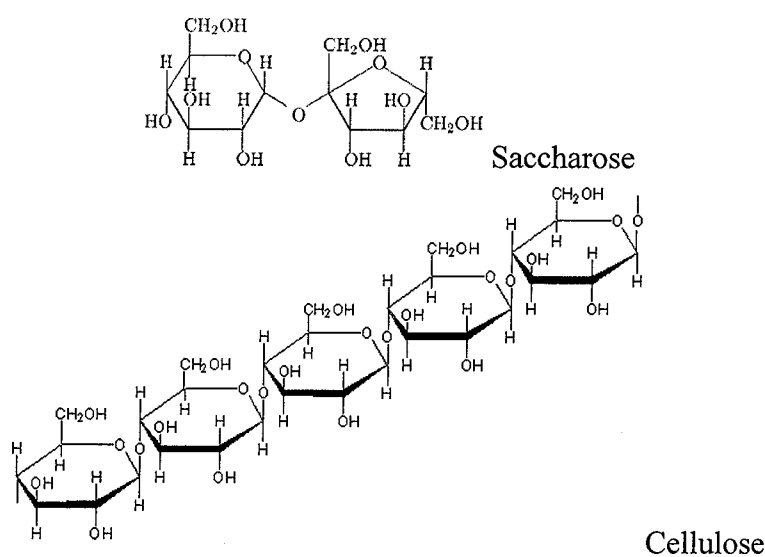


Figure 18 : Formules chimiques d'un monosaccharide : le saccharose et d'un polysaccharide : la cellulose.

Les glucides (dont les polysaccharides font partie) sont des aldéhydes ou des cétones polyhydroxylés (Gallien, 1976). On les classe en oses qui sont des glucides simples de trois à sept atomes de carbone eux même subdivisés en aldoses ou en cétooses suivant la position du groupe carbonyle. Les osides sont des glucides complexes où la fonction carbonyle est liée avec un autre composé. On les nomme alors holosides lorsque le composé lié est un autre ose et hétérosides lorsqu'il ne s'agit pas d'un ose (alcool, phénol, bases de nucléosides, thiol, lipide, etc.). Les oses dérivés rassemblent les désoxyoses, les osamines, les acides uroniques, les oses acides complexes et les glycanes. Enfin, les esters d'oses regroupent les esters d'oses phosphoriques simples, les esters d'oses nucléosides-diphosphates, les esters d'oses sulfuriques, et les pectines (Alais et Linden,

1997). La figure 18 montre un exemple de deux oses : un disaccharide (le saccharose) et un polysaccharide (la cellulose).

Les microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être localisés dans la cellule : dans le cytoplasme où ils sont utilisés par les bactéries comme source d'énergie (Wilkinson, 1958), dans la paroi tels que les peptidoglycannes et les exopolymères situés hors de la cellule. Certains auteurs comme Kenne et Linderberg (1983) classent les polysaccharides en deux groupes, les spécifiques et les non-spécifiques aux bactéries. Les glucides spécifiques aux bactéries individuelles peuvent être, le galactose, l'acide galacturonique, l'acide glucuronique sous forme d'oligoholoside qui forment des polymères par l'intermédiaire de liaisons osidiques et sucres-lipides. Les non-spécifiques sont généralement beaucoup plus simples dans leur composition que les précédents. Ce sont en général des homoglycannes. Le dextrane composé de résidus de glycannes liés en α 1-6 en est un bon exemple (Characklis, 1990).

Les protéines

Les protéines sont des polymères d'acides aminés que l'on trouve en grande quantité dans les cellules (moitié du poids sec des cellules). Ces macromolécules font partie des protides, c'est à dire des substances azotées. Deux acides aminés de formule générale $RCH(COOH)NH_2$ peuvent se lier par une liaison peptidique (HN-CO) (Alais et Linden, 1997). Ils prennent alors le nom de résidus puisqu'ils ont chacun perdu H et OH lors de cette liaison covalente. Lorsque la chaîne est assez longue, elle se replie en une structure tridimensionnelle stable. Les interactions qui stabilisent la structure tridimensionnelle des protéines sont principalement des interactions plus ou moins faibles, non covalentes : liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, électrostatiques et de van der Waals. Ces interactions sont dites faibles mais peuvent être très nombreuses dans une protéine. Des liaisons covalentes peuvent également apparaître entre deux chaînes latérales de cystéines lors de l'oxydation de leur groupement SH pour former un pont disulfure S-S (Gallien, 1976). Les protéines étant composées d'acides aminés dont certains comportent des zones hydrophobes (groupes phénoliques), des réarrangements vont être induits par la présence d'eau. Ces groupes vont avoir tendance à se regrouper formant ainsi une zone hydrophobe au centre de la protéine.

Lorsque les protéines sont uniquement constituées d'acides aminés, on parle d'holoprotéines. *A contrario*, on parle d'hétéroprotéines pour les protéines complexes, dont l'hydrolyse produit des acides aminés et des substances non protidiques (Gallien,

1976). On les divise en glycoprotéines (mucine), lipoprotéines, nucléoprotéines, chromoprotéines (hémoglobine) et phosphoprotéines (caséine).

Les lipides

Les lipides sont des substances qui contiennent en leur sein des acides gras de formule $(CH_3-(CH_2)_n-COOH)$ lorsqu'ils sont saturés (Gallien, 1976). Ils sont constitués de chaînes aliphatiques, saturée ou non, de 4 à 40 atomes de carbones. En se dégradant, les lipides, libèrent une grande quantité d'énergie, en partie nécessaire pour le développement des bactéries et sont l'un des constituants des cellules. A ce titre, ils seront présents dans le milieu.

Ces composés sont caractérisés par leur solubilité nulle ou faible dans l'eau et leur bonne solubilité dans les solvants organiques non polaires. Un lipide est un composé totalement apolaire (lipide neutre) ou bipolaire ; il forme alors une molécule amphiphile avec une tête polaire et une queue fortement polaire. Les lipides vrais que l'on peut définir comme étant la condensation d'un acide gras avec des alcools par une liaison ester ou amide sont dits simples lorsque les alcools mis en jeu sont le glycérol (glycérolipides), les cérides (alcools à longues chaînes), les lipides complexes qui contiennent également du phosphore, de l'azote, du soufre et des oses et enfin les stéroles (stéroïdes) qui font partie des molécules liposolubles.

Association organo-organique.

Des interactions inter et extra-moléculaires sont possibles pour ces polymères. Elles peuvent avoir lieu, par exemple, entre des protéines et des polysaccharides, entre des chaînes de même nature (polysaccharides, protéines) par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, entre ces chaînes et des cations (formation de gel), *etc.*

Les protéines qui interagissent avec les polysaccharides biologiques sont de trois types différents : celles qui dégradent les polysaccharides (glycosidases), celles qui les synthétisent (glycosyltransférases) et celles qui les reconnaissent sans les transformer (lectines). Les interactions qu'établissent ces dernières avec les glucides sont caractérisées par leur haute affinité et leur réversibilité (Casset *et al.* 1997). Les lectines vont donc jouer un rôle essentiel dans l'adhésion (pouvoir pathogène d'*Escherichia coli*) (Choudhury *et al.*, 1999). Outre les liaisons hydrogène, les effets stéréoelectroniques spécifiques aux glucides et les interactions hydrophiles/hydrophobes, certains des sites de reconnaissance moléculaire des lectines impliquent un cation (les lectines animales à mannose), deux cations (les lectines de légumineuses) ou aucun cation (les galectines) (Casset *et al.* 1997).

En ce qui concerne les interactions entre chaînes de même nature, une très petite quantité de chaînes osidiques ou peptidiques peut aboutir à la formation d'un gel. Ainsi, un gel d'agar stable et capable de garder une forme définie peut contenir 99.9% d'eau. Les interactions de ces chaînes peuvent former différents types de gels par des ponts hydrogènes et des liaisons ioniques. La formation des gels dépend de la concentration du polymère et de la température, du pH, *etc.* (Alais et Linden, 1997). Certains ions ont également un rôle déterminant dans l'établissement des liaisons intercaténares. C'est le cas du calcium, du magnésium ou des métaux lourds qui par chélation permet l'association des séquences de polyuronates de l'alginate ou des pectines (Alais et Linden, 1997).

Outre l'ionisation de certains groupements chimiques comme COO^- , un des effets les plus importants est induit par des atomes ou des groupements voisins plus ou moins électronégatifs. Un atome très électronégatif (comme peut l'être l'oxygène ou l'azote) c'est-à-dire très avide d'électrons va réduire la densité électronique de l'atome voisin créant une charge partielle positive sur celui-ci et une charge partielle négative sur l'atome où il y a excès d'électron. Ainsi, des liaisons peuvent se renforcer ou s'affaiblir, des sites atomiques peuvent prendre un caractère plus ou moins excédentaire ou déficitaire en électrons suivant l'environnement dans lequel ils se trouvent, à l'intérieur de la molécule. Les sites excédentaires en électrons sont susceptibles de réagir avec des réactifs électrophiles et les sites déficitaires en électrons sont susceptibles de réagir avec des réactifs nucléophiles.

1.3.2.3 Intérêt économique des exopolymères et autres hydrocolloïdes

Ces polymères d'origine bactérienne ont parfois un intérêt économique conséquent. Ces exopolymères sont souvent des produits uniformes et très purs. Le xanthane (*Xanthomonas*), le dextrane (*Leuconostoc*), le curdlane (*Agrobacterium* et *Rhizobium*), le gellane (*Sphigomonas paucimobilis*), le pullulane (*Aureobasidium pullulans*) sont des substances utilisées pour leur pouvoir stabilisant, épaississant, gélifiant, *etc.* D'autres exopolymères comme la cellulose bactérienne (*Acetobacter xylinum*) sont utilisés pour fabriquer des membranes acoustiques de grande rigidité. Les pectines des parois végétales, les gommes végétales (gomme arabique, karaya, tragacathe, guar, caroube), des extraits d'algues marines (alginates, laminaranes, fucoïdanes, carraghénanes, agar-agar), les amylicés (amidon, dextrines), des dérivés chimiques de la cellulose ainsi que des produits d'origine animale : la gélatine (collagène dégradé), la caséine, les glycoaminoglycannes et la chitine peuvent également être employés (Curds et Cockburn, 1970). On regroupe ces

molécules sous le nom d'hydrocolloïdes. Les hydrocolloïdes contiennent généralement soit beaucoup de groupes hydroxyles et acides ionisables lorsqu'il s'agit de polysaccharides soit beaucoup de groupements peptidiques lorsqu'il s'agit de protéines.

1.3.2.4 L'eau

Si dans la plupart des articles scientifiques, on met l'accent sur les divers composés d'une boue activée et sur les EPS d'une façon générale, il ne faut pas perdre de vue que l'ensemble des constituants baigne dans un milieu aqueux. L'eau est donc un élément aussi extrêmement important à prendre en compte dans la structuration d'un floc de boues activées.

L'eau est un solvant très particulier car cette molécule possède plusieurs caractéristiques rarement réunies. La forte polarité de la molécule ($\mu = 1.84$) et la constante diélectrique élevée ($\epsilon = 78.5$). Ces caractéristiques sont responsables des propriétés suivantes : bon pouvoir de solvatation, capacité à polariser une liaison covalente car elle peut être considérée comme une base de Lewis (donneur d'électron), et donc aptitude à se coordonner avec des acides de Lewis (propriété complexante), la constante diélectrique lui confère un bon pouvoir dispersant des ions et la température de fusion et d'ébullition est haute grâce aux liaisons hydrogène qui se forment entre les molécules d'eau et qui ont une énergie d'environ 20 à 40 kJ/mol (Jolivet, 1994).

Les molécules d'eau se lient facilement aux surfaces hydrophiles; en particulier lors de la présence de groupements fonctionnels électronégatifs. Ces groupements fonctionnels s'hydratent grâce à leur moment dipolaire et à leur capacité d'engendrer des liaisons hydrogène entre les atomes N et O, et les molécules d'eau. Une ou plusieurs couches d'eau vont ainsi se former. L'eau libre est atteinte au-delà de ces couches d'hydratation. C'est cette molécule qui va servir de solvant dans la plupart des extractions. Toutefois, les surfaces naturelles ne peuvent être considérées comme parfaitement homogènes et ne peuvent être considérées comme exclusivement hydrophiles ou *a contrario* parfaitement hydrophobes. Dans le cas de sites hydrophobes, l'hydratation sera impossible.

1.3.2.5 Rôle des cations dans les liaisons inter-polymériques

Dans ces systèmes bioorganominéraux, les cations jouent un rôle important notamment au regard de la cohésion du floc et de la nature des liens entre les EPS et les divers composés présentés ci-avant.

Les cations constituent un grand axe de recherche dans le domaine de la floculation des boues activées. Les surfaces des bactéries, les EPS fournissent des sites d'adsorption principalement négatifs. Le rôle des cations dans la stabilité des floes doit donc être souligné (Urbain *et al.*, 1993).

Dans l'article de Sobeck et Higgins (2002), trois théories sont utilisées afin de parvenir à expliquer le rôle des cations dans la floculation. Il s'agit des théories :

- Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) (Sobeck et Higgins, 2002 ; Hermansson, 1999).
- De l'alginate (Sobeck et Higgins; 2002).
- Par pontage par cations divalents (Higgins et Novak, 1997 ; Sobeck et Higgins, 2002);

La théorie DLVO

La théorie DLVO (Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948) décrit le comportement des particules chargées entourées d'une double couche de contre-ions. L'énergie d'interaction totale interparticulaire est le résultat de la somme d'un terme répulsif (répulsion électrostatique entre charges du même signe) et d'un terme attractif (forces de van der Waals) (*cf.* fig. 19). Contrairement au profil de l'énergie d'attraction de van der Waals qui reste constant quelle que soit la charge ionique du milieu, l'énergie répulsive de la double couche varie suivant les conditions du milieu. pH, force ionique, nature de l'électrolyte. L'addition de cations augmente la force ionique favorisant ainsi la biofloculation à cause de la diminution de la taille de la double couche et donc de la diminution des forces répulsives entre les particules. Donc, selon cette théorie l'addition d'ions, tels que Na^+ et Cl^- augmente la force ionique et compresse la double couche favorisant ainsi la biofloculation. Cependant, de nombreuses études montrent qu'une augmentation substantielle de la concentration en chlorure de sodium provoque une détérioration des propriétés de décantation du floccule ; en particulier lorsque la concentration devient forte par rapport aux cations divalents (Higgins et Novak, 1997) ou selon Bruss *et al.* (1992) pour des concentrations de 50 à 300 meq/L. Enfin, Zita et Hermansson (1994) observent que la théorie DLVO n'est valide que pour des conditions de faible force ionique et qu'une concentration de force ionique à 0,1 M provoque une défloculation. Cette théorie est donc insuffisante à décrire le mécanisme mis en jeu lors de la biofloculation. De plus, elle ne prend pas en compte l'hétérogénéité physico-chimique de la surface et de la structure du floccule.

La valence des contre-ions contrôle aussi l'épaisseur de la double couche. Les ions divalents vont beaucoup plus favoriser la coagulation des colloïdes, même à faible concentration, que les ions monovalents (règle de Schulze-Hardy). En réduisant l'épaisseur de la double couche ils vont augmenter les probabilités de rencontre des colloïdes. Cette règle est souvent évoquée pour expliquer l'efficacité de la floculation en fonction de la charge (z) de l'ion. En effet, la forme de cette loi est de type $1/z^6$. Si un monovalent à une efficacité de 1, un divalent est 64 fois plus efficace et un trivalent 729 fois plus efficace.

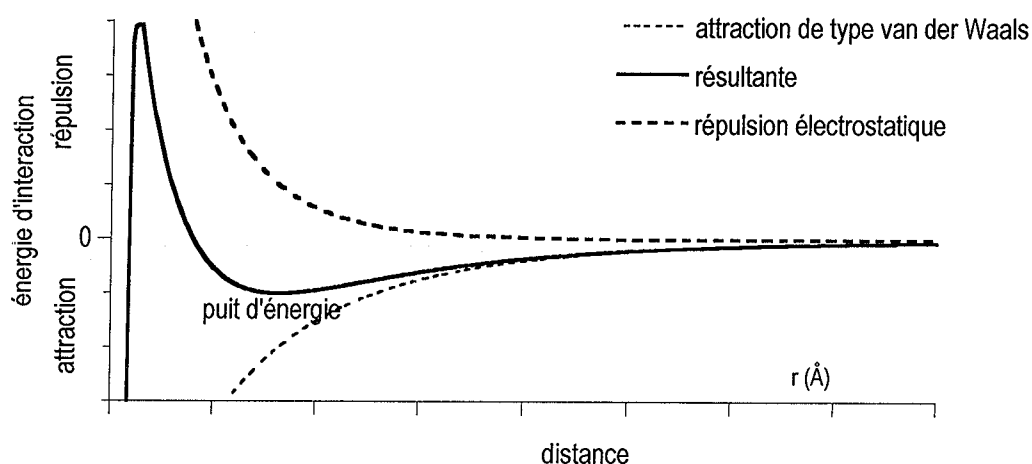


Figure 19 : Énergie d'interaction totale interparticulaire somme d'un terme répulsif (répulsion électrostatique entre charges du même signe) et d'un terme attractif (forces de van der Waals)

Théorie de l'alginate (hétéropolymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités d'acide β -D-mannuronique et d'acide α -L-guluronique liées par des liaisons $\beta(1-4)$ ¹⁹

Plusieurs bactéries, connues pour leur production d'alginate, telles que *Azotobacter* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été identifiées dans les boues activées ce qui peut suggérer la présence d'alginate dans les boues (Sobeck et Higgins, 2002). Bruss *et al.* (1992) ont montré que l'échange des cations Ca^{2+} par un ajout massif de Na^+ provoque une déstructuration du floc mesurable par l'augmentation de la turbidité du surnageant et de la SRF (Specific Resistance to Filtration). Puisque l'agrégation de l'alginate est spécifique du cation Ca^{2+} cela peut être interprété par la formation de liaisons faibles intermoléculaires par ce cation. Les auteurs estiment à 50% de la somme totale de Ca^{2+} dans les boues sert à lier les alginate. En effet, ils proposent un modèle admettant que plusieurs sites sont

¹⁹ www.eleves.ens.fr/home/guillaume/rapportRoscoff2001.doc

capables d'adsorber le calcium (exopolymères, composés inorganiques et matières organiques) et que dans une certaine proportion le magnésium est capable de se substituer au calcium mais engendrerait une détérioration du floc. Les exopolymères formeraient donc un gel, équivalent à une matrice en 3 dimensions, dont la sélectivité vis-à-vis des cations serait inégale ($\text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$).

Keiding et Nielsen (1997) ont montré que des changements mineurs en calcium provoquent la désorption des macromolécules organiques et la désintégration du floc. Les cations multivalents, en particulier Ca^{2+} et Mg^{2+} , seraient des agents de pontage ayant probablement une affinité spécifique pour chaque sorte de polymère (Mg^{2+} pour l'ADN, Ca^{2+} pour les protéines) (Urbain *et al.*, 1993).

Théorie des pontages par cations divalents

La théorie des pontages par cations divalents généralise la précédente en suggérant que contrairement aux interactions spécifiques alginate/ Ca^{2+} , il existe des pontages non spécifiques (Bruss *et al.* 1992). En 1997, Higgins *et al.* montrent que la déshydratation ainsi que la décantation sont fortement influencées par la composition cationique des boues activées. Ils démontrent que le rapport des concentrations exprimées en meq./L $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Mg}^{2+}]$ correspondant à l'optimum de décantation n'est pas constant pour toutes les boues activées. D'autre part, si le rapport des concentrations $([\text{Na}^+]+[\text{K}^+]+[\text{NH}_3^+])/([\text{Ca}^{2+}]+[\text{Mg}^{2+}])$ est supérieur à 2, la décantabilité des boues diminue fortement. En effet, le remplacement d'ions divalents provenant de la structure du floc par des ions monovalents provoque une détérioration des propriétés du floc (Sobeck et Higgins, 2002). L'influence de ces cations sur la structure du floc fait de ce rapport un bon indicateur des propriétés du flocs.

Sobeck et Higgins (2002) ont observé que l'ajout de Ca^{2+} , Mg^{2+} à concentration égale agissent de façon similaire sur les propriétés du floc. Il ne semble donc pas qu'il y ait d'interactions spécifiques. Lorsque l'on ajoute un cation monovalent tel que Na^+ les propriétés du floc sont détériorées. Forts de ces résultats les auteurs en concluent que la théorie par pontage des cations divalents est la plus apte à décrire le rôle des cations dans la floculation.

Le phénomène mis en jeu, pendant la floculation, entre les divers composants du floc sont nombreux et complexes. Ils peuvent conduire à ce que des résultats publiés par différentes équipes paraissent contradictoires, l'hétérogénéité du matériel en étant l'une des causes. Cependant, les divers composants du floc et les interactions entre ces divers

composants, tels les EPS, les groupes fonctionnels des EPS et les cations présents dans le milieu, semblent faire l'unanimité. Par leurs groupes fonctionnels et leur quantité, les protéines et les polysaccharides semblent avoir une grande influence sur la floculation. Les cations, par leur possibilité de lier entre eux des polymères, facilitent la floculation lorsqu'ils ne sont pas présents en excès dans le milieu. Leurs charges élevées renforcent leur efficacité. De plus, il a été montré que les cations divalents interagissent de façon spécifique avec certains types de matières comme les lectines (Casset *et al.* 1997), augmentant ainsi leur efficacité à former des réseaux tridimensionnels. L'efficacité et l'affinité des divers cations divalents pour les EPS ne semble pas être la même : il existe une certaine sélectivité des exopolymères pour les cations (Jang *et al.* 2001 ; Guibaud *et al.* 2005).

1.3.2.6 Eléments de déséquilibre au sein du floc

Les bactéries constituent la majorité des microorganismes présents dans les boues activées. Le succès du processus de boues activées dépend de la communauté bactérienne présente qui utilisera et minéralisera la matière organique indésirable.

Dans un système fonctionnant correctement, la teneur en substrat et l'oxygène dissout sont suffisants pour assurer un développement des colonies bactériennes sous forme de floccs. Les bactéries filamenteuses, peu nombreuses, participent au bon fonctionnement de la séparation solide/liquide en servant de squelette aux floccs (Parker *et al.*, 1972 ; Cenens *et al.*, 2000). Cependant, lorsque les conditions optimales de développement ne sont pas réunies, le processus peut se déséquilibrer.

La prolifération des bactéries filamenteuses conduit, en effet, à l'obtention de floccs ayant de faibles capacités à décanter. (Madoni *et al.* 2000). Bien que les causes de cette prolifération soient multifactorielles, rappelons ici qu'un apport de matière facilement assimilable ainsi qu'un manque d'oxygène peuvent conduire à ce type de dysfonctionnement, entraînant de ce fait une perte de matière organique. Une chloration est alors souvent nécessaire pour maîtriser ce foisonnement bactérien (Pernelle *et al.*, 2001). Au contraire, une absence totale de bactéries filamenteuses conduit à la formation de microfloccs (Jenkins, 1986).

Un autre type de déséquilibre peut conduire à un développement des bactéries sous une forme libre. L'occupation de l'espace disponible est alors maximale. Selon Wanner (1994), la mauvaise biofloculation, observable pour des boues jeunes, est le résultat de la faible production d'EPS par le glycocalix. La non-formation de floccs entraîne une

décantation très lente des boues. Pour des boues âgées et dans le cas d'une exposition continue à un milieu oligotrophe, les exopolymères du substrat servent de source énergétique et carbonée. Cette utilisation anormale des EPS entraîne la destruction de la matrice mucilagineuse constitutive des floccs et conduit également à la formation de microflocs.

Le phénomène de bulking visqueux apparaît lorsque les boues contiennent une quantité excessive d'exopolymères. Puisque les exopolymères sont des hydrocolloïdes capables de retenir de grandes quantités d'eau, les boues produites présenteront de faibles capacités de décantation et de vitesse de compaction. La présence de ces exopolymères visqueux peut être révélées par une coloration à l'encre de chine (Wanner, 1994). Il s'agit donc d'exopolymères capsulaires.

Enfin, la flottation d'une partie des boues est nommée "rising sludge". Dans un cylindre translucide, cela se traduit par la présence de plusieurs phases distinctes. Une certaine quantité de boue décante rapidement et se concentre dans la partie inférieure du cylindre et du surnageant clair se forme au-dessus. Une partie de la boue décantée commence à flotter et à remonter jusqu'à la surface de l'eau. Cette partie de la boue contient un grand nombre de petites bulles de gaz emprisonnées dans les floccs (*Nocardia*). Ces bulles pourraient avoir pour origine la dénitrification endogène des boues et seraient donc formées de diazote (Wanner, 1994).

1.3.2.7 Exopolymères : leurs tailles et étude chromatographique de leurs tailles

Nous avons vu que les EPS sont des composants essentiels d'un flocc de boues bactériologiques. Outre leur nature et leurs différentes fonctionnalités chimiques, la masse moléculaire de ces polymères est une caractéristique fondamentale qui va jouer sur l'organisation et la fonction d'un flocc. Peu de travaux portent sur la détermination des masses moléculaires des exopolymères. Les outils communément employés sont essentiellement des outils chromatographiques. Les travaux les plus anciens remontent aux années 80. Les premières méthodes chromatographiques utilisaient la séparation sur gel à basse pression (Sato et Ose, 1980 ; Novak et Haugan, 1981 ; Horan et Eccles, 1986 ; Goodwin, 1987 ; Karapanagiotis *et al.*, 1989). Le nombre de pics détectés varie généralement entre 2 et 3, et les masses molaires comprises entre 10^3 et 10^6 Daltons. Comme nous le verrons après, il est d'ores et déjà nécessaire d'avoir conscience, quel que soit l'outil analytique, que la détermination des masses moléculaires se fait toujours après une étape d'extraction.

Par exemple Horan et Eccles (1986) ont purifié des polysaccharides extraits de boues avec un traitement spécifique à base d'enzymes. Ces polysaccharides sont fractionnés selon leur taille grâce à une technique chromatographique de perméation sur gel. Ils ont montré qu'une de ces fractions de polysaccharides a une masse moléculaire supérieure à 10^6 et une ou deux fractions distinctes ont une masse moins élevée. Horan et Eccles (1986) remarquent que la présence de polymères de masses moléculaires élevées permet des liaisons indépendantes de la direction, menant à des floccs sphériques et stables. Les essais de récupération des fractions de polysaccharides sur colonne préparative n'ont pas réussi à cause d'une distribution de taille très large.

Karapanagiotis *et al.* (1989) ont comparé différentes méthodes d'extraction sur boues digérées (résine échangeuse d'ions Dowex, chauffage, NaOH et phénol) et leur influence sur la distribution des masses molaires des différents extraits sur une colonne basse pression. Dans cette étude trois pics ont également été obtenus. Selon les auteurs et en vue des résultats obtenus : parmi les méthodes d'extraction utilisées, la résine Dowex préserverait le mieux la masse molaire des exopolymères (peu ou pas de dégradation significative).

Forster (1985) a extrait les EPS par chauffage. Il a mis en évidence une fraction d'EPS de masse moléculaire élevée ($>10^5$ Da) dont les masses les plus grandes sont supérieures à 2.10^6 Da, ainsi qu'une fraction majeure de masse inférieure à 10^5 Da et une ou plusieurs fractions mineures. Il souligne qu'une augmentation de masse de fraction majeure est corrélée avec une détérioration des propriétés de décantabilité.

Goodwin et Forster (1989) ont comparé la séparation d'EPS extraits par chaleur. Les méthodes choisies étaient la chromatographie sur gel et par passage sur une série de membranes de différentes porosités. La chromatographie a permis d'obtenir une fraction majeure de masse comprise entre 10^3 et 10^4 Da et deux autres fractions de masses plus élevées de 4.10^7 à 2.10^8 Da. L'utilisation des membranes permet de mettre en évidence une quantité importante d'EPS de masses inférieures à 500 Da, peut-être non résolue par la chromatographie. Ils suggèrent que les EPS de masses inférieures à 10^2 Da sont des fractions provenant du même type de polymère. Ils insistent également sur l'importance du mode de préparation des EPS lors de l'étude des masses moléculaires.

Frølund et Keiding (1994) ont utilisé la technique de chromatographie d'exclusion par taille à haute pression (HPSEC) pour réaliser un gain de temps et diminuer l'altération des polymères pendant l'extraction. L'extraction des exopolymères est réalisée par résine Dowex. L'étude réalisée en variant les conditions de pH et de force ionique a permis de

mettre en évidence les conditions optimales de séparation pour cette étude. Selon les auteurs, à pH 7 et à une force ionique de 0.011, il n'y a pas d'adsorption irréversible dans la colonne et le nombre de pics est maximal (7 pics).

L'efficacité et la sensibilité de la méthode ont été étudiées. L'analyse par HPSEC des EPS :

- Présente une bonne répétitivité provenant de la même station d'épuration.
- Permet de distinguer des échantillons provenant de stations différentes.
- Permet de montrer une variation de la composition des EPS durant les périodes de pluie ou de neige ; permet également de détecter l'activité d'exoenzymes dans un échantillon d'EPS.

Lors des recherches suivantes sur la chromatographie d'exclusion de taille haute pression, Frølund *et al.*, (1996) ont également montré l'existence de sept pics. Le problème des cinétiques d'extraction différentes suivant les composés des EPS a été mis en évidence. L'analyse par HPSEC a permis de montrer que lors de l'augmentation du temps d'extraction par Dowex aucun pic ne disparaît et l'aire totale du chromatogramme augmente. Ceci permet de suggérer que l'extraction par Dowex ne provoque pas de rupture des polymères.

Görner *et al.* (2003) ont montré que la séparation par HPSEC permet d'obtenir des fractions chromatographiques contenant chacune un nombre limité d'EPS de nature différente et les ont analysés par microspectrométrie infrarouge. Cette méthodologie permet d'obtenir des informations, sur la taille des exopolymères, sur leur nature chimique mais aussi sur la longueur des chaînes aliphatiques associées aux protéines. Les protéines dont la taille est comprise entre 45 et 470 kDa, montrent deux configurations possibles : soit des chaînes courtes (6 à 8 CH₂ pour 1 CH₃) soit des chaînes plus longues avec 11-12 CH₂). Les polysaccharides sont de très faible taille (< à 1 kDa).

L'analyse chromatographique des EPS du floc qui ont une structure très complexe, présente plusieurs difficultés : différents composés présentent des groupes chimiques qui peuvent interagir avec la colonne par des interactions hydrophobes, adsorption ionique ou exclusion ionique qui s'ajoutent au phénomène d'exclusion par taille. Il est donc difficile de réaliser une séparation par taille uniquement sans éliminer les composés indésirables avant. Cependant, l'élimination de composés indésirables d'un mélange complexe, sans influencer ce que l'on cherche à étudier est très délicate. En effet, ces différents composés peuvent requérir différentes phases mobiles pour être élués selon leurs seuls volumes hydrodynamiques.

1.3.2.8 L'extraction des exopolymères

Nous avons vu, dans les chapitres précédents, que l'extraction était une étape clef qui influence la détermination des masses moléculaires des EPS extraits. Dans cette partie, nous allons faire un rapide tour d'horizon des principales méthodes d'extraction décrites dans la littérature.

De nombreuses procédures d'extraction existent. Certaines utilisent la centrifugation seule. Les autres méthodes d'extraction comprennent l'application d'un traitement physique ou chimique pour casser les floccs et détacher le matériel extracellulaire, suivi d'une centrifugation pour séparer la matière organique extraite des débris cellulaires et autres solides (Karapanagiotis *et al.*, 1989). Le schéma général d'une procédure d'extraction se compose de quatre étapes principales :

- Echantillonnage et prétraitement éventuel.
- Extraction des EPS.
- Purification éventuelle (Chromatographie par exemple).
- Analyse des EPS.

Le principe des principales méthodes employées, ainsi que leurs avantages et inconvénients sont regroupés dans le tableau suivant (Tab. 2).

Il n'existe pas de méthode d'extraction universelle (Urbain *et al.*, 1993). Le choix d'une méthode doit prendre en compte les besoins spécifiques et les contraintes de chacun. Selon les objectifs, deux paramètres importants sont à prendre en compte :

- La lyse des cellules doit être minimisée.
- La dénaturation des protéines doit être évitée.

Les comparaisons des compositions chimiques en EPS obtenues suivant les différentes méthodes d'extraction sont difficiles, à cause de l'hétérogénéité des techniques analytiques différentes utilisées, plus ou moins adaptées (Frølund *et al.*, 1996) : Liu et Fang (2002) ont comparé 6 méthodes d'extraction selon les protocoles suivants (Fig. 20). Les auteurs classent par ordre décroissant les différentes méthodes en comparant les quantités d'EPS totales extraites soit : formaldéhyde-NaOH, EDTA, formaldéhyde-ultrason, résine échangeuse d'ion, formaldéhyde et l'échantillon de contrôle.

Il est également important de noter que certaines méthodes interfèrent avec certaines méthodes analytiques. Par exemple, le formaldéhyde interfère avec l'analyse des polysaccharides par la méthode de Dubois (Dubois *et al.* 1956), l'acide humique (Frølund *et al.* 1996) et l'EDTA (Martinez *et al.* 2004), interfère fortement avec la méthode de

Lowry (Lowry *et al.* 1951). Or, cette dernière méthode est utilisée par Liu et Fang (2002) pour le dosage des protéines.

Tableau 2 : récapitulatif des principales méthodes d'extraction des exopolymères

| Type d'extraction | Principe | Avantages | Inconvénients | Références |
|---------------------------------------|---|---|--|---|
| Centrifugation | Séparation des EPS faiblement liés de la biomasse cellulaire | Pas de contamination chimique | Pas d'extraction significative des EPS liés | (Brown et Lester, 1980 ; Liu and Fang 2002) |
| Ultrasons | Utilisation des ultrasons pour disperser les agrégats | Pas de contamination chimique | Lyse des cellules suivant le temps et l'intensité du traitement | (Brown et Lester, 1980 ; Urbain <i>et al.</i> 1993 ; Jorand <i>et al.</i> , 1995 ; Boyette <i>et al.</i> 2001 ; Liu and Fang, 2002) |
| Ultrasons et résine | Utilisation des ultrasons pour disperser les agrégats et échange des cations | | | (Guellil <i>et al.</i> , 2001, Dignac <i>et al.</i> 1998) |
| Soude en solution (pH 11) | Ionisation des groupes carboxyliques des protéines et des polysaccharides (pHi # 4 à 6 provoquant une répulsion des EPS et augmentant la solubilité | | | (Frølund <i>et al.</i> , 1996; Higgins et Novak, 1997) |
| Thermique | Chauffage 80 – 100°C ou par vapeur | | | (Frølund <i>et al.</i> , 1996 Bura <i>et al.</i> 1998) |
| Par résine Dowex | Echange des cations divalents par des cations monovalents avec une résine Dowex (généralement sous forme sodique) d'où libération des polymères | Méthode très efficace, pas de lyse des cellules, Pas de dénaturation des polymères selon les conditions | Peu de reproductibilité (quantité de résine et temps /intensité du mélange très important), effet de cisaillement et d'attrition par agitation du liquide et des billes de résine. | (Frølund <i>et al.</i> , 1996) |
| EDTA (et formaldéhyde)* à 80°C | L'EDTA, en chélatant les ions bivalents, déstabilise la membrane cellulaire bactérienne | | Lyse des cellules. Extraction d'EPS d'origine intracellulaire. Peut être moins destructif si la concentration de EDTA est >27mM? (Sanin, 2001) | (Brown et Lester, 1980; Sanin, 2001 ; Liu and Fang 2002*) |
| Glutaraldéhyde | | | | (Sponza, 2002; Azeredo <i>et al.</i> , 1998) |
| Vapeur | | | Extraction d'une grande quantité de matériel intracellulaire | (Brown and Lester, 1980 ; Bura <i>et al.</i> 1992 ; Azeredo <i>et al.</i> , 1998) |
| Formaldéhyde + | | | dialyse de 24 heures | (Liu et Fang, 2002) |

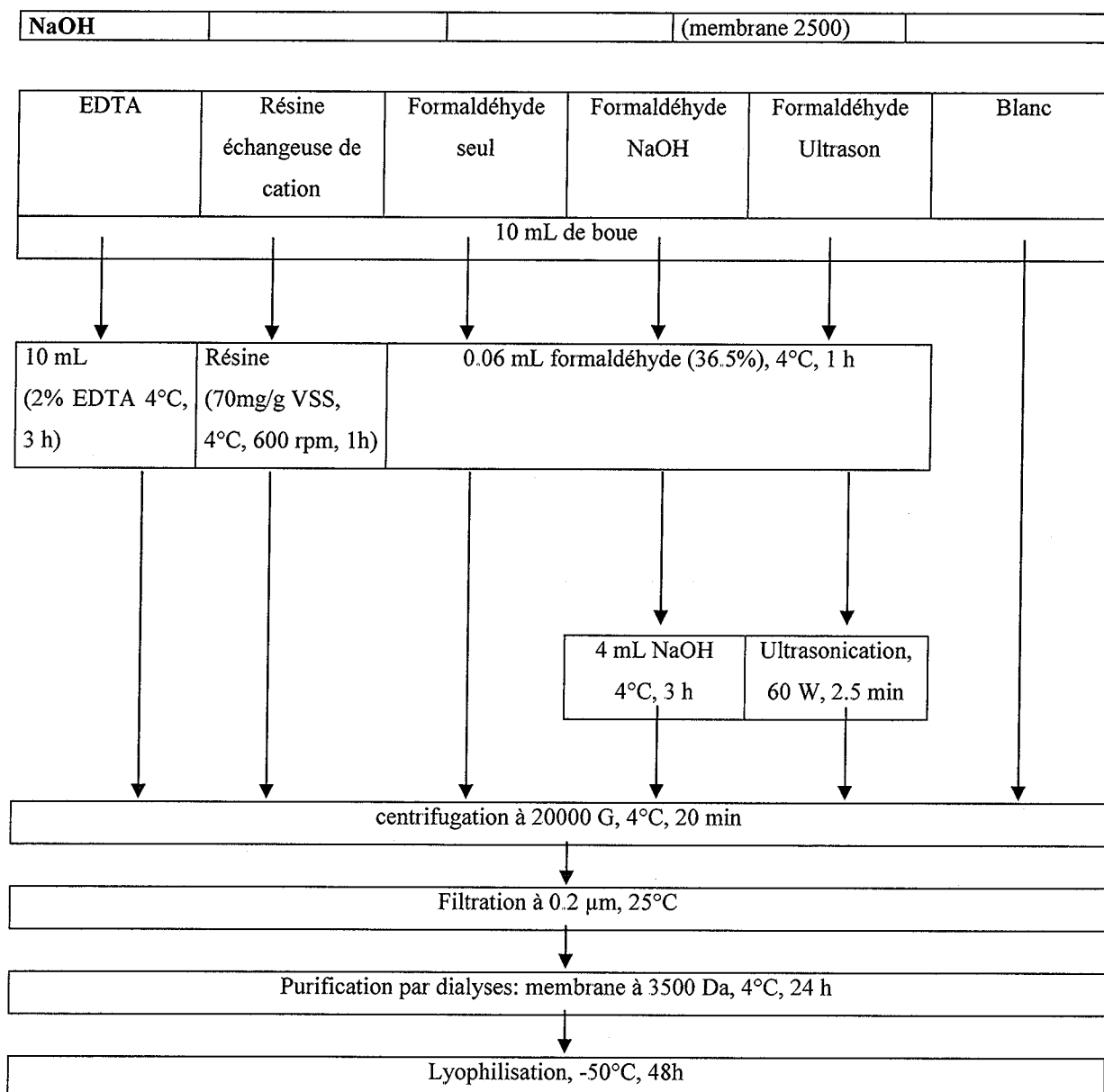


Figure 20 : comparaison de l'extraction d'EPS par 6 méthodes selon les protocoles utilisés par Liu et Fang (2002).

