

Université de Limoges  
Faculté des Sciences et Techniques  
Groupement de Recherche Eau, Sol, Environnement  
Ecole Doctorale Gay Lussac "Sciences pour l'Environnement"

## **THESE**

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
**Discipline : Chimie et Microbiologie de l'Eau**

Présentée et soutenue par

**Paul d'ABZAC**

Le 25 juin 2010

Composition, extraction et rôle dans la fixation des  
éléments métalliques des polymères extracellulaires  
issus de biomasses épuratoires granulaires anaérobies

Directeurs de Thèse : Pr Gilles GUIBAUD et Dr François BORDAS

### JURY

#### Rapporteurs :

Mr PAUL E. Professeur, INSA de Toulouse

Mr ANDRES Y. Maître assistant HDR, Ecole des Mines de Nantes

#### Membres du jury :

Mme LESPES G. Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Mr BAUDU M. Professeur, Université de Limoges

Mr BORDAS F. Maître de conférences, Université de Limoges

Mr GUIBAUD G. Professeur, Université de Limoges

#### Membres invités :

Mr LENS P.N.L. Professeur, UNESCO-IHE de Delft

Mr van HULLEBUSCH E. Maître de conférences, Université de Paris-Est



Université de Limoges  
Faculté des Sciences et Techniques  
Groupement de Recherche Eau, Sol, Environnement  
Ecole Doctorale Gay Lussac "Sciences pour l'Environnement"

## **THESE**

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
**Discipline : Chimie et Microbiologie de l'Eau**

Présentée et soutenue par

**Paul d'ABZAC**

Le 25 juin 2010

Composition, extraction et rôle dans la fixation des  
éléments métalliques des polymères extracellulaires  
issus de biomasses épuratoires granulaires anaérobies

Directeurs de Thèse : Pr Gilles GUIBAUD et Dr François BORDAS

### JURY

#### Rapporteurs :

Mr PAUL E. Professeur, INSA de Toulouse

Mr ANDRES Y. Maître assistant HDR, Ecole des Mines de Nantes

#### Membres du jury :

Mme LESPES G. Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

Mr BAUDU M. Professeur, Université de Limoges

Mr BORDAS F. Maître de conférences, Université de Limoges

Mr GUIBAUD G. Professeur, Université de Limoges

#### Membres invités :

Mr LENS P.N.L. Professeur, UNESCO-IHE de Delft

Mr van HULLEBUSCH E. Maître de conférences, Université de Paris-Est



*Pour vous Grand-mère et Alex...*



# Remerciements

## Introduction

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Groupement de Recherche Eau, Sol et Environnement (GRESE) et financés par une bourse de la Région Limousin. Je souhaite ainsi remercier le Professeur Michel Baudu, Directeur du GRESE, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces quelques années, du Master Recherche à la fin de ma thèse.

## I. Il était une fin...

Mes tous premiers sentiments de reconnaissance vont à Messieurs Gilles Guibaud (Monsieur le Professeur) et François Bordas pour m'avoir fait confiance et pour avoir encadré mon travail de recherche au cours de ce doctorat. L'encadrement d'une thèse n'ayant pas seulement un aspect recherche mais l'aspect humain étant également nécessaire, je les remercie pour leur soutien, leurs conseils avisés et leur bienveillance.

Je remercie également les membres du jury pour avoir accepté de rapporter mon travail et pour m'avoir apporté leurs précieux conseils et leurs remarques judicieuses. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon sincère respect.

Je souhaite exprimer ma gratitude au Pr. Piet Lens et au Dr. Eric van Hullebusch pour leur aide critique et leur expérience, ainsi qu'au Dr Emmanuel Joussein pour son aide lors des séances de MEB.

## II. Un Docteur sachant conter doit pouvoir compter sur ses pairs

### *1. GRE(A)SE et al.*

Le Doctorat conduit à une certaine et laborieuse solitude mais permet également de rencontrer des gens, qu'ils soient lycéens, doctorants, ingénieurs, Docteurs, Masters, techniciens ou Professeurs ; chimistes, microbiologistes, biochimistes ou géologues ; français, allemands, tchèques, polonais ou malgaches ; de droite, de gauche, du centre, sans étiquette ou révolutionnaires ; disponibles, invisibles, organisés ou bordéliques ; bavards, discrets, maniaques, bizarres, drôles, dépressifs ou boudeurs ; fumeurs, dormeurs, chasseurs, sportifs ou végétariens... Je tiens donc à remercier chaque personne du laboratoire (ou qui est passée par le laboratoire au cours de ces quelques années) pour le petit quelque chose qu'elle m'a apporté.

« Votre vie est dans les autres, et sans les autres votre vie n'est rien » disait Pierre Leroux, je confirme... Alors merci : Priscilla, Jonathan, Isabelle, Jérôme, Audrey, Sonia, Sophie, Liliane, Ely, Virginie, Ficus, Aurélie, Max, Jakub, Angélique, Nastasia, Ony, Bo, Salma, Mike, Hakim, François, Gilles, Stéphane, Rémy, Bernard, Marion, Véronique, Michel, Catherine, Marilyne, Geneviève, Magali, Alexandra, Christophe, Patrice, Aurélie, Lourdès, Karine, Christiane, Sophie, Martine, Raad... (sans oublier ceux que j'ai pu oublier !!!)

Une pensée me paraît également indispensable pour la Team Orga : Cyril « Pastaga », Nico « Gros Bras » et Julien « Woodman » des « 2 be 2 » !!! Tony C. pense à vous les mecs !!! Merci également à Carine, Romain, Benjamin...

Enfin, l'Association Aquatech-Limoges et ses manifestations sont indissociables de cette thèse. La joie d'organiser (n'est-ce pas Priscilla) et le froid des tournois de foot ainsi que les réunions d'anciens ont mis un peu de piment entre deux manips (surtout la poubelle de punch...).

## ***2. Priscilla folle du désert***

Une petite pensée toute particulière à Priscilla qui m'a suivi tout au long de ces années de fac... COPIEUSE !!! Plus sérieusement, un grand grand grand grand merci pour ton soutien, tes avis, tes coups de gueule, tes éclats de rires, tes délires... Finalement on l'a fait mais heureusement qu'on n'était pas seuls !!!! (et on ne s'est même pas entretué dans ce petit bureau)

## ***3. Une famille formidable***

Même si la thèse représente 99,999 % de ces quelques années, j'ai été bien content de retrouver ma famille au cours des miettes de temps qu'il reste. Même si il faut vivre une thèse pour comprendre ce que c'est, merci de toujours avoir été là, alors merci Clémence, Papa, Maman, Cathy, Bertrand et Adeline, Claire, Mathilde, Hélène, Mamie, Tatie, Grand-Mère, Grand-Père, Marie-Hélène et Alex, Tata You, Anne-Marie, Pierre, Tilly et Fabien, Fany et Sylvestre, Marie et Joseph, Simon, Léa, Lucie...

## ***4. Les Copains d'abord***

Combien de fois j'ai entendu : « Tu as de la chance tu es encore étudiant ». Et bien vous voyez bien que finalement j'ai fait quelque chose durant ma thèse !!!! Mais sans les potes ça aurait été bien plus compliqué. Merci de m'avoir changé les idées, de m'avoir remonté le moral, de m'avoir supporté, de m'avoir encouragé... Sans vous je n'en serais pas là Jean Pat, Christophe, Arnuche, PJ, Beneck, Anthoche, Jules, Manolo, Dam's, Jane, Arianne, Alex, Angélique, Eve et les autres.



## **Conclusion**

Comme disait B. Disraeli, « Je suis en proie à une étrange sensation. Si ce n'est pas une indigestion, ça doit être de la gratitude ! ». Pas de problème digestif de mon côté... donc merci à toutes et à tous.



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Partie A : Synthèse Bibliographique .....</b>	<b>8</b>
<b>Chapitre A-1 : Les polymères extracellulaires (PEC).....</b>	<b>9</b>
I. Définition .....	10
II. Origine et composition .....	10
II.1. Origine des PEC .....	10
II.2. Types de PEC et composition.....	12
II.2.a. PEC solubles et PEC liés .....	12
II.2.b. Composition élémentaire .....	15
II.2.c. Composition biochimique .....	16
III. Physico-chimie des PEC .....	21
III.1. Poids moléculaire .....	22
III.2. Groupements fonctionnels des PEC.....	23
III.3. Charge de surface et hydrophobicité .....	25
IV. Rôles au sein des biomasses.....	27
IV.1. Formation et structure de la biomasse.....	27
IV.2. Développement et protection de la biomasse.....	30
VI.2.a. Source de nutriments et d'énergie .....	30
VI.2.b. Maintien de l'hydratation de la biomasse .....	31
VI.2.c. Protection de la biomasse .....	32
VI.2.d. Transfert de gènes dans la biomasse .....	33
V. Conclusion.....	34
<b>Chapitre A-2 : Extraction et caractérisation des PEC.....</b>	<b>35</b>
I. Stockage et préparation des biomasses .....	36
II. Extraction des PEC .....	37
II.1. Méthodes physiques .....	37
II.2. Méthodes chimiques .....	39
II.3. Méthodes biologiques.....	41
II.4. Combinaisons de différentes méthodes .....	42
III. Séparation et purification des extraits de PEC .....	43
IV. Comparaison des techniques d'extraction.....	43
IV.1. Effets sur la composition des extraits de PEC .....	44
IV.2. Efficacité de l'extraction .....	45
IV.2.a. Le rendement d'extraction.....	46
IV.2.b. Evaluation de la lyse cellulaire.....	47
IV.2.c. Altération des molécules .....	48
V. Méthodes de caractérisation des PEC.....	48
V.1. Les dosages colorimétriques .....	48
V.2. Identification des composés des PEC.....	50
V.3. Caractérisation de la structure et des propriétés des molécules .....	51

V.4. Etude in situ des PEC .....	54
VI. Conclusion.....	55
<b>Chapitre A-3 : Sorption des éléments métalliques .....</b>	<b>57</b>
I. Interactions PEC-éléments métalliques .....	58
I.1. Sorption et biosorption.....	58
I.2. Les biomasses et la biosorption des EM .....	59
I.3. Les PEC et la sorption des EM .....	60
II. Facteurs influençant la sorption.....	63
II.1. Influence liée au milieu .....	63
II.2. Influence liée à l'élément métallique.....	65
II.3. Influence liée aux PEC .....	66
III. Analyse et modélisation de la sorption.....	67
III.1. Modes opératoires .....	67
III.2. Modèles utilisés pour l'étude de la sorption.....	68
III.2.a. La cinétique de sorption.....	68
III.2.a. L'isotherme de sorption .....	68
IV. Conclusion.....	69
<b>Chapitre A-4 : Conclusion de la synthèse bibliographique .....</b>	<b>71</b>
<b>Partie B : Matériels et Méthodes .....</b>	<b>74</b>
<b>Chapitre B-1 : Matériels et produits .....</b>	<b>75</b>
I. Appareillages .....	76
II. Produits chimiques.....	77
<b>Chapitre B-2 : Méthodes.....</b>	<b>79</b>
I. Les boues granulaires anaérobies.....	80
II. Extraction des PEC.....	80
II.1. Extractions physiques .....	81
II.2. Extractions chimiques.....	81
II.3. Détermination du poids sec (PS) et du poids sec volatil (PSV) .....	82
II.4. Rendement d'extraction.....	83
III. Caractérisation des PEC .....	83
III.1. Composition biochimique des extraits de PEC .....	83
III.2. Analyse infrarouge .....	84
III.3. Carbone organique total (COT).....	84
IV. Fraction minérale associée aux PEC .....	84
IV.1. Teneurs en composés minéraux .....	84
IV.1.a. Minéralisation.....	85
IV.1.b. Analyse.....	85
IV.2. Microscopie électronique à balayage .....	85
V. Propriétés des PEC .....	86
V.1. Constantes d'acidité des extraits de PEC .....	86
V.2. Sorption du plomb et du cadmium par les PEC .....	87

<b>Partie C : Résultats Expérimentaux .....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre C-1 : Comparaison des techniques physiques et chimiques d'extraction des PEC.....</b>	<b>91</b>
Introduction .....	92
Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols.....	94
Conclusions .....	120
<b>Chapitre C-2 : Caractérisation de la fraction minérale associée aux PEC.....</b>	<b>121</b>
Introduction .....	122
Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges .....	124
Supporting Information for the Manuscript .....	144
Conclusions .....	148
<b>Chapitre C-3 : Effets de l'extraction sur les propriétés de sorption des PEC .....</b>	<b>151</b>
Introduction .....	152
Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges.....	154
Conclusions .....	176
<b>Partie D : Discussion, Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>178</b>
Les Polymères Extracellulaires : Composition, ... ..	180
... Extraction ... ..	183
... et Rôle dans la fixation des éléments métalliques (EM). .....	185
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>192</b>
<b>Liste des publications et communications.....</b>	<b>228</b>



# Liste des figures

## INTRODUCTION

Figure 1. Différentes étapes de la formation des biofilms à l'interface solide/liquide. .... 2

## PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure A<sub>1</sub>. Composition et disposition des PEC solubles et liés (adapté de Wingender *et al.* ; 1999)..... 13

Figure A<sub>2</sub>. Mécanismes à l'origine des PEC solubles et liés (adapté de Laspidou et Rittmann ; 2002)..... 15

Figure A<sub>3</sub>. Exemples de structure des acides aminés, des monosaccharides et d'un nucléotide ..... 23

Figure A<sub>4</sub>. Représentation schématique de la biogranulation favorisée par la présence de PEC (Higgins et Novak 1997; Liu *et al.* 2004b) ..... 29

Figure A<sub>5</sub>. Principaux mécanismes impliqués dans la sorption des éléments métalliques ..... 58

Figure A<sub>6</sub>. Comparaison des « pH-sorption edges » mesurés (points) et modélisés selon le modèle de Kurbatov (trait) pour des extraits de PEC vis-à-vis du plomb (carré ; trait plein) et du cadmium (losanges, pointillés) (PEC extraits par REC + sonication à partir de boues activées ; PEC : 8,7 mg PS.L<sup>-1</sup> ; métal : 2,2 .10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) (Guibaud *et al.* 2006) ..... 64

## PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX

### Chapitre C-1 : Comparaison des techniques physiques et chimiques d'extraction des PEC

Figure 1. IR spectra of EPS samples extracted from the four sludges with centrifugation (solid line Eerbeek, dotted line Emmtec, dashed–dotted line Nedalco; dashed line Revico) ..... 102