L'efficacité de l'extraction est également difficile à définir. Deux définitions existent : quantité totale d'EPS extraits par rapport à la matière organique totale de l'échantillon, quantité totale d'EPS extraits par rapport à la quantité totale d'EPS dans l'échantillon. La deuxième définition, d'un point de vue théorique, apparaît comme étant la plus correcte, mais la quantité totale d'EPS contenue dans un échantillon étant généralement inconnue, la première définition est couramment employée (Nielsen et Jahn, 1999).

Le tableau 3 présente les compositions en EPS et l'efficacité de l'extraction selon diverses méthodes appliquées aux boues activées.

Remarque : les boues utilisées dans les travaux de Frølund *et al.* (1996) sont des boues produites en laboratoire.

Tableau 3 : compositions en EPS (en mg/g de Matière Volatile des EPS extraits) et efficacité de l'extraction selon diverses méthodes appliquées aux boues activées

| Méthode | Protéines | ADN | Polysaccharides | Acides uroniques | Substances humiques | Lipides | Efficacité d'extraction (% C _{org} extrait du C _{org} Total) | Référence |
|---------------------------|-----------|-------|-----------------|------------------|---------------------|---------|--|------------------------------|
| Vapeur, 10 min | 77.1 | 3.7 | 15.8 | nd | nd | nd | 10 | Brown et Lester, 1980 |
| Chauffage 80°C | 121 | nd | 8 | 2.2 | nd | nd | 9 | Frølund <i>et al.</i> , 1996 |
| NaOH (pH 11) | 96 | nd | 22 | 3.1 | nd | nd | 8 | Frølund <i>et al.</i> , 1996 |
| Dowex/cisaillement | 243 | nd | 48 | 6.1 | 126 | nd | 27 | Frølund <i>et al.</i> , 1996 |
| Ultrason (50W 2 × 15s) | 279.9 | 67.34 | 60.54 | nd | nd | nd | 10 | Urbain <i>et al.</i> , 1993 |
| Ultrason (37W 60s, glace) | 90.3 | nd | 27.5 | nd | nd | nd | | Jorand <i>et al.</i> , 1998 |
| Ultrason (50W 20s, 4°C) | 434 | 109 | 99 | nd | 115 | 18 | | Conrad <i>et al.</i> 2003 |

nd : non déterminé

2 Matériel et méthodes

La première partie de ce paragraphe sera consacrée à la description des Stations d'Épuration où nous avons prélevé les boues activées étudiées. Ensuite nous décrirons la méthode d'extraction des EPS à partir de ces boues et les outils analytiques que nous avons utilisés :

- Pour la caractérisation physico-chimique des boues par les méthodes standards.
- La chromatographie d'exclusion par taille qui a servi à séparer un mélange complexe des EPS en fractions de compositions plus simples et à déterminer la taille des EPS présents dans les fractions.
- La microspectrométrie infrarouge pour identifier la nature chimique des EPS.

Enfin, nous terminerons par la description des protocoles de microbiologie appliqués aux souches bactériennes.

La plupart des aspects traités ici seront repris entièrement ou partiellement dans les articles qui seront inclus dans cette thèse.

2.1 Stations étudiées

Dans le cadre de cette étude sur des EPS de boues activées, nous avons effectué des prélèvements dans les bassins d'aération d'une part, de trois stations d'épuration des eaux urbaines de Maxéville, Toul et Golbey-Epinal, d'autre part, dans une station de traitement des eaux de la papeterie d'Etival-Clairefontaine et enfin, dans un réseau de collecte des eaux usées et pluviales (réseau unitaire) de Boudonville.

La station de traitement des eaux usées de Maxéville

Cette station a actuellement une capacité de 480000 Equivalents Habitants (Communauté du Grand Nancy – Meurthe et Moselle). Avant 2002, la filière urbaine avait une capacité de 340000 EH et traitait un débit de 100000 m³/j pour les effluents urbains et 3000 m³/j pour les effluents industriels. L'âge des boues est de 3.5 j. L'efficacité du traitement de la pollution organique était de 91.5% dans cette station et l'efficacité du traitement de la pollution azotée d'environ 50%. Nos échantillonnages étaient effectués dans les bassins d'aération de la filière de traitement des eaux urbaines en six points successifs et un prélèvement a été effectué dans le bassin de la filière industrielle (traitement séparé des eaux de la brasserie de Champigneulle). Après les travaux de rénovation, les prélèvements ont été effectués dans le bassin d'aération de la filière mixte.

Les quatre stations de traitement des eaux usées (Maxéville, Toul, Golbey-Epinal et Etival-Clairefontaine) utilisent le traitement par les boues activées, les échantillons prélevés à Boudonville ne sont que des eaux usées et leur étude a été entreprise par curiosité et par comparaison avec les boues des stations d'épuration.

La station de Toul

Mise en service en 1991, la station de Toul a une capacité de 24500 eq. hab. (Communauté de communes du Toulais). Cette station est équipée d'un traitement spécifique de l'azote et du phosphore. Elle reçoit la collecte des eaux usées des communes de Toul, Ecrouves, Dommartin, Chaudeney, Foug soit en moyenne annuelle : 7000 m³/j. La station de Toul est capable d'éliminer l'azote et le phosphore par des processus biologiques et physico-chimiques. L'élimination de l'azote est effective grâce à la présence d'une zone d'anoxie de 12000 m³ précédant la zone d'aération d'un volume de 4320 m³. L'âge des boues est de 13 j. Les traitements physico-chimiques par injection de sel d'aluminium permettent la déphosphatation. Les boues sont déshydratées par pressage mécanique sur un filtre à bande. Selon l'AERM (2002), l'efficacité du traitement de la pollution organique est de 95% et l'efficacité du traitement de la pollution azotée de 88%.

La station de Golbey-Epinal

Mise en service en 1994, cette station reçoit les eaux usées de la commune d'Epinal et de Golbey. Sa taille est de 80000 EH., mais reçoit actuellement un flux égal à 58300 EH soit un flux de 20000 m³/j. La station est munie de deux bassins en chenaux de 5000 m³. L'âge des boues est de 21 j. Elle ne possède donc pas de zone anoxique à proprement parler mais les boues rencontrent au cours de leur migration dans le chenal des zones plus ou moins anoxiques. Pendant toute la durée de notre campagne de prélèvements, le prétraitement permettant l'abattement de 20% des graisses, par flottation, fût volontairement arrêté. Ceci à eu pour conséquence de favoriser la prolifération d'une bactérie filamenteuse, identifiée par la station comme étant du genre *Microthrix*. Selon Nielsen *et al.* (2003), *Microthrix parvicella* utilise, stocke et dégrade grâce à l'action de lipases, les acides gras à longues chaînes aliphatiques comme l'acide oléique. La présence excessive de cette bactérie engendre des problèmes de décantation. En effet, une grande quantité de mousse apparaissait à la surface des bassins et une partie de la boue flottait au lieu de décanter : ces boues étaient donc rejetées dans le milieu récepteur. Cet arrêt du prétraitement a duré un an mais, face à ces problèmes de décantation, le système insufflant de l'air pour permettre la flottation des graisses, a été remis en route.

Selon l'AERM 2002, l'efficacité du traitement de la pollution organique était de 93% dans cette station et l'efficacité du traitement de la pollution azotée de 89%. Ces chiffres ne couvrent pas la période d'arrêt du prétraitement des graisses.

La station d'Etival-Clairefontaine

Mise en service en 1981, cette station reçoit les eaux de procédés de la papeterie Clairefontaine représentant un flux de 4320 m³/j. Un décanteur primaire de 450 m³ permet de retirer une partie de la charge organique et minérale des effluents. Le volume du bassin d'aération est de 3000 m³ et le volume du clarificateur est de 1500 m³. L'âge des boues est de 10 j. Elle permet une élimination de 99.5% de la matière organique en suspension. Les boues produites (6000 T/an) sont valorisées par compostage.

La bouche d'égout de Boudonville-Maxéville

Les échantillons ont été prélevés dans les égouts de Boudonville au niveau d'un bassin de rétention de ce bassin versant. Ce système unitaire recueille les eaux usées et les eaux de pluies de la partie Nord-Est de la ville de Nancy sur la rive gauche de la Meurthe. Cette zone urbaine, résidentielle et commerciale compte environ 20000 habitants. (El Samrani *et al.* 2004).

2.2 Caractérisations physico-chimiques des échantillons

Toutes les boues prélevées ont été systématiquement caractérisées d'un point de vue physico-chimique. Nous nous sommes limités à la caractérisation des cinq points suivant par les méthodes standard²⁰.

- Le pH.
- La conductivité (μS/cm).
- La matière sèche en suspension : TS (mg/L).
- La matière volatile en suspension : VS (mg/L).
- L'indice de Molhmann (IM) ou Sludge Volume Index (SVI) (mL/g).

TS et VS

Ces deux paramètres représentent la quantité de matière sèche contenue dans les boues et donnent une approximation de la quantité de matière organique et minérale contenue dans l'échantillon. Pour ces mesures, quatre tubes de 50 mL de boues homogénéisées sont passées à la centrifugeuse (Centrifugeuse 5804 Eppendorf) à 5000 rtm pendant 5 minutes.

²⁰ Standard methods for the examination of water and Wastewater, APHA-AWWA-WPCF, 16th edition, 1985.

Les culots sont placés dans des capsules en aluminium préalablement pesées vides (m_a). Les récipients sont placés au four (CWF1100 Carbolite) à 105°C pendant 24 h. La différence des mesures avant et après séchage (m_b) divisée par le volume de l'échantillon permet de déterminer la quantité de matière sèche en suspension (TS) qui s'exprimera en g/L.

$$TS = (m_b - m_a) / V \quad (\text{g/L}) \quad (3)$$

Les capsules replacées à 550°C pendant quatre heures et à nouveau pesées (m_c) permettent de calculer la quantité de matière volatile en suspension.

$$VS = (m_b - m_c) / V \quad (\text{g/L}) \quad (4)$$

Indice de Mohlman (IM)

Il peut être défini comme étant le "volume en mL occupé par 1 g de boue après une décantation de 30 minutes de la boue activée, caractérise les propriétés de décantation des boues. Bien que ce paramètre soit utilisé et compris par tous, il présente toutefois des limites présentées par différents auteurs. Plusieurs imperfections sont évaluées par Dick et Vesilind (1969). Ils montrent que le temps choisi pour effectuer la mesure ne donne qu'une information partielle de la façon dont décantera la boue. En effet des boues de concentration et d'IM identique pourront avoir des profils de décantation différents pendant une demi-heure avant de s'intersecter au bout de 30 min (Fig. 21). La concentration du taux de matière influence l'index mais pas de façon linéaire : les fortes concentrations en matière tendent à faire baisser l'IM. Les caractéristiques rhéologiques, la température, la forme du cylindre, l'agitation et les propriétés de surface peuvent également influencer l'IM sans que cela soit traduit par ce paramètre. Il permet cependant d'identifier de façon grossière la qualité de décantation d'une boue. On considérera qu'une boue dont l'IM est compris entre 50 et 200 mL/g décantera bien.

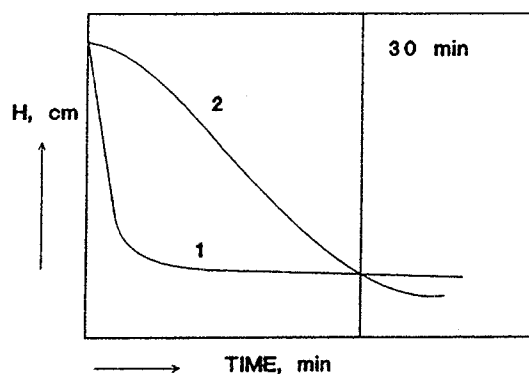


Figure 21 : Graphique (Wanner, 1994) représentant les courbes de décantations de deux boues, ayant la même concentration initiale, avec des caractéristiques de décantation différentes mais avec le même IM.

pH-métrie et conductivité

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre PHM20 (Standard pH meter) Meterlab ; Tacussel Electronique.

La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre de type CD 810 de marque Tacussel Electronique.

2.3 Extraction des exopolymères

Comme cela a été rappelé précédemment, il existe différentes méthodes d'extraction des exopolymères, mais chacune possède des avantages et des inconvénients. Il n'y a pas de méthode universelle. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions dont le protocole d'extraction a été proposé par Frølund *et al.*, en 1996. Cette méthode ne provoque pas de lyse cellulaire à condition de ne pas avoir une agitation trop forte et ne dénature pas les polymères. De plus d'après Karapanagiotis *et al.*, 1989, le Dowex préserverait le mieux la masse molaire des exopolymères.

Les échantillons de boues prélevés dans une des stations décrite précédemment, ont été acheminés au laboratoire dans un laps de temps inférieur à 2h. Le pH, la conductivité, et l'IM de la boue sont mesurés dès l'arrivée au laboratoire (sédimentation de 1 L dans une éprouvette pendant 30 minutes), et mesure des teneurs en matières sèches (centrifugation de 50 mL de boue à 5000 rpm et séchage du culot à l'étuve à 105°C pendant 24h), et en matières volatiles (chauffage à 550°C pendant 4h de la boue séchée) débutent également.

Préparation des boues pour l'extraction et l'épaississement

Les boues sont tout d'abord concentrées quatre fois. 800 mL des boues homogènes sont décantées pendant 1.5h à 17°C dans le noir (en cas de non décantation, une centrifugation à 2000g pendant 15 min peut remplacer cette étape). 600 ml de surnageant est enlevé et 200 ml de boues épaissies sont centrifugées à 2000 g pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et les culots sont redispersés dans 200 mL d'une solution de NaCl 5.10^{-3} M. Le culot obtenu après décantation de la boue est utilisé pour l'extraction des EPS. On obtient des boues lavées et épaissies.

Extraction des exopolymères des boues activées (préalablement épaissies)

Les boues épaissies sont mises en contact avec une résine échangeuse d'ions (120 g de résine DOWEX 50×8 Na⁺, 20-50 mesh (Fluka, France)) pendant 4h à 4°C. Le principe de l'extraction repose sur un échange des ions bivalents responsables en partie de la cohésion des floccs bactériens par les ions monovalents de la résine. Les exopolymères sont donc libérés dans le surnageant, et une seconde étape de centrifugation permet de les récupérer (9600 g pendant 30 minutes). Le surnageant contenant les EPS extraits est filtré à 0.22 µm avant l'injection pour l'analyse en HPSEC.

Extraction des exopolymères des cultures de souches bactériennes.

Lorsqu'il s'agit des cultures des souches bactériennes, l'extraction est réalisée sur les bactéries présentes dans 500 mL de bouillon de culture après 4, 8 ou 24 h de culture. Une première centrifugation des cultures est effectuée à 2000 g pendant 15 minutes afin d'éliminer le Bouillon Nutritif. Les culots de centrifugation sont réunis dans un même tube de centrifugation et remis en suspension dans 50 mL d'une solution physiologique (9g NaCl/L), puis recentrifugés à 2000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est à nouveau éliminé et le nouveau culot est redispersé dans 50 mL de NaCl 5.10^{-3} mol/L puis mis en contact avec une résine échangeuse d'ions DOWEX (30 g de résine) pendant 4h à 4°C.

Les surnageants de centrifugation contenant les exopolymères libérés pendant la phase d'extraction, sont filtrés à 0.22 µm (filtre stérile en PVDF (Poly Di Fluorure de Vinyldène)) avant injection de 100 µL de ce filtrat dans la colonne de chromatographie d'exclusion stérique.

2.4 Chromatographie liquide haute pression (HPLC) par exclusion stérique

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé la méthode mise au point dans notre laboratoire (Görner *et al.*, 2003). Toutefois le phase mobile initialement utilisée contenait 20 mM de NaHPO₄. Ce sel, présent dans la phase mobile, gênait les analyses infrarouges. Une dialyse de 50 h était donc nécessaire pour l'éliminer. Afin de raccourcir le délai entre l'extraction et l'analyse infrarouge, ce sel a été supprimé. La séparation des EPS selon leur taille a permis de déterminer grâce à l'étalonnage les masses molaires apparentes des protéines et des polysaccharides. Les fractions chromatographiques prélevées en fonction des pics obtenus, étaient utilisées pour l'analyse par microspectrométrie infrarouge.

2.4.1 Principe

La chromatographie d'exclusion par taille permet de séparer les diverses molécules d'exopolymères obtenues en fonction de leur taille ou masse moléculaire (m.m.) et de leur configuration dans l'espace. Dans cette technique, l'échantillon à analyser est entraîné par une phase aqueuse percolant à travers une colonne contenant une phase stationnaire, solide et perméable. Cette perméabilité est contrôlée par la taille de la porosité de particules présentes constituant la phase stationnaire. L'échantillon de 100 µL, prélevé à l'aide d'un passeur automatique, est poussé dans la colonne par la phase mobile (5.10⁻³ NaCl ; 0.005% NaN₃). Les différents types de molécules ou les molécules de taille différentes migrent alors à des vitesses différentes selon leurs interactions avec la phase stationnaire de la colonne. Pour ce type de phase stationnaire formant une sorte de tamis moléculaire, il existe un grand nombre de pores susceptibles de retenir les molécules. Les molécules ayant les masses moléculaires les plus faibles pénètrent dans les pores les plus fins et sont donc ralenties dans leur migration (Fig. 22). Les molécules plus grosses ne peuvent migrer que dans des pores ayant un diamètre plus élevé que leur section et sont exclues des pores ayant une taille trop faible pour les accueillir. Enfin les molécules les plus grosses sont totalement exclues et vont donc migrer plus rapidement que les précédentes. Les molécules seront donc éluées dans l'ordre décroissant de leur masse moléculaire. Un étalonnage est donc nécessaire pour déterminer la zone de séparation de la colonne et pour attribuer une molécule de masse moléculaire connue à un temps de rétention. Pour nos échantillons dont la masse est déterminée à partir de la courbe

d'étalonnage on parle alors de masse moléculaire apparente ; la colonne a été étalonnée par les polysaccharides et les protéines.

Si l'on porte le logarithme de la masse moléculaire des étalons choisis en fonction du volume d'élution : $\log(m.m.) = f(V)$: les grosses molécules, dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont alors totalement exclues. Le volume d'élution est alors égal au volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car elles pénètrent dans certains pores de la phase stationnaire, leur migration est freinée en fonction de leur taille. Une molécule qui entre dans tous les pores sera éluée avec un volume d'élution $V_e = V_m + V_i$, où V_i est le volume des pores dans la phase stationnaire.

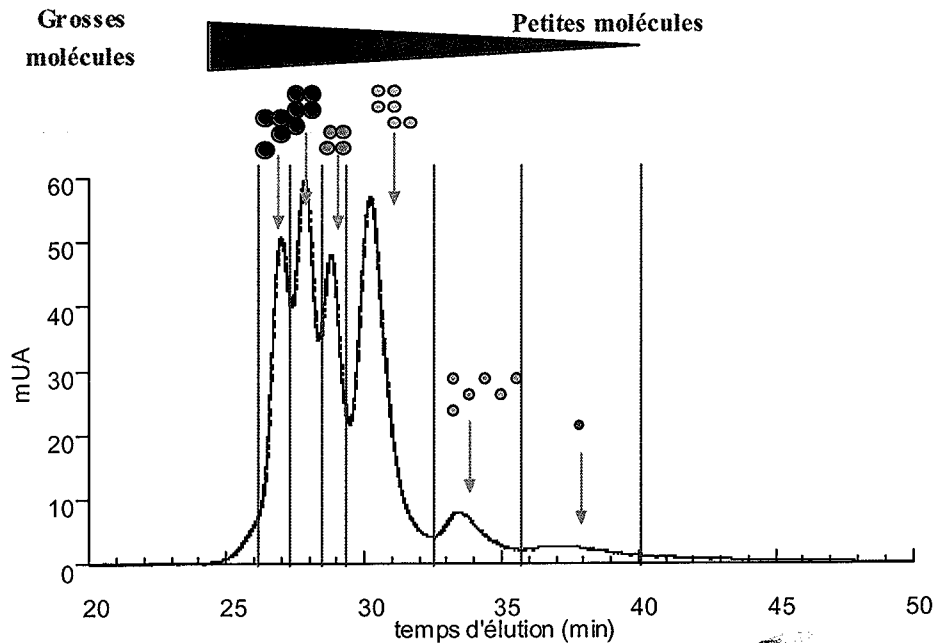
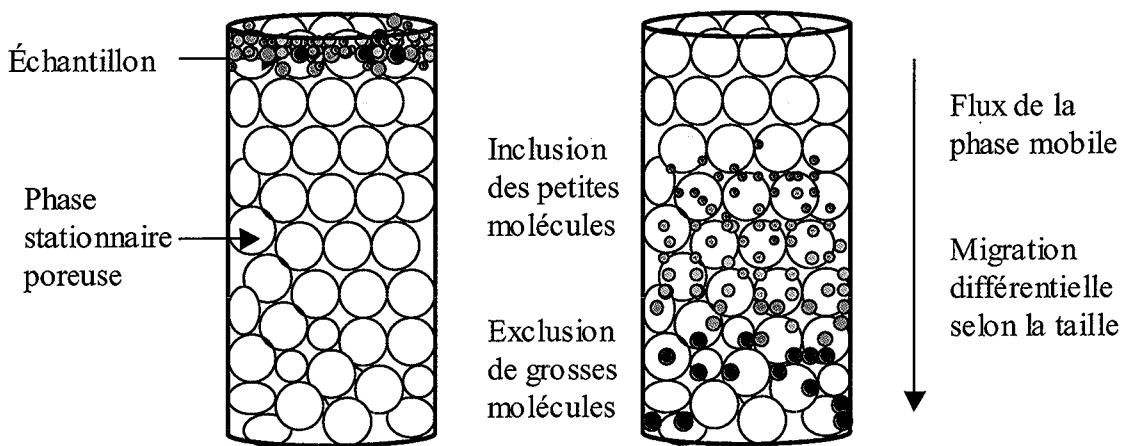


Figure 22 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique et exemple de chromatogramme.

2.4.2 Appareillage chromatographique

Introduction de la phase mobile

L'ensemble du système chromatographique est de marque Hewlett Packard 1100. Le système comporte un dégazeur, une pompe, un injecteur, une colonne, un détecteur UV et un détecteur à indice de réfraction de marque Agilent 1100. Une colonne de garde (Guard column hardware kit) est utilisée avant la colonne pour éviter de la détériorer (Fig. 23).

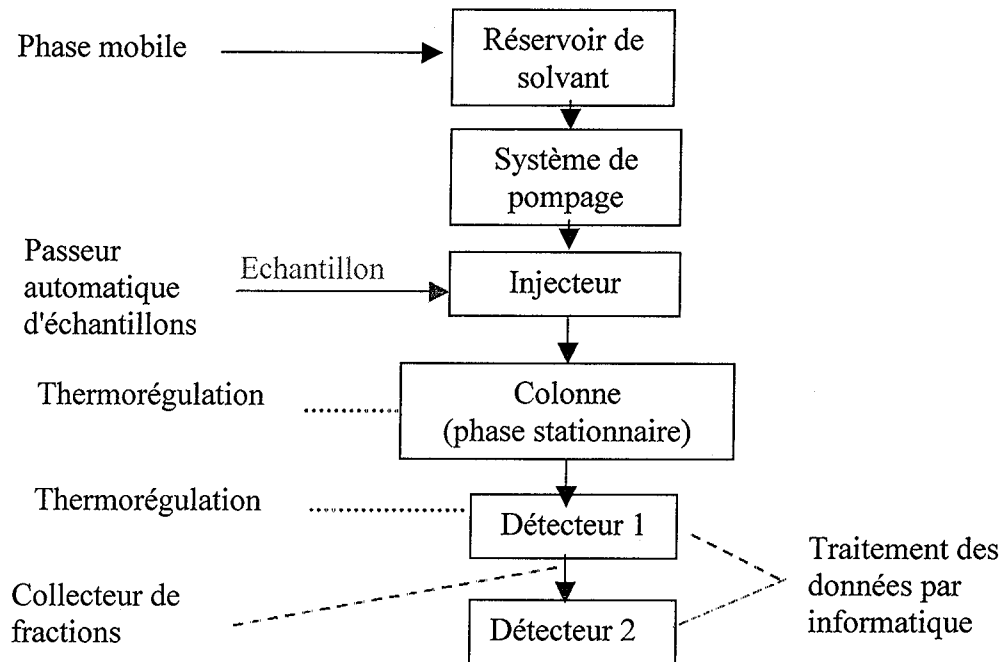


Figure 23 : schéma de principe d'un système chromatographique

Le débit est assuré par une pompe quaternaire (série HP 1100). Cette pompe est constituée d'un bac à solvant, un dégazeur à vide et d'une pompe à gradient à quatre voies. Les solvants sont purgés de leur gaz pendant leur passage dans les chambres à vide du dégazeur. La pompe quaternaire est constituée de deux pistons en série. Chacun de ces pistons en saphir se déplaçant de 20 à 100 μl selon le débit choisi. Un amortisseur servant à réguler le débit est monté entre les chambres de ces deux pistons. La pression est assurée par un ensemble de pompes pouvant atteindre 400 bars. La phase mobile était constituée de 5mM NaCl et 0.005% d'azide. Nous avons travaillé à un débit de 0.5 mL/min.

Détecteurs

L'un des deux détecteurs utilisés est un spectrophotomètre ultraviolet-visible à réseau de diodes. La barrette de diodes se compose d'une série de 1024 photodiodes couvrant une

gamme allant de 190 à 650 nm et dont l'intervalle d'échantillonnage est < 1 nm. La sauvegarde et l'interfaçage des données sont assurées par un micro-ordinateur HP.

Introduction de l'échantillon

La quantité d'échantillon injectée dans la colonne a été fixée à 100 µL, soit le maximum injectable possible.

Colonne

Selon les caractéristiques du fournisseur, la colonne utilisée, une Zorbax bio Series GF 250, (de 250 mm de longueur et de 9.4 mm de diamètre intérieur) est destinée spécialement à la séparation des polysaccharides et des protéines par exclusion par taille. Elle contient des particules sphériques, de silice et de diamètre nominal de 4 à 4.5 µm, pouvant être utilisées à haut débit. La surface de la silice présente des groupements silanol créant des interactions indésirables avec les biopolymères. Celle-ci est donc modifiée par une couche moléculaire d'oxyde de zirconium, elle-même recouverte d'une monocouche d'une phase diol. Une phase stationnaire uniformément hydrophile est ainsi obtenue. Cette modification préserve le volume poreux, minimise l'adsorption des protéines et permet donc de séparation des protéines et autres biomolécules. Le diamètre des pores des sphérules est de 150 Å et présente une surface spécifique de 140 m²/g.

Etalonnage de la colonne

Avant toute analyse, il est nécessaire d'étalonner la colonne par des composés organiques purs et de masses connues. Les étalons choisis sont pour les polysaccharides des standards (Polymers Labs, EasiCal ; Polymères fabriqués par Phenomenex). Ils sont solubles dans l'eau pure dans les solutions tamponnées et dans les solvants organiques polaires et leur polydispersité est très faible. Ces polymères sont produits par *Aureobasidium pullulans* et sont constitués d'unités de maltotriose. La masse moléculaire des polymères disponibles sont 180, 738, 5900, 1180, 2280, 47300, 112000, 212000, 404000 et 788000 Da. Les polysaccharides permettent d'établir une courbe d'étalonnage, (Fig. 24), dont la partie linéaire indique la zone de séparation des polysaccharides. Conformément aux indications données par le fournisseur, la colonne montre une très bonne séparation entre 112000 et 738 Dalton. L'alignement vertical des points obtenus à partir des molécules de 404000 Dalton et 788000 Dalton permet de déterminer le volume mort V_m de la colonne tandis que les volumes d'élution des deux plus petites molécules (polysaccharide de 180 Dalton et azide de sodium permettent de déterminer le volume d'élution total V_e).

Les protéines utilisées pour l'étalonnage (Fig. 25) : ribonucléase, β -amylase, albumine de poulet, sérum d'albumine bovine (BSA), proviennent de la société sigma Aldrich et ont une pureté allant de 97 à 99% (Fig. 25). Une partie des protéines est éluée par un plus grand volume que l'azide de sodium. Cela indique que les protéines ne sont pas seulement séparées par leur taille mais qu'il existe d'autres types d'interactions avec la phase stationnaire intervenant lors de la migration des molécules. Nous sommes conscients que la séparation ne se fait pas exclusivement par la taille. Une phase mobile beaucoup plus concentrée en sel (130 mmol NaCl, 120 mmol Na₂HPO₄), conseillée par le fabricant, permet de la faire. Mais comme précisé précédemment, cette phase mobile nécessite un traitement trop lourd dans le cas de la récupération pour analyse infrarouge (50h de dialyse).

Il est connu que la séparation par le pur mécanisme d'exclusion par taille n'est possible que dans le cas de molécules chimiquement uniformes, ce qui n'est pas le cas des EPS. Il nous semble donc plus important de séparer et d'identifier les EPS présents, le mieux possible. Les tailles calculées à partir de l'étalonnage ne sont qu'une indication de la masse molaire apparente. L'étalonnage de la colonne a permis d'estimer la masse moléculaire apparente des EPS en supposant que les EPS et les étalons interagissent avec la colonne par les mêmes mécanismes.

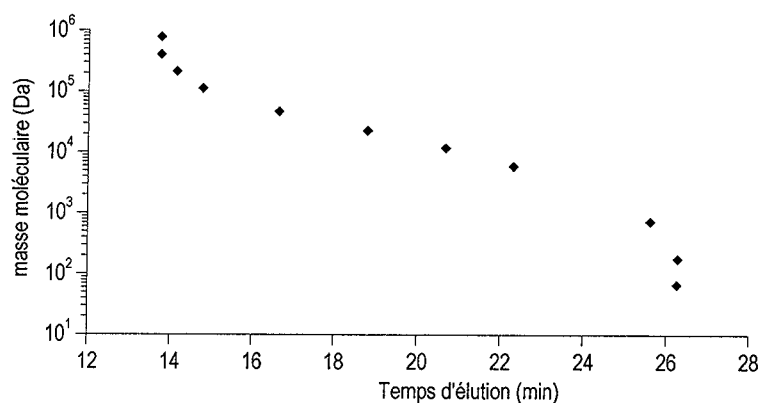


Figure 24 : Etalonnage de la colonne par les polysaccharides. Phase mobile : 5mM NaCl et 0.005% d'azide.
Débit de 0.5 mL/min. Injection de 100 μ L.

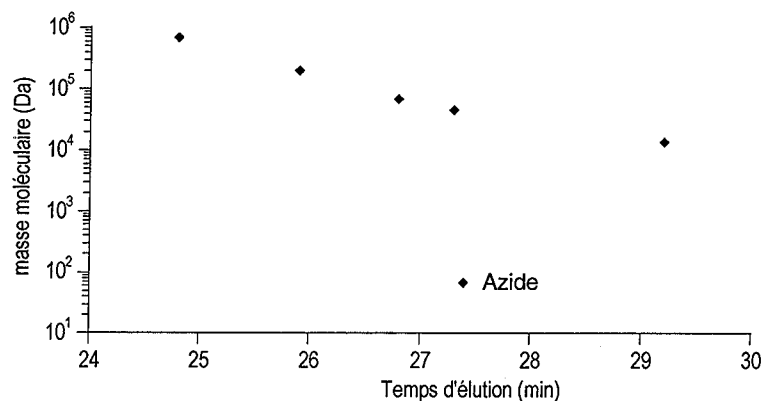


Figure 25 : Etalonnage de la colonne par les protéines. Phase mobile : 5mM NaCl et 0.005% d'azide. Débit de 0.5 mL/min. Injection de 100 μ L.

2.5 Micro-spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier μ FT-IR en mode transmission

La spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier, notée FT-IR, est une technique basée sur les interactions entre radiations électromagnétiques et matières. L'analyse par spectrométrie peut s'effectuer suivant la nature de l'échantillon et selon les besoins sur la partie réfléchiée (réflexion spéculaire, réflexion totale atténuée), sur la partie diffusée (réflexion diffuse) ou sur la partie transmise du faisceau (analyse par transmission). En mode transmission le rayon incident arrive perpendiculairement à l'échantillon. Dans ce cas, seule la partie transmise sera prise en compte au niveau du détecteur. Elle nous donne des informations d'origine massique, c'est-à-dire sur la totalité de la matière traversée par le rayonnement.

Le rayonnement transmis a alors perdu une partie de son énergie lors de l'interaction avec la matière de l'échantillon soumis à un rayonnement λ compris entre 2.5 et 25 μ m soit à un nombre d'ondes ($1/\lambda$) compris entre 6000 et 500 cm^{-1} . Chaque molécule possède des fonctionnalités et des configurations plus ou moins caractéristiques et possédera donc des modes de vibrations propres. La figure 26 rassemble les bandes de vibrations des principales fonctionnalités chimiques rencontrées dans cette étude.

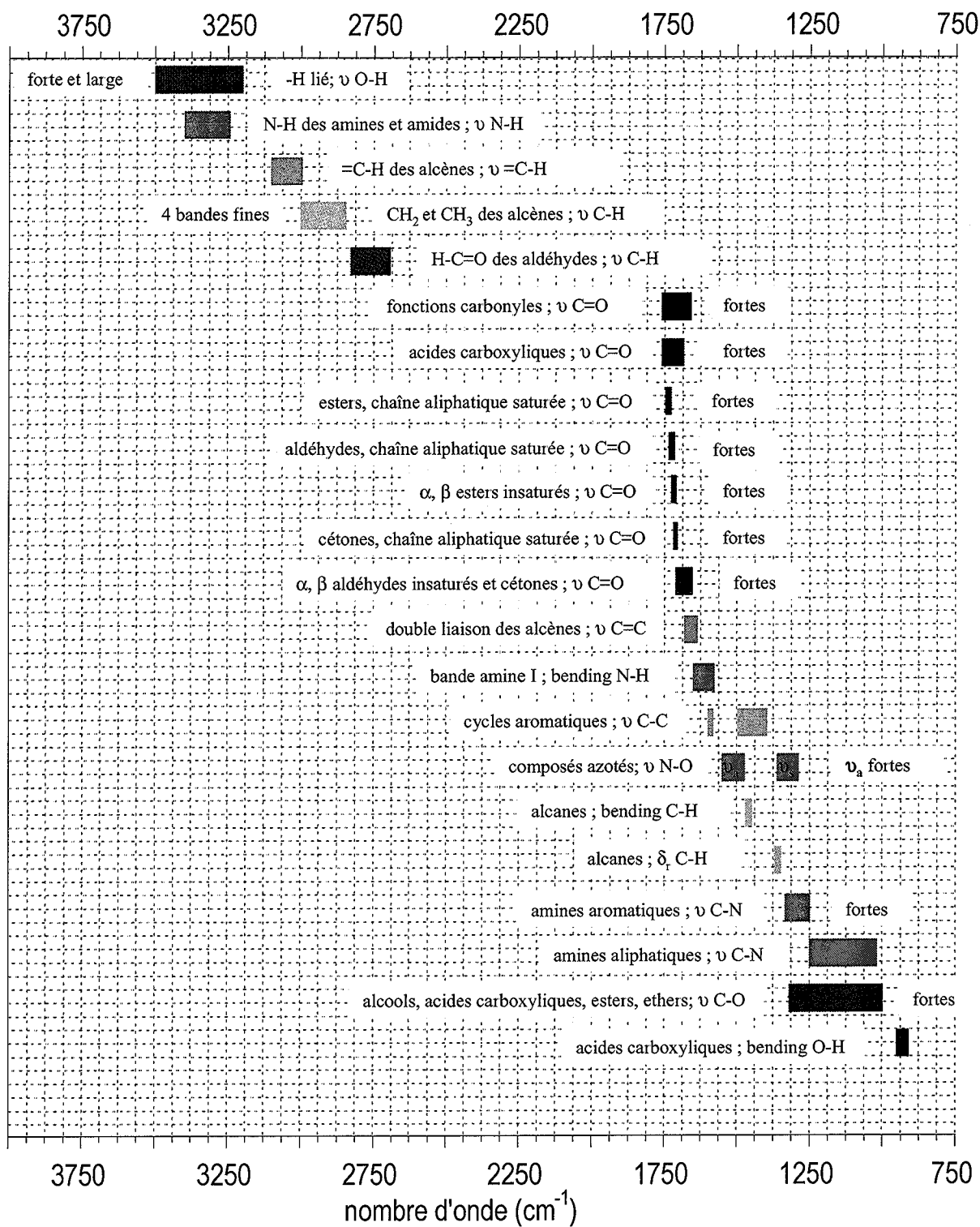


Figure 26 : Représentation graphique de la localisation des principales bandes IR rencontrées dans les spectres infrarouges des EPS.

2.5.1 Rappel théorique

Un édifice théorique polyatomique constitué de n atomes possède $3n$ degrés de liberté correspondant aux coordonnées cartésiennes de chaque atome dans la molécule. Seul $3n-6$ (ou $3n-5$ dans le cas de molécules linéaires) concernent les modes de vibrations de cet assemblage. Ce sont ces modes de vibrations qui sont à l'origine des bandes d'adsorption que l'on observe sur un spectre IR. La spectroscopie IR est donc une spectroscopie moléculaire qui met en jeu les différentes façons de vibrer d'une molécule. Ces modes de vibrations sont rassemblés et représentés Fig. 27 et 28. Ces figures rappellent la signification des symboles et du vocabulaire utilisé par les spectroscopistes relatifs aux types de vibrations que peut subir une molécule polyatomique. La première division, identifiée ci-dessus, concerne les vibrations de valences (stretching) qui sont soit symétriques (ν_s) soit asymétriques (ν_a) et les vibrations de déformations (bending) qui sont divisées en trois types :

- Les déformations d'angles (bending) dans le plan (δ , scissoring) ou hors du plan (γ).
- Les balancements pouvant également être dans le plan (δ_r , rocking) ou hors du plan (δ_b , wagging).
- Les torsions (τ , twisting).

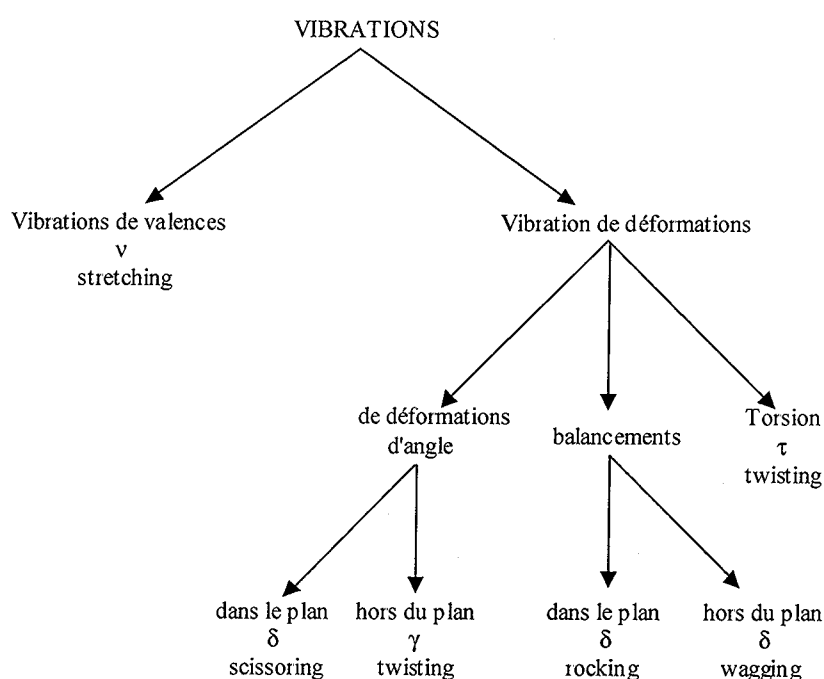


Figure 27 : Nomenclature – symbolisme des vibrations en spectrométrie infrarouge.

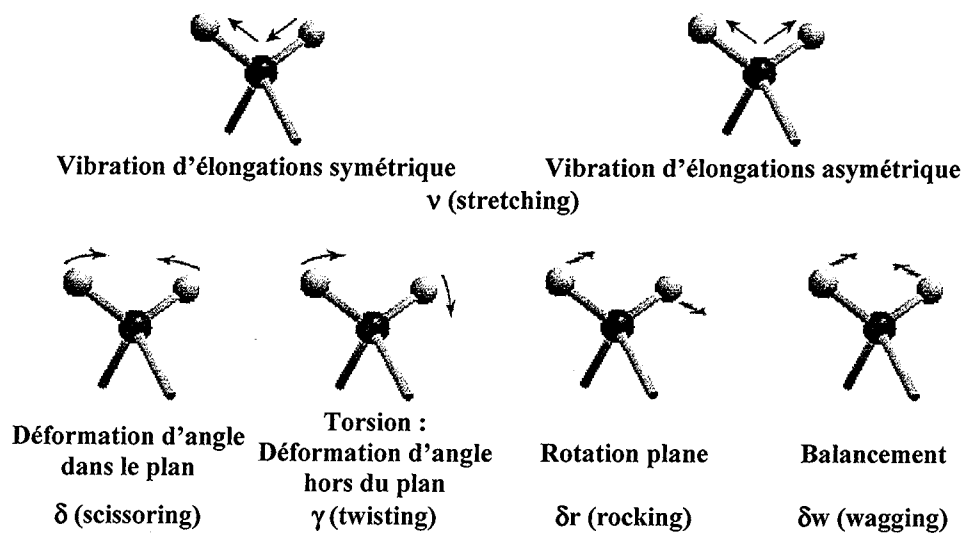


Figure 28 : Représentation des diverses vibrations observables en spectrométrie infrarouge.

Élongations (stretching) : il s'agit de vibrations ayant lieu le long de l'axe de la liaison.

Elles peuvent être symétriques ou asymétriques.

Déformations (bending) : ce sont des vibrations caractérisées par une modification de l'angle de liaison. Les vibrations de déformation sont de plus faible énergie que les vibrations d'élongations.

2.5.2 Aspect instrumental

Le spectromètre utilisé au laboratoire est un spectromètre de masse à transformée de Fourier à simple faisceau (Brucker I.F.S 55) équipé d'un interféromètre du type MICHELSON muni d'un laser He-Ne ($1/\lambda = 15798.071 \text{ cm}^{-1}$) servant de référence et notamment pour l'intervalle d'échantillonnage. Le schéma de cet appareil est présenté figure 29.

Le système d'interférence est réalisé avant l'échantillon entre le miroir fixe et chaque position du miroir mobile grâce à une séparatrice GE-K. Parmi les avantages de l'FT-IR, il convient de signaler l'acquisition rapide des données, ce qui permet d'accumuler un grand nombre de spectres en un temps réduit.

Ce système est connecté à un microscope Brucker IRscope 1 d'un système de diaphragme calibré rotatif permettant de réduire le diamètre du faisceau jusqu'à $8 \mu\text{m}$. Compte tenu des caractéristiques propres de l'élément sensible du détecteur, le plus grand diamètre du faisceau IR ne dépasse pas $100 \mu\text{m}$.

Il est équipé d'un détecteur « all axes » à fenêtre Mercure, Cadmium, Tellure (MCT) refroidi à l'azote liquide (77.5 K). Ce type de détecteur autorise une grande sensibilité de mesure dans une gamme qui va de 6000 à 600 cm^{-1} ce qui est avantageux en microspectrométrie en mode transmission où une partie de l'énergie du faisceau est dispersée par le système optique. La totalité des spectres sont présentés en unité d'adsorbance selon la formule $\log(I/I_0)$.

2.5.3 Utilisation de la microspectrométrie infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse des exopolymères.

L'objectif de notre étude était de caractériser chimiquement chaque fraction des chromatogrammes issue de la séparation chromatographique. Pour ce faire, les fractions des exopolymères sont récupérées dans des piluliers en verre de 1 mL . $10 \mu\text{L}$ de chaque fraction sont ensuite déposés sur une lame de fluorine (CaF_2) placée à l'obscurité à 14°C pendant l'évaporation de la goutte. Pendant l'évaporation de la goutte, la matière présente se concentre et cristallise selon son seuil de solubilité propre. Les différents composés auront donc tendance à se fractionner naturellement les uns des autres s'ils ne sont pas fortement associés. Cependant les quantités de matière recueillie dans chaque prélèvement sont très faibles et la $\mu\text{FT-IR}$ présente l'avantage de pouvoir ajuster la taille du faisceau à celle du cristallite à analyser ; le diamètre minimal dans nos conditions d'analyse IR étant

égal à $8\ \mu\text{m}$. Cette possibilité d'analyse ponctuelle, à l'échelle du micron, autorise une grande sensibilité dans l'identification chimique des différentes familles d'EPS.

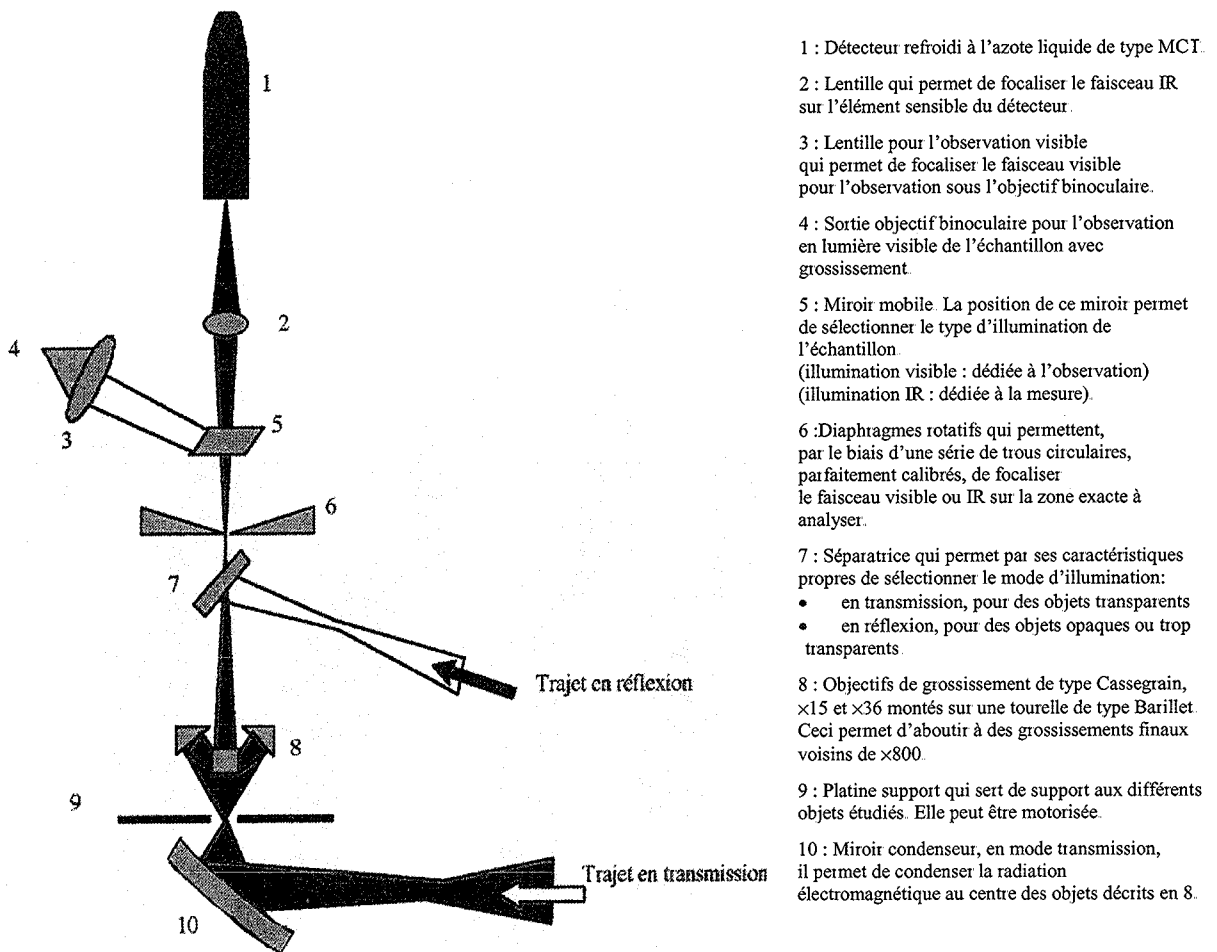


Figure 29 : Schéma de l'appareillage infrarouge. Représentation des différents trajets optiques (Vis ou IR) dans le microscope utilisé.

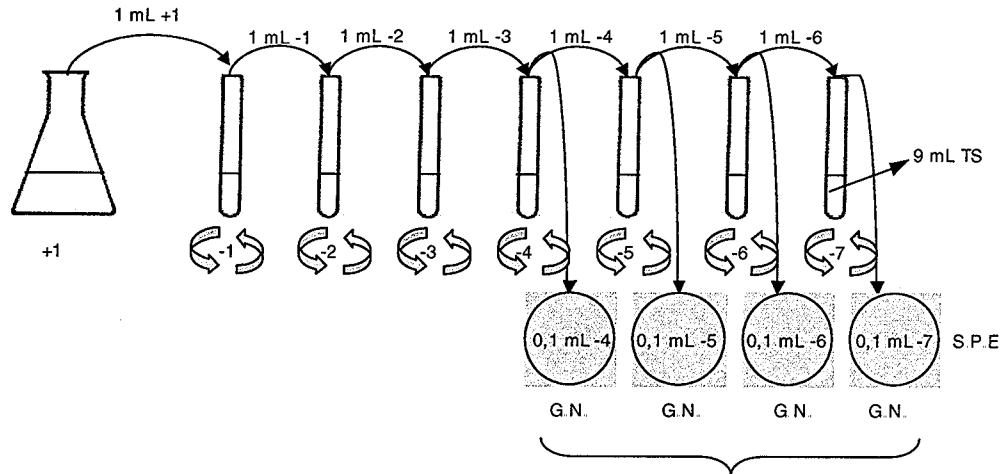
2.6 Protocoles de microbiologie

Des techniques, fondamentales en microbiologie, ont été utilisées afin d'isoler, d'identifier et de cultiver en cultures pures et en cultures mixtes, des souches bactériennes représentatives des échantillons étudiés. Les milieux solides gélosés sont essentiellement utilisés pour le comptage et la sélection de colonies et les milieux liquides sont utilisés pour la culture bactérienne proprement dite. La mesure de l'absorbance, bien que très facile à mettre en œuvre, n'est utilisable que pour des cultures pures. En effet, en culture mixte elle ne permet pas de différencier la quantité de chaque souche. Seul le comptage en boîte de Pétri sur milieu gélosé permettra le dénombrement des populations.


Dans le cadre de cette thèse, nous avons été amenés à étudier l'aspect microbiologique des boues, c'est-à-dire, isoler, purifier puis identifier les principales souches bactériennes présentes au sein des boues. Nous avons caractérisé la nature des EPS produits par ces souches pures ou par des mélanges de souches pures. Dans ce paragraphe, nous allons détailler les différents dispositifs et conditions expérimentales utilisés dans l'analyse des boues.

2.6.1 Numération des populations bactériennes

Les numérations des populations bactériennes issues des boues activées et des cultures sont effectuées par la technique de la suspension-dilutions décimales (Fig. 30). Des boîtes de Pétri correspondant à chaque dilution estensemencée sur une gélose nutritive (G.N.) sontensemencées par étalement de 0.1 mL d'une des dilutions préparées. Le comptage des populations bactériennes se fait 72 h après l'ensemencement en boîte de Pétri (stockage à 30°C). Cette technique permet une approche qualitative et quantitative des populations présentes.



T.S. : Tryptone sel
 + 1 : Solution mère non diluée
 -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7: dilutions
 S.P.E. : Surface Par Etalement
 G.N. : géloses nutritives coulées en boîte de pétrie inoculées avec 0.1 mL en surface par étalement

 Homogénéisation

Boîtes de Pétri incubées à 30 °C
 Puis comptage du nombre de colonies

Figure 30 : Schéma récapitulatif de la technique de numération par suspension-dilutions décimales

2.6.2 Milieux de culture

Un milieu de culture est composé d'un mélange de substrats nutritifs, de sels minéraux et de vitamines. Trois milieux différents ont été utilisés afin d'effectuer les pré-cultures, les cultures et les dilutions. Ces milieux de culture contiennent les éléments suivant.

Le Bouillon Nutritif (B.N.), utilisé pour les pré-cultures et les cultures des souches :

- 3 g d'extrait de viande,
- 10 g de tryptone,
- 5 g de NaCl,
- 1L d'eau distillée,

Le pH est ajusté entre 7 et 7.2 et la solution est autoclavée 20 min à 120°C.

Le Tryptone Sel (T.S.), utilisée pour les dilutions :

- 1 g de tryptone,
- 8.5 g de NaCl,
- 1 L d'eau distillée,

La solution est également autoclavée 20 min à 120°C.

La Gélose Nutritive Nitrée (G.N.N.) utilisé pour les boîtes de Pétri nécessaires au comptage :

- 3 g d'extrait de viande,
- 10 g de peptone,
- 5 g de NaCl,
- 1 g de nitrate de potassium,
- 15 g d'agar.

Le pH est ajusté entre 7 et 7.2 ; autoclavé 20 min à 120°C.

2.6.3 Isolement et purification

Pour identifier une souche pure et étudier sa physiologie, il est écessaire de l'isoler des autres germes présents. Afin d'obtenir une culture pure d'un microorganisme, un prélèvement est effectué à l'aide d'un fil àensemencer. Ce prélèvement est ensuite repiqué sur une gélose nutritive. Ce repiquage conduit à une première culture sur laquelle se développent toutes les espèces prélevées. Chaque colonie isolée provient d'une bactérie. Les caractéristiques morphologiques des colonies ainsi formées permettent de les différencier. Les cultures pures sont conservé à 4°C dans des tubes de gélose nutritive en tranche.

2.6.4 Coloration et identification des souches

Au sein des boues activées coexistent un grand nombre de bactéries différentes. Afin de visualiser et d'identifier les différentes souches, on dispose de différentes techniques de coloration et de tests biochimiques. Les techniques de coloration sont indispensables pour visualiser diverses caractéristiques des bactéries : la coloration de Gram permet une identification optique sommaire du type de bactéries et donne des renseignements sur la morphologie, agencement, la présence de spore, le type de parois cellulaires, la pureté, etc. ; l'encre de Chine permet d'observer la présence de capsule exopolymérique. L'ensemble des tests biochimiques vont nous servir à identifier les souches (famille, genre, espèce).

La coloration de Gram se réalise à partir d'un frottis bactérien sur lame. Elle permet de distinguer les bactéries à Gram positif (paroi épaisse de peptidoglycannes et d'acide teichoïques) et celles à Gram négatif (paroi fine mais qui présente une membrane de lipoprotéines, lipopolysaccharides et phospholipides). Le frottis est successivement :

- Coloré en déposant du cristal violet en abondance et quelques gouttes de bicarbonate de sodium pendant 2 min puis rincé à l'eau distillée,
- Coloré avec un autre colorant appelé Lugol (solution iodo-iodurée) pendant 1 min puis rincé à l'eau distillée,
- Différencié grâce à l'alcool-acétone puis rincé abondamment à l'eau distillée,
- Surcoloré par un autre colorant, la safranine, pendant 1 minute puis rincé et séché.

Les bactéries qui restent colorées en violet, sont appelées Gram positif (Gram+). Les autres, qui sont recolorés en rose, sont dites Gram négatif (Gram-).

La coloration à l'encre de Chine. Pour mettre en évidence la présence de capsule, on réalise une suspension des bactéries dans une goutte d'encre de chine recouverte d'une lamelle. La capsule apparaît alors au microscope sous forme d'un halo clair et réfringent : on parle de coloration négative.

Le test de catalase et d'oxydase. Ces deux tests sont réalisés afin de déterminer la présence de deux enzymes respiratoires. Selon le résultat du test on peut s'orienter vers certaines familles bactériennes : Par exemple, les Entérobactéries (bacilles Gram-), auront un test oxydase négatif et un test catalase positif.

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le tétraméthyl-paraphénylène diamine. On dépose une colonie bactérienne prélevée sur un milieu gélosé sur une plaquette d'oxydase "DrySlide". Si la colonie prend une teinte rose-violette, le test est positif.

Le test de catalase permet, lui aussi, de compléter l'identification des souches. Il consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂). Une colonie de la souche à tester est déposée, avec un outil en verre, dans la goutte d'H₂O₂. Le test est positif si une légère effervescence se produit.

Les tests biochimiques en tubes et en galeries. D'autres tests biochimiques permettent de poursuivre l'identification (recherche de la famille) : fermentation du glucose (Hugh et Liefson), type respiratoire (Viande Levure), Nitrate réductase.

Après avoir effectué les test précédents, on effectue des tests biochimiques en tubes tels que la galerie Entérobactérie comportant les tests suivants : mobilité, lactose, ONPG, production d'H₂S, Lysine décarboxylase, Ornithine décarboxylase, Arginine déshydrolyase,

uréase, TDA, PDA, production d'indole, Citrate de Simmons, malonate, Voges-Proskauer, Gelatinase, Gaz/glucose, mannitol, Saccharose, Clark-Lubs.

Pour confirmer ces résultats, on effectuera une suspension avec la colonie isolée et on réalisera des tests biochimiques à partir de galeries à entérobactérie API utilisant 23 tests biochimiques standardisés. L'interprétation des résultats est obtenue à l'aide d'un manuel de systématique bactériologique de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

2.6.5 Méthode de mesure

Croissance bactérienne

Il s'agit de mesurer l'absorbance grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600 nm. La turbidité du milieu peut alors être calculée grâce à une loi équivalente à celle de Beer-Lambert. La contribution de la biomasse bactérienne B est proportionnelle à l'absorbance à 600 nm du milieu A selon l'expression :

$$A_{600} = \alpha dB = \text{D.O.}$$

d étant la longueur du trajet optique (1 cm par convention) et α un coefficient de proportionnalité.

L'absorbance devrait donc dépendre seulement du nombre de bactéries présentes dans le milieu. Cependant, nous avons vu que l'on trouve autour des bactéries des exopolymères qui vont eux aussi absorber une partie du rayonnement utilisé pour la mesure de la densité optique. Si la production de ces exopolymères s'étale au cours du temps, l'absorbance peut augmenter indépendamment du nombre de bactéries. Ce type de mesure intègre, donc, divers processus tels que : l'accumulation de substrat dans des vacuoles de stockage, la production d'exopolymères, la croissance et la division des cellules. En conséquence, la forme de la courbe de croissance bactérienne tracée par le logarithme l'absorbance à 600 nm est légèrement différente de celle tracée par le logarithme du nombre de bactéries obtenu par comptage, car plusieurs phénomènes se chevauchent. Toutefois, les différentes phases sont toujours identifiables et utilisables pour le calcul des taux de croissance.

2.6.6 Préparation des souches purifiées pour la culture

Cette culture s'effectue en deux étapes : une étape de revivification sur un milieu de pré-culture et une étape de culture proprement dite.

Etape 1 : revivification des souches ou mise en culture

Cette étape consiste au repiquage de deux géloses nutritives en trancheensemencées par stries serrées et de deux bouillons nutritifsensemencés chacun avec une colonie de la souche à étudier. Une foisensemencés, les milieux de pré-culture sont mis à incuberà 30°C durant 24 heures. Les souches sont alors toutes dans le même état physiologique et peuvent être utilisées pour la culture proprement dite.

Etape 2 : culture en erlenmeyer

Après 24 h d'incubation les bouillons nutritifs de pré-culture servent àensemencer 250 mL de bouillon nutritif dans des erlenmeyer de 500 mL (Fig. 31). Ces erlenmeyers sont placés sur des tables à agitation circulaire (140 tours par minute) et incubés à 30°C.

Pour chaque extraction deux erlenmeyers de 500 mL sont préparés ; soit 500 mL de bouillons nutritifs disponibles pour l'extraction. Les extractions des exopolymères ont été effectuées après 24 h de culture. Cependant, afin de suivre plus précisément la cinétique de production des exopolymères de deux des bactéries présentes dans le bassin d'aération d'une station, des extractions successives à 4, 8 et 24 h ont également été effectuées.

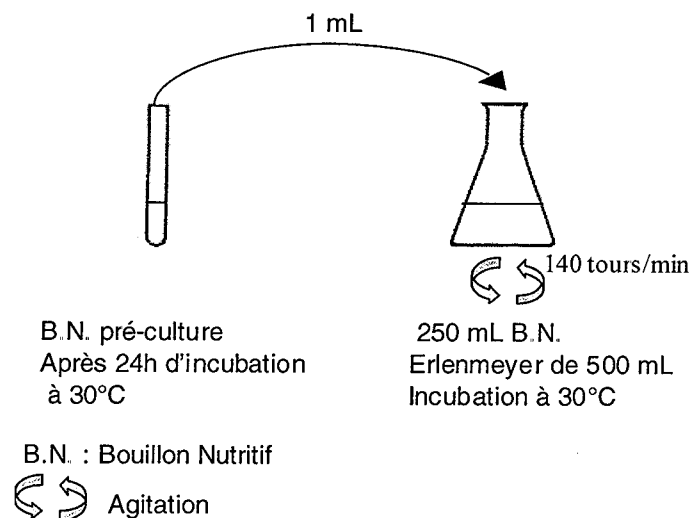


Figure 31 : Préparation des souches pour l'extraction

En parallèle de la préparation des souches pour l'extraction des exopolymères, des numérations ont été réalisées pour chaque temps d'extraction (4, 8, et 24 h) afin de suivre la cinétique de développement de la souche bactérienne. Cette numération sera mise en relation avec la production d'exopolymères extraits.

La diversité des microorganismes rencontrés dans les bassins d'aération est le point de départ d'interactions et de compétitions vis-à-vis de la disponibilité du substrat. De l'équilibre ou du déséquilibre de ce pool bactérien présent dépendra la qualité de la décantation. Dans de nombreux cas, une floculation efficace comme les problèmes liés à la décantation dépendent fortement de la présence de certains types de bactéries (bulking ; foaming) ainsi que de leurs exopolymères (croissance dispersée et bulking visqueux) (Wanner, 1994). La connaissance des genres bactériens présents et des exopolymères produits devrait permettre de sélectionner les souches capables de favoriser une décantation optimale et de donner des indications sur les conditions à maintenir dans le milieu pour permettre leur développement.

3 Résultats et discussion

La chromatographie liquide haute pression par exclusion de taille permet de séparer selon leur taille le mélange des exopolymères extraits des boues. Les chromatogrammes présentent plusieurs pics et les profils des chromatogrammes obtenus pourront être comparés entre une même station et avec les autres stations. Cependant chaque pic obtenu est encore un mélange complexe de molécules. Les fractions chromatographiques correspondant aux divers pics ont été prélevées et analysées par μ FT-IR en mode transmission.

Dans un premier temps, nous avons validé la méthode chromatographique en terme de fidélité et de répétabilité.

Une fois l'approche méthodologique validée, l'étude présente, sous forme d'article, dans le chapitre 5.2, la comparaison des EPS issus de différentes stations de traitement des eaux usées²¹. Les points communs et les différences entre les diverses stations seront discutés d'un point de vue des profils chromatographiques et de la nature de leurs cortèges d'EPS identifiés par infrarouge. L'étude aura pour but de définir s'il existe une signature commune à toutes les stations, si chaque station a une signature spécifique unique ou si au contraire, il existe un nombre limité de configurations possibles. Des informations complémentaires seront fournies sur certains cas particuliers comme : la situation de crise d'une station d'épuration dans le cas de salage des routes, les problèmes de décantation et la comparaison des EPS issus d'un collecteur des eaux usées pluviales et ceux d'une station d'épuration.

Afin de pousser l'investigation plus loin, le troisième chapitre de cette section (§ 5.3) sera consacré à une étude microbiologique d'échantillons de boues de la station industrielle de traitement des eaux de la papeterie d'Etival-Clairefontaine. En collaboration avec P. Chappe et P. Guinot-Thomas, microbiologistes au sein de l'IUT Nancy-Brabois, nous avons pu étudier en détail la production d'exopolymères de quatre souches bactériennes présentes dans ces boues activées. Deux de ces souches, représentant 70% de la microflore bactérienne, nous ont particulièrement intéressés pour leur production d'EPS. Elles ont donc fait l'objet d'un suivi de la cinétique de production de leurs EPS lorsqu'elles se développent en culture pure ou en mélange et donc, en

²¹ Cet article a été accepté pour publication à Wat. Res.

interaction. Un article écrit en collaboration avec l'équipe de microbiologistes (et soumis à Wat. Res.) est inclus dans ce chapitre.

Enfin, les bases d'une banque de données spectrales évolutive des EPS seront mises en place dans le chapitre 5.4. La base de données regroupe tous les spectres IR les plus caractéristiques de chaque station et permettra une identification plus rapide des phases présentes dans les futurs échantillons. Les différents étalons protéiniques et polysaccharidiques ont été analysés en infrarouge afin d'obtenir des spectres IR de référence et de se familiariser avec les différentes caractéristiques de ces molécules aussi bien dans la forme générale de leurs spectres que dans la position des pics des principales fonctionnalités.

3.1 Validation de l'approche méthodologique : HPLC

3.1.1 Interactions hydrophobes dans la colonne

La colonne chromatographique a été étalonnée par des protéines et des polysaccharides étalons mais les masses moléculaires attribuées aux pics sont valables s'il n'y a pas d'interactions hydrophobes de l'échantillon avec la colonne. Ceci peut être vérifié par ajout d'un solvant organique dans la phase mobile. Ce solvant s'adsorbera sur les sites hydrophobes de la colonne et empêchera l'adsorption de l'échantillon par ces sites. La séparation pourra alors se faire uniquement par les diamètres hydrodynamiques des molécules de l'échantillon. Nous avons ajouté 5% de méthanol dans la phase mobile. On peut observer sur la figure 32 en trait pointillé, le profil chromatographique obtenu avec une phase mobile de concentration définie et en trait plein, le profil obtenu avec la même phase mobile additionnée de méthanol (5% en volume). Les temps de rétention ne varient que très faiblement avant 29 min. Il n'y a donc aucun effet significatif du méthanol sur les interactions induites par la colonne. Cependant pour les temps de rétention supérieurs à 29 min, 2 petits pics ont disparu avec la phase mobile contenant du méthanol. De plus les temps d'élution sont supérieurs au volume mort de la colonne. Ici, la séparation n'est donc plus uniquement basée sur le diamètre de la molécule. Des interactions hydrophobes peuvent intervenir.

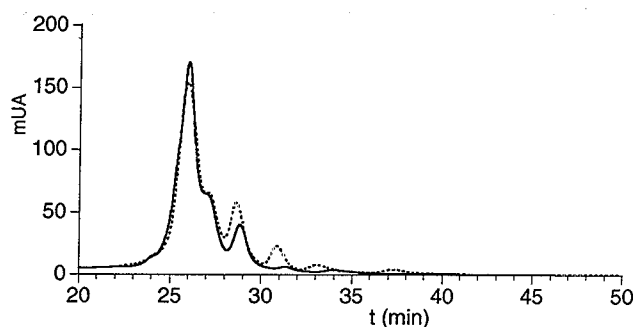


Figure 32 : Comparaison de deux chromatogrammes obtenus avec des phases mobiles différentes. L'une d'entre elles (ligne pleine) contenant du méthanol (5% v/v) afin d'éviter les interactions hydrophobes

3.1.2 Fidélité de la méthode et répétabilité du prélèvement (prélèvement, extraction, injection...)

Une étude préliminaire de fidélité et de répétabilité vise à établir dans quelle mesure les variations observées sur les chromatogrammes sont à attribuer aux phénomènes inhérents aux boues activées et dans quelle mesure il s'agit des variations apportées par la méthode d'analyse. Les définitions de ces deux concepts selon les "Techniques de l'Ingénieur"²² sont rappelées ci-dessous.

- *Fidélité d'un instrument de mesure* : aptitude d'un instrument de mesure à donner des indications très voisines lors de l'application répétée du même échantillon dans les mêmes conditions de mesure. Ces conditions comprennent : même mode opératoire de mesure, même opérateur, même équipement de mesure, utilisé dans les mêmes conditions, même lieu, répétition durant une courte période de temps.
- *Répétabilité* : étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures successives du même échantillon, effectués dans les mêmes conditions de mesure. Les conditions de répétabilité comprennent : même mode opératoire, même opérateur, même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions, répétition durant une courte période de temps, même lieu...

Ainsi nous avons étudié :

- La répétabilité de l'extraction des EPS des boues.
- La fidélité de l'injection des EPS dans le chromatographe.
- La stabilité des échantillons extraits (congélation ou non).

Le schéma du plan d'analyse est représenté ci-après (Fig. 33).

²² Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, P 100

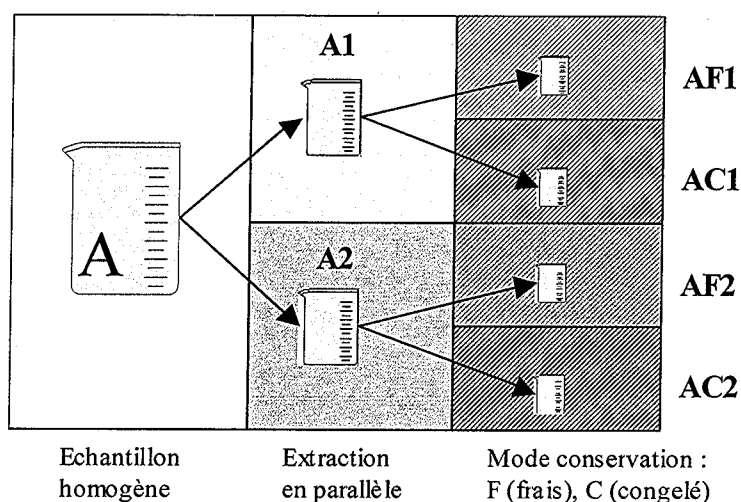


Figure 33 : schéma du plan d'analyse lors d'une extraction en parallèle d'un échantillon divisé en deux (A1 et A2), une partie de chaque extraction est conservée à 4°C (F) l'autre est congelée à -18°C (C).

Pour faire cette analyse, des extractions parallèles sur plusieurs échantillons ont été menées. Un échantillon nommé « A » a été divisé en deux parties égales. L'extraction des exopolymères a été effectuée sur ces deux échantillons notés « A1 » et « A2 ». Des échantillons des exopolymères ainsi extraits ont été conservés de deux manières différentes. Une partie a été congelée pour être utilisée ultérieurement alors que l'autre est conservée au réfrigérateur afin d'être utilisée immédiatement. Les échantillons frais ont été marqués « F » et les échantillons congelés « C ». Les graphiques ci-après représentent les différents cas décrits ci-dessus pour un échantillon.