Figure 2. IR spectra of EPS samples extracted from Nedalco sludge with physical (A) and chemical (B) extraction techniques. In (A): (solid line centrifugation; dashed–dotted line sonication; dashed line CER and sonication; dashed–double-dotted line CER; dotted line heat) In (B): (solid line centrifugation, dotted line EDTA, dashed–dotted line ethanol, dashed–double-dotted line formaldehyde and heat, dashed line formaldehyde and NaOH) ..... 104

Figure 3. Biochemical composition of EPS extracts for each sludge type ((A)- Eerbeek ; (B)- Emmtec ; (C)- Nedalco; (D)- Revico)  proteins;  polysaccharides;  humic-like substances;  uronic acids;  nucleic acids ..... 109

## Chapitre C-2 : Caractérisation de la fraction minérale associée aux PEC

Figure 1. Partitioning of the organic (□) and mineral (■) fractions (in percent of DW) of sludges and EPS extracts extracted from the four anaerobic granular sludges investigated by different extraction protocols. A- Eerbeek; B- Emmtec; C- Nedalco; D- Revico. .... 129

Figure 2. SEM images of EPS samples along with the content (% w/w) of the main elements extracted from Eerbeek sludge with sonication and CER (1 - 2) and with a rinsing step (3 - 4). .... 134

Figure S1. EPS extraction procedures compared in this study ..... 145

Figure S2. SEM images of EPS samples with a rinsing step extracted from Eerbeek sludge with centrifugation (1 - 3), sonication (2) and formaldehyde + heating (4) along with the content (% w/w) of some elements. .... 146

Figure S3. SEM images of EPS samples with a rinsing step extracted from Eerbeek sludge with ethanol (1) and (2), CER + sonication (3), CER (4) and (6), formaldehyde + NaOH (5) along with the content (% w/w) of some elements. .... 147

## Chapitre C-3 : Effets de l'extraction sur les propriétés de sorption des PEC

Fig. 1. IR spectra of EPS samples extracted with different physical EPS extraction procedures from Eerbeek sludge (—— centrifugation; ..... sonication; — . . — CER and sonication; — . — . CER; — — — heat). .... 159

Fig. 2. Comparison of the IR spectra of EPS samples extracted with different chemical EPS extraction procedures from Eerbeek sludge (A: formaldehyde + heat; B: ethanol; C: Formaldehyde + NaOH; D: EDTA) with the IR spectrum of EPS control (grey spectra).... 161

Fig. 3. Total concentrations of proton binding sites associated with the calculated pKas of EPS extracts from Eerbeek (A), Emmtec (B), Nedalco (C) and Revico (D) sludges expressed in  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of DW (black part: sites associated with  $\text{pKas} \leq 7$ , white part: sites associated with  $\text{pKas} > 7$ ). .... 164

Fig. 4. Ratio of the organic fraction in EPS extracts from Eerbeek (A), Emmtec (B), Nedalco (C) and Revico (D) sludges expressed in % of DW. .... 165

## PARTIE D : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Figure D<sub>1</sub>. Composition des échantillons de PEC extraits par centrifugation à partir des 4 boues granulaires anaérobies (A-Eerbeek ; B-Emmtec ; C-Nedalco ; D-Revico) (répartition en % massique du PS)..... 181

Figure D<sub>2</sub>. Composition des échantillons de PEC extraits par (A) centrifugation, par (B) REC, par (C) l'EDTA et par (D) l'association formaldéhyde et soude à partir de la boue Eerbeek (répartition en % massique du PS) ..... 184



Figure D<sub>3</sub>. Ratios des sites de fixation des protons en fonction du pK<sub>a</sub> qui leur correspondent dans les échantillons de PEC extraits par centrifugation (exprimé en %) (A) et nombre de sites de fixation des protons dans les échantillons de PEC extraits à partir de la boue Nedalco (exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  PS) (B)..... 186

Figure D<sub>4</sub>. Nombre de sites de fixation de Pb (A) et Cd (B) en fonction de la somme des teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like dans les échantillons de PEC extraits par les méthodes physiques des 4 boues granulaires (exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  PS) (courbe grise : courbe de tendance)..... 188

Figure D<sub>5</sub>. Quantité de Pb libre en solution (mol) dans la cellule de mesure, déterminée par polarographie, en fonction de la quantité totale de Pb ajoutée dans la cellule (mol) avec (courbe noire) ou sans (courbe grise) PEC (extraits par (A) REC de la boue Eerbeek et (B) chauffage de la boue Revico) (volume initial dans la cellule de mesure : 23 mL ; concentration initiale en PEC : (A)  $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$  et (B)  $0,29 \text{ mg.mL}^{-1}$  ; pH 7,0 ; 20 °C)..... 189



# Liste des Tableaux

## PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau A <sub>1</sub> . Exemples de composition élémentaire de différents échantillons de PEC .....	16
Tableau A <sub>2</sub> . Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, lipides et acides nucléiques d'extraits de PEC issus de différentes biomasses .....	17
Tableau A <sub>3</sub> . Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides et acides nucléiques d'extraits de PEC issus de boues activées traitant différents effluents (Sponza 2002).....	17
Tableau A <sub>4</sub> . Exemples de teneurs de différents monosaccharides de solutions de PEC extraits à partir de boues activées traitant une eau usée classique et une autre riche en sucres (Boyette <i>et al.</i> 2001).....	18
Tableau A <sub>5</sub> . Exemples de pK <sub>a</sub> déterminés dans des échantillons de PEC extraits de différentes biomasses avec leur nombre de sites et les groupements fonctionnels correspondant .....	24
Tableau A <sub>6</sub> . Exemples de protocoles d'extraction physique des PEC .....	39
Tableau A <sub>7</sub> . Exemples de protocoles d'extraction chimique des PEC.....	41
Tableau A <sub>8</sub> . Exemples de quantités totales de PEC extraits à partir de 3 boues activées par différentes méthodes d'extraction (Ge <i>et al.</i> 2007).....	44
Tableau A <sub>9</sub> . Exemples de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à partir d'une boue activée et d'une biomasse granulaire anaérobie par différentes méthodes d'extraction (Liu et Fang 2002b) .....	45
Tableau A <sub>10</sub> . Exemples d'influence de la technique d'extraction sur le rendement d'extraction des PEC .....	46
Tableau A <sub>11</sub> . Exemples d'influence de la méthode d'extraction sur la quantité totale de PEC, la quantité d'acides nucléiques et le rapport protéines/polysaccharides dans des échantillons de PEC extraits à partir de culture de <i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (Sheng <i>et al.</i> 2005) ....	48
Tableau A <sub>12</sub> . Exemples de techniques de dosage des composants des PEC .....	49
Tableau A <sub>13</sub> . Principes des différentes techniques utilisées pour l'analyse de la charge de surface des PEC (Boyette <i>et al.</i> 2001; Mikkelsen 2003).....	53
Tableau A <sub>14</sub> . Exemples d'affinités de différentes biomasses avec les EM .....	59
Tableau A <sub>15</sub> . Exemples de capacités maximales de sorption des PEC issus de diverses biomasses vis-à-vis d'EM lors de tests de sorption monoélémentaires .....	60
Tableau A <sub>16</sub> . Principaux groupements fonctionnels des PEC jouant un rôle dans les mécanismes de sorption (Volesky 2007) .....	62

## **PARTIE B : MATERIELS ET METHODES**

Tableau B <sub>1</sub> : Liste des appareils utilisés au cours des expériences des travaux de recherche..	76
Tableau B <sub>2</sub> : Liste des réactifs chimiques utilisés au cours des expériences des travaux de recherche .....	77
Tableau B <sub>3</sub> . Origines des boues granulaires anaérobies utilisées au cours des expériences ....	80
Tableau B <sub>4</sub> . Caractéristiques des dosages colorimétriques utilisés pour la détermination de la composition biochimique des PEC .....	83

## **PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

### **Chapitre C-1 : Comparaison des techniques physiques et chimiques d'extraction des PEC**

Table 1. Main characteristics of the four anaerobic granular sludges used in this study .....	98
Table 2. Main characteristics of the colorimetric methods used for EPS biochemical characterization. ....	101
Table 3. Extraction yield for each extraction protocol expressed in % (DW EPS.DW <sup>-1</sup> sludge) .....	105
Table 4. Organic carbon content (mg C.g <sup>-1</sup> DW or mg C.g <sup>-1</sup> VDW) of the EPS extracted from 4 different anaerobic granular sludges .....	106
Table 5. Nucleic Acids content (mg.g <sup>-1</sup> DW EPS sample) and ratio Proteins content /Polysaccharides content of EPS extracts of the four sludges investigated .....	108

### **Chapitre C-2 : Caractérisation de la fraction minérale associée aux PEC**

Table 1. Major elements content in anaerobic granular sludge samples and EPS extracts as a function of the extraction scheme. ....	131
Table 2. Trace elements content in anaerobic granular sludge samples and EPS extracts as a function of the extraction scheme. ....	132

### **Chapitre C-3 : Effets de l'extraction sur les propriétés de sorption des PEC**

Table 1. pK <sub>a</sub> values and concentrations of proton binding sites in EPS extracts.....	163
Table 2. Concentrations of Pb and Cd binding sites in EPS extracts at pH 7.0. ....	168

# Abréviations

**ADN ou DNA** : Acide désoxyribonucléique

**ARN ou RNA** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BAP** : Produits associés à la biomasse

**BCA** : Acide bicinchonique

**CLSM** : Microscopie confocale à balayage laser

**CO** : Carbone organique

**ConA** : Concanavaleine A

**COT ou TOC** : Carbone organique total

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DLVO** : Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek

**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique

**EEM** : Spectroscopie de fluorescence utilisant une matrice d'excitation-émission

**EGSB** : Expanded granular sludge bed

**EGTA** : Acide éthylèneglycoltétraacétique

**EM** : Eléments métalliques

**EPR** : Spectrométrie de résonance paramagnétique électronique

**EPS** : Exopolysaccharides ou Extracellular polymeric substances

**FFF** : Fractionnement par couplage flux-force

**FITC** : Fluorescéine isothiocyanate-5

**FTIR** : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

**G6P-DH** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

**GC** : Chromatographie en phase gazeuse

**GC-FID** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

**GFC** : Chromatographie par filtration sur gel

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance

**ICP-AES** : Plasma inductif couplé à un spectromètre d'émission atomique

**ICP-MS** : Plasma inductif couplé à un spectromètre de masse

**ICP-OES** : Plasma inductif couplé à un spectromètre d'émission optique

**KDO** : 2-céto-3-désoxyoctanoate

**LC MS/MS** : Chromatographie en phase liquide couplée à un tandem de spectromètres de masses

**MES ou TSS** : Matières en suspension

**MVS ou VSS** : Matières volatiles en suspension

**NMR** : Résonance magnétique nucléaire

**NMR CP-MAS** : Résonance magnétique nucléaire à polarisation croisée avec rotation à l'angle magique

**PBS** : Solution de tampon phosphate

**PEC ou EPS** : Polymères extracellulaires

**PMS ou SMP** : Produits microbiens solubles

**PS ou DW** : Poids sec

**PSD** : Distribution granulométrique

**PSV ou VDW** : Poids sec volatil

**REC ou CER** : Résine échangeuse de cations

**SDS PAGE** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate

**SEC** : Chromatographie d'exclusion stérique

**SEM EDX** : Microscope électronique à balayage équipé d'une microsonde X dispersive en énergie

**SMDE** : Mode polarographique à goutte de mercure statique tombante

**UAP** : Produits associés à l'utilisation des substrats

**UASB** : Upflow anaerobic sludge blanket

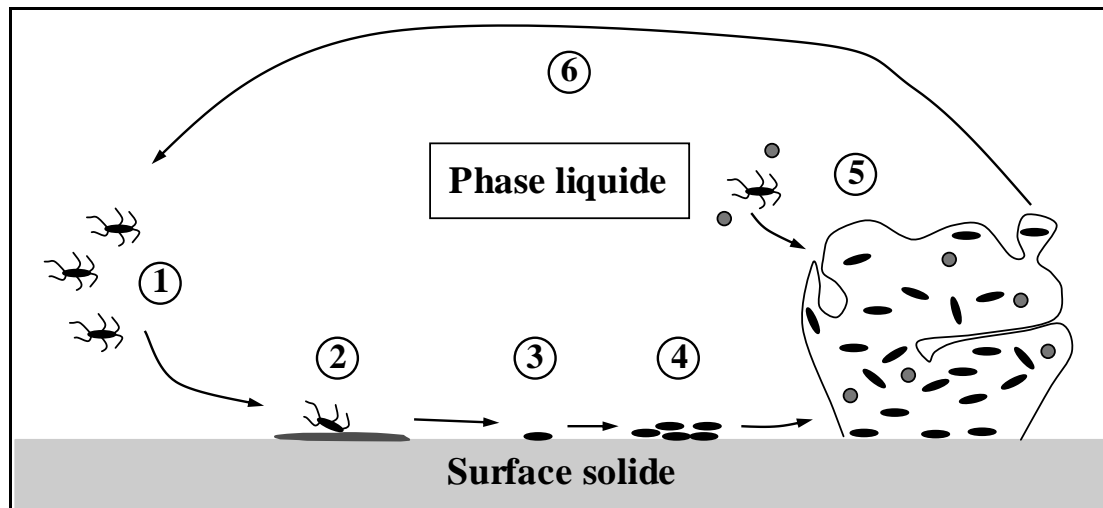


**INTRODUCTION**





Dans l'environnement, les biofilms se trouvent de manière ubiquitaire (sols, eau, air) incluant leur présence à l'intérieur d'hôtes animaux et végétaux et jouent un rôle important dans les processus biogéochimiques de la biosphère. Les biofilms peuvent être définis comme des communautés de microorganismes procaryotes et/ou eucaryotes structurées spatialement et métaboliquement (Nikolaev et Plakunov 2007). Ces microorganismes sont fixés dans une matrice de polymères extracellulaires (PEC) et le biofilm est situé à une interface de différentes phases (*e.g.* solide/liquide, solide/air, liquide/liquide ou liquide/air). Ces communautés peuvent être composées d'une seule ou de plusieurs espèces de microorganismes. Des composés organiques ou minéraux peuvent également se retrouver piégés dans la matrice de PEC en fonction du milieu de croissance du biofilm (Wingender *et al.* 1999).



**Figure 1. Différentes étapes de la formation des biofilms à l'interface solide/liquide.**

Dans notre étude, ce sont les biofilms à l'interface solide/liquide qui nous intéressent. La formation de ces biofilms se fait en plusieurs étapes comme le montre la Figure 1 :

① Les microorganismes sont libres et se déplacent dans leur environnement avec le courant ou grâce à leurs flagelles.