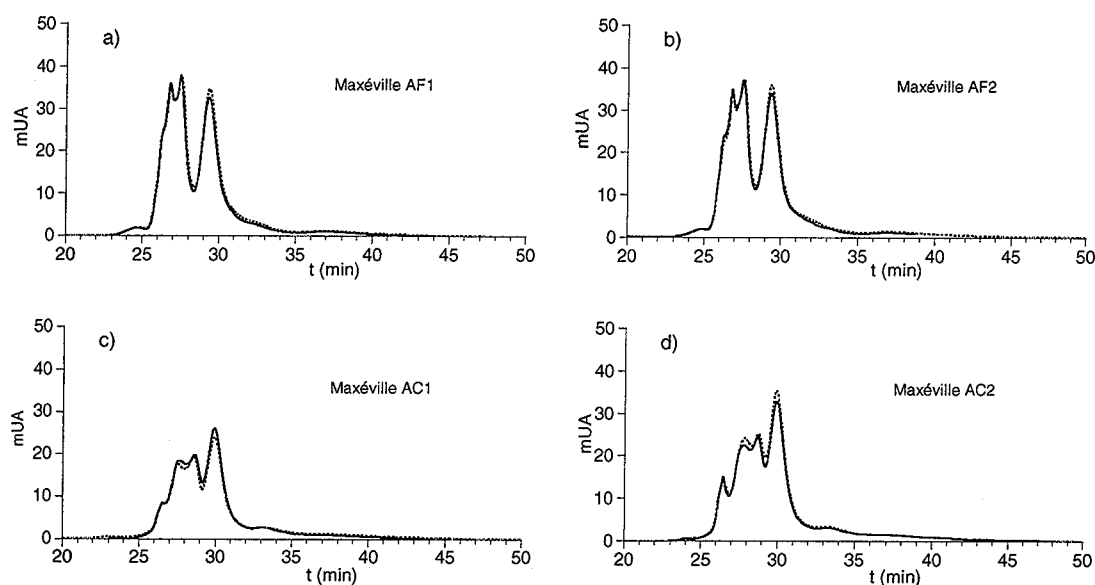


Figure 34 : Chromatogrammes obtenus lors de l'étude de répétabilité et de fidélité de la mesure. Une deuxième injection (ligne pointillée) est effectuée 1h après la première.

Les observations se feront à travers les variations de l'aire des chromatogrammes, des amplitudes des pics et éventuellement des positions des pics. La répétabilité sera testée à travers l'extraction en parallèle et les divers modes et temps de conservation : entre deux échantillons frais (AF1 et AF2), entre deux échantillons congelés (AC1 et AC2) et entre les échantillons frais (symbolisme F) et ceux congelés (symbolisme C). La fidélité de la méthode sera testée en comparant deux injections d'un même échantillon (AC1, AC2, AF1 et AF2).

Les profils des exopolymères frais (AF1 et AF2) présentés figures 34a et 34b sont des profils classiques de Maxéville : ils présentent un épaulement à environ 26 min d'élution suivi de deux pics (d'intensités quasiment équivalentes) compris entre 26 et 28 min d'élution et un pic isolé dont le maximum est atteint après 29 et 30 min d'élution. Entre les deux échantillons frais les différences sont très faibles figures 34a et 34b. Cette différence, quantifiable grâce à l'aire du profil est de 1%. La différence d'aire entre les deux échantillons congelés (AC1 et AC2) est du même ordre de grandeur (Fig. 34c et 34d). Ceci confirme une bonne reproductibilité d'extraction des EPS des boues.

Lorsque l'échantillon est congelé (symbolisme C), les modifications par rapport aux échantillons frais (symbolisme F) sont plus grandes. Les différences d'aires, entre un échantillon frais et le même échantillon congelé figures 34a et 34c ou figures 34b et 34d, sont dans ce cas, comprises entre 15 et 25%. Elles affectent l'amplitude des divers pics, en particulier des pics médians à 26 et 28 min d'élution alors que les positions des familles d'EPS à 30 min sont inchangées. L'épaulement se retrouve ainsi mieux isolé et apparaît sous la forme d'un pic maintenant bien distinct mais son amplitude a, elle aussi, diminué. Ceci met en évidence que la congélation modifie la répartition des masses molaires des EPS.

Sur chaque graphique présenté figure 34, une double injection est réalisée. La courbe figurée en pointillés sur ces graphiques nous permet de juger de la fidélité des mesures obtenues à partir de la réinjection du même échantillon. Ces deux injections sont toujours séparées d'environ 1 heure. Sur l'ensemble des chromatogrammes la différence des aires des profils sont de l'ordre de 3%. Donc, si cette différence mesurée grâce aux aires chromatographiques est due à des aléas instrumentaux, elle est négligeable dans ce laps de temps.

Cette expérience a montré que notre méthode d'extraction permet d'obtenir :

- Une bonne répétabilité de l'extraction à partir des deux échantillons homogènes et indépendants.

- Les échantillons congelés montrent une variation par rapport aux échantillons frais plus grande de l'ordre de 20%. Il est donc préférable de n'utiliser que des échantillons frais.
- Une bonne fidélité entre deux injections du même échantillon (de l'ordre d'une heure). On peut donc considérer que dans un laps de temps assez court après l'extraction, l'échantillon est stable.

3.1.3 Evolution des échantillons sur 8 jours

Les petites variations observées entre deux injections consécutives (1 h de décalage) ne permettent pas de conclure sur l'évolution d'un échantillon frais au cours du temps (Fig. 34). Pour cela il faut répéter ces injections sur plusieurs jours. Deux échantillons de deux stations différentes ont été choisis pour cela. Entre deux injections, les échantillons d'EPS filtrés à 0.22 μm afin d'éliminer les bactéries, sont conservés dans des flacons en verre, de 2 ml de contenance, dans un réfrigérateur à 4°C. A leur sortie du réfrigérateur, ils sont vivement homogénéisés avant l'injection. Dès que l'injection est effectuée, les flacons sont replacés à 4°C. Les aires des chromatogrammes pour les deux échantillons sont consignées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Evolution de l'aire des chromatogrammes pour deux échantillons.

| Echantillon de Maxéville | | Echantillon de Toul | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>t</i> (h) | Aire (mUA ²) | <i>t</i> (h) | Aire (mUA ²) |
| 0 | 4012 | 0 | 3843 |
| 4 | 4445 | 17 | 7582 |
| 20 | 6638 | 18.5 | 7905 |
| 21 | 7280 | 21 | 8216 |
| 24 | 7660 | 23 | 8918 |
| 26.5 | 8785 | 40.5 | 9575 |
| 44 | 10400 | 42.5 | 10038 |
| 48 | 10955 | 44 | 10105 |
| 51 | 11400 | 64.5 | 10823 |
| 71 | 12160 | 67.5 | 11884 |
| - | - | 113 | 11881 |
| - | - | 116.5 | 11439 |
| - | - | 137.5 | 11892 |
| - | - | 139.5 | 11915 |
| - | - | 161 | 12482 |
| - | - | 164.5 | 12530 |
| - | - | 185.5 | 12830 |

On peut immédiatement constater (Fig. 35) que le dernier pic, représentant un temps d'élution plus grand, augmente plus vite que les autres pics ; laissant entrevoir la possibilité d'apparition de produits de dégradation de petites tailles.

On remarque également figure 36 une lente mais indiscutable augmentation de l'aire des chromatogrammes obtenus au cours des jours suivants l'extraction des EPS. Cette augmentation n'est pas linéaire mais semble pouvoir être correctement modélisée par une équation de la forme :

$$y = ax^{1/2} + b \quad (5)$$

où y représente l'aire du chromatogramme en fonction du temps x ; a et b sont des coefficients propres à l'échantillon. Dans les deux cas présentés, on obtient :

$$y = 1100x^{1/2} + 2860 \quad (6)$$

pour l'échantillon de Maxéville.

$$y = 580x^{1/2} + 5540 \quad (7)$$

pour l'échantillon de Toul.

Cette forme n'est pas sans rappeler celles obtenues par Jamdar et Harikumar (2005) pour les cinétiques d'auto dégradation de leurs protéines. Cette dégradation autolytique des protéines abouti à des produits de faibles poids moléculaires (<10 kDa). Ces produits, moins compacts que la protéine d'origine pourrait exposer plus de chromophores que dans une configuration plus compacte. L'augmentation des chromophores interagissant avec le faisceau incident pourrait fournir une explication à l'augmentation de l'aire des chromatogrammes.

Devant cette évolution, on ne peut que conseiller d'injecter les EPS immédiatement après leur extraction, de les conserver à une température proche de zéro mais sans les congeler et de les garder le moins longtemps possible sur la paillasse en cas de réinjection.

Les cinétiques observées par Jambart et Harikumar (2005) dépendent de la température mais également du pH de la solution. Si l'on considère l'effet de remise à l'équilibre à température ambiante de la pièce avant chaque injection et le pH naturel de nos échantillons, on peut entrevoir une explication aux valeurs des coefficients a et b des équations 8 et 9.

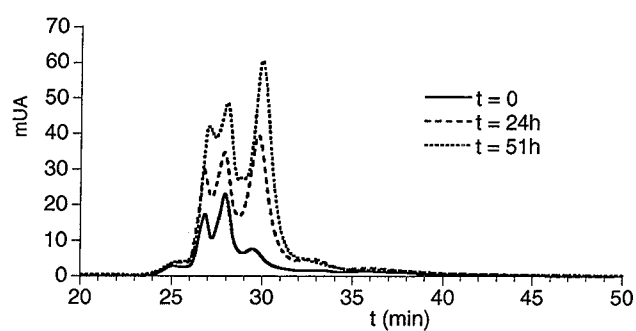


Figure 35 : Evolution des chromatogrammes de Maxéville aux temps t = 0, 24 et 51 h

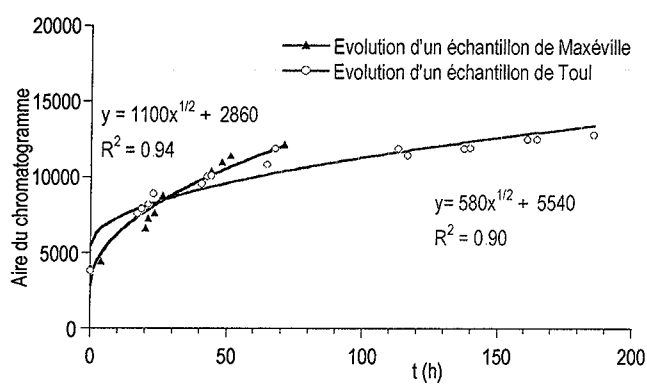


Figure 36 : Point expérimentaux et courbe de tendance de la forme $y = ax^{1/2} + b$ signifiant l'évolution des échantillons de Maxéville et de Toul jusqu'à 8 jours.

3.2 Etude des exopolymères issus des différentes stations de traitement des eaux usées : vers une signature spécifique ?

Afin de connaître les caractéristiques des EPS présents dans les floccs de boues activées, nous avons effectué une caractérisation de la matière organique prélevée dans les bassins d'aération de différentes stations ou dans le système de collecte des eaux usées de Boudonville (France).

Le but de cette étude était de comparer les exopolymères extraits pour :

- Un même bassin à différents points de prélèvement afin de visualiser l'évolution des exopolymères des boues activées au cours du traitement de l'eau usée.
- Diverses stations utilisant le procédé "boues activées".
- Des eaux usées brutes collectées mais pas traitées.
- Des stations recevant des effluents de nature différentes : urbains, ruraux, industriels, mixtes.
- Des exopolymères produits lors des situations de crise de décantation des boues activées dans une station après le salage des routes.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article sous presse à Water Research où les deux méthodes d'analyse sont exploitées. Les chromatogrammes obtenus pour une même station ont montré une remarquable stabilité lorsque les conditions de décantation étaient correctes. Cela nous a permis de choisir un chromatogramme de référence, caractéristique de cet état de référence pour chaque station. Ce sont ces chromatogrammes qui seront comparés entre eux et avec les chromatogrammes obtenus en période de mauvaise décantation. Les spectres IR des EPS obtenus pour tous ces échantillons sont également présentés sous deux formes distinctes. La première est une classification selon les natures chimiques, les principales fonctionnalités chimiques et l'association avec d'autres phases organiques ou minérales. Ce type de classification permettra de mettre en place une base de données générale des spectres infrarouges. L'autre est une classification selon l'origine du prélèvement plus apte à montrer les caractéristiques de chaque station.

3.2.1 Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined Size Exclusion Chromatography and Infrared Microscopy study.
Article : Sous presse (Water Research)

Christophe Garnier, Tatiana Görner, Bruno S. Lartiges, Sandra Abdelouhab, Philippe de Donato

Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Ecole Nationale Supérieure de Géologie, CNRS UMR 7569, Institut National Polytechnique de Lorraine, 15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France.

Abstract

High pressure size exclusion liquid chromatography and Infrared microscopy were coupled to investigate the molecular weight and nature of EPS from various activated sludges. Six main families of compounds (proteins, polysaccharides, organic acids, lipids, mineral phases) were found either as single molecule or as associations. The molecular weight of proteins varied from small 10 kDa to large 600 kDa sizes, while all polysaccharides were smaller than 1 kDa. Association of different molecules implied the presence of species large in size. The EPS chromatographic fingerprints of sludge from various origins remained stable in normal operating conditions, but were drastically modified during settling crises. In poor settling conditions, the EPS with smaller molecular sizes always prevailed and large polymers were under-represented. The extracellular polymeric substances (EPS) identified in activated sludge were collected in a chemical database which provides the basis for comparison of municipal and industrial wastewater treatment plants (WWTP).

Keywords: Exopolymers; Proteins; Polysaccharides; Chromatography; Infrared micro-spectroscopy

1. Introduction

Extracellular polymeric substances (EPS), or exopolymers, are the construction materials of microbial aggregates in activated sludge flocs or in biofilms. The term EPS includes different classes of macromolecules such as

polysaccharides, proteins, nucleic acids (phospho)lipids, and other polymeric compounds which fill and form the space between microbial cells. The EPS keep the organisms together in a three dimensional gel-like hydrated matrix by weak physico-chemical interactions (electrostatic, hydrophobic, van der Waals, and hydrogen interactions). The physicochemical properties of EPS are of interest for their contribution to the sludge flocculation and settling process. The extent of each bond contribution to the cumulative binding force depends strongly on the nature of EPS. Valuable information on the current knowledge about EPS can be found in a special issue (Flemming and Leis, 2001) and in some reviews (*e.g.* Wingender *et al.*, 1999).

The optimization of the wastewater treatment process implies an understanding of interactions on a molecular basis. However the heterogeneity and the complexity of exopolymers represent an obstacle to such studies. Due to the lack of powerful investigation methods, these studies are often limited to the observation of the global impact of EPS or of some of their components on wastewater treatment operations. The flocculating ability, the sludge settling, and their relation to EPS properties, are frequently studied but remain debated and most often the results are controversial. Polysaccharides were suggested to play a major role in flocculation due to their negatively charged groups bridged by divalent cations (Flemming and Wingender, 2001; Körstgens *et al.*, 2001; Sutherland, 1999; Higgins and Novak, 1997). However, in many studies, proteins were found to be the main component within the sludge with a 4-5 protein/polysaccharide ratio; a relationship between protein content and floc formation was also observed (Liao *et al.* 2001; Fang and Jia; 1996; Urbain *et al.* 1993). The protein contribution to flocs binding strength is explained by hydrophobic interactions and by polyvalent cation bridging both enhancing the stability of the biopolymer network (Jorand *et al.*, 1998, 1995).

The ability of EPS to interact with metallic ions is also advantageously involved in a biosorption of toxic metals such as Cd, Cu or Pb from wastewater in activated sludge treatment process. An interesting study on complexation abilities of extracted EPS was published by Guibaud *et al.* (2003), who used IR spectra to identify the presence of various complex forming groups.

EPS play an important role in the structuration and water retention of biofilms and activated sludge. The dewatering and volume reduction of large

amounts of sludge produced by wastewater treatment plants is an important problem. Advanced sludge treatment techniques (Neyens *et al.*, 2003 B97, B98 and 2004) which degrade sludge EPS substances and thus reduce the water retention, represent an economic challenge.

EPS complexity both in nature and microenvironment, involves the use of separation techniques to extract the EPS from their matrix (valuable information can be found in *e.g.* Nielsen and Jahn, 1999; Frølund *et al.* 1996). The use of size exclusion chromatography in the eighties revealed three or four families of macromolecules in extracted EPS samples in the 1 to 10³ kDa range (Forster, 1985 ; Horan and Eccles, 1986). In the last decade, the high pressure size exclusion chromatography (HPSEC) showed the presence of up to six-seven families of exopolymers (Frølund and Keiding, 1994; Frølund *et al.* 1996), but did not bring more information about the nature of macromolecules.

Recently, an original analytical approach (High Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC) combined with the Fourier transform infrared micro-spectroscopy (μ FTIR)) was used to separate and identify complex EPS (Görner *et al.*, 2003). This method has been used in the present study to inventory sludge exopolymers: (i) in one traditional wastewater treatment metropolitan plant over long periods (several months, even years) and thus in various seasonal conditions, (ii) in different plants treating domestic or (iii) industrial wastewater, and (iv) in some cases in crisis situations.

2. Materials and Methods

2.1. *Sample preparation and characterization:*

Activated sludge samples were collected from three metropolitan wastewater treatment plants: Maxéville (300000 inhabitant equivalents), Toul (24500 inh. eqs.), Epinal (58300 inh. eqs), referred to hereafter as WWTP M, WWTP T, WWTP E, respectively. The sludge samples were taken also from Boudonville sewer (Nancy) (sewer B) for comparison with municipal WWTP sludge, and from one paper mill located in Etival (paper mill E), and one beer making plant in Champigneulles (beer plant C).

The grab samples were transported to the laboratory within 2 hours and used for experiments. Different sludge characteristics were systematically measured by standard methods (Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA-AWWA-WPCF, 16th edition, 1985): pH, conductivity, organic fraction (VS [g/L]), dry solid content (TS [g/L]), Sludge Volume Index (SVI [mL/g]). The extraction procedure was adapted from Frølund *et al.* (1996): it uses a cation exchanger Dowex 50×8, 20-50 mesh H⁺ form (Fluka, France) with a four hour extraction time. Such a duration was selected from our kinetics studies as a good compromise between EPS conservation and extraction yield.

2.2. Size exclusion chromatography

The separation of extracted EPS was carried out with a Hewlett Packard 1100 Series chromatograph, equipped with a Zorbax Bio Series column (GF-250, 25 cm x 9.4 mm Agilent Technologies, France) thermostated at 25°C. The mobile phase (flowrate 0.5 mL/min) was made of 0.005 M NaCl and 0.005% NaN₃, pH 7.2 and ionic strength of 0.01. This mobile phase is better than the phosphate phase used previously (Görner *et al.* 2003), as the obtained chromatographic fractions need not be dialyzed before μ FTIR analysis. Indeed, the presence of NaCl precipitate does not interfere with organic matter recognition when using μ FTIR.

Five protein standards of molecular mass 13700, 45000, 67000, 200000 and 670000 Da (Ribonuclease, β -amylase, chicken albumin and bovine serum albumin), provided by Sigma Aldrich were injected for column calibration, all within the linear range of retention times (30 to 24.5 min). The polysaccharide standards (180, 738, 5900, 11800, 22800, 47300, 112000, 212000, 404000 et 788000 Da.) were also injected, with a linear range between 500 and 200000 Da with retention times from 26 to 14 min respectively. The column was calibrated with proteins and polysaccharides, and no molecular weight can be given for organic acids, mineral and lipids or their associations (a chemical association will affect the retention time). It is clear that the calibration provides only approximate information as proteins or polysaccharides can exhibit various structures.

The detection was carried out at 25°C with a diode array UV detector (Hewlett Packard 1100 Series) at several wavelengths (mainly at 210, 260 and 280 nm) and the chromatograms at 280 nm are presented here. The Refractive

Index Detector (Agilent 1100 Series) was also systematically used (chromatograms not shown here). All samples were filtered with 0.22 μm filters (Millipore) prior to injection (100 μL). The chromatographic analyses were always carried out within 12 hours of extraction, the prepared samples yielding reproducible chromatograms during that time (at 4°C).

2.3. Infrared micro-spectroscopy (μFTIR)

Spectral analysis was performed on IRScope I, Bruker A590 device connected with a FT-IR spectrometer (Bruker IFS55). All measurements were made in transmission mode in the 4000-600 cm^{-1} range (200 point scans, resolution $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$). One drop of each fraction separated by chromatography, was placed on a CaF_2 slide and dried on the stage of the microscope under nitrogen stream. The crystalloids thus obtained were selected by optical microscopy before being analysed in the mid IR range (4000-600 cm^{-1}). The aperture of IRScope was adjusted to the size of the crystalloids (8 to 60 μm). Polysaccharides and proteins used for chromatographic calibration also served as references for IR spectra. The biomolecules were identified from the specific IR profiles of $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ (1690-1500 cm^{-1}) and $-\text{C}-\text{O}-$ (1300-1000 cm^{-1}) valence vibrations.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic study of exopolymers

First of all, we tested the reproducibility and the kinetics of the extraction procedure to check to which extent the EPS chromatograms were influenced by sample preparation and handling (extraction, storage and injection). Previous results have shown that the extraction yield of sludge polymers with cation exchange resin depends on the extraction time and that the extraction kinetics was different for various kinds of macromolecules (Frølund *et al.*, 1996). As can be seen from Fig. 1a, the chromatographic peaks of EPS after extraction times of 1 and 4 hours were similar but with an increase in intensity. The profile of the sample extracted for 8 hours showed a significant modification of the relative peaks proportions with a higher amount of small macromolecules ($t_{\text{R}} \sim 30 \text{ min}$) compared to larger macromolecule ($t_{\text{R}} \sim 26 \text{ min}$). An extraction time of 4 hours was then selected for our studies as a compromise between the amount of the

extracted material and possible lysis due to sample handling. The reproducibility of the extraction procedure was good (Fig. 1b).

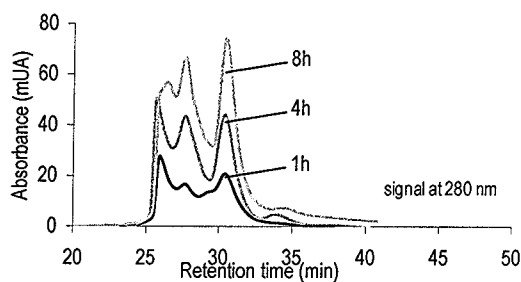


Figure 37 : Fig. 1a. EPS chromatograms obtained with various extraction times (1, 4 and 8 hours) from activated sludge collected in the WWTP M.

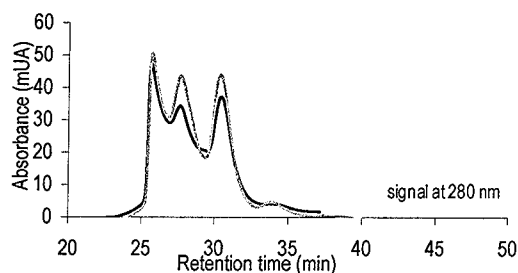


Figure 38 : Fig. 1b. Reproducibility of the extraction procedure (4 hours). The EPS chromatograms were obtained with the same sample as in Fig. 1a.

The retention times of 26, 27.5 and 30 minutes correspond to molecular sizes of about 200 kDa, 50 kDa and about 10 kDa resp. (protein calibration of the column). On all chromatograms, a small peak with a 33 min elution time was attributed to a retention mechanism other than size exclusion as V_0 is about 30 minutes.

The reproducibility of injection (Fig.2a) and the sample stability during 12 hours storage at 4°C were also tested (Fig. 2b): The similarity of chromatograms indicate that no changes were observed in the molecular weight distribution of extracted EPS. It was also checked that storage under freezing over 2 months did not affect much the EPS profile (Fig.2b). Nevertheless, the following results only show fresh samples stored under 4°C for less than 12 hours.

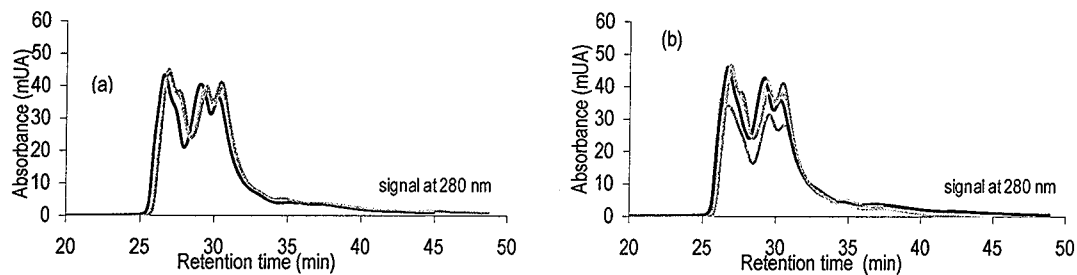


Figure 39 : Fig. 2. Reproducibility of EPS chromatograms: a) of the fresh sample injected in the morning (—), at noon (—) and in the evening (—), after storage at 4°C; b) after storage at -18°C during 2 month in four different vials under freezing, each chromatogram corresponded to one vial.

3.1.1. Study of EPS from one municipal WWTP

The WWTP M follows a classical preliminary treatment and a biological purification in several aerated tanks. In order to know whether the sludge exopolymers composition was the same at all locations of the biological degradation process, seven sampling points were studied. Seven sampling points were chosen within the aeration tanks. All EPS chromatograms were rather similar without any significant differences; Fig. 3 shows as example some typical chromatograms from sampling points N°1, N°4 and N°7. The chromatograms can be considered as similar and small differences (presence of small peaks at 34 min, or minor peak intensity variations) were due to the biological complexity of such system, but the fingerprint remained the same. The corresponding TS, VS and SVI values are listed in Table 1.

No significant difference in the EPS chromatograms was observed during two months of measurements (July-August 2001) whatever sampling location and date (chromatograms not shown because very similar to those Fig. 3). This result was unexpected considering the sampling points N°1 and 7 (inlet and outlet of wastewater) and the sludge parameters (Table 1) indicating that the biodegradation was performed between these two points (decrease of TS and VS). This suggests that the activated sludge flocs are equivalent in exopolymers in the various aeration tanks whether the liquor contains more (point N°1) or less nutrients (point N°7) available for bacterial cells. The stability of the chromatographic profile during a several week period reflected good operation conditions in the WWTP M. The weather conditions were favorable to the

bacterial cells, with temperatures in the 25-33°C range, sometimes slight raining without consequences on sludge settling, SVI values always remaining within the 50-100 mL/g range.

WWTP M was modernized in 2002 with the addition of an anoxic de-nitrification post-treatment, and the modification of the multi-tank aerobic treatment by a single tank. The EPS chromatographic fingerprint associated with the new aeration tank was slightly modified (Fig. 4a), but remained stable over a several month period afterwards (from spring to winter 2003). Frølund and Keiding (1994) observed also that various WWTPs had their typical EPS chromatographic fingerprints.

Tableau 5 : Table 1. Physical characterization of activated sludge samples corresponding to the EPS presented on Fig. 3.

| Sampling point | N°1 | N°4 | N°7 |
|-------------------|------|------|------|
| pH | 6.9 | 7.1 | 6.8 |
| Conductivity (mS) | 0.68 | 0.57 | 0.48 |
| TS (g/L) | 5.6 | 4.8 | 3.6 |
| VS (g/L) | 3.9 | 3.4 | 2.7 |
| SVI (mL/g) | 45.1 | 73.0 | 95.6 |

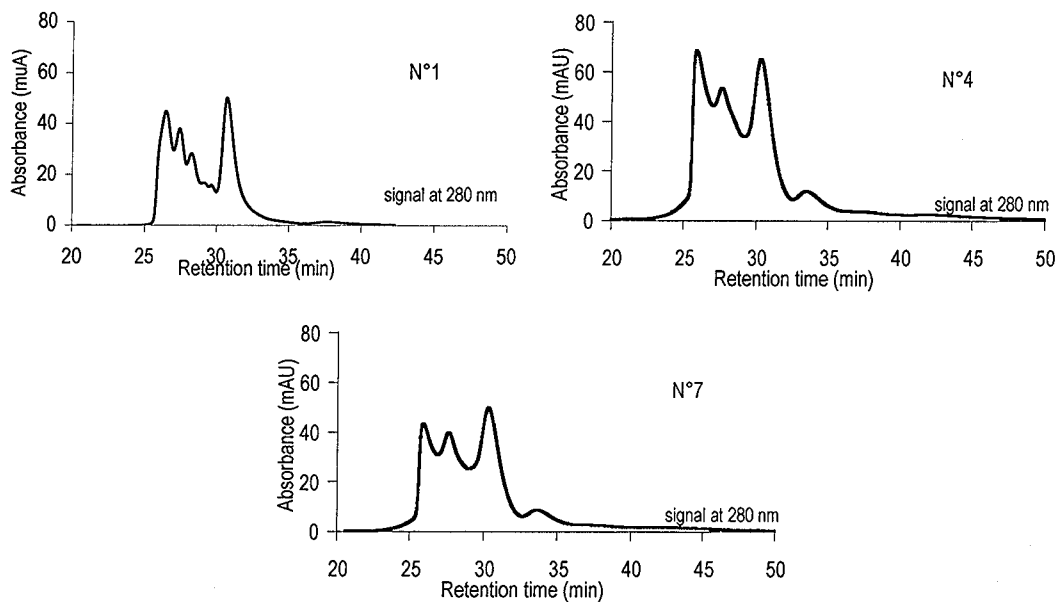


Figure 40 : Fig. 3. EPS typical chromatograms of activated sludge collected in points 1, 4 and 7 in WWTP M.

3.1.2. EPS from different municipal wastewater treatment plants: towards a EPS chromatographic fingerprint.

The EPS analysis was also carried out on activated sludge samples coming from three different WWTPs. In accordance with the results obtained at WWTP M, sampling between 2002 and 2003 revealed that each WWTP possesses its own characteristic chromatogram (Fig. 4). Important differences can be observed in these four cases in peak repartition and intensity. The WWTP M and T have the same activated sludge treatment with a primary clarifier, while the WWTP E was run during our studies without the primary treatment of floatable materials. The EPS chromatogram of WWTP E (Fig. 4c) was quite different from those of WWTP M and WWTP T and it was closer to the profile obtained from the sewer B (Fig. 4d). As a first approximation, the total area of the chromatogram can be related to the total amount of exopolymers, so Fig. 4 shows that the content in EPS was much lower in WWTP E and in the sewer B than in WWTP M and T. In the case of WWTP E, the sludge had bad settling properties (SVI ~ 250).

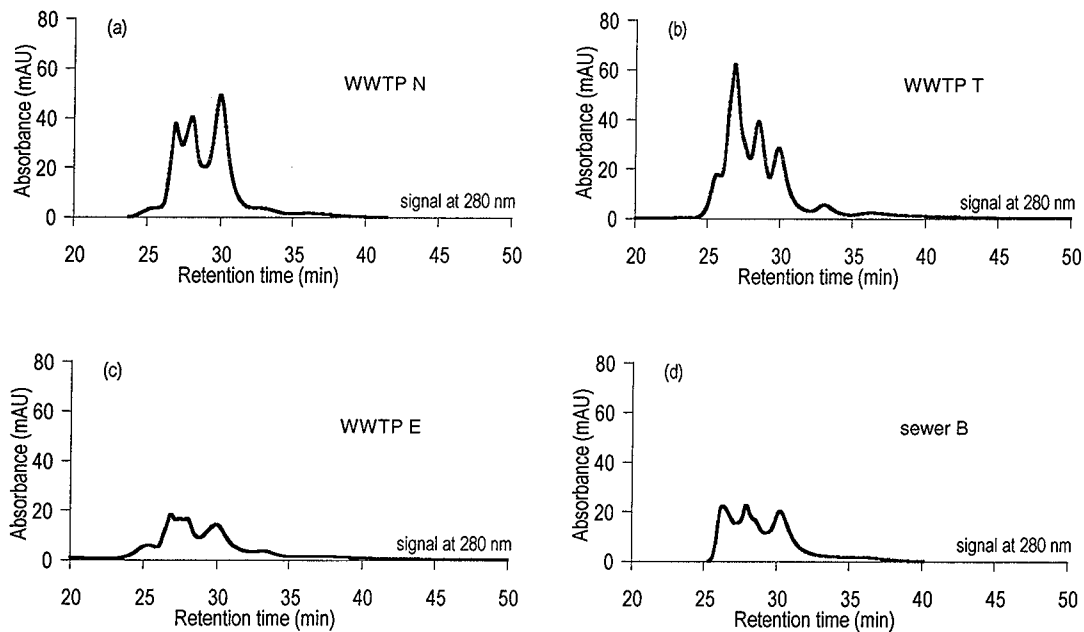


Figure 41 : Fig. 4. Comparison of typical EPS chromatograms of activated sludge from: a) WWTP M: SVI ~ 105; b) WWTP T: SVI = 78; c) WWTP E: SVI ~ 250 and d) sewer B: SVI = 86.

3.1.3. EPS from two industrial wastewater treatment facilities.

The EPS extracted from activated sludge coming from two industrial wastewater treatment facilities were also studied: one from the paper mill E (Fig. 5a) and the second one from the beer plant C (Fig. 5b). Their typical chromatographic profiles were very different from EPS observed in municipal WWTPs. In both industrial cases, the chromatograms are composed of fewer peaks with a low molecular weight dispersion (narrow peaks): the paper mill EPS presents two major peaks with t_R of 26 and 27 minutes corresponding either to ~ 200 and ~ 100 kDa respectively (protein calibration) or to small polysaccharides (≤ 1 kDa polysaccharide calibration), in the beer plant C sludge only one main peak with t_R of about 27 min was present.

Complementary microbiological studies would be necessary to explain the difference in EPS composition in industrial and municipal activated sludge composition. It is possible that the bacterial consortium is unique and characteristic for each WWTP depending on industrial activity, while in some cases the municipal WWTPs show quite similar EPS as consequence of the similarity of pollutants.

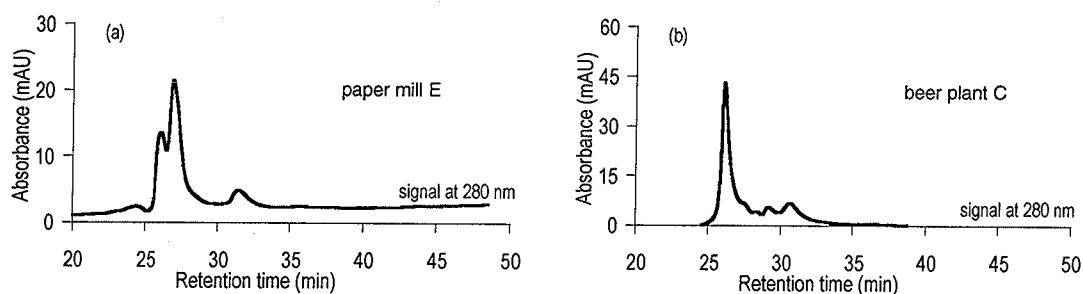


Figure 42 : Fig. 5. Typical chromatograms of EPS extracted from the activated sludge: a) paper mill E (SVI ~ 500) and b) beer plant C (SVI = 102).

3.1.4. Crisis situation

As mentioned before, the chromatographic profiles of EPS were stable over long periods of time. In January 2003 during several days the temperature fell under 0°C with snow and frost and the streets were salted. This cold period was followed by a rapid warming with heavy rains and in the WWTP T some settling difficulties were encountered. The chromatograms of extracted EPS collected at

the crisis time, one week later, and in normal operating conditions, are presented on Fig. 6a. It can be seen that the typical chromatographic profile of this WWTP was drastically modified during the crisis situation: the macromolecules of high and medium molecular weight (retention time of 26-27 min) disappeared to the benefit of smaller molecules (retention time of 30 min).

Poor sludge settling in WWTP T (SVI ~ 293) may be related to street salting, the salt contains Na^+ which can substitute Ca^{2+} involved in EPS bridging. An excess of this monovalent cation relative to divalent cations in the activated sludge leads to poor sludge settling properties [Higgins and Novak, 1997b].