② Les microorganismes s'adsorbent de manière réversible à la couche de substrat fixée sur la surface solide. Les interactions entrant en jeu à ce stade entre la cellule et le substrat sont les forces de Van der Waals, les forces de dispersion de London, des interactions hydrophobes et électrostatiques (Nikolaev et Plakunov 2007).

③ Des protéines de surface des microorganismes telles que les adhésines permettent une fixation irréversible de la cellule sur la surface solide (Goller et Romeo 2008).

④ Les cellules se multiplient et un biofilm en deux dimensions apparaît.

⑤ Les microorganismes produisent des PEC qui forment une matrice dans laquelle sont imbriquées les cellules. D'autres organismes d'espèces différentes peuvent également se fixer et participer à la structure du biofilm en trois dimensions. Des canaux, des pores et des cavités apparaissent au sein de la structure, permettant ainsi la circulation de liquides ou de gaz de manière à ce que les microorganismes des couches inférieures aient accès aux nutriments nécessaires à leur développement (Klausen *et al.* 2003). Le biofilm est alors dit « mature ».

⑥ Des cellules se détachent du consortium afin d'aller coloniser d'autres endroits. Le détachement des cellules peut être en réponse à un stress du biofilm dû à des modifications du milieu (pH, apport de nutriments, salinité...).

Il est estimé que 95 à 99% des microorganismes vivent sous forme de biofilms plutôt qu'en tant que cellule libre (Nikolaev et Plakunov 2007). Ce mode de structuration est une stratégie de survie pour les cellules, leur permettant ainsi de se protéger contre les composés pouvant leur être toxiques (*e.g.* éléments métalliques, désinfectants...), contre la prédation ou encore contre un stress dû à une modification du milieu (*e.g.* pH, force ionique, température, accès aux nutriments, débit...) (Hall-Stoodley et Stoodley 2005; Huq *et al.* 2008). Toutefois, l'organisation des microorganismes au sein du biofilm ainsi que sa structure diffèrent suivant l'interface à laquelle il se trouve, suivant les conditions du milieu (débit, accès aux nutriments...) et également en fonction des espèces présentes dans le biofilm. Ainsi, le biofilm peut être monocouche ou stratifié (Allan *et al.* 2002), et peut avoir une forme laminaire, une forme de champignon ou encore une forme de bandelettes (Stoodley *et al.* 1999).

Bien que les biofilms puissent avoir un rôle hôte pour des microorganismes pathogènes (Huq *et al.* 2008), l'utilisation de bioprocédés, inspirés du principe des biofilms, pour la potabilisation de l'eau et surtout pour le traitement des eaux usées est aujourd'hui une nécessité sanitaire mais également économique (Kassam *et al.* 2003). Ces procédés sont basés sur le développement de biofilms capables de dégrader les composés organiques et de piéger les éléments minéraux de l'effluent. Ces biofilms se trouvent sous diverses formes suivant le procédé, qu'il soit aérobie ou anaérobie. Ainsi, on peut les trouver fixés sur des grains de sable (Lea 2008) ou de charbon actif (Simpson 2008), sous forme de flocons (Urbain *et al.*

1993) ou encore de granules (Nicolella *et al.* 2000; Liu et Tay 2004). Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux granules anaérobies qui sont utilisées pour traiter des effluents industriels riches en composés organiques et minéraux.

Le principal intérêt de l'utilisation de boues granulaires anaérobies réside dans la capacité de ce type de biomasse à dégrader efficacement la matière organique de l'effluent traité dans des réacteurs compacts, conduisant à une faible production de boue. Les composés organiques sont dégradés et utilisés dans le métabolisme des microorganismes pour ensuite être transformés en méthane (O'Flaherty *et al.* 2006). La production de méthane dans les réacteurs anaérobies est un outil de contrôle du bon fonctionnement du réacteur mais également un enjeu économique. Les effluents industriels peuvent également contenir de fortes teneurs en éléments métalliques. Les granules ont des capacités de biosorption vis-à-vis de ces composés minéraux (Van Hullebusch *et al.* 2004; Yao *et al.* 2009), permettant ainsi la diminution des teneurs dans l'effluent.

Les granules sont des agrégats bactériens de forme sphérique qui mesurent entre 0,1 et 5 mm de diamètre et comportent de nombreux canaux et cavités permettant les échanges de substrat et de gaz. Elles sont assimilées à des biofilms particuliers et sont composées de microorganismes, de PEC et d'éléments minéraux (Bhatti *et al.* 1995). Bhatti *et al.* (1995) ont montré que la composition de la fraction minérale des granules dépend du milieu de croissance, c'est-à-dire de la composition de l'effluent, et des conditions du réacteur. Les éléments minéraux composant les granules sont majoritairement le calcium, le soufre, le phosphore et le fer (Gupta et Gupta 2005). La fraction organique des granules anaérobies représente 70 à 90 % du poids sec des granules (Zandvoort *et al.* 2006b; Van Hullebusch *et al.* 2007). Les PEC, quant à eux, représentent 0,6 à 30 % de cette fraction organique (Schmidt et Ahring 1996; Vivanco *et al.* 2006)

*et al.* 2003). Chaque granule est composée de millions de microorganismes par gramme de biomasse (Liu et Tay 2002) et les différentes populations présentes dans les granules diffèrent d'un réacteur à l'autre. La diversité des microorganismes dépend des conditions opératoires du réacteur (*e.g.* température, pH...), des nutriments présents dans l'effluent traité et du type de réacteur (*e.g.* UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket, EGSB – Expanded Granular Sludge Bed...) (McHugh *et al.* 2003). McHugh *et al.* (2003) ont déterminé cinq groupes d'agrégats de microorganismes dans des boues granulaires anaérobies : (i) les *Methanococcus*, (ii) les

*Methanobacteriales*, (iii) les *Methanomicrobiales* (iv) les *Methanosarcina* et (v) les *Methanosaeta*. Néanmoins, les populations présentes dans les granules évoluent en fonction du stade de formation de la granule (Fernández *et al.* 2008) et des conditions du milieu (Quarmby et Forster 1995). Ainsi, diverses études ont montré que les principaux microorganismes présents dans les granules matures de réacteurs anaérobies sont les bactéries méthanogènes de genre *Methanosarcina* et *Methanosaeta* qui produisent des PEC (Liu *et al.* 2002; McHugh *et al.* 2003; Gupta et Gupta 2005). L'organisation des espèces au sein de la granule dépend de la nature du substrat présent dans l'effluent traité. Ainsi, deux grands types de structures se retrouvent dans les granules : des multicouches concentriques (Liu *et al.* 2002) et des microcolonies organisées et réparties dans la granule (Imachi *et al.* 2000). Quelle que soit la structure bactérienne de la granule, les microorganismes sont organisés en fonction des besoins et de l'accès au substrat de chaque espèce.

Au cours des trente dernières années, les recherches sur les biofilms ont mis en évidence que les biomasses sont des systèmes complexes au sein desquels les PEC ont une contribution importante dans la structure, la défense et la nutrition (Brown et Lester 1982; Wingender *et al.* 1999). L'étude de ces biopolymères a permis de mieux comprendre la formation et l'organisation de ces biomasses (Liu *et al.* 2004b). Bien que la littérature concernant les PEC soit aujourd'hui relativement riche, peu de données sont disponibles sur les PEC dans les biomasses épuratoires granulaires anaérobies. L'extraction des PEC des biomasses est une étape indispensable dans l'étude des PEC. Toutefois, le manque de protocole d'extraction de référence pose le problème de la comparaison des résultats des différents travaux de la littérature. Le premier but de ce travail de recherche est l'étude de la composition des PEC issus de boues granulaires anaérobies et la détermination des impacts que peuvent avoir les techniques d'extraction. Pour cela, nous avons utilisé quatre boues différentes et testé neuf méthodes d'extraction couramment citées dans la littérature. Les extraits de PEC ont ensuite été caractérisés par les méthodes classiques de la littérature. Nos résultats ont mis en évidence une fraction minérale importante associée au PEC dans les extraits. Cette fraction, rarement évoquée dans les différents travaux, a été caractérisée par des méthodes nouvelles dans l'étude des PEC afin de mieux comprendre les interactions entre les PEC et les éléments inorganiques.

Les eaux usées traitées par des bioprocédés peuvent contenir de nombreux polluants tels que des pesticides, des colorants ou des éléments métalliques. Les biomasses épuratoires sont

capables de fixer ces polluants (Wang et Chen 2009). Certains éléments métalliques, à l'état de traces, sont indispensables au métabolisme des microorganismes (Gadd 2010). Toutefois, de plus fortes teneurs peuvent être toxiques pour les bactéries. La structure des biomasses agit alors comme une barrière de protection pour les microorganismes. Différentes études ont montré l'implication des PEC au sein des biomasses dans la fixation des éléments métalliques (Pal et Paul 2008). La deuxième partie des recherches s'est concentrée sur les capacités de sorption des PEC issus de boues granulaires anaérobies vis-à-vis des éléments métalliques. Ainsi, après avoir déterminé les fonctions réactives des PEC, nous avons étudié le comportement des PEC vis-à-vis du plomb et du cadmium. Cette partie a pour but d'identifier l'impact de la méthode d'extraction sur les propriétés de sorption des PEC mais également de mieux appréhender les mécanismes entrant en jeu et la part que peuvent avoir les fractions organiques et minérales des extraits dans ces mécanismes. La meilleure compréhension de ces interactions permet de mieux percevoir le devenir de ces polluants dans les bioréacteurs mais également dans les rejets.

Ainsi, ce manuscrit de thèse s'articule en quatre parties :

➤ La première partie (Partie A) correspond à une synthèse bibliographique qui a pour but de faire un état des lieux des recherches concernant les PEC. Le premier chapitre s'attache à la définition, à la composition et aux propriétés des PEC. Le second chapitre revient sur l'extraction et la caractérisation des PEC. Le troisième chapitre est basé sur la sorption des éléments métalliques par les PEC. Enfin, un dernier chapitre conclut cette synthèse bibliographique.

➤ La deuxième partie (Partie B) reprend, dans un premier chapitre, les différents appareils et produits chimiques utilisés au cours des expérimentations. Les caractéristiques des boues utilisées et les méthodes d'analyses sont ensuite développées dans un second chapitre.

➤ Les résultats expérimentaux sont présentés dans la troisième partie (Partie C) sous forme d'articles répartis en trois chapitres. Le premier chapitre traite de la composition des PEC issus des boues granulaires anaérobies et de l'influence de l'extraction sur la fraction organique des extraits. Le second chapitre présente la caractérisation de la fraction minérale associée aux PEC. Enfin, le troisième chapitre comporte les résultats obtenus pour les tests de

## Introduction

---

sorption du plomb et du cadmium dans le but de déterminer l'influence de l'extraction sur la capacité des extraits à fixer les éléments métalliques.

➤ La dernière partie de ce mémoire (Partie D) reprend les différentes conclusions des résultats, où elles sont discutées en mettant en avant les avancées apportées par ce travail dans le domaine des PEC : leur composition, leur extraction et leur rôle dans la fixation des éléments métalliques.

## **PARTIE A : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## ***Chapitre A-1 : Les polymères extracellulaires (PEC)***

---



## **I. Définition**

Dans les biofilms, les bactéries sont plus ou moins immobilisées dans une matrice composée de polymères organiques biosynthétiques (biopolymères) appelés exopolymères ou encore polymères extracellulaires (PEC). Par définition, les PEC ou EPS (Extracellular Polymeric Substances) sont un mélange complexe de macromolécules ayant des masses moléculaires et des propriétés structurales variables et se situant à l'extérieur des cellules dans les biofilms (Omoike et Chorover 2004). Ces biopolymères ont été, dans un premier temps, définis comme des polymères « d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens » (Geesey 1982). Depuis, cette définition a été étoffée et les PEC ont ensuite été considérés comme « des polymères organiques d'origine microbienne qui, dans les systèmes de biofilms, sont souvent responsables des liaisons cellules-cellules et cellules-matériau particulaire (cohésion) et également des liaisons cellules-substrat (adhésion) » (Characklis et Wilderer 1989). Une définition plus moderne des PEC considère qu'ils permettent aux microorganismes de vivre continuellement dans des populations mixtes et stables à haute densité cellulaire. La matrice polymérique est alors un milieu permettant la coopération et la communication des cellules entre elles en les maintenant proches les unes des autres (Wingender *et al.* 1999).

Dans cette étude, les PEC étudiés ont été extraits à partir de biomasses épuratoires granulaires anaérobies. Or, dans la littérature, il existe peu de travaux traitant des PEC issus de ce type de biomasse. Ainsi, dans les différents chapitres de la synthèse bibliographique sur les PEC, la biomasse d'origine de ces biopolymères pourra être des biofilms, des boues activées, des boues granulaires ou encore des cultures de souches bactériennes pures.

## **II. Origine et composition**

### **II.1. Origine des PEC**

Les PEC peuvent avoir trois origines différentes : la sécrétion active des molécules par les bactéries, des produits issus de la lyse cellulaire et l'adsorption de molécules organiques de l'environnement (Dignac *et al.* 1998; Wingender *et al.* 1999).

Tous les microorganismes ne sécrètent pas des PEC. Ainsi, la composition des PEC dans la biomasse dépend des espèces bactériennes présentes. Il existe différents mécanismes impliqués dans la diffusion des PEC à travers la membrane vers la surface bactérienne ou dans le milieu environnant. Ces mécanismes ont été identifiés pour les protéines (Binet *et al.* 1997; Dautin et Bernstein 2007; Ling Lin *et al.* 2007; Gatsos *et al.* 2008) et les polysaccharides (Jonas et Farah 1998; Sutherland 2001a; Jefferson et Cerca 2006) dans le métabolisme des bactéries. Durant leur croissance, les bactéries peuvent également libérer des vésicules membranaires composées de molécules issues de la membrane et de molécules périplasmiques (lipopolysaccharides, protéines enzymatiques, phospholipides) (Li *et al.* 1998). Il a également été mis en évidence que les bactéries échangent des gènes en sécrétant des brins d'ADN chromosomique (Lorenz et Wackernagel 1994), ce qui explique en partie la présence d'acides nucléiques dans les matrices des PEC. La production de PEC par les bactéries varie en fonction de leur phase de croissance avec une production maximale en phase stationnaire (Bhaskar et Bhosle 2005). Les paramètres environnementaux du milieu peuvent également influencer la production de PEC par les microorganismes. Ainsi, les stress dus à la teneur en substrats (Hoa *et al.* 2003; Velasco *et al.* 2006), à la présence d'éléments métalliques (Mikes *et al.* 2005) ou encore à la concentration en oxygène dans le milieu (Hsieh *et al.* 2006) affectent la sécrétion des PEC. Plusieurs auteurs ont essayé de modéliser l'influence générale de ces paramètres sur la production de PEC (Laspidou et Rittmann 2002; Ni *et al.* 2009). Néanmoins, il est difficile de modéliser cette relation devant le nombre de paramètres à prendre en compte et les réactions différentes suivant le type de microorganisme. Au sein de la biomasse, lors de modifications du milieu, les bactéries s'adaptent à ces changements de conditions environnementales en modifiant leur métabolisme de sécrétion des PEC. De plus, la communauté bactérienne s'adapte en favorisant ou diminuant le nombre de microorganismes capables de sécréter des PEC (Liu et Fang 2002b). Toutefois, il n'a pas encore été mis en évidence si la sécrétion de PEC se fait avant ou après l'agrégation des cellules au sein des biofilms.