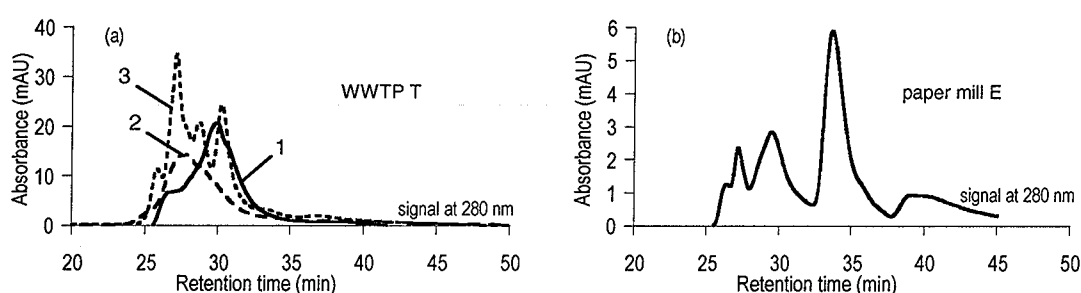


Figure 43 : Fig. 6. EPS chromatograms during crisis situations: a) WWTP T: curve 1 - crisis situation (SVI ~ 293), curve 2 - one week later (SVI ~ 260), curve 3 - normal situation. b) paper mill E (SVI ~ 900), normal situation is presented in Fig. 5.

However, it is also likely that, in crisis situation, the bacterial stress due to hostile environment (low temperature or high salt concentration) induce the formation of smaller EPS macromolecules. Normal operating conditions were progressively recovered accompanied by the re-establishment of SVI index (SVI ~ 260 one week later) and characterized by chromatographic profiles with larger EPS.

The same phenomenon was observed during a crisis situation in paper mill E. The EPS extracted from poor settling flocs (SVI ~ 900) gave a chromatogram (Fig. 6b) very different from the typical profile of this plant (Fig. 5a). Thus, two main peaks of large macromolecules with retention times of 26 and 27 minutes disappeared, again to the benefit of smaller size molecules with retention time of 30 minutes and two new broad peaks ($t_R = 34$ and about 40 min). The origin of the crisis situation was not known but floc deaggregation was clearly revealed on chromatograms. It should be mentioned that settling is more difficult in paper mill

wastewater due to the presence of many filamentous particles originating from the paper pulp. In “normal” settling conditions the SVI values are about 500, while in crisis situations they are within the 800-1000 range.

In both crisis situations described above, the amount of large polymers (present in normal operating conditions) decreased and smaller size compounds prevailed. This observation suggests that the presence of large polymers contributes to a good settleability. The role of the EPS molecular weight remains unclear. According to some authors, (Horan and Eccles, 1986; Higgins and Novak, 1997) the presence of high molecular weight polymers leads to a good quality of flocs. However, other studies showed that poor settling was associated with the presence of a large molecular weight fraction of biopolymers (Forster, 1985; Gehr and Henry, 1983). Our measurements clearly indicated that in poor settling conditions, the EPS with smaller molecular size prevail and large polymers are under-represented.

3.2. Chemical investigation of EPS by infrared micro-spectroscopy (μ FTIR)

The fractions obtained by chromatographic separation were collected for further analysis. However, within the same peak (collected fraction) various chemical species with the same hydrodynamic size can be present. The chemical analysis by μ FTIR consists in placing a drop of the collected fraction on a microscope slide and to focus the IR beam on the obtained crystallites. Actually, in the same collected fraction (often less than 1 ml), the crystallites of different chemical species were found. The μ FTIR analysis was performed on about 30 crystallites per fraction, which means that about 1200 spectra were obtained in the course of this study. We present here the μ FTIR identification of EPS found in municipal and industrial wastewater treatment facilities as a database (not yet exhaustive) to evidence the EPS complexity.

3.2.1. Toward a chemical database

The μ FTIR analysis follows several steps: selection of suitable crystallites in analyzed chromatographic fractions, identification of their chemical structure, interpretation of chemical data and classification according to different chemical species.

All data have been gathered in Table 2. Five main families were found: protein (PR), polysaccharide (PS), organic acid (OA), mineral (M) and lipid (LI)

(column 1 in Table 2). Some crystallites were chemically pure species, some were associations of several species, and as a consequence, each chemical family was separated into subfamilies (column 2 Table 2). The infrared analysis was made onto individual crystals at the micrometer scale, therefore all associations should be interpreted more like the result of strong intermolecular interactions between different chemical species rather than the presence of various chemical functionalities within the same molecule.

The capital letters used in the identification of each subfamily refer to different chemical compounds. These letters are ordered from left to right according to the decrease in their relative abundance in the case of associations. Finally, the two digits at the end provide a further discrimination inside the same subfamily (two digits are in anticipation for future addition in the database).

The main representative infrared characteristic absorption bands of chemical compounds present in subfamilies are given in column 3. The range of retention times in column 4 indicates in which chromatographic peaks the identified species were found. *e.g.*: 25-32 min means that the corresponding subfamily was found in all chromatographic peaks. A representative transmission IR profile of each reported subfamily is given in Fig. 7.

The following observations can be made concerning different chemical families:

Protein (PR):

Six different subfamilies were identified. Two are formed with pure protein (PR-10, and PR-20). The subfamily PR-20 is more characteristic of lipoprotein molecules due to the presence of long alkyl chains (bands at 2956, 2920 and 2850 cm^{-1} , Fig. 7). Other subfamilies (PR-OAS-M-10, PR-M-PS-10, PR-PS-10 and PR-PS-M-10) resulted from various chemical associations where the protein part was dominant (see amide I and II bands in Fig. 7). It should be noted that a mineral phase was often associated with these subfamilies.

Polysaccharide (PS):

Polysaccharides were also found as single compounds (PS-10, Fig. 7) or as association with others chemical species. Eight subfamilies could be distinguished: PS-OAS-M-20, PS-OAS-M-10, PS-PR-OA-10, PS-PR-OA-10, PS-10, PS-M-10, PS-M-20 and PS-PR-10.

Organic acids:

Two subfamilies were observed, a predominant one (OA-M-10) in association with an abundant carbonate phase (band at 1412 cm^{-1}) and a minor one (OA-M-20), (band at 1456 cm^{-1}).

Mineral phase (M):

Some chromatographic peaks contained kaolinite (M-10) or a carbonate phase associated with either proteins (M-PR-10), or polysaccharides (M-PS-10). A carbonate phase was also found associated with organic acid salt (M-OAS-(PR)). Typical IR spectra are given in Fig. 7.

Lipid (LI):

Only one chemical family was identified and no association with organic or mineral phase was observed. The infrared profile indicated the presence of long linear alkyl chain having a number of CH_2 groups greater than 18 (peak at 2958 , 2923 and 2853 cm^{-1}) (Fig. 7).

Others:

Two minor subfamilies were identified including organo-mineral associations of organic acid salt and polysaccharide (OAS-PS-PR-10 and OAS-PS-M-20). According to the model proposed by Stevenson (1982), these associations could correspond to humic acids.

Tableau 6 : Table 2: Infrared chemical database of EPS present in the sludge of different origins.

| Family | Subfamily Identification | Position of the main IR absorption bands ¹ (cm ⁻¹) | Chromatographic fractions ² (min) |
|----------------|--------------------------|--|---|
| Protein | PR-10 | PR(3287;1651;1547;1402) | 25-32 |
| | PR-OAS-M-10 | PR(3288;1651;1526;1408) - OAS(1576) - M(1408) | 24-26 |
| | PR-M-PS-10 | PR(3298;1651;1548) - M(1426;878) - PS(1047) | 29-32 |
| | PR-PS-10 | PR(3292;1645;1540;1399) PS(1150;1104;1075;1032) | 25-28 |
| | PR-PS-M-10 | PR(3286;1650;1548;1408) - PS(1032) - M(1408) | 29-32 |
| | PR-20 | PR(3271;1647;1540;1411) LI(2956;2920;2850;1740;1712) | 24-26 |
| Polysaccharide | PS-OAS-M-20 | PS(1161;1112;1050;1033) - OAS(1566) - M(1413) | 24-33 |
| | PS-PR-OAS-10 | PS(1053) - PR(3288;1650;1573;1413) - OAS(1573) | 27-32 (-40) |
| | PS-OAS-M-10 | PS(1053) - OAS(1576) - M(1414) | 25-32 |
| | PS-PR-OA-10 | PS(1161;1107;1060;1033) PR(3338;1651;1544;1417) - OA(1739) | 28-29 |
| | PS-10 | PS(1051) | 24-29 (-32) |
| | PS-M-10 | PS(1160;1111;1053;1033) - M(1437;865) | 25-29 (-32) |
| | PS-M-20 | PS(1193;1045) - M(1437) | 26-27 |
| | PS-PR-10 | PS(1116;1072) - PR(3377;1651;1544;1414) | 28-29 |
| Organic acids | OA-M-10 | OA(1728) - M(1412;842) | 24-32 |
| | OA-M-20 | OA(1702) - M(1456;847) | 27-28 and 34-40 |
| Mineral phase | M-10 | M(kaol(3694;3620);1420;877) | 30-40 |
| | M-PS-10 | M(1439;865) - PS(1163;1110;1057) | 29-30 |
| | M-PR-10 | M(1436;870) - PR(3280;1645;1542;1409) | 24-25 and 28-29 |
| | M-OAS-PR-10 | M(1426;879) - OAS(1598) - PR(3294;1656) | 24-25 |
| Lipid | LI-10 | LI(2958;2923;2853;1740;1710;1460;1379) | 24-26 |
| Others | OAS-PS-M-PR-10 | OAS(1593) - PS(1149;1126;1080) - M(832) PR(3331;1653;1451) | 27-28 |
| | OAS-PS-M-20 | OAS(1572) - PS(1157;1061) - M(1486) | 28-29 |
| | Undefined | (2813;2778;2706;2682) - (1664;1606) - (1372;1352) | 30-33 |

PR = protein, PS = polysaccharide, OA = organic acid, OAS = organic acid salt, M = mineral phase, LI = lipid

¹ medium position +/- 5 cm⁻¹

² Interval of retention times (min) where chromatographic fractions were sampled

3.2.2. Chemical fingerprint of EPS from various municipal and industrial wastewater installations.

Table 3 provides a first insight into the chemical composition of EPS present in sludges from various wastewater treatment facilities. It reveals that the chemical nature of the EPS differs from one plant to another. The range of retention times indicates where the subfamily appeared on chromatograms. It can then be observed that the same association or pure macromolecule was present in

different chromatographic peaks, *i.e.* with different sizes. Our column was calibrated for proteins and polysaccharides, and no molecular weight can be given for organic acids, mineral and lipids or associations (a chemical association will affect the retention time).

Tableau 7 : Table 3: Origin of sludge and main EPS chemical characteristics

| EPS origin | Family | Subfamily Identification | Retention time range (min) | Interval of molecular weight (kDa) ¹ |
|--------------|--|---|----------------------------|---|
| WWTP M | Protein and polysaccharide | PS-PR-OAS-10 PR-OAS-M-10 PR-10 | 24-26 | / 800 - 350 |
| | Protein and polysaccharide | PS-OAS-M-20 PS-PR-OAS-10 PR-10 | 26-27 | / 350 - 220 |
| | Protein, organic acid and polysaccharide | PS-OAS-M-20 PR-PS-10 PS-OAS-20 OA-M-20 | 27-28 | / / / / |
| | Polysaccharide | PS-PR-OAS-10 | 32-34 | / |
| WWTP T | Protein and polysaccharide | PR-M-PS-10 PS-10 | 24-26 | / < 1 |
| | Protein and polysaccharide | PR-10 PS-M-10 PS-10 | 26-28 | 350 - 150 / < 1 |
| | Mineral, polysaccharide and protein | M-PR-10 PS-PR-OAS-10 PR-10 | 28-29 | / / 150 - 100 |
| | Polysaccharide and protein | PS-10 PS-M-10 PR-PS-M-10 | 29-32 | < 1 / / |
| WWTP E | Lipid, polysaccharide and protein | LI-10 PR-10, PR-20 PS-10 | 24-26 | / / 1 |
| | Protein | PR-10 | 26-27 | 350 - 220 |
| | Polysaccharide | PS-OAS-10 | 27-29 and 29-32 | / |
| Sewer B | Protein | PR-PS-10 and PR-10 | 25-27 | / |
| | Polysaccharide | PS-OAS-M-10 | 27-28 | / |
| | Polysaccharide | PS-M-10 and PS-10 | 28-29 | / |
| Paper mill E | Polysaccharide | PS-OAS-10 and 20 | 25-26 | / |
| | Polysaccharide and protein | PS-OAS-20 PR-10 | 26-30 | / < 350 |
| | Mineral and polysaccharide | M-10 PS-OAS-10 and 20 | 30-33 | / / |
| Beer plant C | Polysaccharide | PS-M-10 | 25-27 | / |
| | Protein | PR-10 | 27-30 | 1 |
| | Polysaccharide | PS-10 | 30-32 | < 1 |

PR = protein, PS = polysaccharide, OA = organic acid, OAS = organic acid salt, M = mineral phase, LI = lipid

¹ molecular weight values are given according to the protein or polysaccharides calibration curve.

The EPS originating from WWTP M and T exhibit various and complex chemical associations involving protein, polysaccharide, organic acid, and mineral phases. In contrast, WWTP E and sewer B show more simple EPS chemical composition. In WWTP E, the EPS were mainly formed from lipid, protein and polysaccharide associations. WWTP E was also the only municipal WWTP containing lipids in EPS. In sewer B, the EPS were formed only from proteins, polysaccharides, or associations. Moreover, in all four cases the mineral phase

was always a carbonate phase (Fig. 7) and it was always involved in organic association.

The chemical characteristics of industrial sludge EPS (paper mill E and beer plant C) are also specific but generally more simple from a chemical point of view. The EPS coming from paper mill E sludge were formed by polysaccharides associated with proteins and a mineral phase of kaolinite-type (M-10). This can be directly correlated with the use of this mineral as a filler during paper production. This mineral was not involved in any organic association contrary to the carbonates. The EPS from beer plant C had also a specific chemical fingerprint. The main chromatographic peak (Fig. 5b, $t_R \sim 26$ min) was formed by polysaccharide associated with a carbonate phase. Pure protein and polysaccharide were also present in the fractions collected at $t_R = 27-30$ and $30-32$ min respectively but their amount was very low.

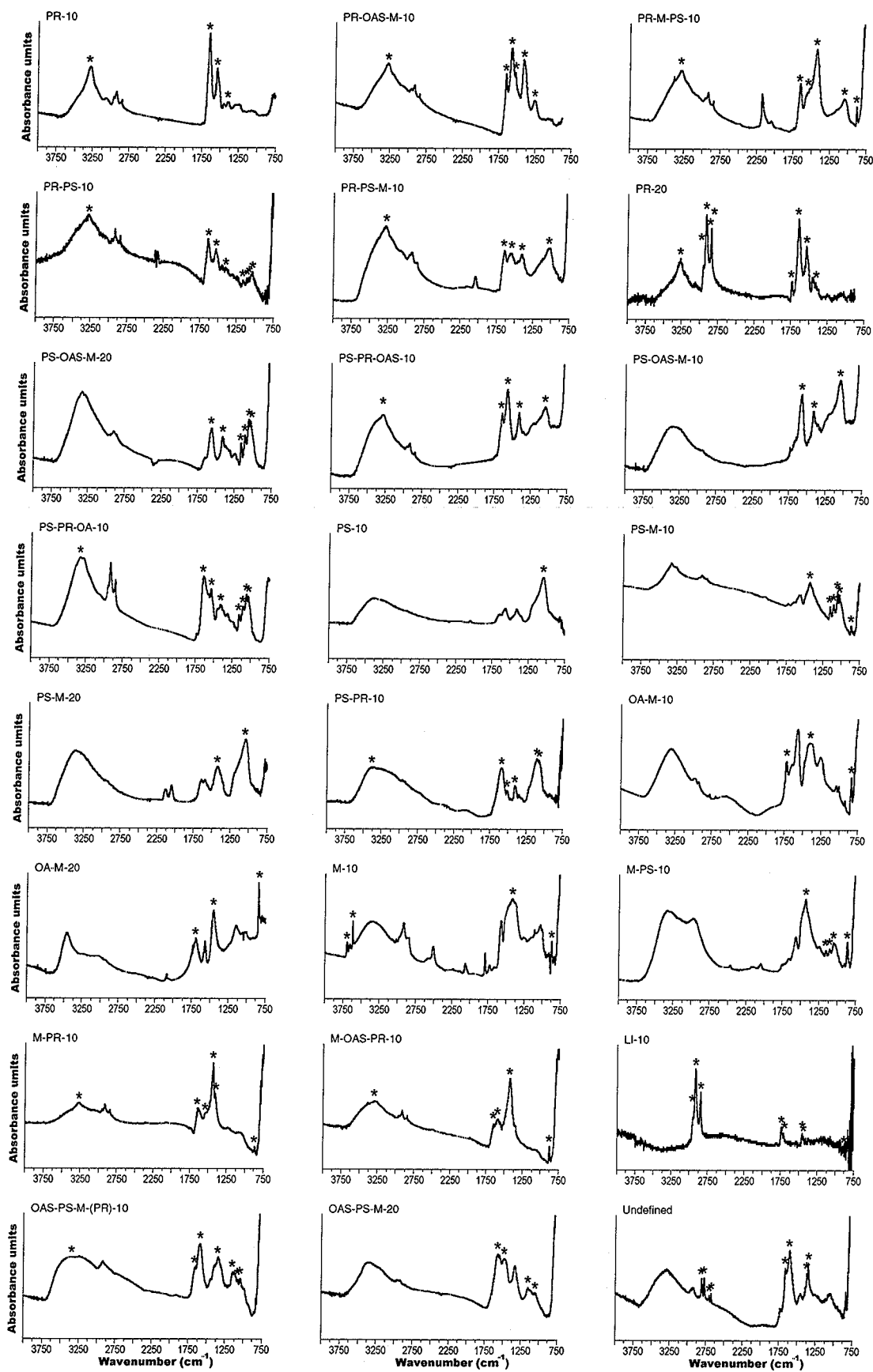


Figure 44 : Fig. 7: Typical infrared spectra of identified chemical families.

4. Conclusion

This study was performed at two levels: (i) macroscopic chromatographic approach which allowed to screen the macromolecules of various sizes and (ii) microscopic spectroscopic approach to identify chemical species or more often their association. Several conclusions can be drawn:

At the macroscopic level: The EPS from various municipal WWTPs possess their own chromatographic fingerprints which differ from those obtain from industrial WWTPs. In crisis situation, the chromatographic profiles strongly differ from those obtain in normal situation.

The EPS composition remains relatively constant over a long period of time (several months) if some outside impact does not disturb the existing microbial equilibrium. In poor settling conditions, the EPS with smaller molecular size prevail and large polymers are underrepresented.

The molecular weights of pure proteins varied from small 10 kDa up to large 600 kDa sizes, while all polysaccharides were smaller than 1 kDa. The associations of different molecules implied the presence of large size species.

At microscopic level: Chemical characterization of all chromatographic peaks by infrared microscopy has provided the basis of a chemical database of sludge exopolymers. This database is organized into 6 main families (Protein, Polysaccharide, Organic acids, Mineral phase, Lipid and Other) subdivided in 6, 8, 2, 4, 1 and 3 subfamilies. The most abundant compounds were proteins and polysaccharides, pure or in many associations which can be interpreted as the result of strong intermolecular interactions between different chemical species. The total binding energies between EPS molecules multiply with the large number of binding sites available in the macromolecules and add up to bond values exceeding those of covalent C-C bonds (Flemming and Wingender, 2001). This could clearly be seen at the microscopic level, where beside pure species, many associations were identified.

After this important step of data collection, future work is required to interpret flocculation and settling in terms of hydrodynamic size and chemical nature of exopolymers. The database can be used to provide a better understanding in EPS studies of structural, ecological or technical aspects (adhesion, settling, colligative effects, structure modelling, dewatering...).

Acknowledgments:

The authors wish to thank the directors of the different municipal and industrial WWTPs for their authorization and collaboration in the sludge sampling.

References:

- Fang, H.H.P, Jia X.S., 1996. Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludge. *Biotechnol. Technol.* 10, 803-808.
- Flemming, H.-C., Leis, A., (Editors) 2001. Extracellular polymeric substances-the construction material of biofilms. *Water Sci. Tech.* 2001, Vol. 43. ISSN 0273-1223.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43. 1-8.
- Forster, C.F., 1985. Factors involved in the settlement of activated sludge I. Nutrients and surface polymers. *Water Res.* 19, 1259-64.
- Frølund, B. Keiding K., 1994. Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 708-716.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular sludge using cation exchange resin. *Water Res.* 33,1749-1758.
- Gehr, R., Henry, J.G., 1983. Polymer dosage control in dissolved air flotation. *J. Environ. Eng.* 109, 448-65.
- Görner, T., de Donato, Ph., Ameil, M.E., Montarge-Pelletier, E., Lartiges, B.S., 2003. Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Res.* 37, 2388-2393.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., M. Baudu, 2003. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, 52, 1701-1710.
- Higgins, M.J., Novak, J.T., 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng.* 123, 479-485.
- Higgins, M.J., Novak, J.T., 1997b. The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: laboratory results. *Wat. Env. Res.*, 69, 215-224.
- Horan, N.J., Eccles, C.R., 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludge. *Water Res.* 20, 1427-1432.

- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J., 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* 29, 1639-1647.
- Jorand, F., Boué-Bigné, F., Block, J.C., Urbain, V., 1998. Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Technol.* 37, 307-315.
- Keiding, K., Nielsen, P.H., 1997. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effect of ionic composition. *Water Res.* 31, 1665-1672.
- Körstgens, V., Flemming, H.-C., Wingender, J., Borchard W., 2001. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 43, 49-57.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, G., Leppard, G.G., Liss, S.N., 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res.* 35, 339-350.
- Neyens, E., Baeyens, J., 2003. A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *J. Hazard. Mater.* 98B, 51-67.
- Neyens, E., Baeyens, J., Creemers C, 2003. Alkaline thermal sludge hydrolysis. *J. Hazard. Mater.* B97, 295-314.
- Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R., De heyder, B., 2004. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *J. Hazard. Mater.* 106B, 83-92.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., 1999. Extraction of EPS. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., editors. *Microbial Extracellular Polymeric Substances; characterization, structure and function*. Berlin, Springer Verlag. p. 50-69.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York, Wiley and sons., p. 443
- Sutherland, I.W., 1999. Biofilm exopolysaccharides. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., (Editors). *Microbial extracellular polymeric substances; characterization, structure and function*. Berlin, Springer, 73-93.
- Urbain, V., Block, J.C., Manem, J., 1993. Bioflocculation in activated sludge: An analytical approach. *Water Res.* 27, 829-838.
- Wingender, J., Jäger, K.E., Flemming, H.-C., 1999. Interaction between extracellular polysaccharides and enzymes. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., (Editors). *Microbial extracellular polymeric substances; characterization, structure and function*. Berlin, Springer, 1-19.

3.2.2 Base de données IR relative aux exopolymères

Cette partie reprend de façon plus détaillée les éléments de la base de données préalablement introduite par Garnier *et al.* (2005) Wat. Res.

Les différentes fractions collectées en sortie de détecteur sont des mélanges de matières organiques ayant le même temps d'élution. La cristallisation d'une goutte de ces fractions permet d'obtenir des cristaux analysables par la μ FT-IR. Environ 30 cristallites par fraction sont soumis au rayonnement infrarouge. A la fin de cette thèse, c'est donc environ 1200 spectres qui ont été acquis. Cette tâche est inexhaustible et la comparaison des spectres pourrait en devenir fastidieuse malgré la sélection des spectres les plus représentatifs. Une base de données avec un système de recherche apparaît donc comme indispensable. Cette base de données et les divers composants sélectionnés vont donc être décrit dans ce chapitre et sont présentés tableau 8.

3.2.2.1 Conception de la base de données

Les spectres les plus représentatifs de chaque station sont sélectionnés et stockés dans une bibliothèque de spectres gérée par le logiciel Opus. Pour l'instant 25 spectres ont été sélectionnés pour fonder cette base de données. Celle-ci est bien sûr évolutive puisque de nouveaux spectres peuvent être ajoutés à tout moment. Un numéro d'entrée est attribué à ces spectres et toute nouvelle entrée incrémente ce chiffre sans perturber l'édifice de la base de données.

Cette base de données (Tab. 8) est un ensemble structuré d'informations non redondantes dont l'organisation est régie par les caractéristiques décrites précédemment à propos des différentes familles d'exopolymères. Chaque entité pure sera donc marquée de une ou plusieurs lettres correspondant à sa classe (PR pour protéine; PO pour polysaccharide; SAO et AO pour sel d'acide organique et acide organique; M pour minéral inorganique, *etc.*). Dans le cas d'un mélange des différentes familles d'exopolymères, on utilise un classement en sous-famille. La classe la plus abondante est placée en premier, puis selon leur prépondérance, suivent les autres constituants présents. Les lettres utilisées pour les sous-familles font référence à la nature des EPS de la même manière que les familles. Si la dénomination n'existe pas encore, ces lettres ou succession de lettres, sont suivies du numéro 10. Si la dénomination existe cette valeur par défaut est incrémentée de 10 en 10.

Tableau 8 : Base de données spectrales des EPS présents dans les boues de différentes origines (Garnier *et al.* 2005).

| Family | Subfamily Identification | Position of the main IR absorption bands ¹ (cm ⁻¹) | Chromatographic fractions ² (min) |
|----------------|--------------------------|---|--|
| Protein | PR-10 | PR(3287;1651;1547;1402) | 25-32 |
| | PR-OAS-M-10 | PR(3288;1651;1526;1408) - OAS(1576) - M(1408) | 24-26 |
| | PR-M-PS-10 | PR(3298;1651;1548) - M(1426;878) - PS(1047) | 29-32 |
| | PR-PS-10 | PR(3292;1645;1540;1399) - PS(1150;1104;1075;1032) | 25-28 |
| | PR-PS-M-10 | PR(3286;1650;1548;1408) - PS(1032) - M(1408) | 29-32 |
| | PR-20 | PR(3271;1647;1540;1411) - LI(2956;2920;2850;1740;1712) | 24-26 |
| Polysaccharide | PS-OAS-M-20 | PS(1161;1112;1050;1033) - OAS(1566) - M(1413) | 24-33 |
| | PS-PR-OAS-10 | PS(1053) - PR(3288;1650;1573;1413) - OAS(1573) | 27-32 (-40) |
| | PS-OAS-M-10 | PS(1053) - OAS(1576) - M(1414) | 25-32 |
| | PS-PR-OA-10 | PS(1161;1107;1060;1033) - PR(3338;1651;1544;1417) - OA(1739) | 28-29 |
| | PS-10 | PS(1051) | 24-29 (-32) |
| | PS-M-10 | PS(1160;1111;1053;1033) - M(1437;865) | 25-29 (-32) |
| | PS-M-20 | PS(1193;1045) - M(1437) | 26-27 |
| | PS-PR-10 | PS(1116;1072) - PR(3377;1651;1544;1414) | 28-29 |
| Organic acids | OA-M-10 | OA(1728) - M(1412;842) | 24-32 |
| | OA-M-20 | OA(1702) - M(1456;847) | 27-28 and 34-40 |
| Mineral phase | M-10 | M(kaol(3694;3620);1420;877) | 30-40 |
| | M-PS-10 | M(1439;865) - PS(1163;1110;1057) | 29-30 |
| | M-PR-10 | M(1436;870) - PR(3280;1645;1542;1409) | 24-25 and 28-29 |
| | M-OAS-PR-10 | M(1426;879) - OAS(1598) - PR(3294;1656) | 24-25 |
| Lipid | LI-10 | LI(2958;2923;2853;1740;1710;1460;1379) | 24-26 |
| Others | OAS-PS-M-PR-10 | OAS(1593) - PS(1149;1126;1080) - M(832) - PR(3331;1653;1451) | 27-28 |
| | OAS-PS-M-20 | OAS(1572) - PS(1157;1061) - M(1486) | 28-29 |
| | Undefined | (2813;2778;2706;2682) - (1664;1606) - (1372;1352) | 30-33 |

PR = protein, PS = polysaccharide, OA = organic acid, OAS = organic acid salt, M = mineral phase, LI = lipid

¹ medium position +/- 5 cm⁻¹

² Interval of retention times (min) where chromatographic fractions were sampled

Traduction de la légende :

PR = protéine, PS = polysaccharide, OA = acide organique ou AO, OAS = sel d'acide organique ou SAO, M = phase minérale, LI = lipide

¹ position médiane +/- 5 cm⁻¹

² Intervalle du temps de rétention (min) où les fractions chromatographiques ont été identifiées.

3.2.2.2 Système de gestion de la base de données

OPUS 2.3 commercialisé par la société Bruker est le logiciel de traitement et de stockage des données qui joue le rôle d'interface entre les utilisateurs et la base de données. Il permet de manipuler, d'interroger les spectres d'une base de données et d'obtenir les informations liées aux spectres. La recherche de spectres de la base de données à partir d'un spectre quelconque est assurée par la combinaison de deux algorithmes de recherche nommés "similitude" et "identité" mais dont les critères de recherche ne sont pas explicités dans les brochures de l'appareil.

3.2.2.3 Caractéristiques des spectres IR

La μ FT-IR est utilisée pour identifier, comparer et classer les exopolymères contenus dans chaque fraction à analyser. Pour ce faire, leur spectre infrarouge est déterminé par des pics et des domaines vibrationnels dont la position est caractéristique d'une liaison ou d'un ensemble de liaisons. L'ensemble de ces bandes permet d'identifier la nature des molécules soumises au rayonnement IR. Dans les paragraphes suivants seront présentés les grandes zones des spectres dans l'IR moyen et les positions des principales bandes ou pics caractéristiques de la matière organique potentiellement présente dans les EPS.

Axes et grandes zones des spectres IR présentés.

Sur les spectres infrarouges l'absorption du rayonnement IR est représenté en fonction du nombre d'onde ($\bar{\nu}$). L'absorbance A est égale à l'intensité de rayonnement I n'ayant pas traversé la cellule de mesure par rapport au rayonnement incident I_0 selon la loi :

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (8)$$

Quant au nombre d'onde (cm^{-1}), il est égal à l'inverse de la longueur d'onde. Les spectres présentés [$4000 ; 750 \text{ cm}^{-1}$] couvrent en partie l'infrarouge moyen [$4000 ; 400 \text{ cm}^{-1}$] puisque l'utilisation de lames de fluorite en tant que support ne permet d'informations correctes en deçà de $830\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$: sa fenêtre de mesure couvrant l'intervalle [$76900 ; 830 \text{ cm}^{-1}$].

Un spectre IR peut être découpé en plusieurs zones caractéristiques de certains types de vibrations.

- Entre 3500 et 2500 cm^{-1} s'exprime les vibrations d'élongations entre un atome tel que O, N, ou C et un atome d'hydrogène.
- L'intervalle $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ est le domaine des triples liaisons.

- L'intervalle 2000 - 1500 cm^{-1} est le domaine des doubles liaisons C=C et C=O en particulier dans les exopolymères.
- L'intervalle 1500 - 1250 cm^{-1} pour les vibrations de déformation C-H.
- L'intervalle 1250 - 1000 cm^{-1} pour vibrations d'élongation C-C et C-O ou entre deux hétéroatomes.
- Les nombres d'ondes <1000 cm^{-1} pour les déformations C-H et C-X.

Protéines

La fenêtre 1800 à 1500 cm^{-1} est, dans le cas des peptides, dominée par les bandes Amide I et II des protéines et des peptides. La bande Amide III se situe aux alentours de 1400 cm^{-1} . Chacune de ces bandes sont des combinaisons des vibrations d'élongations ou de vibration des liaisons mises en jeu dans la liaison peptidique. Les liaisons concernées sont donc C-O, C-N, N-H, N-C $_{\alpha}$. Où C $_{\alpha}$ indique le carbone asymétrique de la liaison peptidique.

L'intervalle [3000 ; 2800] cm^{-1} est le siège des vibrations de valence de -CH $_3$; -CH $_2$. Le rapport entre les bandes CH $_2$ et CH $_3$ des spectres sont caractéristiques de la longueur de la chaîne aliphatique (Barrès *et al.* 1987), de leur ramification ou de leur cyclicité. Les acides aminés ont des chaînes courtes ou pas de chaîne de tout. Même considéré globalement au sein de la protéine, le rapport CH $_2$ /CH $_3$ ne pourra être très élevé. Arbitrairement les protéines présentant un rapport CH $_2$ /CH $_3$ supérieur à 10 seront considérées comme des lipoprotéines.

Six EPS majoritairement protéiniques ont été identifiés. Deux sont formés de protéines pures (PR-10 et PR-20) mais la famille PR-20 pourrait être considérée en tant que lipoprotéine à cause de ses longues chaînes aliphatiques (bande à 2956, 2920 et 2850 cm^{-1} ; Fig. 47-48). Les autres sous-familles (PR-SAO-M-10, PR-M-PS-10, PR-PS-10 PR-PS-M-10) résultent d'associations avec d'autres phases organiques et minérales ou les protéines sont majoritaires. Les photos 1, 2 et 3 de la figure 46, présentée ci-après, sont caractéristiques des protéines.

Polysaccharides

Les fonctions qui les caractérisent (-OH, C=O des cétones ou des aldéhydes) et leur polymérisation par le biais de la liaison osidique -C-O-C- permet de les caractériser par l'absorption du rayonnement IR. La fenêtre comprise entre 1250 à 1000 cm^{-1} est une région dominée par les absorptions engendrées par cette liaison osidique.

L'un de ces polysaccharides est également présent en phase pure (PS-10) ou en association avec d'autres espèces chimiques. Sept sous-familles ont été identifiées : PS-SAO-M-10, PS-AOS-M-20, PS-PR-AO-10, PS-M-10, PS-M-20 et PS-PR-10 (Fig. 49-50).

Les photos 4, 5 et 6 de la figure 46, présentée ci-après, sont caractéristiques des protéines.

Acides organiques et sels d'acides organiques : acides humiques (AH) ?

Les acides humiques sont produits lors de la décomposition de la matière organique. Les conditions environnementales et la nature de la matière organique d'origine vont impliquer une très grande variabilité dans la structure et la composition de ces acides humiques. On trouvera donc dans cette matière toutes sortes de fonctionnalité chimique. Le modèle proposé par Stevenson (1982) (Fig. 45) représente les acides humiques comme des macromolécules complexes où les groupements phénoliques sont substitués par des composés aliphatiques. Ces macromolécules contiennent également des fractions de composés peptidiques et polysaccharidiques. Ce modèle montre de nombreuses fonctions quinones, cétones, aldéhydes, alcools et carboxyliques. Les spectres auront donc une grande complexité mais auront un nombre de fonctions acides bien plus grand que dans les protéines ou que dans les polysaccharides.

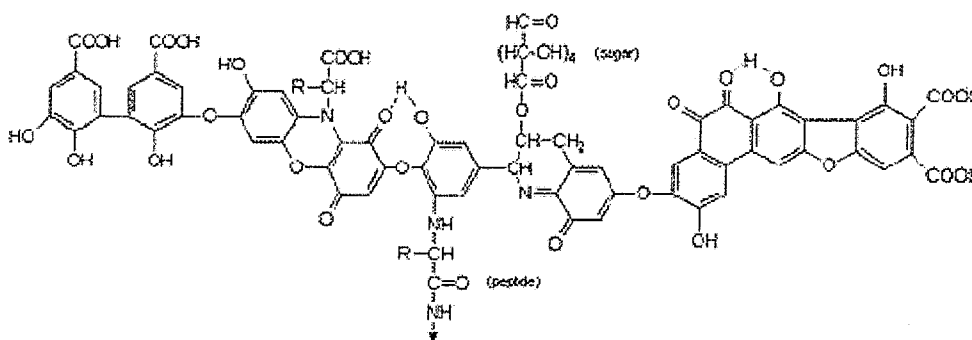


Figure 45 : Modèle d'acide humique de Stevenson (1982)

On trouvera donc toutes les bandes d'absorption de la matière organique présentées dans ce chapitre : protéines, polysaccharides, lipides (Kappler *et al.*, 2001 ; Galantini *et al.*, 2004 ; Guibaud *et al.*, 2005). Les fonctions qui permettront de différencier par leur abondance et leur association les acides humiques sont essentiellement les fonctions phénoliques et carboxyliques. Sur les acides humiques décrites par Caner *et al.* 2003, Galantini *et al.* (2004) et Guibaud *et al.* (2005) les bandes des acides carboxyliques sont

positionnées à environ 1720 et 1230 cm^{-1} , et les principales structures aromatiques (Galantini *et al.*, 2004) à environ 1610 cm^{-1} .

Deux sous-familles, incluant des associations organo-minérales complexes de sels d'acides organiques (SAO), des polysaccharides, de carbonate et en plus faible quantité des protéines, (notée SAO-PS-M-PR-10 et SAO-PS-M-(PR)-20) pourraient correspondre à cette description. Ces entrées pourraient donc être notées AH-10 et AH-20. Deux autres spectres, notés AO-M-10 et AO-M-20 (Fig. 51), sont classés parmi les acides organiques (AO). Les photos 7, 8 et 9 de la figure 46, sont caractéristiques des associations organo-minérales.

Les lipides

Les acides gras sont des acides carboxyliques à l'extrémité d'une chaîne latérale non polaire (qui peut être : saturée, linéaire, ramifiée ou cyclique) ou d'une chaîne latérale polaire (fonctions alcools, cétoniques ou acides). L'intervalle [3000 ; 2800 cm^{-1}], siège des vibrations de valences de $-\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2$ qui sont caractéristiques de la longueur de la chaîne aliphatique, de leur ramification ou de leur cyclicité.

La vibration d'élongation de la liaison $\text{C}=\text{O}$ est observable pour des nombres d'onde compris entre 1800-1740 cm^{-1} . Elle est généralement plus large et plus intense que celle des aldéhydes et des cétones. La bande d'élongation de la liaison $\text{O}-\text{H}$ est souvent large et intense, si bien qu'elle se superpose aux vibrations d'élongations des $\text{C}-\text{H}$ vers 3000 cm^{-1} . Dans les cas des sels d'acides, la fonction terminale COO^- est obtenue par déprotonation de la fonction acide. Cette déprotonation entraîne la disparition de la liaison $\text{O}-\text{H}$. Cependant en raison de l'existence d'un phénomène de résonance entre les liaisons restantes, on peut considérer que cette fonction chimique n'est pas constituée d'une liaison $\text{C}=\text{O}$ et d'une liaison $\text{C}-\text{O}$ mais plutôt de deux liaisons $\text{C}-\text{O}$ dotées d'un caractère de liaison de 1.5. L'ion carboxylate engendrera donc une forte bande d'élongation asymétrique vers 1650-1550 cm^{-1} et une plus faible vers 1400 cm^{-1} .

Seulement une famille chimique, sans association avec des phases organiques ou minérales, a été identifiée. Le spectre de cette phase révèle la présence d'une longue chaîne aliphatique dont le nombre de CH_2 pour 1 CH_3 est supérieur à 18.

Les acides nucléiques (AN)

Les macromolécules d'ADN, supports de l'information génétique, sont présentes dans le noyau des cellules bactériennes, mais cette molécule sera libérée lors de la lyse cellulaire. Elle est donc susceptible de faire partie des EPS extraits par notre méthode. L'unité d'acide nucléique est constituée d'un pentose (sucre à cinq carbones : le

désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN) et d'une base organique. Les bases sont des composés azotés cycliques. On rencontre dans les brins d'ADN les bases suivantes : la thymine, la cytosine, l'adénine, la guanine. Dans l'ARN, l'uracile remplace la thymine (Gallien, 1976). Ces unités sont reliées entre elles par des groupements phosphates. Les principales bandes d'absorption de l'ADN sont provoquées par :

- Les groupements phosphates dont les vibrations d'élongations symétriques et asymétriques sont positionnées par He *et al.* (2004) à 1053 cm^{-1} pour ν_s , 1213 cm^{-1} pour ν_a . Kagemoto *et al.* (1996) placent ν_s à 1089 cm^{-1} et ν_a à 1226 cm^{-1} .
- Les vibrations de la liaison C=N du ribose à 1000 cm^{-1} (He *et al.*, 2004).
- Et pour les bases, des vibrations C₆=O de la guanine et C₄=O de la thymine à 1644 cm^{-1} (He *et al.*, 2004).

Minéraux

Qu'ils proviennent d'échantillons de boues urbaines ou de boues industrielles, les EPS sont très souvent associés avec des phases minérales.

Dans l'industrie papetière, kaolin, carbonate de calcium, talc, dioxyde de titane, sont souvent utilisés en temps que charges minérales ou lors des étapes de finition tel que le couchage. Ces charges minérales améliorent les caractéristiques du papier. En effet, le couchage consiste à déposer sur une ou deux faces du papier un enduit à base de pigments fins. La surface rugueuse et macroporeuse est alors lissée; l'aspect, l'imperméabilité ou le toucher du papier ainsi modifiés. Les très faibles dimensions de ces particules, leur structure, leur capacité d'échange cationique, leur surface spécifique et leurs différents sites énergétiques, les rendent très réactives vis-à-vis des molécules et des autres particules les environnant. Ces particules parfois d'une taille de l'ordre du nanomètre pourront s'associer aux exopolymères et traverser la colonne de chromatographie. Ces minéraux sont alors détectables par IR.

Les quatre vibrations d'élongation des O-H, présentes sur les spectres infrarouges des kaolinites, sont souvent utilisées pour la caractérisation de ce minéral. La plus caractéristique de ces bandes, proche de 3695 cm^{-1} , est accompagnée, dans les cas des kaolinites, de trois autres pics à 3670 , 3650 et 3615 cm^{-1} . Le massif de vibration d'étirement de Si-O, se trouve quant à lui, dans le domaine 1150 à 950 cm^{-1} . La bande positionnée à 778 cm^{-1} est provoquée par les déformations de la liaison Si-O. Les bandes associées aux carbonates se trouvent, quant à elles, entre 1450 et 1410 cm^{-1} et environ 780 cm^{-1} . Ces deux phases ont été identifiées seules ou en association avec d'autres phases organiques ou minérales dans les EPS étudiés (Fig. 54).

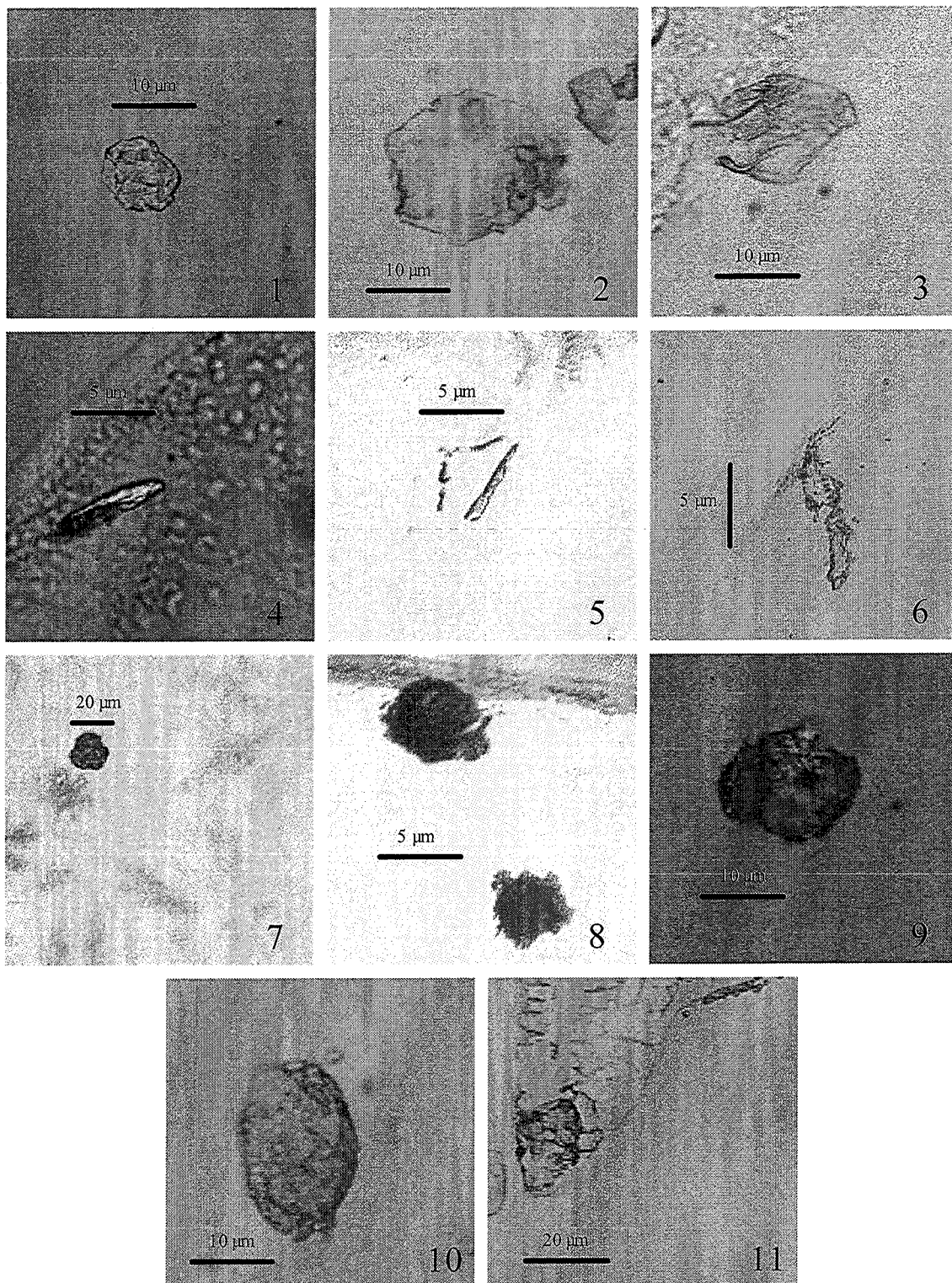


Figure 46 : Exemples de microcristalites obtenus : les photos 1, 2 et 3 sont des protéines pures ; 4, 5 et 6 les photos sont des polysaccharides purs ; les photos 7, 8 et 9 sont des associations organo-mimérales ; La photo 10 est une association de protéine-polysaccharide. Le cristallite de la photo 11 a un spectre infrarouge pouvant être attribué à un acide humique.

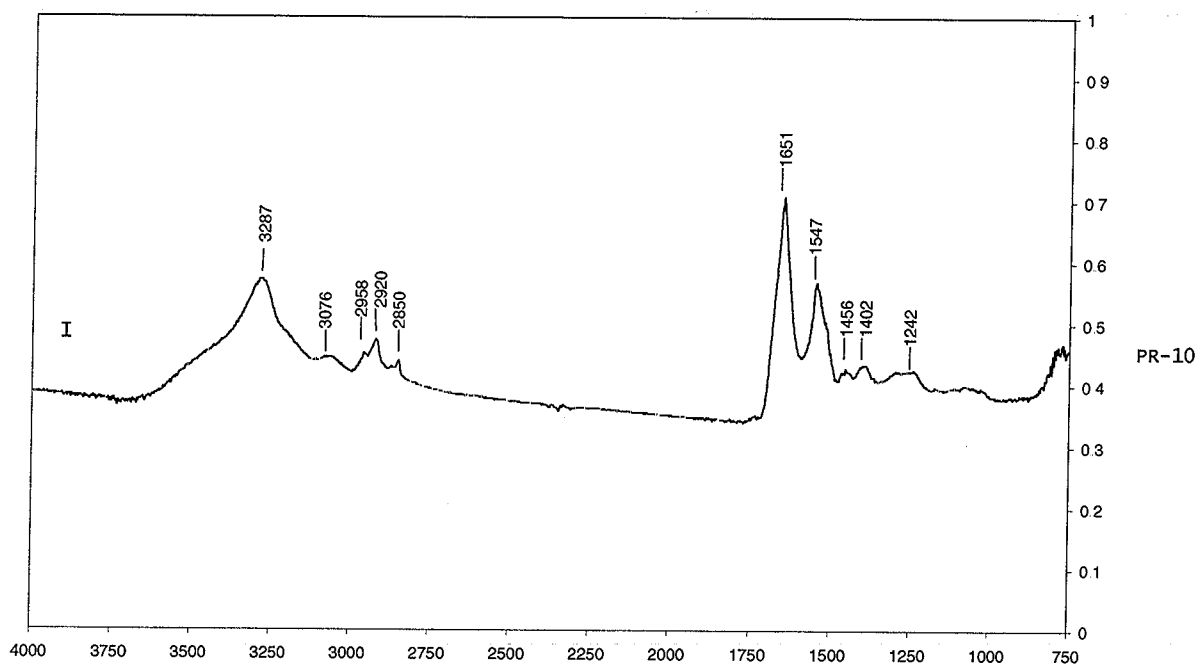


Figure 47 : Spectre correspondant à l'entrée numéro I de la base de données d'une protéine pure.

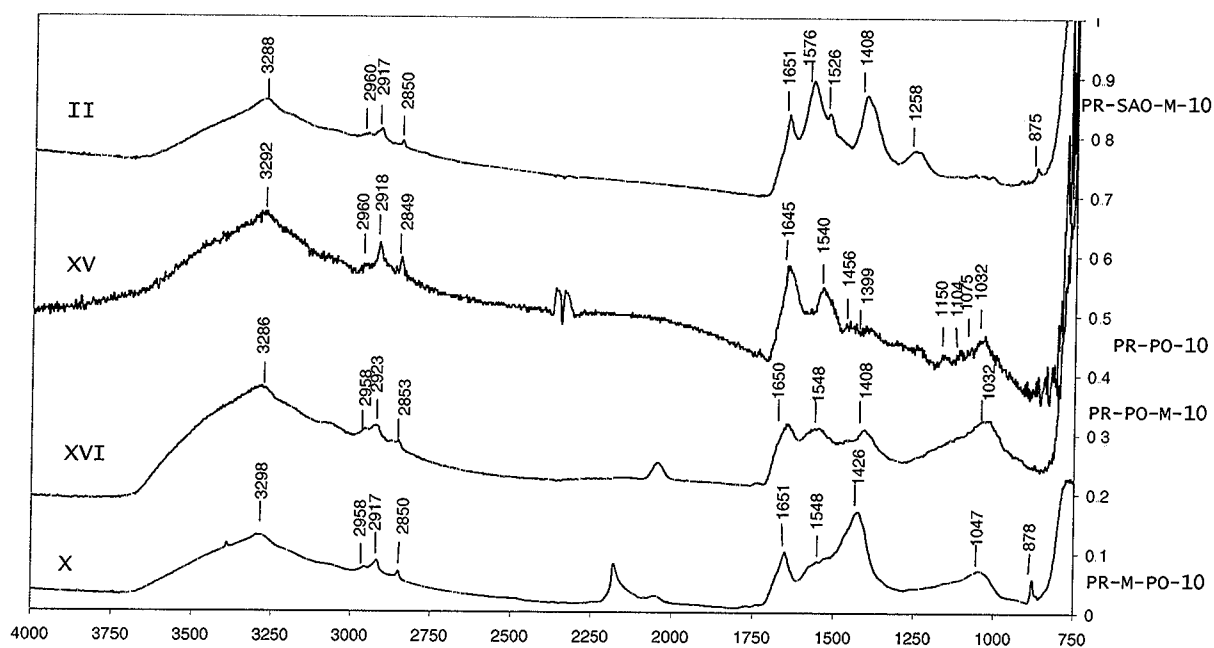


Figure 48 : Spectres correspondant aux entrées II, X, XV et XVI de la base de données de protéines mélangées à d'autres phases.

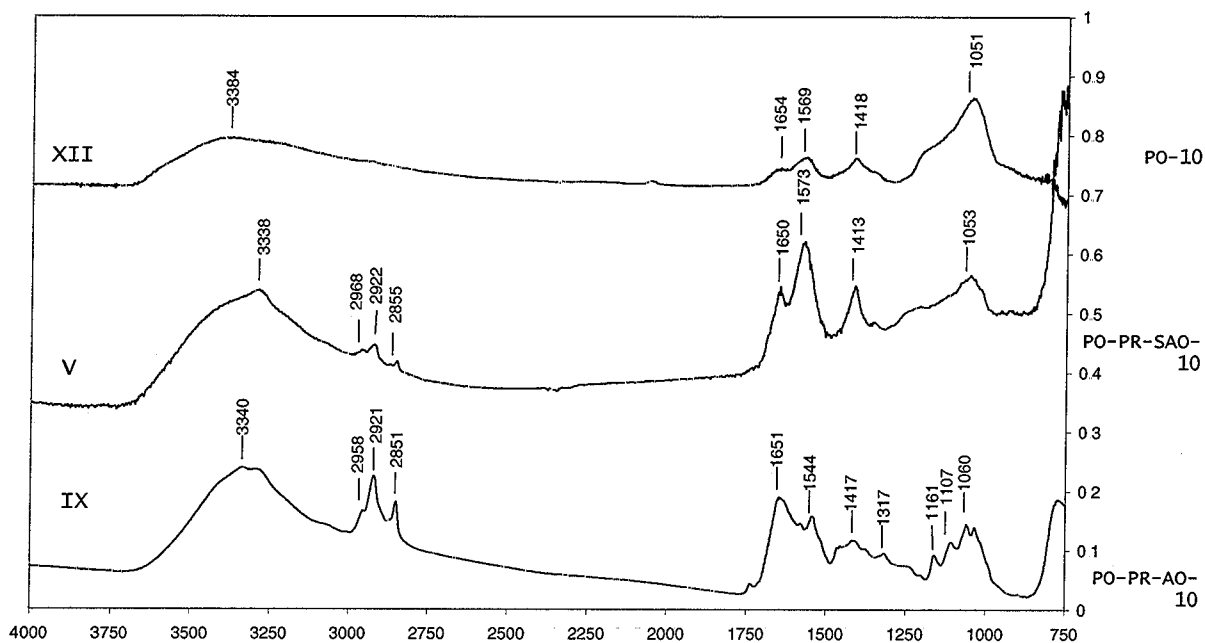


Figure 49 : Spectres correspondant aux entrées V, IX et XII de la base de données d'un polysaccharide pur ou mélangé à d'autres phases.

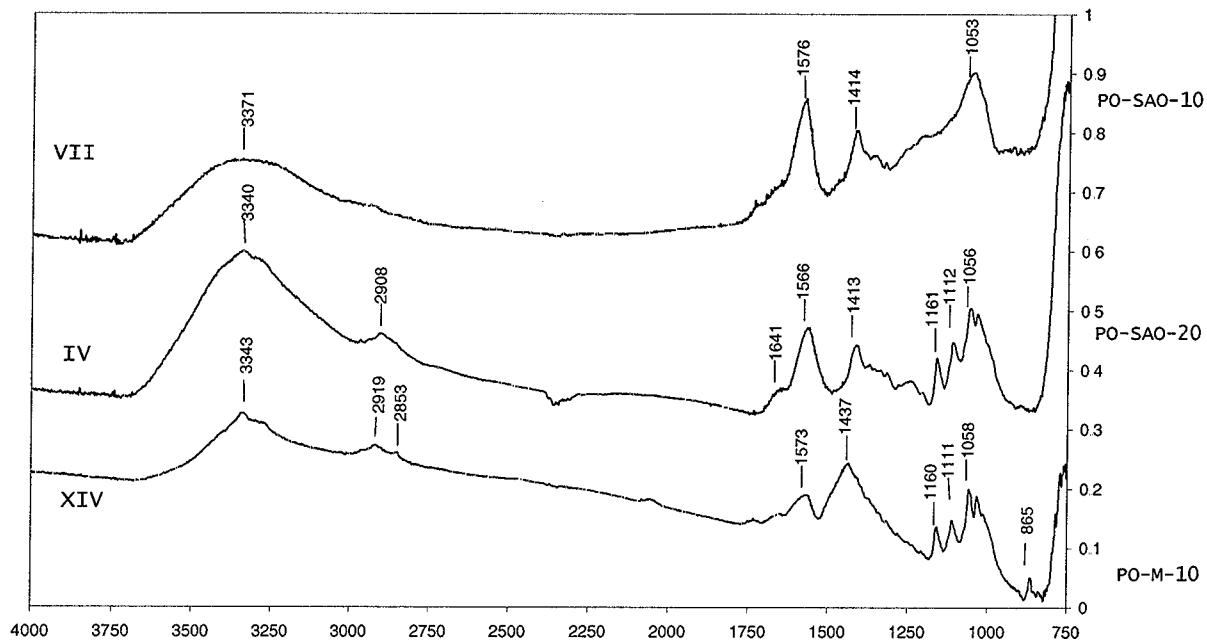


Figure 50 : Spectres correspondant aux entrées V, IX et XII de la base de données d'un polysaccharide pur ou mélangé à d'autres phases.

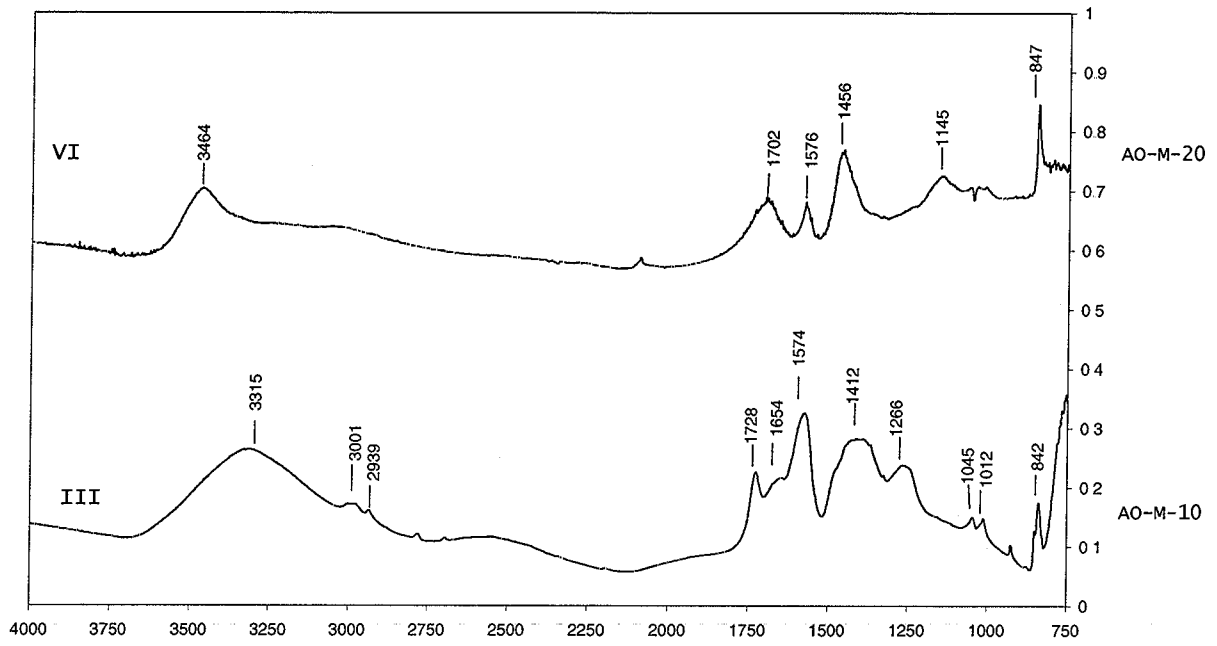


Figure 51 : Spectres correspondant aux entrées VI et III de la base de données d'un acide organique mélangé à d'autres phases.

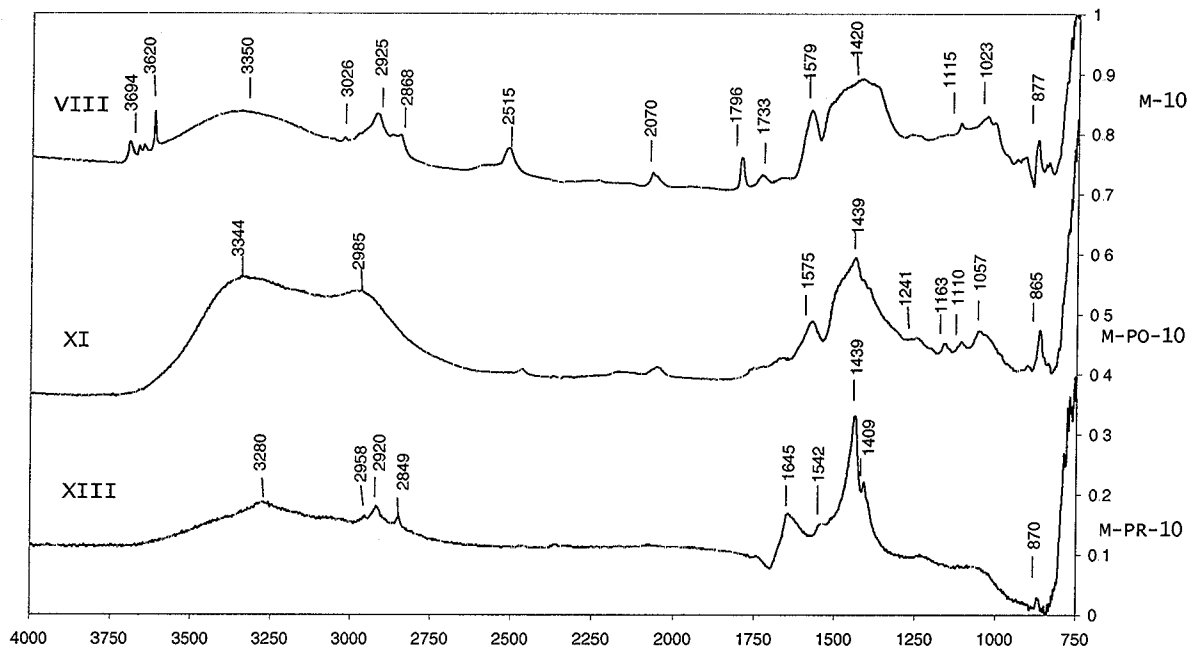


Figure 52 : Spectres correspondant aux entrées VIII, XI et XIII de la base de données d'un minéral pur ou mélangé à d'autres phases.

3.3 Approche microbiologique des boues : éléments d'information sur les productions d'exopolymères des souches *Klebsiella* et *Enterobacter*

Cette approche microbiologique va nous permettre de nous intéresser aux microorganismes présents dans les boues activées et à leurs interactions possibles. Nous présenterons ici les résultats obtenus sur les boues de la station industrielle de la papeterie d'Etival-Clairefontaine sous la forme d'un article soumis à *Water Research*. Les souches bactériennes, qui sont l'ensemble des bactéries issues d'une cellule-mère ou d'un ensemble de cellules supposées génétiquement identiques, les plus représentatives de cette boue ont été isolées et cultivées. La culture d'une souche isolée (culture pure) permet donc de développer une population supposée génétiquement homogène. A partir de ces cultures pures une extraction des EPS a été réalisée ; grâce aux méthodes analytiques décrites dans cette thèse, les exopolymères produits par une souche bactérienne spécifique ainsi que leur cinétique de croissance ont pu être étudiés.

Deux souches représentant 70% des populations étudiées et dont les productions d'EPS sont très différentes l'une de l'autre ont été sélectionnées pour réaliser une culture mixte. Dès que deux souches X et Y sont mises en contact dans le même milieu nutritif, elles entrent nécessairement en interaction pour l'utilisation des nutriments disponibles. Il est donc probable, que l'une de ces souches supprime l'autre en nombre et qu'il y existe un effet de la population X sur la population de Y et réciproquement. Nous nous attacherons en fin de chapitre à présenter les différents modèles qui décrivent ces comportements. Enfin, nous comparerons ces différents modèles aux résultats obtenus sur notre mélange 50/50 des deux souches bactériennes pures. Les aspects cinétiques de production des exopolymères et du nombre de populations en relation avec les jeux de compétition qui peuvent exister entre ces deux souches, seront discutés.

3.3.1 Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry.

Ch. Garnier¹, T. Gorner¹, P. Guinot-Thomas², P. Chappe², Ph. de Donato¹

¹Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Ecole Nationale Supérieure de Géologie, CNRS UMR 7569, Institut National Polytechnique de Lorraine, 15 avenue du Charmois, BP 40, 54501 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France.

²Institut Universitaire de Technologie Nancy-Brabois, Université Henri Poincaré Nancy I, Le Montet, Genie Biologique, 54601 Villers-lès-Nancy Cedex, France.

Abstract

The EPS of two different bacterial strains, *Enterobacter (E1)* and *Klebsiella (E2)*, representing 70% of bacterial microflora, were isolated from the wastewater sludge of the paper industry and their EPS production was followed by high pressure size exclusion chromatography. The two bacterial strains had very different kinetics of EPS production: *Enterobacter* produced regularly and gradually during 24 hours of culture, while *Klebsiella* produced the total amount of EPS already after 4 hours of culture without any changes later. In a cultivated mixture of E1 and E2 strains (50/50), the competitive effects on the EPS production have been clearly demonstrated. The chromatographic profile of EPS produced by the cultivated mixture could be successfully modeled using experimental chromatograms of EPS produced by each pure strain.

Keywords: Exopolymers; Chromatography; Infrared micro-spectroscopy; Bacterial cultures

1. Introduction

The manufacture of paper generates significant quantities of wastewater; as high as 60 m³ per tone of produced paper (Thompson *et al.*, 2001). These wastewaters contain hardly biodegradable organic compounds as cellulose and lignin (Chen *et al.*, 2002), additives (clays, calcium carbonates, *etc.*), dissolved organic matters such as azo-dyes, inorganic compounds (metal, salts), hydrocarbons from lubricants leaks, fat and resin acids, tannins and phenolic

compounds from wood; organochlorated compounds found in effluents of some whitening process (Pokhrel and Viraraghavan, 2004; Thompson *et al.*, 2001; Boni *et al.*, 2004) and nutritive nitrogen and phosphorus compounds, used in secondary treatment to the maintain of bacterial life (Bryant *et al.*, 1997). Some of pollutants, notably dioxins and furans, are recalcitrant to degradation and persist in nature (Ali and Sreekrishnan, 2001). Pulp and paper wastewater have negative environmental impact, overloading the auto-purification mechanism of receiving rivers, disturbing biological and chemical balance and inducing morphological or color changes, and affecting gonadal differentiation in poeciliid fish (Larsson *et al.*, 2002).

Several types of biological treatments exist as activated sludge with oxygen or air, biological disks, bacterial beds, *e.g.* the removal and biotransformation of resin acid in an aerobic lagoon reached 96% (Ali and Sreekrishnan, 2001). The review of performance of available treatment processes was published by Pokhrel and Viraraghavan (2004).

The activated sludge process is the most widely used in treatment of municipal or industrial wastewaters. It is based on digestion of organic matter by bacteria assembled in microbial aggregates. The microorganisms produce the extracellular polymeric substances (EPS), which keep them together in synergistic microconsortia with multicellular functioning. By definition the EPS are located at or outside the cell surface and they represent the “glue” keeping the biological floc together. The efficiency of sludge settling influences the quality of purified water and depends on properly matching parameters keeping the agglomerates together. Rich and valuable information about EPS composition, properties and recent research progress can be found in Flemming and Wingender (2001) (Flemming and Wingender, 2001) edition of contributions presented on the first conference dedicated to EPS. The EPS composition was often studied (Goodwin and Forster, 1985; Urbain *et al.*, 1993; Frølund and Keiding, 1994; Frølund *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997; Jahn and Nielsen, 1998; Wingender *et al.*, 1999; Görner *et al.*, 2003), and many studies showed that EPS are mainly composed of polysaccharides and proteins; however sometimes proteins and nucleic acids appear in significant amounts or even predominate in EPS from different origins (Laspidou and Rittmann, 2002).

Good settling in an industrial activated sludge system requires mixed bacterial cultures (Boyette *et al.* 2001) with the appropriate chemical and physical properties to agglomerate. The poor biofloculation results from a low production of EPS which can have two causes (Wanner, 1994): There is a high concentration of readily degradable substrates in the cultivation medium and cells are not metabolically forced to synthesize this kind of storage products or the synthesis of biopolymers is blocked by the presence of some toxic or inhibitory compounds in wastewaters. Therefore the knowledge of sludge bacterial strains and their optimal life conditions is necessary to optimize the wastewater treatment process. The studies of EPS properties and function have been hampered by a lack of suitable methods. In the last two decades the number of methods to investigate the EPS of all origin in real time and in situ increased rapidly. The use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) brought valuable information about the size of polymers compounds present in a sludge (Frølund and Keiding, 1994; Görner *et al.*, 2003). It was found that each wastewater treatment plant had its own typical chromatographic EPS fingerprints in normal working conditions (Frølund and Keiding 1994, Garnier *et al.*, 2005) with a high proportion of large sizes polymers, while in crisis situation of poor settlement mainly small EPS sizes were present (Garnier *et al.*, 2005)

The aim of our research was to identify the bacterial strains present in the sludge of paper mill and to study their contribution to the EPS production. The most significant strains were identified, isolated, cultured and their EPS production was analyzed by HPSEC. Kinetic studies of EPS production were investigated on strains in pure culture and in mixture.

2. Materials and methods

2.1. Sludge sample preparation

Industrial sludge samples were collected from the aeration tank of the paper mill Clairefontaine (Etival, France), where wastewater is treated by activated sludge process. They were rapidly transported to the laboratory and used for the EPS extraction within 2 hours of collection. The industrial sludge sample had following physico-chemical characteristics measured by normalized methods: pH

7.2, Total Solids TS: 2.0 g/L and Volatile Solids VS (*cf.* standard methods for the examination of water and Waste Water, APHA-AWWA-WPCF, 16th edition, 1985, p.2.56 : 2.66): 1.7 g/L. The EPS extraction for chromatographic analysis was carried out by the cation exchange resin according to the protocol proposed Frølund *et al.* (1996) with four hours extraction time. The sludge sample was firstly thickened four times: 800 mL of sludge was decanted during 1.5 h at 17°C, the supernatant of 600 mL was eliminated and 200 mL of settled sludge was centrifuged at 2000g during 15 min. The supernatant was eliminated, the sludge pellets were resuspended in 200 mL solution de NaCl $5 \cdot 10^{-3}$ M and submitted to extraction using cation resin Dowex 50×8 Na⁺ form, 20-50 mesh (Fluka, France), (60 g of resin/100 mL of sludge). The suspension of sludge pellets and resin in NaCl solution was stirred at 4°C during 4 hours and centrifuged 30 min at 12000g to separate the EPS from the remaining floc components. The supernatant containing extracted EPS was filtered with 0.22 µm filters and used for HPSEC analysis.

Cultured strains: the EPS extraction was done on bacterial cultures after 4, 8 or 24 h of bacterial growth as follows: 1000 mL of bacterial culture were centrifuged at 2000 g during 15 min in order to eliminate the nutritive medium. To obtain a sufficient quantity of EPS, the pellets were then suspended in only 50 mL of physiological solution (9 g/L NaCl) for washing, centrifuged at 2000 g during 15 min and the obtained pellets were again resuspended in 50 mL of NaCl $5 \cdot 10^{-3}$ M. The EPS extraction was done during 4h at 4°C (60 g resin/ 100 mL).

2.2. Microbial analysis

2.2.1. Numerations

Bacteria were enumerated after spread plating of 0.1 mL of serially diluted samples on Nutritive Agar medium. The culture medium contained (per liter of distilled water): meat extract 3 g, pepton 10 g, NaCl 5 g, potassium nitrate 1 g and agar 15 g. The Petri dishes with cultures were then stored at 30°C for 72 hours and microorganisms were numbered.

2.2.2. Purification of strains

Four major strains were isolated and purified as follows: one colony of each strain was picked up and mixed in sterile physiological water before being

isolated on Nutritive Agar. This was repeated until the bacteria presented pure cultures. The pure cultures were then stored at 4°C on Nutritive Agar in tubes.

2.2.3. Morphological and biochemical characterisation of bacteria

The morphology of cells was studied by microscopic observation, Gram staining and negative coloration in India ink, the respiratory type was determined by the reply to the planting out in Yeast-Meat medium. The biochemical identification of strains was realized on the basis on the following enzymatic tests: catalase, oxydase, O-F test, and by using current biochemical tube tests adapted to the organisms identified. Results were confirmed by inoculating API galleries 20E (Biomérieux, France).

2.2.4. Preparation of culture in Erlenmeyers

The pre-cultures of each purified strain were realized by inoculating one colony of each strain in a Nutritive Broth. The broths were then incubated at 30°C for 24 hours. Sterile culture media of 250 mL volumes were placed in 500 mL Erlenmeyer flasks, they were inoculated with 1 mL of each pre-culture suspension and placed on a gyratory shaker (150 rpm) at 30°C. The cultures were stopped after 4, 8 and 24 hours, bacterial material collected and their EPS (extracted according to the same protocol in the case of the industrial sludge) were analyzed by HPSEC.

2.2.5. Kinetic of the growth bacteria

The analysis of bacterial growth was done by colonies counting (as previously described in 2.2.1.) and by the absorbance measurement at 600 nm with a Spectronic 20D Spectrophotometer.

2.3. Chromatographic analysis

The separation of extracted EPS was carried out with a Hewlett Packard 1100 series chromatograph. A Zorbax Bio Series column (GF-250, 2.4 mm ID × 25 cm – Agilent Technologies, France) thermostated at 25°C was used. The mobile phase (flow rate 0.5 mL/min) was composed of $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L NaCl and 335 mg/L NaN₃. The detection was carried out at 25°C with a diode array UV detector (HP 1100 Series) at 280 nm and simultaneously with a Refractive Index Detector (Agilent 1100 Series). All samples were filtered with 0.22 µm PVDF filters (Milipore) prior to injection (100 µL). The column was calibrated by

standard polysaccharides of molecular mass 180, 738, 5900, 1180, 2280, 47300, 112000, 212000, 404000 and 788000 Da and standard proteins of molecular mass 13700, 45000, 67000, 200000 and 670000 Da (ribonuclease, β -amylase, chicken albumin and bovine serum albumin), provided by Sigma Aldrich (France).