Les PEC peuvent également provenir de débris cellulaires issus de la lyse des bactéries (Wingender *et al.* 1999). En effet, les molécules de hauts poids moléculaires du matériel intracellulaire (acides nucléiques, protéines) et des membranes (peptidoglycanes, phospholipides) sont relarguées dans le milieu lors de la lyse et se retrouvent piégées dans la matrice polymérique. Ces macromolécules sont ensuite considérées comme des PEC à part entière car elles ont les mêmes rôles dans la biomasse que les PEC sécrétés activement par les bactéries.

Enfin, les effluents traités biologiquement contiennent des composés organiques tels que des micropolluants ou des substances humiques-like qui sont des produits de la dégradation enzymatique de divers biopolymères, qui ont ensuite subi un réarrangement (Sponza 2002). Les molécules présentes varient en fonction de l'effluent traité. Ces macromolécules peuvent s'adsorber avec la matrice de PEC ou les bactéries elles-mêmes lors du traitement et être assimilées à des PEC, étant donné qu'elles ont les mêmes propriétés (Wingender *et al.* 1999).

## **II.2. Types de PEC et composition**

Par définition les PEC se trouvent à l'extérieur des cellules et forment un réseau de macromolécules plus ou moins fortement liées entre elles et avec les cellules.

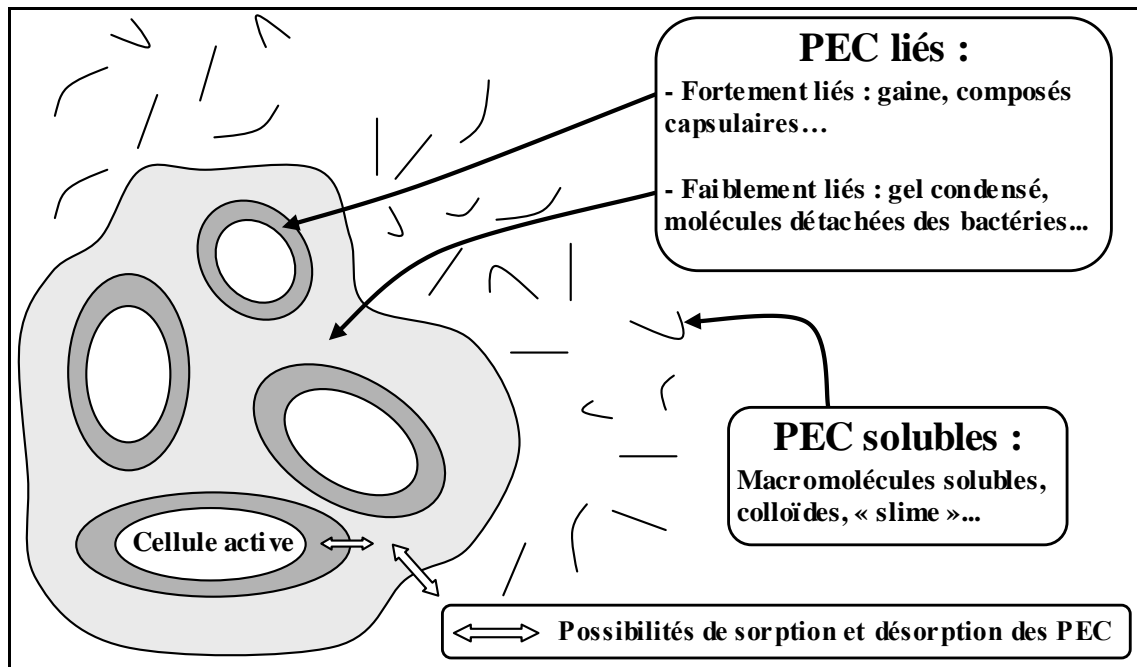
### ***II.2.a. PEC solubles et PEC liés***

L'environnement des cellules au sein des biofilms est composé, entre autres, de cellules vivantes et de produits microbiens tels que des PEC, de la biomasse inerte et des produits microbiens solubles (PMS ou SMP pour Soluble Microbial Products) (Laspidou et Rittmann 2002). Au sein même de la classe des PEC, il a été mis en avant, par différents auteurs, une nuance quant à la liaison des PEC avec les cellules bactériennes (Nielsen *et al.* 1997; Laspidou et Rittmann 2002; Wilén *et al.* 2003a). Ainsi, les PEC peuvent être classés sous deux formes : les PEC liés et les PEC solubles. Les PEC liés seraient les molécules fixées aux membranes cellulaires ou très proches de ces dernières et les PEC solubles seraient les molécules libres (Figure A<sub>1</sub>). Ces deux groupes sont présents en quantités différentes au sein des biomasses (Wolfstein et Stal 2002).

Le groupe des PEC liés est apparenté par Wingender *et al.* (1999) à un glycocalyx qui correspond à des couches de biopolymères entourant la cellule bactérienne et liées aux protéines ou aux lipides de la membrane. Ces PEC peuvent former une gaine qui est liée à la membrane autour des cellules. Au sein de cette gaine, se trouvent des protéines qualifiées de lectine-like, ayant les mêmes propriétés que les lectines, capables de se fixer spécifiquement aux oses (Higgins et Novak 1997). Ainsi, ces protéines renforcent la structure de la gaine en se fixant fortement aux polysaccharides. Les PEC liés comprennent également des composés capsulaires tels que des polysaccharides liés aux phospholipides de la paroi cellulaire de manière covalente (Roberts 1996). Enfin, les PEC liés peuvent être l'être faiblement aux cellules et ainsi former un gel (ou « slime ») dans lequel les molécules sont peu organisées

(Wingender *et al.* 1999). Ce gel est composé de biopolymères détachés des cellules et de matériel organique issu de l'environnement. Toutefois, certains auteurs classent les « slimes » dans les PEC solubles, même si les molécules ne sont pas sous forme dissoute, car elles ne sont que faiblement attachées aux cellules.

La composition des PEC solubles est, quant à elle, beaucoup plus imprécise et la définition des PEC solubles diffère suivant les auteurs. Pour Wingender *et al.* (1999), les PEC solubles regroupent les macromolécules dissoutes, les colloïdes qui sont les polymères non dissous et qui ne sont pas liés aux cellules ainsi que les « slimes ». D'autres auteurs incluent également les produits d'hydrolyse des PEC liés, relargués dans le milieu (Hsieh *et al.* 1994; Nielsen *et al.* 1997).

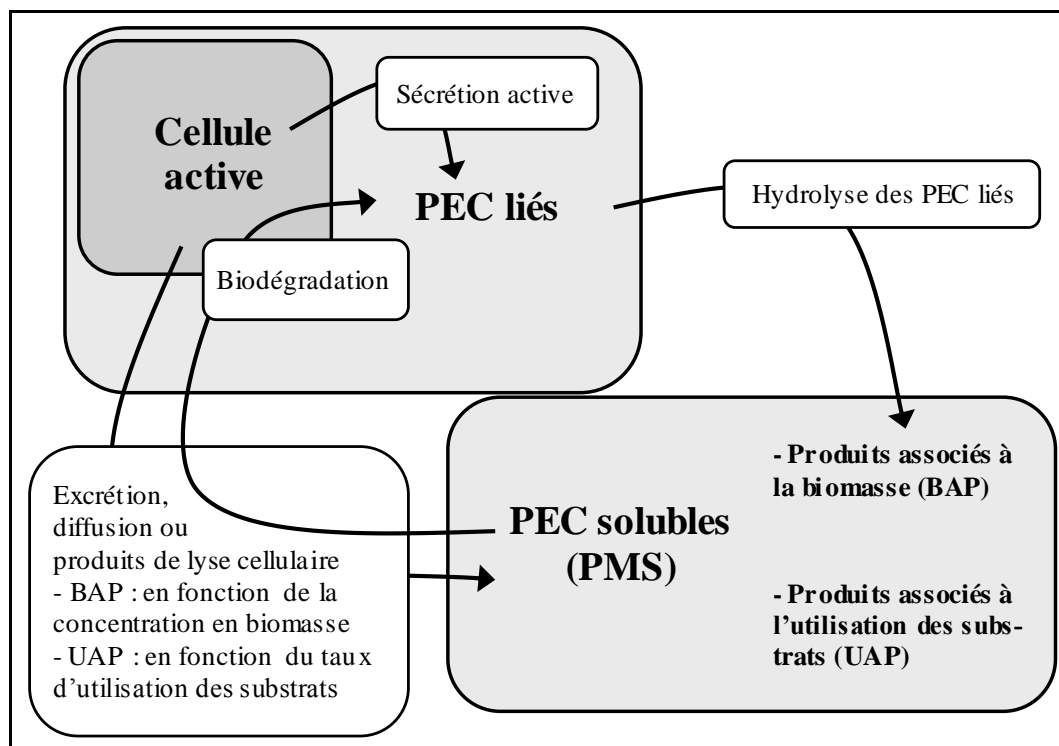


*Figure A1. Composition et disposition des PEC solubles et liés (adapté de Wingender *et al.* ; 1999)*

Une autre classe de composés fait débat dans l'étude des PEC : les produits microbiens solubles ou PMS. Les PMS ont été définis comme étant des composés cellulaires solubles et biodégradables de poids moléculaires moyens relargués lors de la lyse cellulaire, qui diffusent à travers la membrane cytoplasmique, perdus lors de la synthèse des cellules ou excrétés en réponse par exemple à la présence de composés toxiques dans le milieu (Namkung et Rittmann 1986). Ces PMS sont présents de manière ubiquitaire et forment la source principale de la demande chimique en oxygène des effluents dans les procédés de traitement biologique (Lapidou et Rittmann 2002). Les PMS sont, à l'origine, considérés comme étant des

molécules différentes des PEC. Ils se divisent en deux groupes : les composés associés à la biomasse (BAP) et les composés associés à l'utilisation des substrats (UAP). Les BAP proviennent de la dégradation de la biomasse et sont produits proportionnellement à la concentration de la biomasse. Les UAP sont des composés issus de la dégradation des substrats par le métabolisme de la biomasse lors de sa croissance et sont produits proportionnellement au taux d'utilisation des substrats (Barker et Stuckey 1999). Laspidou et Rittmann, (2002) ont proposé un modèle réunissant le concept des SMP et celui des PEC en se basant sur des principes inhérents au métabolisme cellulaire, certains composés étant biodégradables et donc susceptibles d'être des substrats donneurs d'électron, la biomasse active étant l'accepteur d'électrons. Ainsi, d'après leurs travaux, les SMP pourraient être considérés comme étant des PEC solubles (Figure A<sub>2</sub>). Toutefois, ce modèle ne fait pas l'unanimité. Ainsi, des auteurs incluent également dans la composition des SMP des composés ayant de hauts poids moléculaires comme certains PEC liés (Aquino et Stuckey 2004). D'autres études ont montré que les SMP et les PEC solubles présentent des caractéristiques chimiques similaires mais pas identiques (Tsai *et al.* 2008), mais ces différences peuvent provenir du fait que les auteurs n'utilisent pas les mêmes définitions de ces composés.

De nombreuses théories existent sur l'origine et la composition des PEC liés et solubles, basées par exemple sur la différence de composition chimique des composés (Zevenhuizen et Faleschini 1991) ou encore sur les différences de cinétique des mécanismes de sorption/désorption des PEC avec la matrice entourant les cellules (Nielsen *et al.* 1997). De plus, il faut tenir compte du fait que les conditions environnementales influent sur les propriétés des molécules composant les PEC (*e.g.* pH, présence de cations, présence de composés toxiques...) (Nielsen *et al.* 1997). Wingender *et al.* (1999) proposent de définir les PEC solubles et liés en fonction du protocole d'extraction utilisé. L'extraction des PEC solubles peut donc se faire avec un procédé simple comme une centrifugation alors que l'extraction des PEC liés, plus fortement attachés à la biomasse, nécessite des procédés plus drastiques engendrant une dispersion de la biomasse (*e.g.* sonication, chauffage, réactifs chimiques...). Ainsi, pour l'étude des PEC liés et solubles dans des biomasses, certains auteurs utilisent des procédés d'extraction en deux étapes : l'une pour récupérer les PEC solubles puis une autre pour extraire les PEC liés (Tsai *et al.* 2008). **C'est cette dernière notion basée sur le procédé d'extraction qui a été choisie pour différencier PEC solubles et PEC liés dans la suite du manuscrit.**



*Figure A2. Mécanismes à l'origine des PEC solubles et liés (adapté de Laspidou et Rittmann ; 2002)*

### **II.2.b. Composition élémentaire**

Les PEC sont des molécules organiques composées de carbone, d'azote, de phosphore, d'oxygène et d'hydrogène (Tableau A<sub>1</sub>). Par exemple, le carbone représente 50 % des protéines et 44 % des polysaccharides (rapport masse/masse) (Metzger *et al.* 2009). Les autres éléments constitutifs des PEC sont très peu évoqués dans la littérature et peuvent être mesurés par exemple par spectrométrie de fluorescence X (Omoike et Chorover 2004). La concentration en carbone organique (CO) dans les échantillons de PEC permet d'évaluer la quantité de fraction organique présente (Guibaud *et al.* 2003). La teneur en CO dépend de la composition biochimique des PEC. Ainsi, Guibaud *et al.* (2003) ont obtenu des valeurs de CO allant du simple au double et comprises entre 270 et 526 mg C.g<sup>-1</sup> de poids sec (PS) pour des échantillons de PEC extraits à partir de quatre boues activées différentes. Les protéines et les polysaccharides représentent 70 à 80 % du CO (protéines : 68-76 % CO, polysaccharides : 3-5 % CO) (Dignac *et al.* 1998), donc les variations dans la répartition de ces deux types de composés va avoir un fort impact sur la teneur en CO. Les 20 à 30 % du CO restant correspondent aux substances humiques-like, aux acides uroniques, aux acides nucléiques et aux lipides (< 1 % CO). D'après certains auteurs, les teneurs en carbone et azote dans les

échantillons de PEC font partie des indicateurs de la qualité de l'extraction des PEC. Ainsi, de fortes teneurs en carbone et azote dans un échantillon de PEC implique des PEC relativement purs, sans molécules inorganiques et donc que l'extraction est efficace (Klock *et al.* 2007).