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic profile of the EPS extracted from the industrial sludge

The chromatogram of EPS extracted from the industrial sludge is shown on Fig.1. The separation carried out on a size exclusion column gave four peaks eluted with retention times of about $t_{R1} \approx 25.5$ min, $t_{R2} \approx 27$ min, $t_{R3} \approx 31$ min, $t_{R4} \approx 32$ min, with two important peaks at 25.5 and 27 min. The bold line represents UV-Vis diode array detector signal at $\lambda = 280$ nm. This wavelength permitted the detection mainly of protein compounds. The dashed line corresponds to the refractive index detection, which is sensible mainly to the presence of polysaccharides. As it can be seen, the chromatographic peaks at 25.5 and 27 min contained proteins and polysaccharides, while the peaks at 31 min and 32 min were composed mainly of proteins. The molecular weights corresponding to t_{R1} - t_{R4} calibrated by polysaccharides and proteins are presented in Table 1.

The EPS composition is a contribution of bacterial pool responses. To have a better insight into the EPS production, the most representative bacterial strains present in this sludge sample have been studied in relation with their production of EPS.

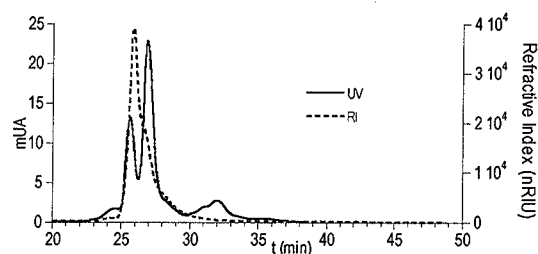


Figure 53 : Figure 1: Typical chromatogram of EPS extracted from the industrial sludge:

Bold line: UV detection at 280 nm; dashed line: Refractive index detection.

Tableau 9 : Table 1: Molecular weight and corresponding retention times t_R calibrated by proteins and polysaccharides.

| | $tr_1 \approx 25.5$ min | $tr_2 \approx 27$ min | $tr_3 \approx 31$ min | $tr_4 \approx 32$ min |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| protein | 280000 Da | 220000 Da | 110000 Da | 90000 Da |
| polysaccharide | 1200 Da | 620 Da | <200 Da | <200 Da |

3.2. Isolation and identification of the most representative strains

The numeration of the microflora in industrial activated sludge reached 4.10^6 microorganisms/ml of sludge; this value is comparable with current values obtained on activated sludge from wastewater treatment plants either urban or industrial. (Chappe, 1993). The strains were counted on the basis of their cultural characters: about 10 different strains were found, the strains called E1-E4 represented about 96% of the present population (41%, 28%, 15% and 12% respectively). Their characteristics are in Table 2. The two major isolated strains called E1, E2 represented 41% and 28% of the total bacterial flora. They were determined as *Enterobacter* (E1) and *Klebsiella* (E2), according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Holt *et al.*, 1994). Their biochemical characteristics are presented in Table 3. The two isolated strains, E1 and E2, have been identified on the basis of these biochemical tests. One of the two strains, E2, was non motile and presented an outermost bacterial surface layers which is called capsule. The capsule consists from several polysaccharides. The other strain, E1, was very motile.

Tableau 10 : Table 2: Main characteristics of four major strains E1 and E2 , E3, E4 detected in industrial sludge sample.

| | E1 | E2 | E3 | E4 |
|----------|-----|-----|-----|-----|
| Gram | - | - | - | - |
| Catalase | + | + | + | - |
| Oxydase | - | - | - | - |
| VL | AAF | AAF | M | AAF |
| Mobility | +++ | - | +++ | - |
| Capsule | - | +++ | - | - |

Tableau 11 : Table 3: Taxonomic studies of isolates.

| Biochemical test | E1 (<i>Enterobacter</i>) | E2 (<i>Klebsiella</i>) |
|------------------|----------------------------|--------------------------|
| Mobility | ++ | - |
| Lactose | + | + |
| ONPG | + | + |
| H ₂ S | - | - |
| LDC | + | - |
| ODC | - | - |
| ADH | - | - |
| Urease | - | slow |
| TDA, PDA | - | - |
| Indole | - | - |
| CS | + | + |
| Malonate | + | + |
| VP | - | + |
| Gelatinase | - | - |
| Gas/glucose | + | + |
| Mannitol | + | + |
| Sucrose | + | + |

3.3. Pure individual strains E1 and E2

The pure strains E1, E2, E3, E4 were then cultivated (each strain separately) during 4, 8 and 24 hours and their EPS were extracted and analyzed by HPSEC. Only two strains E1 and E2 gave enough of EPS to obtain chromatograms (results not shown). Therefore next studies were focused only on the strains E1 and E2.

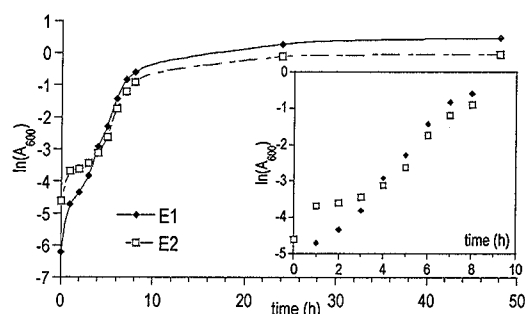


Figure 54 : Figure 2: Kinetics of growing of bacterial strains E1 and E2

3.3.1. Kinetics of bacterial strains growth

The growth kinetics of pure strains E1 and E2 was followed during 24 hours (Fig. 2). Bacterial growth was studied by measurements of the absorbance done each hour during the 10 first hours and then at 24 h.

The growing rate μ as well as the generation of doubling of the bacterial population G can be calculated by plotting the tangents at the exponential phases of the curves. For both strains, we found a growing rate $\mu = 0.8 \text{ h}^{-1}$. According to

the formula $G = \ln 2/\mu$, the time of doubling of the bacterial population for each culture was $G = 0.87$ h. Both strains have the same growth profile. The stationary phase is reached about 8h of culture.

3.3.2. Chromatographic profiles of the EPS produced by pure strains E1 and E2

In order to follow the exopolymeric production of pure strains E1 and E2 cultivated in a nutritive culture medium, several extractions have been realized at different phases of their development. The chosen times 4, 8 and 24 h correspond to the middle of the exponential phase (4 h), to the end of the exponential phase (8 h) and in the stationary phase (24 h). The EPS extraction from cultivated strains is described in Materials and methods. The chromatograms are presented on Figure 3, the strain E1 kinetics in A column and E2 kinetics in B column.

Strain E1 (Fig. 3, column A)

The chromatogram of exopolymers extracted after 4 h of culture, presented only one peak with a retention time t_R of about 28 min, this peak contained mainly proteins. No significant contribution of polysaccharidic substances was detected. After 8 hours of culture, two new classes of macromolecules of large sizes with retention times of 25 and 27 min appeared. The peak at 25 min corresponded to a mixture of proteinic and polysaccharidic substances, while mainly proteins were present in the peak at 27 min. The peak with $t_R \approx 28$ min (observed previously after 4 hours of culture) remained practically the same. Evolution of the chromatogram area indicates that the quantity of produced EPS raised strongly during 24 hours of culture, and it was mainly due to the polymers with high molecular weight whose production started after 8 h of culture. A new class of macromolecules with elution time of 33 min appeared with a significant peak surface and consisted only from proteins. It can be concluded that the *Enterobacter* isolate, strain E1, produced one family of EPS rapidly in the first 4 hours phase of the culture and had a slow production of the large and the medium size exopolymers.

Strain E2 (Fig. 3, column B)

In the case of the strain E2, the quantity of extracted exopolymers remained constant between 4 and 24 h of culture. The strain *Klebsiella* (E2) presented four distinguished peaks at 25, 27, 28 and 33 min with a dominant peak ($t_R \approx 25$ min) corresponding to large molecular sizes. Mixture of protein and polysaccharide

molecules is responsible for the peaks at $t_R = 25$ and 27 min and mainly protein molecules for those at $t_R = 28$ and 33 min. The strain E2 had a rapid production of all kinds of exopolymers and their amount and composition remained stable during 24 hours of culture.

From the above mentioned observations it is obvious that the two strains had very different strategies of exopolymeric substances production. In the case of the strain E2 (B column), nearly all EPS were present after only 4 hours of culture contrary to the strain E1 (A column) where the EPS composition and amount increased during 24 hours of culture.

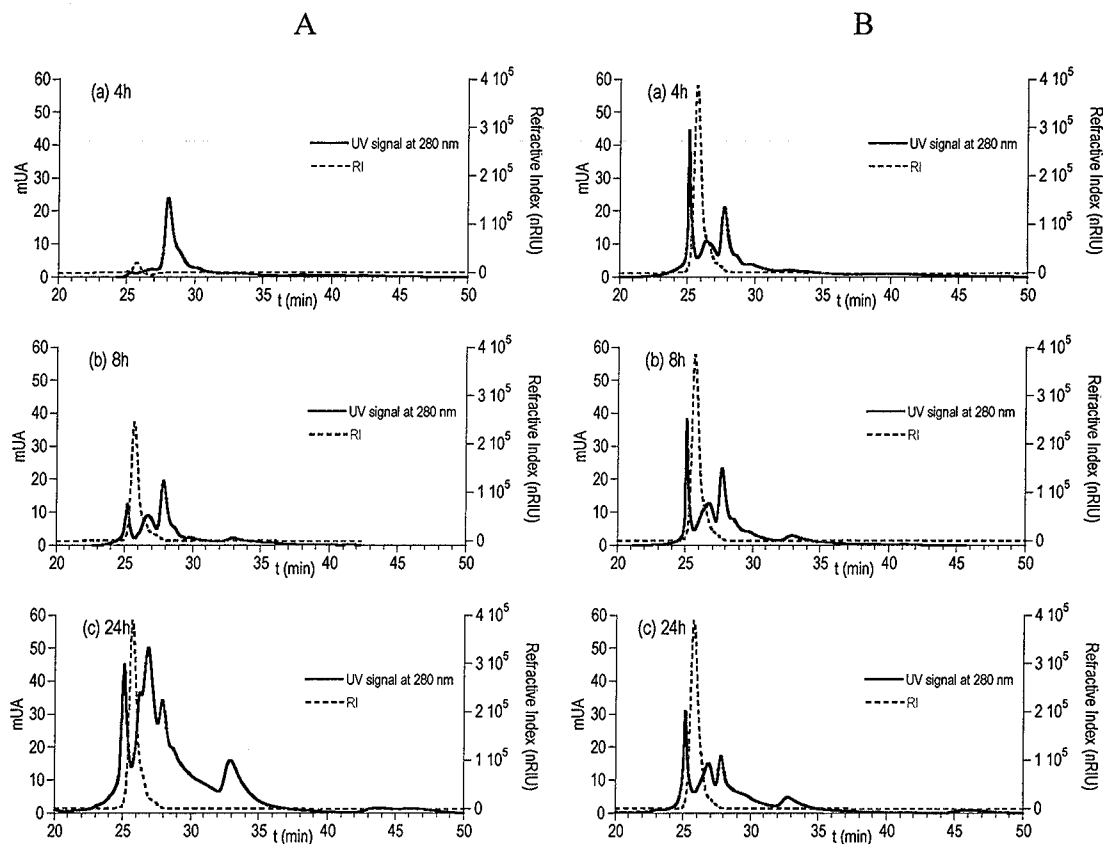


Figure 55 : Figure 3: Chromatograms of EPS extracted from pure strains E1 and E2 after different times of culture. (Bold line: UV detection signal at 280 nm; dashed line: refractive index detection).

A) Bacterial strain E1 (*Enterobacter*) and culture duration: a = 4h, b = 8h and c = 24h.

B) Bacterial strain E2 (*Klebsiella*) and culture duration: a = 4h, b = 8h and c = 24h.

The above-presented kinetic studies were done with pure strain cultures. In industrial tank conditions where plenty of various strains coexist, they will fight for the available nutrients, so their kinetics can be changed and their EPS

production as well. Therefore the same experiments were conducted on a arbitrary chosen mixture 50/50 of strains E1 and E2.

3.4. Mixture 50/50 of E1 and E2 bacterial strains.

3.4.1. Bacterial strains mixture and growth kinetics

Pure strains E1 and E2 were put together with 50/50 proportions of number of cells (arbitrary fixed conditions) and their culture was carried out during 24 hours. The count made after 4, 8 and 24 hours is presented on Fig. 4 shows that the number of population E2 decreased after 4 hours of co-existence and after 24 hours represented only 20% of the total population. The strain E1 (which had a slow kinetics of EPS production as seen previously) was more vigorous and resistant in competition with E2 strain during 24 h culture. This are the first indication of the existence of competition effect between the strains E1 and E2.

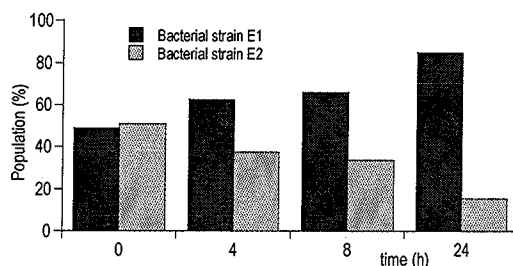


Figure 56 : Figure 4: Growth kinetics of E1 and E2 strains mixture 50/50.

3.4.2. Chromatographic study of EPS produced by a mixture of strains E1 and E2 (50/50)

The chromatographic profiles of EPS extracted from the mixture of two strains E1 and E2 after 4, 8 and 24 h of culture are presented in Fig. 5. In A column are shown the experimentally obtained chromatograms and in B column are modeled chromatograms using chromatographic profiles obtained on pure strains (Fig. 3) at considered culture time. The chromatogram reconstitution was made by summation (Eq. 1) assuming that the nature of EPS produced is the same in individual and mixture culture.

$$nCP(E1)_t + mCP(E2)_t = CP(E1 + E2)_t \quad (1)$$

where n and m (m, n , can be inferior to 1 in case of competition) are values representing the necessary contribution of chromatographic profiles (CP) of each pure strain at time t to match or approach the experimentally obtained chromatograms of EPS produced by the strain mixture. These values m and n are in Table 4. $CP(E1)_t$, $CP(E2)_t$ is the chromatographic profile of EPS extracted from the individual culture of E1 and E2 resp., at the considered time (t). $CP(E1+E2)_t$, is the chromatographic profile of EPS extracted from the 50/50 mixture of the strains E1 and E2 at the considered time (t).

Tableau 12 : Table 4: Values of the parameters n et m representing the necessary contribution of chromatographic profiles of each pure strain E1 and E2 resp. to match or approach the experimentally obtained chromatograms of EPS produced by the strain mixtures.

| Time t (h) | Values of the parameters n et m | |
|---------------|---------------------------------|--------|
| | n (E1) | n (E2) |
| 4 | 0.05 | 1 |
| 8 | 1 | 0.85 |
| 24 | 1 | 0.3 |

After four hours of the culture medium, the populations E1 and E2 represented 62 and 38% of population in the mix (Fig. 4). However, the chromatogram of the mixture EPS (Fig. 5Aa) can be reconstituted (Fig. 5Ba) by (quasi exclusively) the profile of exopolymers produced by pure E2 strain (Fig. 3Ba). It is not surprising, because the strain E1 produced only very few EPS during first 4 hours (Fig. 3Aa), so there contribution to the chromatographic profile in mixture is very low (see $n = 0.05$ in Table 4).

After 8 h of culture in mixture, the proportion of E2 decreases (Fig .4) and their contribution to EPS production is lower which is represented by $m = 0.85$ (Table 4) necessary to mach the experimental chromatogram of mixture E1 and E2 (Fig. 5Ab). However, in pure cultures the strains E1 and E2 produced the exopolymers of the same size and in comparable quantities (Figs. 3 Ab, Bb).

After 24 hours of culture, the chromatogram of mixture EPS (Fig. 5Ac) can be modeled (Fig. 5Bc) by a major contribution of E1 strain and a minor contribution of E2 (Tab.4 where $n = 1$ and $m = 0.3$). It is to note that the two strains in pure cultures are in their stationary phases at 24 h of culture (Fig. 2) and that the production of exopolymers of the strain E1 (Fig. 3Ac) is more diversified (various peaks) and more important than E2 production (Fig. 3Bc). The good

fitting obtained Fig. 5 argue in favor of an similar nature of the EPS produced individually by E1 and E2 and in a 50/50 mixture. The chromatogram of the industrial sludge EPS was quite different from that of EPS extracted from the mixture of two major strains after 24 hours of culture. It is not surprising, because the competitive effect of minor bacterial strains was not taken into account in our study. Also the residence time of bacterial strains in the industrial plant (more than 24 hours) and the chemical composition of nutritive medium influence the bacterial consortium equilibrium and behavior.

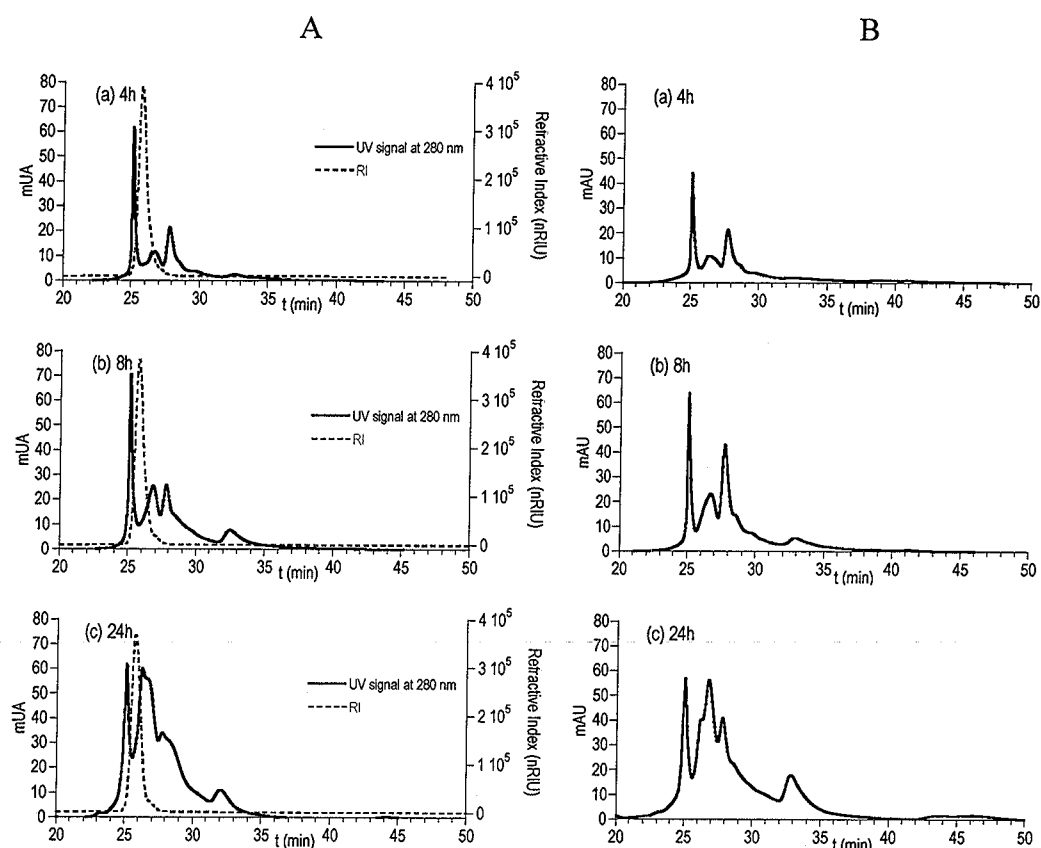


Figure 57 : Figure 6: Kinetics of EPS production by the mixture of strains E1 and E2 after different times of culture:

A) Experimental chromatograms: a = 4h, b = 8h and c = 24h.

B) Reconstituted chromatograms: a = 4h, b = 8h and c = 24h.

(Reconstitution has been made using the chromatogram of EPS obtained for each individual bacterial strain at considered times as presented in Fig. 4).

4. Conclusion

This study was focused on the EPS extracted from the bacteria isolated from activated sludge of the paper industry. Two main strains, *Enterobacter* (E1) and *Klebsiella* (E2), representing 70% of bacterial microflora were isolated. From the above-presented results it can be seen that the strains E1 and E2 had very different EPS production (different kinetics and polymer sizes). In arbitrary chosen competition conditions (mixture 50/50) competitive interaction phenomena have been evidenced. The strain E1 was more vigorous and contributed highly to the mixture EPS production. After 24 hours of culture *Enterobacter* produces 77% of the total EPS.

This study permitted a deeper insight into EPS production at least of two majority chosen strains. Complementary studies will be conducted in order to precise how different bacterial strains contribute to the EPS production and how to force them to produce the high molecular polymers which seem to be a key for good sludge settling.

Acknowledgments:

The authors wish to thank Clairefontaine for their technical and financial supports, Ms F. Giraud for this technical support and Ms C. Henryon for bacterial growth experiments.

Reference

- Ali M, Sreekrishnan TR. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in Env. Res.* 2001; 5: 175-196
- Boni MR, D'Aprile L, De Casa, G. Environmental quality of primary paper sludge. *J. Hazardous Mat.* 2004; B108: 125-128
- Boyette SM, Lovett JM, Gaboda WG, Soares JA. Cell surface and exopolymer characterization of laboratory stabilized activated sludge from a beverage bottling plant. *Wat. Sci. Tech.* 2001; 43(6): 175-184
- Bryant CW, Barkley WA, Garrett MR, Gardner DF. Biological nitrification of kraft wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 1997; 35(2-3): 147-153
- Buttiaux R, Beerens H, Tacquet A. *Manuel de Techniques Bactériologiques*. Ed. Médicales Flammarion, Paris, 1962
- Chappe P. *Etude de microorganismes lipolytiques de boues activées de stations d'épuration*, Thesis 1993
- Chen LC, Chien CY, Chu CP, Lee DJ, Hsieh KH, Lee CH, Liu JC. Conditioning and dewatering of pulp and paper sludge. *Drying Tech.* 2002; 20(4-5): 967-988
- Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Tech.* 2001; 43: 1-8
- Frølund B, Keiding K, Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for the separation of activated sludge exopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41: 708-716
- Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH. Extraction of extracellular sludge using cation exchange resin. *Water Res.* 1996; 33: 1749-1758

- Garnier Ch, Gorner T, Lartiges BS, Abdelouhab S, de Donato Ph. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined Size Exclusion Chromatography and Infrared Microscopy study. *Water Res.* 2005; 39: 3044-3054
- Goodwin JAS, Forster CF. A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to settlement characteristics. *Water Res.* 1985; 19: 527-533
- Görner T, de Donato Ph, Ameil MH, Montarges-Pelletier E, Lartiges BS. Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy *Water Res.* 2003; 37: 2388–2393
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (authors /editors). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (ninth edition). Williams & Wilkins: A Waverly Company. 1994; p 816
- Lapidou CS, Rittmann E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 2002; 36: 2711-2720
- Larsson DGJ, Kinnberg K, Sturve j, Stephensen E, Skön M, Förlin L. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in Guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. *Ecotoxicol. Env. Saf.* 2002; 52: 13-20
- Nielsen PH, Jahn A, Palmgren R. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Tech.* 1997; 36: 11-9
- Pokhrel D, Viraraghavan T. Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Science of The Total Environment.* 2004; 333(1-3): 37-58
- Thompson G, Swain J, Kay M, Forster CF. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Tech.* 2001; 77: 275-286
- Urbain V, Block JC, Manem A. Biofloculation in activated sludge: an analytical approach. *Water Res.* 1993; 27: 829-38
- Wanner J. Activated sludge bulking and foaming control. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster-Basle. 1994
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC, editor. *Microbial extracellular polymeric substances.* Berlin: Springer, 1999

4 Conclusion

Cette étude est basée, d'une part, sur le développement et l'utilisation d'une double technique analytique alliant la chromatographie d'exclusion stérique haute pression (HPLC-SEC) et la microspectrométrie infrarouge (μ FTIR) et d'autre part sur des méthodes de microbiologie. Elle s'est intéressée aux exopolymères produits au sein des floes de boues activées des stations d'épuration urbaines ou industrielles. Les exopolymères structurant le floc sont extraits par une résine échangeuse d'ion. La solution obtenue est un mélange complexe de matières organiques.

La comparaison d'extractions en parallèle d'un échantillon homogène a permis de tester la répétabilité de cette méthode et la fidélité des résultats obtenus avec l'HPLC. En effet, les profils obtenus à partir de l'injection de ces exopolymères pour une séparation chromatographique donnent un résultat extrêmement reproductible entre deux injections (différence de l'ordre du %). Mais d'autres expériences ont montré l'influence du mode de conservation et de l'évolution des échantillons selon une loi puissance $\frac{1}{2}$ sur un laps de temps plus long (8 jours). A partir de ces expériences des restrictions d'utilisations ont pu être mises en place : les échantillons étaient systématiquement utilisés immédiatement après l'extraction et conservés au frais entre deux injections.

Les profils chromatographiques obtenus présentent plusieurs pics permettant de définir plusieurs fractions. Ces différentes fractions, contenant encore plusieurs types d'exopolymères de différentes natures mais ayant des temps d'élutions identiques, sont récupérées pour être étudiées par les méthodes analytiques de μ FT-IR. Les microcristallites, obtenus par cristallisation de chaque fraction, sont observés par microscopie infrarouge en mode transmission. L'acquisition du spectre infrarouge est alors effectuée dans la gamme $4000-750\text{ cm}^{-1}$ en ajustant le diamètre du faisceau infrarouge entre 8 et 64 μm . Les spectres IR des différentes matières organo-minérales obtenus sont alors indexés et les différentes fonctionnalités chimiques sont identifiées. On peut trouver parmi cette matière organique des phases polysaccharidiques, protéiniques, d'acides organiques sous formes dissociées ou non, lipidiques, minérales, *etc.* Ces différentes phases peuvent être pures ou en associations plus ou moins complexes selon la nature et l'origine de la matière organique. Les observations faites sur les profils chromatographiques et sur les spectres infrarouges ont permis de tirer plusieurs conclusions.

- Les chromatogrammes ont permis de déterminer une signature spécifique pour chaque station. En effet, le nombre de pics, leurs intensités relatives et leurs positions sont identiques pour une même station et différentes d'une station à l'autre. Cependant lors de conditions exceptionnelles, telles que les périodes de salage des routes en hiver, les aléas climatiques ou un apport d'éléments nocifs pour les microorganismes, on peut remarquer un changement brutal dans le profil chromatographique. Le système semble revenir lentement vers un état d'équilibre correspondant à notre état de référence.
- Les exopolymères, étudiés pour chaque fraction de chaque échantillon, représentent une accumulation de plus de 1200 spectres. Parmi ces spectres, certains sont des phases de polysaccharides purs ou des phases de protéines pures ; dans ces cas particuliers, on peut leur attribuer une masse moléculaire relative en comparant leurs temps d'élution aux courbes d'étalonnage de la colonne pour des étalons de même nature. On trouve pour les protéines des masses comprises entre 90 kDa et 280 kDa et pour les polysaccharides entre 180 Da et 1800 Da. Les autres spectres sont des associations organo-organiques ou organo-minérales.
- Notre classification en familles et sous-famille (selon la phase majoritaire puis, si nécessaire, selon les espèces secondaires en allant de la plus représentée à la moins représentée), permet un premier tri parmi les spectres d'un même échantillon. Cette sélection permet de caractériser et de connaître rapidement les principales fonctionnalités des exopolymères de chaque fraction et de chaque échantillon et donc de les comparer facilement. Là encore des spécificités se détachent : la station de Maxéville et de Toul montre des associations complexes entre des protéines, des polysaccharides, des acides organiques et des phases minérales ; Epinal et Boudonville montrent des compositions chimiques plus simples essentiellement polysaccharidiques et protéiques en phases pures ou associées bien que l'on puisse noter, à Epinal, la présence de lipides. Les phases minérales de ces stations urbaines sont de nature carbonatée. Dans les stations industrielles, les EPS semblent encore plus spécifiques et plus simples.
- Parmi ces spectres identifiables dans une station, l'élimination des spectres communs à plusieurs stations et donc redondants, permet de sélectionner les spectres de chaque type de matière rencontrée pendant cette étude. A partir de ces spectres, nous avons pu élaborer une base de données chimiques des EPS. Les nouveaux résultats obtenus pourront être comparés plus rapidement grâce à l'utilisation des algorithmes de recherche du logiciel OPUS gérant cette bibliothèque de spectres.

L'isolement, l'identification et la culture des souches les plus présentes au sein d'un floc de l'une des boues étudiées, a permis de compléter cette double méthodologie analytique. Deux d'entre elles, *Klebsiella* et *Enterobacter* ont fait l'objet d'un suivi de la cinétique de production d'exopolymères en culture pure et en culture mixte.

- Ces deux souches montrent, en culture pure des cinétiques de croissance très différentes. La première produit graduellement ses exopolymères, l'autre produit dès 4h la totalité des exopolymères extractibles.
- La comparaison de cette cinétique avec celle de ces deux souches en culture mixte semblent montrer une influence négative de *Klebsiella* sur *Enterobacter* et une neutralité de *Enterobacter* sur *Klebsiella*.
- Un modèle sommaire tel que celui présenté dans cette thèse pourrait permettre de prédire l'évolution de ce système si les conditions initiales changeaient. Dans cet échantillon ces deux souches, représentaient 70% des bactéries du milieu. Ainsi, si l'effet des 30% restant

est négligeable devant l'effet de ces deux souches des déductions sur le système naturel pourraient être envisageables.

Depuis l'obtention de ces résultats, d'autres expériences ont été réalisées pour le compte de la station d'Elancourt (Yvelines) et sont venues compléter nos connaissances sur les exopolymères. Cette station connaissait, au moment des expériences, des problèmes de décantation. En outre le profil chromatographique et la nature des exopolymères présents montrent de nombreux points communs avec la station d'Epinal et l'on trouve dans cette station des lipides en grande quantité. Dans le cas de la station d'Epinal, la présence de lipides a provoqué un développement anormal de bactéries filamenteuses *Microthrix*. Il est probable qu'il existe un nombre de signatures exopolymériques limitées correspondant à des conditions particulières de fonctionnement. Si l'on pouvait relier une signature exopolymérique à des conditions particulières de fonctionnement, notre méthode permettrait éventuellement, d'identifier la source du problème.

- Alais, C.; Linden, G. *Abrégé de biochimie alimentaire*. Edition Masson, 1997, 248 pages.
- Andreadakis, A.D. Physical and chemical properties of activated sludge floc. *Wat. Res.* 1993, 27(12), 1707-1714.
- Arlabosse, P. Quelles évolutions technologiques pour mieux garantir et pérenniser une gestion optimale des boues. Place du séchage dans les filières de valorisation des boues. Actes du congrès : Rencontre Technique Nationale INSA, Toulouse, 2002.
- Azeredo, J.; Oliveira, R.; Lazarova, V. A new method for extraction of exopolymers from activated sludges *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 37 (4-5) 367-370.
- Bagreev, A.; Bandosz, T.J.; Locke, D.C. Pore structure and surface chemistry of absorbents obtained by pyrolysis of sewage sludge-derived fertilizer. *Carbon* 39, 2001, 1971-1979.
- Barrès, O.; Burneau, A.; Bubessy, J.; Pagel, M. Application of micro-FT IR spectroscopy to individual hydrocarbon fluid inclusion analysis. *Applied Spectroscopy*, 1987, 41, 1000-1008.
- Boëglin, J.C. *Traitements biologiques des eaux résiduaires* Tech. Ing., JP(J3942), 1998.
- Bonino, P. Quelles évolutions technologiques pour mieux garantir et pérenniser une gestion optimale des boues : Actes du congrès Rencontre Technique Nationale INSA, Toulouse, 2002.
- Brown, M.J.; Lester, J.N. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Env. Microbiol.* 1980, 40(2), 179-185.
- Bruss, J.H.; Nielsen, P.H.; Keiding, K. On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Wat. Res.* 1992, 26(12), 1597-1604.
- Bura, R.; Cheung, M.; Liao, B.; Finlayson, J.; Lee, B.C.; Droppo, I.G.; Leppard, G.G.; Liss S.N. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 37(4-5), 325-333.
- Caner, L.; Toutain, F.; Bourgeon, G.; Herbillon A.J. Occurrence of sombric-like subsurface A horizons in some andic soils of the Nilgiri Hills (Southern India) and their palaeoecological significance. *Geoderma*, 2003, 117(2-3), 251-265.
- Casset, F.; Pérez, S; Imberty, A. Regards sur les interactions lectines-glucides. *Regard sur la biochimie*, 1997, 4, 59-70.
- Cardot, C. *Les traitements de l'eau. Procédés physico-chimiques et biologiques, cours et problèmes résolus*. Ellipses, Paris, collection Technosup, 1999, 247 pages.
- Çeçen, F.; Erdinçler, A.; Kiliç, E. Effect of powdered activated carbon addition on sludge dewaterability and substrate removal in landfill leachate treatment. *Advances Env. Res.*, 2003, 7, 707-713.

- Cenens, C.; Smets, I.Y.; Ryckaert, V.G., Van Impe, J.F. Modeling the competition between floc-Forming and filamentous bacteria in activated sludge waste water treatment systems_I. Evaluation of mathematical models on kinetic selection theory. *Wat. Res.* 2000, 34 (9), 2525-2534.
- Cenens, C.; Smets, I.Y.; van Impe, J.F. Modeling the competition between floc-Forming and filamentous bacteria in activated sludge waste water treatment systems_II. A prototype mathematical model based on kinetic selection and filamentous backbone theory. *Wat. Res.* 2000, 34(9), 2535-2541.
- Chaignon, V.; Lartiges B.S., El Samrani A.; Mustin, C. Evolution of size distribution and transfert of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Wat. Res.*, 2002, 36, 676-684.
- Choudhury, D.; Thompson, A.; Stojanoff, V.; Langermann, S.; Pinkner, J.; Hultgren, S.J.; Knight, S.D.; X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*., *Science*, 1999, 285, 1061-1066.
- Conrad, A.; Suutari, M.K.; Keinanen, M.M.; Cadoret, A.; Faure, P.; Mansuy-Huault, L.; Block, J.C. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, 2003, 38(10), 1093-1105.
- Cornu, M. Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes, Thèse Lyon I, 2000, 199 pages.
- Curds, C.R.; Cockburn A.; Protozoa in biological sewage-treatment processes —I. A survey of the protozoan fauna of British percolating filters and activated-sludge plants. *Wat. Res.*, 1970, 4(3), 225-228.
- Decho, A.W. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Rev.*, 1990, 28, 1968-1980.
- Derjaguin, B.V.; Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolyte, *Acta Physiochem. U.S.S.R.*, 1941, 14, 633-662.
- Dick, R.I.; Vesilind, P.A. The sludge volume index – What is it ? *J. Wat. Pollut. control Fed.*, 1969, 41(7), 1285-1291.
- Dignac, M.-F.; Urbain, V.; Rybacki, D.; Bruchet, A.; Snidaro, D.; Scribe, P. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 38(8/9), 45-53.

- Dubeau, M.-P.; Sanssouci, E. Est-ce que les associations bactériennes peuvent être considérées comme étant des organismes pluricellulaires rudimentaires ? Projet d'intégration en microbiologie Bio600. Sherbrooke 2002.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Roberts, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956, 28, 350-356.
- El Samrani, A.G.; Lartiges, B.S.; Ghanbaja, J.; Yvon J.; Kohler, A. Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Wat. Res.* 2004, 38(8), 2063-2076.
- Esquenet, C. Propriétés structurales et dynamiques des solutions polyélectrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs. Thèse, 2003.
- Eriksson, L.; Steen, I.; Tendaj, M. Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Wat. Sci. Tech.*, 1992, 25, 251-265.
- Féray, C. Nitrification en sédiment d'eau douce : incidence de rejets de station d'épuration sur la dynamique de communautés nitrifiantes. Thèse Lyon I, 2000.
- Forster, C.F. The surface of activated sludge particles in relation to their settling characteristics. *Wat. Res.*, 1968, 2(11), 767-776.
- Forster, C.F. Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index *Wat. Res.*, 1971, 5(10), 861-870.
- Forster, C.F. Factors involved in the settlement of activated sludge_I Nutrients and surface polymers. *Wat. Res.*, 1985, 19(10), 1259-1264.
- Frølund, B.; Keiding, K. Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, 41(6), 708-716.
- Frølund, B.; Palmgren, R.; Keiding, K.; Nielsen, P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.*, 1996, 30(8), 1749-1758.
- Galantini, J. A.; Senesi, N.; Brunetti, G.; Rosell, R. Influence of texture on organic matter distribution and quality and nitrogen and sulphur status in semiarid Pampean grassland soils of Argentina. *Geoderma*. 2004, 123(1-2), 143-152.
- Garnier, Ch.; Görner, T.; Lartiges, B.S.; Abdelouhab, S. de Donato, Ph. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined Size Exclusion Chromatography and Infrared Microscopy study. *Wat. Res.* 2005, 39, 3044-3054.
- Gay, J. Lutte contre la pollution des eaux. Valorisation énergétique des boues. *Tech. Ing.* 2002, G 1 455, 1-18.