**Tableau A<sub>1</sub>. Exemples de composition élémentaire de différents échantillons de PEC**

Référence	(Omoike et Chorover 2004)	(Metzger <i>et al.</i> 2009)	(Klock <i>et al.</i> 2007)	(Zhou <i>et al.</i> 2001)	
Echantillon	PEC liés	PEC libres	PEC	PEC	PEC
Biomasse	Cultures bactériennes		Cultures bactériennes	Bactéries de sédiments	Boue activée
<b>C</b>	61,3 %	60,6 %	35-45 %	8-39 %	/
<b>N</b>	6,1 %	9,2 %	9-11 %	2-9 %	/
<b>P</b>	1,2 %	1,3 %	/	/	/
<b>O</b>	31,5 %	28,4 %	/	/	/
<b>N/C</b>	0,10	0,15	0,17-0,24	0,21-0,25	0,47
<b>O/C</b>	0,51	0,55	/	/	/
<b>P/C</b>	0,02	0,05	/	/	/
<b>N/P</b>	5,53	3,11	/	/	/
<b>H/N</b>	/	/	/	/	29
<b>H/C</b>	/	/	/	/	13

La composition élémentaire des PEC est souvent accompagnée des ratios des différents éléments (Tableau A<sub>4</sub>), le ratio N/C (ou C/N) étant le plus cité. Les protéines et les polysaccharides sont souvent les composés majoritaires des PEC et les protéines, contrairement aux polysaccharides, possèdent des fonctions amides et amines qui seraient les principaux responsables des teneurs en azote au sein des échantillons de PEC (Omoike et Chorover 2004). Ainsi, le ratio N/C est un des éléments qui permet de vérifier le ratio protéines/polysaccharides (Metzger *et al.* 2009).

### **II.2.c. Composition biochimique**

Au niveau des molécules composant les PEC, leur nature est très hétérogène et dépend de plusieurs paramètres : la nature de la biomasse (boues activées, boues granulaires, biofilms, cultures de souches pures de bactéries) (Tableau A<sub>2</sub>), la composition du milieu (nature de l'effluent, propriétés physico-chimiques du milieu) (Tableaux A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>) ou la nature des microorganismes présents. D'après la littérature, on retrouve six grandes classes de composés biologiques dans les PEC : les polysaccharides, les protéines, les substances humiques-like,

les acides uroniques, les lipides et les acides nucléiques (Frølund *et al.* 1996). On peut également retrouver des molécules issues des combinaisons de ces grandes classes de molécules biologiques comme les glycoprotéines ou les lipopolysaccharides (Garnier *et al.* 2005). Les principaux constituants des PEC sont les protéines, les polysaccharides et les substances humiques-like. Concernant les boues activées ou les biofilms épuratoires, les protéines sont les composés majeurs alors que pour des cultures de souches bactériennes, les polysaccharides sont souvent les molécules majoritaires (Tableau A<sub>2</sub>). Toutefois, la composition du milieu de croissance est un facteur important dans la composition des PEC. En effet, comme le montre le Tableau A<sub>3</sub>, des effluents issus de différentes industries, donc ayant des compositions différentes, engendrent la production de PEC différents au sein des biomasses épuratoires. Par exemple, un effluent riche en sucres conduit à un fort taux de monosaccharides au sein des PEC de la biomasse épuratoire (Tableau A<sub>4</sub>).

**Tableau A<sub>2</sub>. Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, lipides et acides nucléiques d'extraits de PEC issus de différentes biomasses**

Biomasse	Technique d'extraction	Prot.	Polysac.	Subst. hum.	Acides uro.	Lip.	Acides nuc.	Unités	Références
Boue granulaire anaérobie	Résine	11	8	6	1	/	0,1	mg.g <sup>-1</sup> MVS	(Liu et Fang 2002b)
Boue granulaire anaérobie	Chauffage	110	25	/	/	/	45	mg.g <sup>-1</sup> MVS	<i>et al.</i> 2003)
Boue activée	Résine	301	132	107	47	< 21	24	mg.g <sup>-1</sup> MVS	(Comte <i>et al.</i> 2006c)
Boue activée	Résine	243	48	126	6	/	/	mg.g <sup>-1</sup> MVS	(Frølund <i>et al.</i> 1996)
Biofilm d'égouts	Résine	154	12	293	6	/	12	mg.g <sup>-1</sup> COT	(Jahn et Nielsen 1995)
Culture de <i>Klebsiella aerogenes</i>	Centrifugation	54	89	/	27	/	9	mg.g <sup>-1</sup> MES	(Brown et Lester 1980)

**Tableau A<sub>3</sub>. Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides et acides nucléiques d'extraits de PEC issus de boues activées traitant différents effluents (Sponza 2002)**

Types d'effluents traités	Prot. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)	Polysac. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)	Acides nuc. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)
Industrie chimique	48	17	10
Industrie du cuir	47	27	12
Industrie de la teinture	42	26	13
Industrie du vin	70	17	6
Station d'épuration municipale	71	17	7



**Tableau A4. Exemples de teneurs de différents monosaccharides de solutions de PEC extraits à partir de boues activées traitant une eau usée classique et une autre riche en sucres (Boyette et al. 2001)**

Monosaccharides (kg/m <sup>3</sup> )/(kg/m <sup>3</sup> MES)	Eau usée classique	Eau usée riche en sucres
Glucose	1,26	24,3
Galactose	0,84	13,2
Mannose	0,36	7,2
Acide glucuronique	0,12	3,6

❖ **Les polysaccharides**

Les polysaccharides sont les molécules les plus étudiées des exopolymères car ce sont souvent les composés majoritaires des PEC issus des biofilms et des cultures de souches bactériennes pures. C'est pour cela que dans la littérature, les exopolysaccharides (EPS) sont souvent assimilés aux PEC. La plupart des microorganismes sécrètent des polysaccharides (bactéries Gram positives et négatives, champignons, algues). Les polysaccharides sont des composés de poids moléculaires très hétérogènes. On distingue les homopolysaccharides qui sont des molécules composées par la répétition de la même unité monosaccharidique et les hétéropolysaccharides qui sont, eux, formés d'une suite de 2 à 8 monosaccharides différents (sucres neutres et acides uroniques). Les sucres neutres les plus présents dans la composition des exopolysaccharides sont le glucose, le galactose et le mannose (Dignac *et al.* 1998). Les polysaccharides peuvent être neutres ou polyanioniques et les molécules peuvent posséder des groupements hydroxyles, acyles, sulphates ou phosphates (Sutherland 2001b). La biosynthèse des polysaccharides (catabolisme de dégradation enzymatique des sucres puis polymérisation) peut être intracellulaire ou extracellulaire (Kumar *et al.* 2007). Les exopolysaccharides regroupent également des composés de la paroi cellulaire (lipopolysaccharides) et des composés intracellulaires tels que les riboses (sucres issus de l'hydrolyse de l'ARN) présents dans la matrice polymérique (Dignac *et al.* 1998). Les polysaccharides, au sein de la matrice de PEC, sont soit sous forme de capsules liées de manière covalente à la membrane cellulaire, soit sous forme de « slimes » faiblement liés aux cellules (Kumar *et al.* 2007). La classe des polysaccharides regroupe donc des composés très hétérogènes, tant sur le plan de leur structure que de leurs propriétés.

❖ *Les protéines*

Les protéines sont les composés majoritaires des PEC issus des biomasses épuratoires et de certains biofilms (Azeredo *et al.* 1999; Liu et Fang 2002b; Comte *et al.* 2006c). Les protéines dans les PEC regroupent des molécules ayant des fonctions telles que des enzymes, des lectines, des protéines intracellulaires issues de cellules lysées ou encore des polypeptides capsulaires (Higgins et Novak 1997). Les protéines sont des chaînes plus ou moins longues d'acides aminés. Elles possèdent de nombreux groupements fonctionnels tels que des fonctions amines, carboxyliques, hydroxyles ou thiols. La majorité des protéines des PEC a une origine intracellulaire. La synthèse se fait dans le cytoplasme et la molécule est ensuite excrétée dans le milieu. Il existe de nombreux mécanismes de sécrétion des protéines qui diffèrent suivant les fonctions des protéines et le type de microorganisme (bactéries Gram positive ou négative) (Binet *et al.* 1997). Les protéines peuvent être associées à des sucres ou des lipides, on parle alors respectivement de glycoprotéines et de lipoprotéines. La classe des protéines au sein des PEC rassemble des molécules variées ayant des rôles structurels (lectines) ou enzymatiques importants dans la structure et le développement de la biomasse.

❖ *Les substances humiques-like*

Dans l'étude des PEC, le terme « substances humiques » est abusif car, par définition, ces molécules proviennent exclusivement des sols, ce qui n'est pas le cas dans la matrice polymérique. Les auteurs utilisent donc souvent le terme de « humic-like substances » regroupant les molécules issues du sol et celles issues de la biomasse, qui est défini par le protocole de dosage utilisé (développé dans la partie « Matériels et méthodes »). Les substances humiques-like sont des macromolécules hétérogènes tant physiquement que chimiquement. Ce sont des produits de dégradation biologique ou chimique de résidus organiques de l'environnement ayant subi une repolymérisation (Francioso *et al.* 2002). Les substances humiques-like peuvent se trouver en suspension ou sous forme dissoute en milieu aqueux (Chang Chien *et al.* 2007). Dans les biomasses, les substances humiques-like proviennent de l'adsorption de ces molécules du milieu avec la matrice polymérique ou de la dégradation de biopolymères par les microorganismes. De nombreux groupements fonctionnels sont présents dans la structure des molécules tels que des fonctions alcools, phénols, énols, carboxyles, quinones, lactones... (Chang Chien *et al.* 2007).

❖ *Les acides nucléiques*

Le dosage des acides nucléiques pratiqué généralement dans l'étude des PEC, permet de déterminer les concentrations en ADN et ARN dans les échantillons et le terme « acides nucléiques » regroupe donc ces deux types de composés. Les acides nucléiques sont des macromolécules composées de nucléotides. Un nucléotide comprend un sucre à cinq atomes de carbone (le désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN), un groupement phosphate et une base azotée purique ou pyrimidique. Les acides nucléiques représentent quelques pourcents des molécules composant les PEC extraits à partir de biomasses épuratoires (Frølund *et al.* 1996). A l'origine, les acides nucléiques extracellulaires étaient considérés comme étant uniquement des produits de lyse cellulaire et servaient d'indicateur de lyse. Toutefois, de nombreux microorganismes sécrètent de larges quantités d'ADN extracellulaire qui peut se retrouver à des teneurs 50 % plus abondantes que l'ADN intracellulaire (Steinberger et Holden 2005). Les acides nucléiques ont donc deux origines possibles : des produits de lyse cellulaire ou des sécrétions produites sous formes de vésicules qui se lysent dans le milieu extracellulaire (Allesen-Holm *et al.* 2006). La conformation des doubles brins d'ADN extracellulaire est linéaire ou circulaire (Steinberger et Holden 2005). Les acides nucléiques extracellulaires ont des similarités mais également des différences par rapport au matériel génomique induisant une différenciation dans les acides nucléiques extracellulaire entre ceux issus de la lyse et ceux sécrétés (Böckelmann *et al.* 2006). Dans les biofilms composés de plusieurs espèces de microorganismes, de fortes teneurs en acides nucléiques ont été mesurées au niveau de la couche externe des microcolonies (Allesen-Holm *et al.* 2006). Cette localisation des acides nucléiques confirmerait le rôle de ces composés dans les interactions et la « communication » entre les cellules. De plus, les acides nucléiques peuvent se trouver sous forme de réseaux filamenteux formant une structure maillée induisant un rôle dans le maintien structurel de la biomasse (Böckelmann *et al.* 2006).

❖ *Les acides uroniques*

Le terme « acide uronique » est également abusif et représente un ensemble de molécules dosées par une méthode définie comme par exemple le dosage par colorimétrie de Blumenkrantz et Asboe Hansen (1973). Dans les extraits de PEC issus de biomasses épuratoires, les acides uroniques représentent 1 à 2 % de la masse des molécules identifiées composant les PEC (Frølund *et al.* 1996; Bura *et al.* 1998). Les acides uroniques sont des oses simples ayant subi une oxydation du carbone portant la fonction cétone. Ainsi, l'acide

glucuronique provient du glucose oxydé en C<sub>6</sub>. Les acides uroniques entrent dans la composition de certains polysaccharides, leur apportant une fonction ionisable (Sutherland 2001b).

#### ❖ *Les lipides*

Les lipides regroupent différentes classes de composés tels que les acides gras, des lipides neutres, des glycolipides ou encore les phospholipides (Conrad *et al.* 2003). Les lipides peuvent être associés à d'autres composés formant ainsi des lipoprotéines ou des lipopolysaccharides. Les lipides représentent une faible part des PEC issus de biomasses épuratoires (1 à 2 %) (Dignac *et al.* 1998; Conrad *et al.* 2003). Ils se trouvent principalement dans les couches externes des biomasses granulaires et ils jouent un rôle important dans l'adhésion des biomasses aux surfaces (Sand et Gehrke 2006). Les lipides possédant de longues chaînes aliphatiques saturées ou insaturées (phospholipides) sont des macromolécules aux propriétés majoritairement hydrophobes (Réveillé *et al.* 2003). Ces molécules possèdent divers groupements fonctionnels tels que des esters, des groupements alcools, amines, phosphates ou carboxyles... Les lipides peuvent avoir trois origines : la sorption de lipides présents dans le milieu, des composés intracellulaires ou membranaires issus de la lyse cellulaire ou des produits du métabolisme bactérien sécrétés dans le milieu (Conrad *et al.* 2003).

Les PEC regroupent donc une vaste gamme de macromolécules aux structures et propriétés variées. Au sein de la matrice polymérique, les PEC sont plus ou moins liés aux cellules et auront donc divers rôles dans la formation et le développement des biofilms.

### **III. Physico-chimie des PEC**

Les différentes molécules composant les PEC ont des structures variées et portent divers groupements fonctionnels qui leur confèrent des propriétés physico-chimiques et biologiques. L'étude de ces propriétés permet de mieux appréhender leur rôle au sein des biomasses.

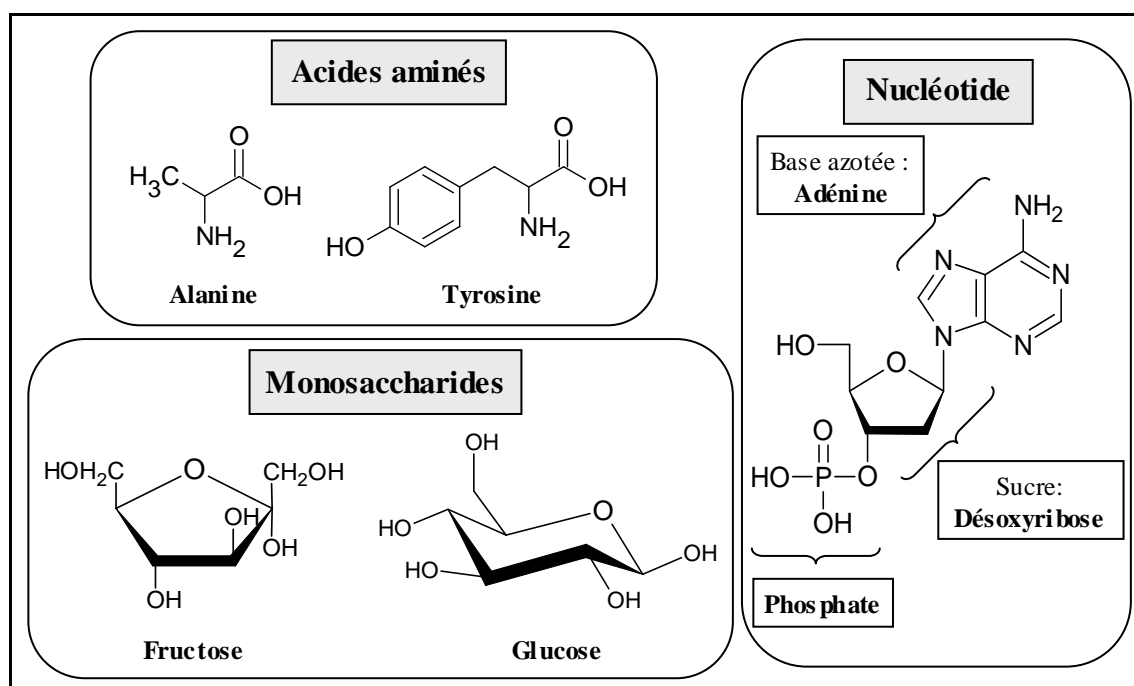
### III.1. Poids moléculaire

Les molécules composant les PEC ont des tailles et des poids moléculaires différents. La détermination du poids moléculaire des PEC se fait par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cette méthode permet de séparer les molécules des PEC par poids moléculaire permettant d'avoir des profils chromatographiques dans un temps limité (environ 40 minutes) afin d'éviter l'altération des molécules (Görner *et al.* 2003; Omoike et Chorover 2004; Comte *et al.* 2007). La détection par infrarouge couplée à la séparation par SEC permet d'identifier les molécules composant les différentes fractions (Garnier *et al.* 2005). En revanche, comme il a été vu précédemment, la composition biochimique des PEC est très hétérogène et variable suivant la biomasse étudiée et les profils par poids moléculaire des PEC seront donc différents (Andersson *et al.* 2009). Par exemple, des études ont identifié dans les matrices de PEC, des polysaccharides ayant des poids moléculaires inférieurs à 1 kDa jusqu'à 40 000 kDa (Smitinont *et al.* 1999; Welman et Maddox 2003; Garnier *et al.* 2006) ou des protéines ayant des poids moléculaires compris entre 10 et 700 kDa (Görner *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2005).

Certaines données de la littérature se recoupent néanmoins. Ainsi, une étude a déterminé qu'un tiers des molécules composant les PEC a un poids moléculaire compris entre 15 et 30 kDa (Liu *et al.* 2001), ce qui va dans le sens d'une autre étude ayant déterminé que 48% des PEC ont un poids moléculaire supérieur à 25 kDa (Zhou *et al.* 2001). Il apparaît également que les PEC fortement liés aux cellules dans les biomasses ont des poids moléculaires plus élevés que les PEC faiblement liés des « slimes » (Andersson *et al.* 2009; Yu *et al.* 2009). En effet, Yu *et al.* (2009) ont réalisé des profils de poids moléculaire compris entre 0,3 et 1200 kDa. Les PEC fortement liés se trouvent dans toutes les fractions du profil mais sont majoritairement présents dans la fraction de poids moléculaire compris entre 330 et 1200 kDa et il s'avère que ces molécules sont principalement des protéines et des acides nucléiques. Les PEC des « slimes », quant à eux, ont un poids moléculaire qui varie de 0,3 à 20 kDa. Andersson *et al.* (2009) confirment ces résultats en montrant que les PEC capsulaires (donc fortement liés aux cellules) ont des poids moléculaires plus élevés que les PEC faiblement liés. D'autres études ont montré que les protéines ont des poids moléculaires plus élevés que les polysaccharides (Görner *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2005). Ainsi, Görner *et al.* (2003) ont identifié des protéines dans toutes les fractions de poids moléculaire entre 45 et 670 kDa avec une majorité de molécules comprises entre 67 et 200 kDa. Concernant les polysaccharides, leur poids moléculaire a été mesuré entre 0,5 et 1 kDa. Ces résultats ont par la suite été confirmés par Garnier *et al.* (2006). De plus, Görner *et al.* (2003) ont noté que certains

polysaccharides étaient élués après le volume total de colonne et ont émis deux hypothèses possibles : la présence de glycoprotéines ou de fortes interactions entre des polysaccharides et des protéines. En effet certaines protéines ont les mêmes propriétés que la lectine (15-20 kDa), qui se fixe fortement aux sucres (Higgins et Novak 1997), et pourraient être à l'origine du ralentissement de certains polysaccharides dans la colonne. Concernant les autres molécules composant les PEC, il existe très peu de données relatives à leur poids moléculaire.

### III.2. Groupements fonctionnels des PEC



**Figure A<sub>3</sub>.** Exemples de structure des acides aminés, des monosaccharides et d'un nucléotide

Les molécules composant les PEC ont des structures variées et possèdent des groupements fonctionnels potentiellement ionisables en fonction du pH (Figure A<sub>3</sub>). Les principaux groupements fonctionnels sont les groupements carboxyliques et hydroxyles, et en moindre mesure on trouve les groupements phénols, carbonyles, amines, amides, thiols ou encore phosphoriques (Huffman *et al.* 2003; Comte *et al.* 2006c; Sun *et al.* 2009). La détection de ces groupements se fait principalement par spectroscopie infrarouge. Ainsi, les groupements fonctionnels des PEC sont identifiés en fonction de leur nombre d'onde d'absorption. Néanmoins, les échantillons de PEC sont un mélange très hétérogène de molécules variées pouvant également avoir des interactions entre elles. En spectrométrie infrarouge, les nombres d'onde d'absorption peuvent donc en être modifiés. De plus, certains groupements se

retrouvent dans diverses classes de composés, par exemple les groupements amines et amides sont présents dans la structure des acides nucléiques et des protéines (Figure A<sub>3</sub>). L'analyse par spectrométrie infrarouge des PEC a donc plus un rôle qualitatif que quantitatif et permet par exemple d'identifier les composés présents dans les fractions de poids moléculaires différents après une séparation par SEC (Görner *et al.* 2003).

**Tableau A<sub>5</sub>. Exemples de pK<sub>a</sub> déterminés dans des échantillons de PEC extraits de différentes biomasses avec leur nombre de sites et les groupements fonctionnels correspondant**

(Liu et Fang 2002a)					(Braissant <i>et al.</i> 2007)
Biomasse : HPS		Biomasse : SRB			Biofilms : SRB
pK <sub>a</sub>	Concentration (mmol.g <sup>-1</sup> PEC)	pK <sub>a</sub>	Concentration (mmol.g <sup>-1</sup> PEC)	Groupement ionisable	pK <sub>a</sub> Groupement ionisable
4,8	2,8	4,4	6,5	Carboxylique	3,0-3,2 Carboxylique, sulphate
6,0	0,8	6,0	2,4	Carboxylique, phosphorique	6,9-7,0 Acides sulfoniques et sulfoniques, thiol
7,0	0,3	7,4	0,8	Phosphorique	8,5-9,0 Thiol, amine
/	/	8,2	0,6	Sulfhydrile	
9,8	2,0	9,4	1,4	Amine, phénol	
11,0	5,1	11,0	4,9	hydroxyle	

HPS : boue productrice d'hydrogène, SRB : biofilm sulfato-réducteur

Ces groupements fonctionnels peuvent être sous forme ionisée ou non en fonction du pH et sont alors des sites de fixation électrostatique potentiels pour d'autres éléments du milieu tels que des cations métalliques (Liu et Fang 2002a). Ainsi, quand le pH augmente, les fonctions peuvent se déprotoner si la constante d'acidité du groupement (pK<sub>a</sub>) est inférieure au pH. La détermination des pK<sub>a</sub> apparents des PEC se fait par interprétation d'un dosage acido-basique à l'aide d'un logiciel adapté tel que FITEQL (Brassard *et al.* 1990) ou ProtoFit (Turner et Fein 2006) qui fera correspondre au mieux la courbe de titrage avec un modèle. Ces analyses permettent de déterminer les constantes d'acidité des échantillons mais également les concentrations en nombre de sites de fixation correspondant à chaque classe de pK<sub>a</sub>. Il existe très peu de données concernant les pK<sub>a</sub> des PEC, les données sur les constantes d'acidité concernent généralement les parois cellulaires dans les études sur les biofilms (Yee *et al.* 2004; Fein 2006). Le Tableau A<sub>5</sub> présente les résultats obtenus par Liu et Fang (2002a) qui ont déterminé jusqu'à 6 pK<sub>a</sub> dans les échantillons de PEC. La concentration en nombre de

sites montre que les groupements hydroxyles et carboxyliques sont les plus importants. D'autres études ont déterminé deux ou trois  $pK_a$  dans les échantillons de PEC (Comte *et al.* 2006b; Braissant *et al.* 2007) mais les groupements majoritaires restent identiques. Ces différences sont le résultat des compositions biochimiques variées des différents extraits de PEC, des techniques et des théories utilisées pour les déterminer. Le pH de l'environnement des matériels microbiens est compris entre 6,5 et 7,5, les fonctions ionisées à ce pH seront donc principalement les groupements carboxyliques et phosphoriques des PEC.

La propriété des PEC à avoir des groupements ionisables en fonction du pH est un paramètre important dans le développement des biofilms. En effet, les PEC, grâce à ces groupements fonctionnels, sont capables d'interagir avec leur environnement, par exemple en fixant des cations métalliques potentiellement toxiques pour les bactéries ou en se liant à des cations pontants tels que  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  afin de renforcer la structure de la biomasse.

### **III.3. Charge de surface et hydrophobicité**

L'étude de la charge de surface est souvent couplée à celle sur l'hydrophobicité dans les différents travaux de recherche sur les biofilms et le matériel bactérien. Il existe cependant peu de données concernant les PEC sur ces deux paramètres.

Dans les agrégats bactériens, la charge de surface est fortement influencée par la teneur et la composition des PEC (Mikkelsen 2003). En effet, à un pH proche de la neutralité, les PEC portent des charges négatives dues à l'ionisation des groupements carboxyles et phosphoriques. La source majeure de ces groupements anioniques serait les protéines et les acides nucléiques (Liao *et al.* 2002; Sponza 2003). Cependant différentes études ont montré que, plutôt que les teneurs totales en PEC, ce seraient les ratios protéines/polysaccharides et protéines/(polysaccharides+acides nucléiques) qui se corrèleraient avec la charge de surface des échantillons (Morgan *et al.* 1990; Liao *et al.* 2001; Raszka *et al.* 2006). Ainsi, Morgan *et al.* (1990) ont établi un rapport entre la charge de surface et le ratio protéines/polysaccharides avec un coefficient de corrélation de 0,66. D'autres études ont montré cette relation avec des coefficients de corrélation de 0,91 (Zhang *et al.* 2007). Concernant la charge de surface d'échantillons de PEC extraits à partir de boues activées et anaérobies, Morgan *et al.* (1990) ont obtenu des valeurs comprises entre -0,2 et -0,9 meq.g<sup>-1</sup> PEC par titration des colloïdes. Ces valeurs sont en adéquation avec celles des Mikkelsen (2003) qui sont de -0,4 meq.g<sup>-1</sup> PEC lyophilisés et -0,5 meq.g<sup>-1</sup> PEC frais déterminées par la même méthode.



La charge de surface et l'hydrophobicité sont liées. Ainsi, les agrégats bactériens ayant une charge de surface positive auront un caractère hydrophobe, et inversement, si la biomasse est globalement chargée négativement, elle aura un caractère hydrophile (Sponza 2002). Les molécules hydrophobes sont des molécules rejetées en milieu aqueux et donc incapables d'interagir avec l'eau alors que les molécules hydrophiles sont attirées (Jorand *et al.* 1998; Garnier *et al.* 2005). Au sein des biomasses, les PEC influencent l'hydrophobicité de la biomasse (Sheng et Yu 2006b). Les molécules composant les PEC peuvent être hydrophobes ou hydrophiles (Jorand *et al.* 1998). Ainsi, l'hydrophobicité de la biomasse correspond à la moyenne des propriétés hydrophobes et hydrophiles des PEC (Liao *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2007). L'hydrophobicité des PEC est un paramètre important dans la formation des agrégats bactériens (Urbain *et al.* 1993; Jorand *et al.* 1998).