- Goodwin, J.A.S.; Forster, C.F. A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.*, 1985, 19(4), 527-533.
- Görner, T.; de Donato, Ph.; Ameil, M.H.; Montarges-Pelletier, E.; Lartiges, B.S. Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Wat. Res.*, 2003, 37(10), 2388-2393.
- Gouy, M.G. Sur la fonction electrocapillaire, *Ann. Phys.*, 1917, 9(7), 129-184.
- Guellil, A.; Boualam, M.; Quiquampoix, H.; Ginestet, P.; Audic, JM.; Block, J.C. Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs. *Wat. Env. Res.*, 2001, 43(6), 33-40.
- Guibaud, G.; Comte, S.; Bordas, F.; Baudu, M. Metal removal from single and multimetallic equimolar systems by extracellular polymers extracted from activated sludges as evaluated by SMDE polarography. *Process Biochem.*, 2003, 40(2), 661-668.
- He, Y.; Song, G.W.; Zou Q.C. Spectra analysis of interaction between poly((2-methylacryloxyethyl) dimethyl buthylammonium bromide) and nucleic acids. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Available online 2004.
- Healy, T.W.; La Mer, V.K. The adsorption-flocculation reactions of a polymer with an aqueous colloidal dispersion. *J. Phys. Chem.*, 1962, 66(10), 1835-1838.
- Hermansson, M. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, 14, 105-119.
- Higgins, M.J.; Novak, J.T. The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: laboratory experience. *Wat. Env. Res.* 1997a, 69(2), 215-224.
- Higgins, M.J.; Novak, J.T. The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: laboratory experience. *Wat. Env. Res.* 1997b, 69(2), 225-232.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R., Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (authors /editors). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (ninth edition). Williams & Wilkins: A Waverly Company. 1994, p 816.
- Horan, N.J.; Eccles, C.R. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.*, 1986, 20(11), 1427-1432.
- Jamdar, S.N. ; Harikumar, P. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins, *Boiresource Tech.* 2005, 96(11), 1276-1284.
- Jang, A.; Kim, S.M.; Kim, S.Y.; Lee, S.G.; Kim, I.S. Effect of heavy metals (Cu, Pb, and Ni) on the compositions of EPS in biofilms. *Water Sci Technol.*, 2001, 43(6), 41-48.
- Jenkins, D.; Richard, M.G.; Daigger, J.T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming.* 1986, Pretoria, SA: Wat. Res. Commission

- Jolivet, J.P.; Henry, M.; Livage, J. De la solution à l'oxyde : Condensation des cations en solution aqueuse. Chimie de surface des oxides. 1994, Paris, CNRS Edition, 388 pages.
- Jorand, F.; Zartarian, F.; Thomas, F.; Block, J.C.; Bottero, J.Y.; Villemin, G.; Urbain, V.; Manem, J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Wat. Res.*, 1995, 29(7), 1639-1647.
- Jorand, F.; Boué-Bigne, F.; Block, J.C.; Urbain, V. Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances *Water Sci Technol.*, 1998, 37(4-5), 307-315.
- Kagemoto, A.; Nakazaki, M.; Kimura, S.; Momohara, Y.; Ueno, K.; Baba, Y. Calorimetric investigation on liquid crystals of deoxyribonucleic acid in concentrated solutions. *Thermochimica Acta.* 1996, 284(2), 309-324.
- Kämpfer, P. Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecology*, 1997, 23, 169-181.
- Kappler, A.; Ji, R.; Schink, B.; Brune, A. Dynamics in composition and size-class distribution of humic substances in profundal sediments of Lake Constance. *Organic Geochemistry* 2001, 32(1), 3-10.
- Karapanagiotis, N.K.; Rudd, T.; Sterritt, R.M.; Lester, J.N. Extraction and characterisation of extracellular polymers in digested sewage sludge. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1989, 44, 107-120.
- Keiding, K.; Nielsen, P.H. Desorption of organic macromolecules from activated sludges: effect of ionic composition. *Wat. Res.*, 1997, 31(7), 1665-1672.
- Kenne, L.; Lindberg, B. Bacterial polysaccharides. In Aspinnall GO (ed) *The polysaccharides*, vol.2. Academic Press, New York, 1983.
- Laspidou, C.S. Rittmann, E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.*, 2002, 36, 2711-2720.
- Lartiges, B.S. Déstabilisation d'une suspension de silice colloïdale par un sel d'aluminium. Thèse INPL, 1994, 131 pages.
- Lee, S.J.; Chu, C.P.; Tan, R.B.H.; Wang, C.H.; Lee, D.J. Consolidation dewatering and centrifugal sedimentation of flocculated activated sludge. *Chem. Eng. Sci.*, 2003, 58, 1687-1701.
- Li D.H.; Ganczarczyk, J.J. Size distribution of activated sludge flocs, *Res. J. WPCF*, 1991, 63(5), 806-814.
- Liao, B.Q.; Allen, D.G.; Droppo, I.G.; Leppard, G.G.; Liss, S.N. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Wat. Res.*, 2001, 35(2), 339-350.

- Lim, A.L.; Bai, R. Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater. *J. Membrane Sci.*, 2003, 216, 279-290.
- Liu, H.; Fang, H.H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotech.*, 2002, 95(3), 249–256.
- Lowry, O.H.; Rosen Brough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.;. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Madoni, P.; Davoli, D.; Gibin, G. Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated sludge plants in Italy *Wat. Res.*, 2000, 34(6), 1767-1772.
- Madwar, K.; Tarazi, H. Desalination techniques for industrial wastewater reuse. *Desalination*. 2002, 152, 325-332.
- Malkow, T. Novel and innovative pyrolysis and gasification technologies for energy efficient and environmentally sound MSW disposal. *Waste Management* 2004 (24) 53–79.
- Magara, Y.; Nambu, S. Uotosawa, K. Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics. *Wat. Res.*, 1976, 10(1), 71-77.
- Martin, M.J.; Serra, E.; Ros, A.; Balaguer, M.D.; Rigola, M. Carbonaceous adsorbents from sewage sludge and their application in a combined activated sludge-powered activated carbon (AS-PAC) treatment. *Carbon*, 2004, 42, 1383-1388.
- Martínez, O.F.; Lema, J.; Méndez, R. Cuervo-López, F.; Gómez, J. Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresource Tech.* 2004, 94(1), 43-48.
- Morgan, J.W.; Forster, C.F.; Evison, L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Wat. Res.*, 1990, 24(6), 743-750.
- Mikkelsen LH, Keiding K. Equilibrium aspects of the effects of shear, solids content on aggregate deflocculation. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1999, 80, 151-182.
- Nickerson, R.D.; Messman, H.C. Making active carbon from sewage sludge. CA984815, 1976.
- Nielsen, P.H.; Jahn, A. Microbial extracellular polymeric substances (Jost –Wingender –Neu-Flemming) Edition Springer, 1999, Chapter 3, 50-69.
- Nielsen, P.H.; Keiding, K. Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Wat. Res.*, 1998, 32(2): 313-320.
- Nielsen, P.H.; Kragelund, C.; Nielsen, J.L.; Tiro, S.; Lebek, M.; Gesesesse, A. Control of *Microthrix parvicella* in activated sludge plants: Possible mechanisms. Proceedings of the Post-conference colloquium on Foam and Scum in Biological Wastewater Treatment 5th. September 2003, PICT, Prague, Czech Republic p.50.

- Novak, J.T.; Haugan, B.E. Polymer extraction from activated sludge. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 1981, 53, 1420.
- Parker, D.S., Kaufman, W.J., Jenkins, D. Floc breakup in turbulent flocculation processes. *J. Sanit. Eng. Div., Proc.*, 1972, ASCE 98 (SA1), 79-99.
- Pernelle, J.J.; Gaval, G.; Cotteux, E.; Duchène, P. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Wat. Res.*, 2001, 35(1), 129-134.
- Sanin, F.D. Effect of EDTA on activated sludge properties *Fresenius Environmental Bulletin*. 2001, 10(2), 165-169.
- Sato, T.; Ose, Y. Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Wat. Res.*, 1980, 14, 333-338.
- Slater, R.W.; Kitchener, J.A. Characteristics of flocculation of mineral suspensions by polymers: *Disc. Faraday Soc.*, 1966, 42, 267-284.
- Sobeck; D.C., Higgins; M.J. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Wat. Res.*, 2002, 36, 527-538.
- Sponza, D.T.; Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems. *Process Biochem.*, 2002, 37(9), Pages 983-998.
- Snidaro, D.; Zartarian, F.; Jorand, F.; Bottero, J.-Y.; Block, J.-C.; Manem, J.; IWA Publishing Characterization of activated sludge flocs structure *Wat. Sci. Tech.*, 1997, 36(4), 313-320.
- Stevenson, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York, Wiley. 1982, 443 pages.
- Sutherland; G. Preparation of activated carbonaceous material from sewage sludge and sulfuric acid. US3998756, 1976.
- Tardat-Henry M. Beaudry J.-P., *Chimie des Eaux*, deuxième édition. Mont-Royal, Les éditions le Griffon d'argile, 1992, 537 pages.
- Thide Environment. La thermolyse. 2002. <http://www.thide.com/>.
- Urbain, V. Caractérisation physico-chimique des boues activées en relation avec leur propriété de décantation. Thèse, 1992, 196 pages.
- Urbain, V.; Block, J.C.; Manem, J. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Wat. Res.*, 1993, 27(5), 829-838.
- Valentas, K.J.; Amundson, N.R. Breakage and coalescence in a dispersed phase systems. *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 1966, 5, 533-544.

- Verwey, F.J.W.; Overbeek, J.T.G. Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam. 1948.
- Von Smoluchowski M. Versuch einer mathematischen theorie der koagulations kinetic kolloider losungen. Zeitschrift fu physikalische Chemie, 1917, 92, 129-155.
- Wanner, J. Activated sludge bulking and foaming control. Technomic Publishing Co. Inc., Landcaster-Basle. 1994, 87-129.
- Wiese, G.R.; Healy, T.W; Coagulation and electrokinetic behavior of TiO_2 and Al_2O_3 colloidal dispersions. J. Colloid Interface Sci. 1975, 51, 427-433.
- Wilkinson, J. F. The extracellular polysaccharides of bacteria. Bacteriol. Rev. 1958, 22, 46-73.
- Wingender; J.; Neu, T.R.; Flemming, H.-C. Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1999.
- Zartarian; F., Mustin; C., Bottero; J.Y., Villemin; G., Thomas; F., Aillères; L., Champenois; M., Grulois; P., Manem; J. Spatial arrangement of the components of activated sludge flocs Wat. Sci. Tech., 1994, 30(11), 243-250.
- Zartarian; F., Mustin; C., Villemin; G., Ait-Ettager; T., Thill; A., Bottero; J.Y., Mallet; J.L., Snidaro, D. Three-dimensional modeling of an activated sludge floc. Langmuir, 1997, 13, 35-40.
- Zita; A., Hermansson; M. Effects of ionic strength on bacterial adhesion and stability of floes in a wastewater activated sludge system. Appl. Envir. Microbiol., 1994, 60(9), 3041-3048.

Annexe

Éléments de compréhension de la compétition des populations bactériennes en cultures mixtes

Nous avons étudié des bactéries en cultures pures et en culture mixtes. Quelques éléments de compréhension de la compétition des populations bactériennes en cultures mixtes qui laissent apercevoir l'évolution dynamique et interactive de ce monde, sont présentés dans ce chapitre.

Les différents modèles

En culture mixte, pour un temps de culture suffisamment long, la population ayant un taux de croissance supérieur peut dépasser en nombre la population la plus lente. Cela constitue un avantage dans la compétition. En absence d'interactions, l'issue d'une culture de deux souches ayant des taux de croissance différents verra donc systématiquement le succès relatif de la population dont le taux de croissance est le plus grand (Cornu, 2000). Ce taux de croissance peut être recalculé à partir des phases exponentielles de croissance, dans notre cas ils sont égaux. Le succès relatif de l'une ou l'autre de nos deux souches sera donc essentiellement dû aux interactions entre ces deux souches et pas à un avantage sélectif dû aux vitesses de croissance. Plusieurs cas sont alors possibles. En effet, chaque souche peut avoir un effet bénéfique (stimulation de la croissance), neutre, ou encore, défavorable (inhibition de croissance, voire mort cellulaire) sur l'autre souche. Selon les diverses combinaisons possibles de ces trois effets, on obtient six types d'interactions allant du mutualisme à la compétition (Tab. 13).

Tableau 13 : Classification des interactions en fonction de la matrice des effets (d'après Odum, 1953 et Cornu, 2000*).

| | <i>X</i> bénéfique pour <i>Y</i> | <i>X</i> neutre pour <i>Y</i> | <i>X</i> défavorable à <i>Y</i> |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>Y</i> bénéfique pour <i>X</i> | Mutualisme ou protocoopération | Commensalisme | Prédation ou parasitisme |
| <i>Y</i> neutre pour <i>X</i> | Commensalisme | Neutralisme | Inhibition |
| <i>Y</i> défavorable à <i>X</i> | Prédation ou parasitisme | Inhibition | Compétition |

Si une autre espèce essaye de partager la même niche écologique ou le même milieu, la seule interaction possible semble être la compétition. Le modèle qui en découle est présenté dans le paragraphe suivant.

La modélisation de la croissance et de la survie de ces deux souches en mélange nécessite la prise en compte des processus d'interactions entre ces souches (compétition pour les ressources du milieu). Lorsque plusieurs espèces sont en compétition au sein d'une même niche écologique, chaque espèce se trouve confrontée aux variations du milieu ambiant, de l'abondance, de la nature et de la diversité des ressources. Elles sont également tributaires de leurs exigences alimentaires, des interactions possibles entre les espèces présentes et du taux de mortalité de leur espèce. Les causes de cette mortalité sont variées : manque de ressource, prédation, intoxications et inhibition diverses en provenance d'espèces antagonistes pouvant lutter pour la même ressource, modifier le milieu, produire des toxines, *etc.*

Selon le "principe de Gause", si deux espèces sont en compétition pour une seule ressource, seule l'espèce la plus compétitive peut survivre durablement ; les écologues parlent d'exclusion compétitive. Le formalisme mathématique servant à décrire l'évolution dynamique de deux populations selon cette hypothèse est donné par le système d'équations différentielles suivant:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = aX - bX^2 - cXY \\ \frac{dY}{dt} = a'Y - b'Y^2 - c'XY \end{cases} \quad (9)$$

Ces modèles font intervenir plusieurs termes (où a, a', b, b', c et c' sont positifs) :

- aX et $a'Y$ impliquent des croissances exponentielles
- $-bX^2$ et $-b'Y^2$ est un terme d'autolimitation propre à l'espèce en dehors de l'influence externe d'une autre espèce.
- $-cXY$ et $-c'XY$ un autre terme d'interaction négative décrivant l'influence de l'espèce concurrente. L'abondance ou la simple présence d'une des espèces inhibe l'autre, la rareté d'une espèce favorise l'autre.

Les conditions limites du système, $dX = 0$ et $dY = 0$, permettent d'obtenir deux droites dont les pentes sont égales à $(-b/c)$ et $(-c'/b')$. Ces deux droites décrivent donc les lieux géométriques où la variation de l'espèce X ou de l'espèce Y est momentanément nulle. Elles permettent, en outre, de définir les paramètres d'autolimitation des deux espèces (b/a) et (b'/a') ainsi que leur limitation mutuelle (c/a) et (c'/a'). En effet, en traçant ces deux droites sur un graphique représentant le nombre de populations de chacune des deux espèces, les intersections des droites avec les axes du graphique, sont égales à l'inverse des valeurs des paramètres d'autolimitation et de limitation mutuelle propres à l'espèce.

Si les deux droites se croisent (Fig. 61a), de telle façon que les inégalités : $a'/b' > a/c$ et $a/b > a'/c'$ soient respectées, l'une ou l'autre des espèces disparaît. De plus, les droites divisent le plan en quadrants. Dans chaque quadrant, les signes de dX et dY permettent de déterminer le sens des trajectoires, décrivant l'évolution du système possible. Le point de concours de ces deux droites s'appelle le point de catastrophe ; de petits écarts par rapport à ce point et le système peut évoluer vers l'extinction de l'une ou l'autre des deux espèces présentes. L'ensemble des lieux géométriques des diverses trajectoires possibles permettrait de définir une ligne de catastrophe incluant ce point (Fig. 61a).

Si, au contraire, les trajectoires ne se croisent pas (Fig. 61b), l'une des espèces est systématiquement éliminée mais c'est toujours la même.

Dans les deux cas précédents l'une des deux espèces disparaît comme l'annonce le principe de Gause. Toutefois si l'autolimitation de chaque espèce est supérieure aux limitations interspécifiques réciproques, les deux droites se croisent mais cette fois leur intersection peut être considérée comme un attracteur ponctuel (Fig. 62). Les interactions entre les deux espèces sont tels que $a'/b' < a/c$ et $a/b < a'/c'$. Les deux espèces évolueront vers un état d'équilibre quelles que soient les conditions initiales.

Les boues activées sont un écosystème sans cesse renouvelé par l'apport de matière dégradable où la colonisation par la microfaune et la microflore n'est pas encore optimale. Dans cet écosystème, volontairement entretenu dans un état juvénile, des espèces à multiplication rapide (tel que les bactéries et les rotifères déjà présents dans les effluents), seront en forte compétition. Il n'a pas été envisageable de mener une série d'expériences exhaustives permettant de déterminer toutes les limitations intra ou interspécifiques des bactéries dans ce type de milieu. Cependant, ces quelques règles, appliquées à ce type de biotope, permettent de subodorer la complexité et la difficulté de maintenir en permanence une faune et une flore bactérienne active et diversifiée. En revanche, la croissance sous forme de floc et la production d'exopolymères peut éventuellement être considérée comme un moyen de protection vis-à-vis des autres espèces et donc de stabilisateur du système.

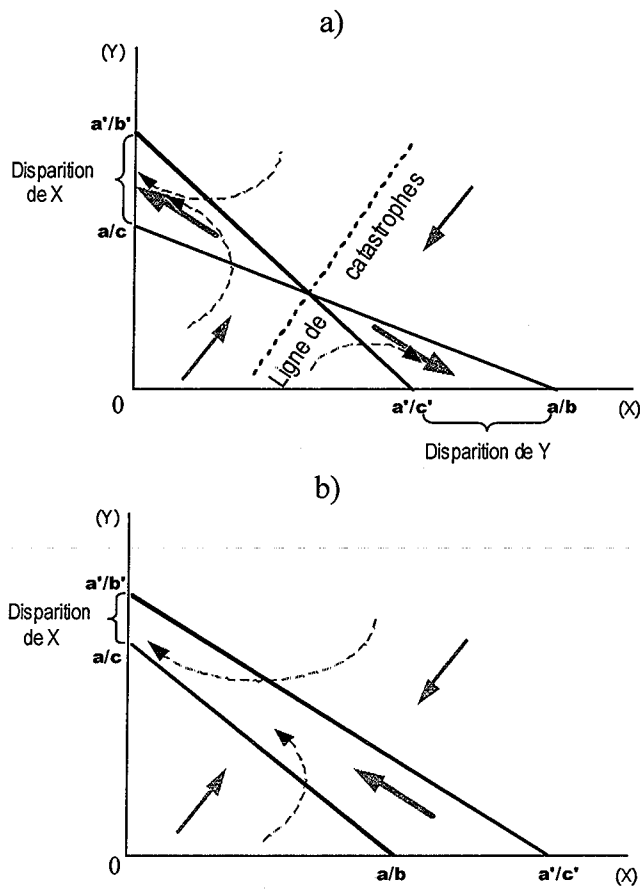


Figure 58 : Trajectoires d'un système de deux espèces en compétition pour une ressource.

a) au-delà de la ligne de catastrophe l'une des deux espèces est éliminée.

b) la compétition aboutie toujours à la disparition de la même espèce, nommée X ici.

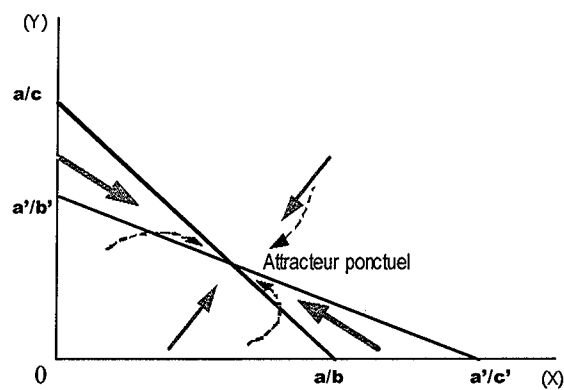


Figure 59 : Trajectoires d'un système de deux espèces en compétition pour une ressource. Le système évolue vers un état d'équilibre désigné sous le nom d'attracteur ponctuel.

Interactions biotiques et modèle adapté aux observations faites précédemment

Le modèle présenté dans le paragraphe précédent, faisait l'hypothèse que les deux souches avaient des interactions négatives l'une sur l'autre. Grâce à la classification de Odum (Tab. 13) on peut qualifier cette interaction de compétition. Cependant, nous venons de voir que l'une de nos deux souches étudiées ne semble pas affectée (au-delà de 4 h de culture par l'autre souche) alors que l'autre est inhibée (production d'EPS moins forte et nombre de populations en diminution par rapport à l'autre souche). Il s'agirait donc d'une inhibition. Dans ce cas, le modèle devra prendre en compte cet effet.

A partir d'un modèle prenant en compte un taux de prédation constant, étudions le cas particulier suivant. Si l'on considère que l'interaction de Y vers X est constante et que la croissance de l'inhibiteur (Y) est indépendante ($c = 1$) de la souche inhibée (X); on donc peut donc écrire :

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = aX - bX^2 - Y \\ \frac{dY}{dt} = a''Y - b'Y^2 \end{cases} \quad (10)$$

$dX = 0$ donne $Y = aX - bX^2$ (équation d'une parabole)

$dY = 0$ donne $Y = \frac{a''}{b'}$ (constante) avec $a'' = a' + c'$

Comme on peut le voir sur le graphique suivant (Fig. 63), la droite horizontale coupe la droite de la parabole en deux points. La ligne de catastrophe, perpendiculaire à l'axe des abscisses, passe par le point A qui est le point d'instabilité du système. A gauche de la droite de catastrophe l'espèce X disparaîtra. A droite de cette courbe, toutes les trajectoires iront vers un point d'équilibre qui n'est autre que le point d'intersection B des deux courbes. C'est un point de convergence (attracteur ponctuel) de toutes les trajectoires partant de cette zone du graphique.

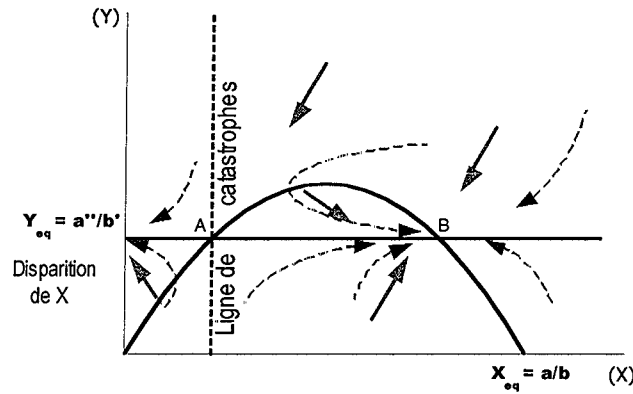


Figure 60 : Trajectoires du système $(X ; Y)$ selon un modèle prenant en compte une interférence constante de entre les deux souches (Frontier *et al.* 2004).

Les hypothèses faites à partir de l'observation de notre système (interaction de Y vers X constante et croissance de l'inhibiteur est indépendante de la souche inhibée ($c = 1$)) peuvent être formalisées par ce modèle. Il peut permettre de prédire l'évolution de notre système selon les conditions initiales du couple $(X ; Y)$ et de le confronter à d'autres expériences du même type ou à un système plus réaliste (prise en compte d'autres bactéries récentes). Si ce modèle est satisfaisant, il pourrait à terme permettre d'anticiper une éventuelle destruction du système.

Glossaire

Acides humiques : substances libérées par l'humus (terre brune ou noirâtre formée par la décomposition des végétaux) Ces composés humiques peuvent être extraits par solvants alcalins (pyrophosphates de Na). La solution obtenue est traitée à l'acide ; une partie brune floccule, ce sont les acides humiques (50000-100000 Da); la solution restante contient les acides fulviques (500-2000 Da). Une partie de l'humus n'est pas extractible: c'est l'humine (très grosses molécules insolubles).

Acide gras : constituant caractéristique des lipides, comprenant une chaîne aliphatique (hydrophobe) et une fonction acide (hydrophile).

Acides nucléiques : les acides nucléiques sont des macromolécules formées par un enchaînement de nucléotides. Les nucléotides sont le résultat de l'association de 3 molécules : une base azotée, un sucre et de l'acide orthophosphorique $\text{PO}(\text{OH})_3$. Parmi ces acides nucléiques on distingue l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'ARN (Acide RiboNucléique).

Adsorption : interaction réversible (physisorption) ou irréversible (chimisorption), d'une molécule ou d'une particule, avec la surface d'un matériaux.

Aérobic : condition d'aération suffisante pour permettre le développement de microorganismes pouvant se développer en présence d'oxygène.

Agrégat fractal : agrégat présentant une rugosité de surface, des pores, des excroissances, dont une partie agrandie est identique (aux variations statistiques près) à l'objet de départ.

Anaérobic : condition d'appauvrissement en oxygène ou d'anoxique ne permettant que le développement de microorganismes pouvant se développer dans ces conditions. La dénitrification a lieu lors d'un stress anoxique. L'ion NO_3^- est alors utilisé en tant qu'accepteur d'électrons au cours d'une chaîne d'oxydation.

Attracteur ponctuel : point invariant de l'espace vers lequel est attirée systématiquement la trajectoire du système dynamique.

Bases azotées: adénine et guanine, cytosine et thymine sont les bases azotée de l'ADN. Dans l'ARN, l'uracile remplace le thymine.

Bassin versant : zone géographique associée à une rivière et regroupant tous les terrains sur lesquels ruissellent, s'infiltrent et courent toutes les eaux qui alimentent cette rivière. Il est délimité par la ligne de partage des eaux superficielles.

Biodiversité : mot construit à partir des mots biologie et diversité. C'est la diversité du monde vivant, au sein de la nature ou d'un biotope. Dans notre cas il s'agit de l'ensemble des microorganismes présents dans le bassin d'aération ou dans le biofilm.

Biofilm : couche bactérienne se développant sur une surface.

Biomasse : masse de toutes les espèces vivantes présentes dans un milieu naturel donné.

Biotope : lieu limité géographiquement, ayant un milieu physico-chimique déterminé et uniforme, qui héberge une flore et une faune spécifique (la biocénose).

Boues activées : les installations de traitement biologique se présentent donc comme de très vastes cultures bactériennes où l'on met en contact une population bactérienne et l'effluent à traiter en présence d'oxygène. Les bactéries aérobies, susceptibles de se nourrir des matières organiques présentes dans les eaux usées utilisent la matière organique dissoute pour leur métabolisme et la minéralise. Dans le procédé des boues activées les colonies microbiennes se développent au sein même du liquide à épurer. Ce dispositif n'est qu'une intensification du phénomène naturel d'auto-épuration se déroulant dans les rivières.

Capsule : structure externe facultative produite par certaines bactéries. Elle est composée d'un polymère de nature polysaccharidique ou protéinique.

Chromatogramme : chaque injection d'un échantillon abouti à l'obtention d'un chromatogramme qui représente l'évolution du signal choisi (longueur d'onde UV-visible indice de réfraction, *etc.*) lié à la concentration instantanée du constituant élué, en fonction du temps et du débit. Le chromatogramme est une représentation graphique où des pics émergent de la ligne de base, tracé obtenu en l'absence de composés. L'étalonnage, avec des molécules connues, permet d'identifier ou de connaître certaines caractéristiques des molécules éluées.

Colloïdes : particules de très faible taille (1 nm à 1 µm) dont le rapport volume/surface (très faible) lui confère des propriétés d'interactions très fortes avec la matière environnante qu'elle soit dissoute, colloïdale ou particulaire. Ces matières, très nombreuses dans les eaux turbides, décantent à des vitesses extrêmement faibles, l'ajout de coagulant permet d'augmenter leur vitesse de décantation.

Commensalisme : relation entre deux espèces permettant à l'une des espèces d'évoluer dans de meilleures conditions dans son environnement que s'il y vivait seul et sans léser l'autre espèce. Le commensal cherche auprès de son hôte protection, nourriture, moyen de déplacement, un meilleur accès à la lumière...

Couche diffuse de Gouy : la couche de Stern attire des contre-ions. Ici, anions et cations sont présents et ne sont pas fixés à la surface.

Couche fixe de Stern : l'accumulation des charges de signes opposés face aux charges de surface forment une première couche dite de "Stern". Les ions de cette couche sont liés au colloïde et suivent le mouvement de la particule.

Dimension fractale : elle sert à quantifier le degré d'irrégularité et de fragmentation d'un ensemble géométrique, d'un objet naturel ou d'un système dynamique. Ce nombre, qui mesure la manière dont ces entités remplissent un espace ou un plan dans lequel elles se trouvent, n'est pas nécessairement un entier.

Eutrophisation : du grec *eu* : "bien" et *trophein* : "nourrir" c'est-à-dire riche en éléments nutritifs. Il désigne un déséquilibre qui résulte d'un apport excessif de nutriments : azote et phosphore notamment. Le phosphore étant généralement le facteur limitant dans les milieux aquatiques naturels.

Il en résulte un développement excessif d'algues, une diminution de l'oxygène dissout, une diminution du plancton et donc une diminution de la biodiversité.

Exopolymères : polymères d'origine bactérienne présents à l'extérieur des cellules. Ils peuvent être liés ou non à la paroi cellulaire. Par extension on parle d'exopolymères pour toutes les matières organiques présentes au-delà de la paroi cellulaire (polymères excrétés, capsule, ADN provenant de la lyse cellulaire, morceaux de la paroi cellulaire, matière organique et acide humique piégé, *etc.*).

Filamenteuses (bactéries) : bactéries se développant sous la forme de filament plus ou moins enchevêtré. Elles peuvent participer à la formation des flocons en formant le squelette (théorie "backbones") si elles ne sont pas trop nombreuses mais induisent des problèmes de décantations lors de leur prolifération (formation de mousse).

Floc : agrégat d'aspect floconneux qui, dans le cas des boues activées, est constitué de bactéries agglomérées dans une matrice organique et de particules minérales.

Floculation : phénomène physico-chimique au cours duquel les agrégats et les matières en suspension s'agrègent en un floc, en grossissant ils deviennent assez volumineux pour décanter rapidement ce qui entraîne leur sédimentation. C'est une étape fondamentale du traitement de l'eau (dépollution, potabilisation).

Flottation : On diminue artificiellement la densité des particules pour leur permettre de flotter (la loi de Stock reste applicable). Cette opération est basée sur la capacité qu'ont certains liquides, solides ou molécules à se lier avec des bulles de gaz pour former des particules gazeuses ayant une densité inférieure au liquide. Pendant les pré-traitements des eaux usées, l'injection de microbulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses qui seront raclées en surface.

Fractale : forme géométrique non euclidienne, qui préserve les mêmes schémas d'irrégularité des échelles des plus grandes aux plus petites et dont l'aire décroît au fur et à mesure que son périmètre s'allonge. Dans le cas d'objet naturel, la notion d'invariance est statistique : l'irrégularité garde la même intensité mais la forme générale n'est plus exactement la même.

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ils sont d'origine naturelle ou anthropique. Leurs caractères toxiques et cancérigènes en font des polluants très étudiés.

Hydrocolloïdes : polymères hydrophiles capables de former des gels.

Métazoaire : organisme pluricellulaire qui présente toutes les caractéristiques d'un animal. Un Métazoaire possède des cellules, des tissus et des organes.

Mouvement brownien : mouvement désordonné continu des particules, des colloïdes ou des agrégats en suspension dans un liquide ou un gaz.

Mutualisme : forme d'association bénéfique pour les deux espèces (symbiose) mais qui est essentielle à la survie de chaque protagoniste.

Osmose : phénomène de diffusion observé lorsque deux solutions de concentrations différentes ne sont séparées que par une membrane semi-perméable ; l'eau diffuse alors à travers la membrane, du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré.

Parasitisme : association (obligatoire pour le parasite), d'un individu avec un autre, ne profitant qu'à un seul protagoniste qui vit au dépend de l'autre (l'hôte).

Point isoélectrique : pH où la charge nette de surface de la particule considérée est nulle.

Prédation : une espèce est la proie de l'autre protagoniste (le prédateur) qui s'en repaît.

Principe de Gause : deux espèces ayant des exigences écologiques identiques ou simplement voisines ne peuvent pas coexister dans le même milieu. Une des deux populations éliminera l'autre. Les écologues parlent d'exclusion compétitive.

Protéines : molécule de haut poids moléculaires qui donne par hydrolyse des acides aminés (holoprotéines) ou des acides aminés et d'autres types de produits dans le cas des hétéroprotéines. Elles entrent pour une forte proportion dans la constitution des êtres vivants. Les acides aminés sont liés entre eux par une liaison peptidique.

Protocoopération : forme de d'association bénéfique pour les deux espèces (symbiose) mais qui n'est pas essentielle à la survie de chaque protagoniste.

Protozoaire : organismes unicellulaires faisant partie du règne des Protistes qui, comme des animaux, doivent se nourrir pour obtenir des nutriments.

Siccité : pourcentage de matières sèches dans une boue.

SVI : Sludge Volume Index ou indice de Molhman (IM).

Thermolyse : Procédé de traitement thermique dans lequel les déchets ménagers sont chauffés à température moyenne de 500°C dans un four tournant en absence d'oxygène. Cette dégradation thermique conduit à la formation de gaz et de solides carbonés déchlorurés. Le gaz de thermolyse est extrait du four en continu, dépoussiéré puis dirigé vers une chambre de combustion dans laquelle il est brûlé. Les fumées chaudes (1100°C) ainsi produites sont utilisées pour le chauffage du four.

Transformée de Fourier : La transformée de Fourier est basée sur la découverte que toute fonction périodique du temps $x(t)$ peut être décomposée en une somme infinie de fonctions sinus et cosinus.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Jean-Yves BOTTERO, Directeur de Recherche, CEREGE, Université Aix-Marseille III,
Aix en Provence**

Monsieur Etienne PAUL, Maître de Conférences, INSA, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur GARNIER Christophe

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude chimique et microbiologique des exopolymères de boues activées : éléments de
compréhension du fonctionnement des stations d'épuration"**

en vue de l'obtention du titre de :

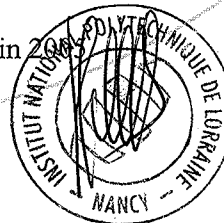
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Géosciences** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 juin 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

Les stations d'épuration utilisant le procédé "boues activées" représentent 65% des stations en France. Mais, les conditions d'exploitation, les températures extrêmes, le salage des routes en hiver, une mauvaise oxygénation, la dilution des boues par les orages, l'arrivée massive de matières facilement assimilables favorisant certaines bactéries, sont autant de raisons d'avoir des déséquilibres parmi les espèces épuratrices du système.

Le but de cette thèse est d'identifier et de caractériser les exopolymères présents dans les floccs de boues activées par leur taille et par leur nature chimique. La chromatographie liquide haute pression par exclusion de taille nous a permis d'obtenir, de séparer et de simplifier le mélange des exopolymères extraits des boues selon leur taille ou leur masse moléculaire. Les faibles quantités de matière recueillie dans chaque prélèvement n'ont pu être étudiées qu'en μ FT-IR. En effet, cette technique présente l'avantage de pouvoir ajuster la taille du faisceau à celle du cristallite à analyser ; le diamètre minimal dans nos conditions d'analyse IR étant égale à 8 μ m. Cette possibilité d'analyse ponctuelle, à l'échelle du micron, autorise une grande sensibilité dans l'identification chimique des différentes familles d'EPS. A partir des spectres obtenus (plus de 1200), nous avons pu élaborer une base de données chimiques des EPS. Grâce à cette méthode et à notre base de données nous avons déterminé une signature spécifique pour chaque station étudiée. D'autres expériences, nous ont montré qu'il est probable qu'il existe un nombre de signatures exopolymériques limitées correspondant à des conditions particulières de fonctionnement. Si l'on peut relier une signature exopolymérique à des conditions de fonctionnement particulières, notre méthode permettrait éventuellement, d'identifier la source du problème.

Des cultures pures de *Klebsiella* et *Enterobacter*, nous ont permis de suivre la cinétique de production des exopolymères de deux souches dans des conditions optimales. En mélange, dans des conditions entraînant une certaine compétition entre ces souches, ce type d'expérience a permis de suggérer un modèle d'évolution des populations utilisable dans ce cas.