Liao *et al.* (2001) ont montré que l'hydrophobicité des PEC est principalement influencée par les teneurs en protéines et en polysaccharides plutôt que par la teneur totale en PEC. Ainsi, les protéines ont un effet positif sur l'hydrophobicité alors que les polysaccharides ont un effet négatif. Jorand *et al.* (1998) ont séparé les PEC solubles des PEC qui précipitent à pH acide (pH 2). Ensuite, ils ont utilisé des résines XAD pour séparer les PEC hydrophobes et hydrophiles au sein de la fraction soluble. Les PEC hydrophobes sont fixés à la résine XAD8 alors que les PEC hydrophiles sont les molécules sorbées à la résine XAD4 ou non sorbées. La fraction précipitée représente 50% du carbone organique dissous, les composés hydrophobes 7 %, les composés hydrophiles acides sorbés sur XAD4 13 % et les substances hydrophiles non sorbés 30 %. Les principales molécules composant la fraction hydrophobe sont des protéines. Ces auteurs notent également que cette fraction contient une plus grande quantité de fonctions aromatiques que l'on trouve dans la structure des protéines et des substances humiques-like. La fraction hydrophile non sorbée est quant à elle composée quasi exclusivement de polysaccharides. Enfin, la fraction précipitée est composée de 77 % des protéines et de 66 % des polysaccharides. Cette présence simultanée dans la fraction est due à la grande quantité de glycoprotéines présentes dans l'échantillon de PEC. Park *et al.* (2008) ont également détecté des composés polysaccharidiques dans le précipité hydrophobe et concluent que dans les biomasses, les polysaccharides sont en grande partie sous forme de lipopolysaccharides, de glycoprotéines ou sont associés à d'autres molécules des PEC. D'autres études confirment le rôle positif des protéines ainsi que le rôle négatif des polysaccharides dans l'hydrophobicité (Arabi et Nakhla 2008) mais ajoutent également la participation des acides uroniques et des substances humiques-like à l'hydrophobicité des PEC (Wilén *et al.* 2003a). Ainsi, quand le ratio protéine/polysaccharide augmente,

l'hydrophobicité des PEC augmente proportionnellement (Zhang *et al.* 2007). Les protéines sont composées d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes. Higgins et Novak (1997) ont déterminé dans des échantillons extraits à partir de différentes biomasses (boues, cultures de bactéries) que les acides aminés hydrophobes tels que l'alanine, la leucine ou la glycine représentent une grande quantité des acides aminés caractérisés et seraient à l'origine des liaisons hydrophobes des PEC (Dignac *et al.* 1998).

La matrice polymérique des biomasses renferme donc un large et hétérogène panel de molécules qui sont différentes tant sur le plan structurel que sur le plan des propriétés. Toutefois, c'est l'ensemble de ces propriétés qui va engendrer leur rôle fondamental dans la formation, le développement et le maintien des biomasses.

## **IV. Rôles au sein des biomasses**

D'après la littérature, les PEC ont de nombreuses fonctions dans la vie des biomasses, dues aux propriétés des molécules. Ces rôles vont de l'initiation de la formation des biomasses aux apports nutritifs en passant par le renforcement de la structure ou la protection contre des éléments potentiellement toxiques pour les microorganismes (Wingender *et al.* 1999). Ces différentes fonctions peuvent se classer selon leur rôle structurel ou leur rôle fonctionnel.

### **IV.1. Formation et structure de la biomasse**

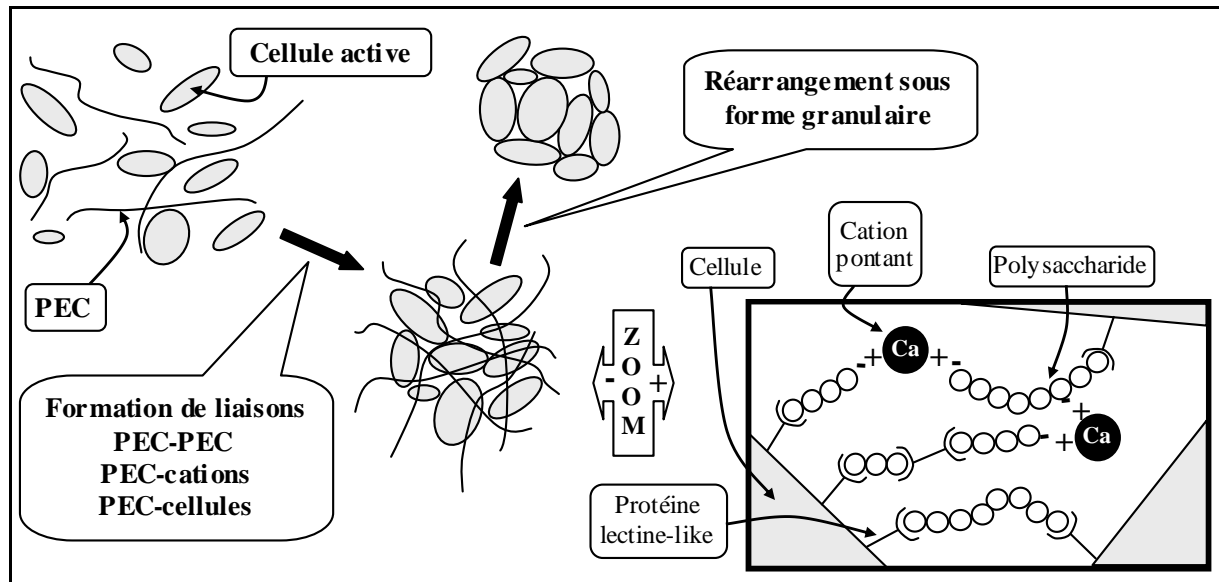
Les PEC ont un rôle prépondérant dans la phase d'initiation de la formation des biomasses, que ce soit concernant l'adhésion des biofilms sur une surface solide (Vu *et al.* 2009), la floculation des boues activées (Wilén *et al.* 2003b) ou la granulation des biomasses granulaires (Liu *et al.* 2004b). Dans cette étude, les biomasses dont sont issus les PEC étudiés sont des granules anaérobies, nous développerons donc plus particulièrement le rôle des PEC dans la formation et le maintien de la structure des biomasses granulaires.

La biogranulation est un procédé d'auto-immobilisation des cellules dans une matrice. D'après la littérature, lors de l'agrégation des cellules, trois types d'interactions sont à prendre en compte : les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals selon la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verway, Overbeek) (Hulshoff Pol *et al.* 2004) et les interactions polymériques (Azeredo et Oliveira 2000). La répulsion électrostatique entre les cellules a un

effet négatif sur l'agrégation des bactéries alors que les forces de Van der Waals et les interactions polymériques ont un effet positif. Ainsi, en présence de peu de PEC autour des cellules, l'adhésion est limitée par les forces de répulsion électrostatiques alors qu'en présence de grandes quantités de PEC autour des cellules, l'adhésion est favorisée par les interactions polymériques (Tsuneda *et al.* 2003). Les cellules sont des entités chargées négativement et selon le modèle DLVO, deux composés de même charge se repoussent. Mais différentes études ont montré que la production de PEC par les cellules permet de diminuer cette charge négative et donc de favoriser la liaison entre les bactéries qui est amorcée par la diminution de la répulsion entre les cellules (Schmidt et Ahring 1994). L'hydrophobicité est également un paramètre important dans la granulation et l'organisation de la structure des granules (Liu *et al.* 2004a). Ainsi, l'augmentation de l'hydrophobicité des cellules favorise leur agrégation. Les PEC sont composés de molécules hydrophobes (protéines, acides uroniques...) et de molécules hydrophiles (polysaccharides) (Dignac *et al.* 1998). La composition des PEC entourant les cellules va donc avoir un impact sur l'hydrophobicité des cellules et sur la granulation (Liao *et al.* 2001). Outre la quantité de PEC produite par les bactéries, la composition de ces PEC est donc également à prendre en compte lors de l'initiation de l'agrégation des bactéries. En effet, quand le ratio protéines/polysaccharides augmente, la charge de surface diminue et l'hydrophobicité augmente (Wang *et al.* 2006).

Après l'attachement initial des cellules à une surface solide, à un substrat ou à d'autres cellules, celles-ci commencent à se regrouper grâce aux forces de liaison à l'interface, résultat de l'augmentation de l'accumulation des PEC (Fang *et al.* 2000). Les propriétés des PEC jouent alors un rôle essentiel dans la structuration des granules permettant la liaison physique entre les cellules : liaisons électrostatiques avec des composés organiques ou inorganiques du milieu et liaisons protéines-polysaccharides (Figure A<sub>4</sub>). Les PEC possèdent des groupements ionisables qui sont des sites de fixation électrostatique. Ainsi, les PEC présentent 20 à 30 fois plus de sites de fixation électrostatique que les membranes bactériennes (Liu et Fang 2002a). Ces sites permettent à des cations divalents de jouer le rôle de « cations pontants » entre les PEC eux mêmes ou entre les PEC et les cellules, ce qui renforce la structure de l'agrégat (Yu *et al.* 2001) (Figure A<sub>4</sub>). En effet, des études ont montré que la présence de cations divalents dans le milieu tels que Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ou Fe<sup>2+</sup> favorise la granulation (Higgins et Novak 1997; Yu *et al.* 2000). Par exemple, la présence d'ions calcium augmente la stabilité des biofilms en permettant la réticulation des polysaccharides polyanioniques de type alginate (Körstgens *et al.* 2001). Higgins et Novak (1997) ont également mis en évidence la présence dans les biomasses de protéines dites « lectine-like » ayant les mêmes propriétés que la lectine, qui a la

particularité de se fixer spécifiquement aux oses. Ainsi, les cations pontants et les protéines lectine-like permettent un enchevêtrement des molécules de PEC qui consolide la structure du réseau polymérique (Figure A<sub>4</sub>).



**Figure A<sub>4</sub>. Représentation schématique de la biogranulation favorisée par la présence de PEC (Higgins et Novak 1997; Liu et al. 2004b)**

Par leurs propriétés différentes les polysaccharides et les protéines n'ont pas les mêmes rôles dans

*et al.* 2003). La formation des granules est accompagnée d'une forte augmentation des polysaccharides par rapport aux protéines dans les PEC (Tay *et al.* 2001). Les polysaccharides sont considérés comme les molécules clés des PEC dans la structure des granules (Quarmby et Forster 1995). Les PEC se trouvent à l'intérieur de la granule mais forment également une couche qui entoure la granule (De Beer *et al.* 1996; Veiga *et al.* 1997). La répartition des polysaccharides au sein des granules n'est pas homogène. Ainsi, De Beer *et al.* (1997) ont mis en évidence que, dans la granule mature, 50 % des polysaccharides sont présents dans la couche externe de 40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et le reste est réparti de manière aléatoire dans la granule. Les polysaccharides qui composent la couche externe sont des polysaccharides acides liés en  $\beta$  qui sont plus hydrophobes et difficilement biodégradables alors que les polysaccharides au cœur *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005). Ces polysaccharides liés en  $\beta$  sont rigides et forment l'armature de la granule alors que les autres polysaccharides sont plus flexibles (Sutherland 2001a). Néanmoins, la répartition des PEC au sein des granules est un phénomène dynamique et la

production de PEC évolue en fonction du temps et des changements de condition du milieu (Wang *et al.* 2006). Par exemple, une étude a montré qu'au premier jour de granulation les polysaccharides représentent 45 % des PEC et les protéines 38 % ; au bout de 60 jours, dans les granules stabilisées, les polysaccharides ne représentent plus que 40 % des PEC alors que les protéines représentent 44 % des PEC (Wang *et al.* 2006). Un autre exemple, concernant l'influence des conditions du milieu, montre que lorsque les forces de cisaillement hydrodynamiques augmentent dans un réacteur, en réponse au stress, la production de polysaccharides est favorisée pour le maintien de la structure de l'agrégat (Liu et Tay 2002). Les acides nucléiques sembleraient également avoir un rôle dans le maintien de la structure des biomasses. Il existe actuellement peu d'études sur le rôle structural des acides nucléiques mais la combinaison des acides nucléiques extracellulaires avec des cations formerait un réseau filamenteux au sein de la biomasse (Böckelmann *et al.* 2006). La formation des biomasses granulaires n'est donc pas l'agrégation aléatoire de microorganismes en suspension mais plutôt une adaptation évolutive des bactéries (Liu *et al.* 2004b).

## **IV.2. Développement et protection de la biomasse**

### ***VI.2.a. Source de nutriments et d'énergie***

Outre son rôle structural, la matrice polymérique a un rôle de réserve nutritive et énergétique pour les microorganismes des biomasses (Laspidou et Rittmann 2002). Ainsi, diverses études ont mis en avant le rôle des PEC solubles, qui sont des composés facilement biodégradables, comme source de nutriments et d'énergie pour les bactéries. Ainsi, sur le plan énergétique, les PEC solubles sont recyclés par les bactéries (oxydation) et deviennent des composés donneurs d'électrons (Laspidou et Rittmann 2002). La matrice de PEC regroupe les molécules organiques sécrétées par les bactéries et celles du milieu piégées dans la matrice. Ces composés sont des sources de carbone pour le métabolisme des bactéries. Au cœur des biomasses granulaires, les bactéries ont un accès difficile aux nutriments issus du milieu. Wang *et al.* (2005) ont mis en évidence que les bactéries dans ces couches internes des granules produisent en plus fortes quantités des PEC solubles qui sont donc facilement assimilables par les microorganismes. De même dans des milieux pauvres en nutriments, les PEC sécrétés sont en grande quantité solubles (Aquino et Stuckey 2003). La matrice est composée en partie de molécules de hauts poids moléculaires qui sont difficilement assimilables par les bactéries et qui ont une diffusion limitée dans la matrice (Cadoret *et al.*

2002). Pour être utilisées dans le métabolisme des bactéries, il est donc nécessaire de les hydrolyser. La présence d'enzymes extracellulaires dans les biomasses a été mise en évidence. Dans les boues activées, la quantité d'enzymes dissoutes est négligeable, donc l'activité enzymatique est principalement située dans les floccs (Frølund *et al.* 1996). Au sein de ces biomasses, les enzymes peuvent être liées aux cellules par des liaisons hydrophobes (Gessesse *et al.* 2003) ou être piégées dans la matrice polymérique (Cadoret *et al.* 2002). Néanmoins, les exoenzymes sembleraient principalement être dans la fraction faiblement liée aux cellules où se trouvent les molécules de hauts poids moléculaires (Frølund *et al.* 1995). La production d'enzymes par les bactéries dans les biomasses est un phénomène dynamique. En effet, Cadoret *et al.* (2002) ont observé que, quand la quantité de composés de hauts poids moléculaires augmente dans la matrice polymérique, l'activité enzymatique augmente également. De même, dans un réacteur biologique à boues activées, quand l'effluent présente un faible taux de charge organique, il y a une faible activité enzymatique dans les floccs et quand ce taux de charge organique augmente, l'activité enzymatique augmente également (Frølund *et al.* 1995). L'activité enzymatique dans les biomasses est donc une réponse aux changements de condition du milieu pour apporter aux cellules l'énergie et les nutriments nécessaires à leur métabolisme.

### ***VI.2.b. Maintien de l'hydratation de la biomasse***

Il existe peu d'études traitant du rôle des PEC dans l'hydratation des biomasses. Ce rôle a surtout été étudié dans les biofilms et les boues activées et aucune donnée n'est disponible concernant les biomasses granulaires. Dans les agrégats bactériens, l'eau est le principal composé suivi des PEC et de la biomasse. Cette eau se trouve principalement dans la matrice polymérique mais une partie est également intracellulaire (Keiding *et al.* 2001). Dans la matrice de PEC, les molécules d'eau sont liées aux PEC par des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophiles et peuvent aussi être simplement piégées dans le réseau poreux des PEC (Liss *et al.* 1996; Jin *et al.* 2004). Keiding *et al.* (2001) avancent une autre explication sur l'hydratation de la matrice de PEC. En effet, à un pH proche de la neutralité au sein de la biomasse, la forte concentration de charges négatives portées par les PEC associées à leurs contre-ions engendre un gradient osmotique avec le milieu extérieur au biofilm induisant l'engorgement d'eau dans la matrice pour compenser ce gradient. L'hydratation des biomasses semble principalement liée à la présence de protéines et de polysaccharides dans la matrice (Jin *et al.* 2004). Les acides uroniques sont présents en moindre quantité dans les PEC

mais ces molécules ont des propriétés fortement hydrophiles et ont également un rôle dans l'absorption d'eau par la matrice. Jin *et al.* (2004) ont conclu que les PEC faiblement liés aux cellules ne participent que très peu à la rétention d'eau dans la matrice polymérique. En revanche, diverses études ont observé une couche de polysaccharides fortement hydratée autour des cellules (Chang *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2007). En effet, beaucoup de polysaccharides sont hygroscopiques et, en réponse à une dessiccation, les bactéries produisent de larges quantités de polysaccharides (Roberson et Firestone 1992). L'alginate est un polysaccharide qui a un rôle structural dans les biofilms mais également dans la rétention de l'eau. Une étude a montré que dans certaines souches de bactéries, la limitation d'eau induit l'expression des gènes de biosynthèse de l'alginate (Van De Mortel et Halverson 2004). Ainsi, l'alginate permet de retenir l'eau dans une couche extracellulaire proche de la membrane afin de ralentir sa déshydratation (Chang *et al.* 2007).

### ***VI.2.c. Protection de la biomasse***

Au sein des biomasses, les bactéries sont soumises à différents stress tels que le manque de nutriments ou la dessiccation et il a été vu précédemment le rôle majeur des PEC dans la survie des microorganismes. Le milieu naturel des biofilms comporte également de nombreux composés toxiques pour les bactéries tels que les éléments métalliques ou des composés organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, hydrocarbures halogénés, antibiotiques) et les PEC ont un rôle de protection des cellules vis-à-vis de ces composés (Finlayson *et al.* 1998; Mah et O'Toole 2001; Janecka *et al.* 2002; Joshi et Juwarkar 2009). Face à ce danger, les bactéries ont différents moyens de défense (Aquino et Stuckey 2004) :

- La sécrétion d'acides ou de bases induisant un changement de pH et engendrant la précipitation ou l'ionisation des composés toxiques.
- La sécrétion d'agents chélatants qui vont se complexer aux éléments métalliques libres afin de diminuer leur biodisponibilité.
- La sécrétion de polysaccharides qui vont rendre la paroi cellulaire plus épaisse afin de limiter le transfert des composés toxiques vers l'intérieur de la cellule.

De plus, la matrice polymérique agit comme une barrière en diminuant la diffusion des composés toxiques vers les cellules. Les ligands anioniques (protéines, lipides, polysaccharides, acides uroniques, acides nucléiques) de la matrice proches des cellules se complexent avec les éléments métalliques, les rendant moins biodisponibles (Joshi et Juwarkar 2009). Les capacités de biosorption des PEC vis-à-vis des éléments métalliques sont

importantes dans la protection des microorganismes et la bioremédiation (Pal et Paul 2008) et seront développées ultérieurement (Chapitre A-3).

Diverses études ont observé une augmentation de la production de PEC en présence de composés toxiques (Kuo et Parkin 1996; Janecka *et al.* 2002; Kazy *et al.* 2002; Joshi et Juwarkar 2009). Certaines souches bactériennes d'une même espèce peuvent être soit résistantes, soit sensibles à la présence d'éléments métalliques. Kazy *et al.* (2002) ont mis en évidence que les souches résistantes produisent de plus fortes quantités de polysaccharides (alginates) qui ont de fortes propriétés complexantes avec ces éléments métalliques. La chélation de ces composés toxiques avec les polysaccharides engendre une diminution de la biodisponibilité du métal et serait la raison de la meilleure tolérance des bactéries de la souche résistante face aux éléments métalliques. Concernant les antibiotiques, Mah et O'Toole (2001) ont observé que la sorption ou la réaction des antibiotiques avec les PEC limite leur accès aux cellules. Ainsi, les bactéries sont protégées par les polysaccharides et les enzymes de la matrice qui inactivent ces agents antimicrobiens.

Au sein des biomasses, il peut également y avoir une compétition entre les espèces (Adav *et al.* 2010). Certaines espèces bactériennes sécrètent des substances qui inhibent le développement d'autres espèces. Une étude menée par Adav *et al.* (2010) a sélectionné deux espèces concurrentes pourtant présentes simultanément au sein de biomasses. Ils ont observé que la présence de PEC permet l'adsorption de ces substances, ce qui supprime leur caractère inhibiteur. Ces deux espèces sont donc présentes simultanément dans les biomasses, la matrice polymérique jouant le rôle d'isolant.

#### ***VI.2.d. Transfert de gènes dans la biomasse***

Dans la matrice polymérique sont présents des brins d'ADN extracellulaire. Cet ADN provient soit de matériel intracellulaire suite à la lyse des cellules soit de la sécrétion par les bactéries (Allesen-Holm *et al.* 2006). Cet ADN extracellulaire a un rôle dans la structure de la matrice polymérique (Molin et Tolker-Nielsen 2003) mais également dans l'adaptation des microorganismes au milieu par le transfert de gènes (Nadell *et al.* 2009). Le mécanisme de sécrétion d'ADN extracellulaire est encore mal compris. Toutes les bactéries sécrètent de l'ADN au cours de leur croissance (Molin et Tolker-Nielsen 2003) et elles sont également capables d'intégrer cet ADN extracellulaire à leur génome via le transfert horizontal de gènes. Le but de ce transfert de gènes est l'adaptation des différents microorganismes en acquérant de nouvelles compétences (Nadell *et al.* 2009). La sécrétion d'ADN et l'activation de ces



nouvelles propriétés au sein des biofilms suggèrent que l'échange de gènes est un processus important dans le développement et la coopération au sein des agrégats bactériens multi-espèces (Nadell *et al.* 2009).

## **V. Conclusion**

Les PEC sont des macromolécules organiques regroupant des protéines, des polysaccharides, des substances humiques-like, des acides uroniques, des lipides et des acides nucléiques. La composition des PEC au sein des biomasses est variable et dépend aussi bien du type de biomasse que de la composition du milieu. La matrice polymérique qui compose les biomasses n'est pas homogène et on distingue les PEC liés aux cellules bactériennes et les PEC solubles. En effet, les molécules hétérogènes qui composent les PEC ont des propriétés physico-chimiques variées, ce qui induit des rôles différents dans la biomasse. Ainsi, on distingue le rôle structural des PEC dans la formation et la stabilisation de la structure de la biomasse et le rôle crucial dans la survie de la biomasse, qui est en fait une adaptation des bactéries en réponse à différents stress (manque de nutriments, dessiccation, présence de composés toxiques).

## ***Chapitre A-2 : Extraction et caractérisation des PEC***

---

Afin d'étudier les PEC (composition, propriétés), il est nécessaire de les extraire de la biomasse. Il n'existe pas de méthode de référence d'extraction des PEC. Dans la littérature, de nombreux protocoles différents sont utilisés. L'extraction des PEC peut se décomposer en trois étapes : la préparation des échantillons, l'extraction (physique et/ou chimique) des PEC et la purification des extraits. Les étapes de préparation et de purification ne sont pas systématiquement présentes dans tous les protocoles.

## **I. Stockage et préparation des biomasses**

Les biomasses initiales, avant extraction, peuvent être conservées sous forme de matériel frais, sous forme lyophilisée (Aguilera *et al.* 2008) ou sous forme congelée (Klock *et al.* 2007). L'utilisation de biomasse fraîche nécessite une conservation entre 0 et 4 °C afin d'éviter des changements dans la composition des PEC, cette température réduisant, entre autres, l'activité enzymatique des bactéries (Wingender *et al.* 1999). Klock *et al.* (2007) ont montré que la lyophilisation et la congélation de la biomasse entraînent une contamination des PEC par du matériel intracellulaire due à de la lyse cellulaire et à l'augmentation de la perméabilité des membranes des cellules. De plus, la structure de la matrice polymérique des biomasses ainsi conservées est modifiée. En effet, le degré de polymérisation des molécules et la stabilité des liaisons dans la matrice peuvent être altérés. Pour l'étude des PEC, il est donc préférable de les extraire à partir de biomasses fraîches.

Certains protocoles possèdent une phase de lavage (Zeng *et al.*) et/ou de préconcentration (Comte *et al.* 2006c) de la biomasse. Ces deux étapes se font principalement par centrifugation. Les solutions utilisées pour le lavage peuvent être de l'eau ultrapure (Jia *et al.* 1996), des solutions salines (NaCl) (Li et Yang 2007) ou des tampons phosphates salins (PBS) (Matias *et al.* 2003). L'utilisation de PBS ou de NaCl pour le lavage des biomasses permet de conserver les conditions originales de salinité et de pH de la biomasse (Li et Yang 2007) et ainsi d'atténuer les perturbations dans la structure de la matrice liées au lavage et donc de limiter la désorption de PEC de la biomasse. Toutefois, la centrifugation utilisée dans le lavage provoque la séparation des PEC solubles de la biomasse. Certains protocoles utilisent des centrifugations jusqu'à 9 000 ×g (Sponza 2002) lors du lavage qui peuvent donc engendrer la perte de PEC à partir de la biomasse. La préconcentration de la biomasse se fait par centrifugation (Comte *et al.* 2006c) ou séchage par évaporation sous vide (Ahimou *et al.* 2007) en diminuant le volume de la solution. Toutefois, un traitement comme le séchage sous

vide peut entraîner une lyse cellulaire et libérer du matériel intracellulaire dans l'extrait de PEC.

Pour des biomasses de type granulaire, qui ont des structures denses et compactes, une étape d'homogénéisation mécanique de l'échantillon favorise par la suite l'extraction des PEC (McSwain *et al.* 2005). Cette homogénéisation augmente ainsi la surface spécifique de la biomasse et améliore l'extraction des PEC.

## II. Extraction des PEC

L'extraction des PEC peut être physique (chauffage, centrifugation, sonication...) ou chimique (utilisation de bases, d'acides, d'alcools...), le but étant de séparer les PEC du reste de la biomasse. Certains protocoles combinent également différentes techniques. Pour une même méthode, différentes variantes sont mentionnées dans la littérature (Tableaux A<sub>6</sub> et A<sub>7</sub>) en jouant sur les différents paramètres tels que le temps de contact, la puissance de sonication, la vitesse de centrifugation, la concentration des réactifs, la température de chauffage... En effet, la plupart des méthodes étaient à l'origine utilisées pour l'extraction des PEC à partir de biofilms ou de cultures de bactéries, et chaque auteur a adapté ces méthodes en fonction de la biomasse étudiée (flocs, granules). Dans cette partie est présentée une liste non exhaustive des méthodes d'extraction physiques et chimiques des PEC.

### II.1. Méthodes physiques

Les méthodes physiques d'extraction des PEC ont pour but de disperser la biomasse pour libérer les PEC. Des exemples de conditions expérimentales sont présentés dans le Tableau A<sub>6</sub>. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

➤ **La centrifugation et l'ultracentrifugation** : c'est la méthode la plus simple et la moins dégradative pour séparer les PEC de la biomasse. Dans les études comparant différentes techniques d'extraction des PEC, la centrifugation est utilisée comme méthode de « contrôle » car une étape de centrifugation est présente dans chaque protocole. Toutefois, dans des biomasses ayant des structures plus denses que les cultures de bactéries, comme les flocs ou les granules, la centrifugation ne permet pas la déstabilisation de cette biomasse et cette méthode ne permet l'extraction que des PEC solubles et d'une faible quantité de PEC liés.

➤ **Le chauffage** : le chauffage de la biomasse qui peut se faire à l'autoclave ou au bain marie va provoquer une hydrolyse de certaines liaisons de la matrice de PEC, ce qui va fragiliser la structure de la biomasse et donc faciliter la libération des PEC. Toutefois, ce genre de traitement pour extraire les PEC peut engendrer un fort taux de lyse cellulaire et l'altération des molécules des PEC si la température n'est pas optimisée.

➤ **La sonication et l'ultrasonication** : la sonication est utilisée pour rompre les liaisons de plus faible énergie au sein de la biomasse que celle appliquée par la sonication. La rupture des liaisons engendre une déstructuration de la biomasse facilitant ainsi l'extraction des PEC. Toutefois, cette méthode est moins efficace sur les biomasses granulaires en raison de la forte densité de certaines granules compactes.

➤ **L'homogénéisation** : la désagglomération des biomasses est mécanique et permet de casser la structure pour libérer les PEC. Cette méthode peut se faire au moyen d'un homogénéiseur automatique ou de billes de verre incorporées à l'échantillon qui est ensuite placé sous agitation.

➤ **L'utilisation d'une résine échangeuse de cations (REC)** : les résines échangeuses de cations agissent à la fois par une action physique et une action chimique. La résine, sous forme de petites billes mélangées à la biomasse, va permettre, par agitation, l'homogénéisation et le cisaillement de l'échantillon. De plus, durant l'extraction, la REC échange des ions  $\text{Na}^+$  initialement liés à la résine contre des cations mono-, di- ou trivalents de la matrice polymérique. L'échange des cations divalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , qui jouent le rôle de cations pontants entre les molécules de PEC, déstabilise la structure de la biomasse et facilite l'extraction des PEC.

Les rendements de ces méthodes physiques sont souvent inférieurs à ceux des méthodes chimiques. Ainsi, dans certaines études, l'utilisation de réactifs chimiques pour extraire les PEC est préférée ou combinée aux méthodes physiques.

**Tableau A<sub>6</sub>. Exemples de protocoles d'extraction physique des PEC**

Méthode d'extraction	Paramètres	Référence
Centrifugation	10 000 ×g, 4 °C, 20 min	(Adav et Lee 2008)
Centrifugation	20 000 ×g, 4 °C, 20 min	(Liu et Fang 2002b)
Centrifugation	25 000 ×g, 25 °C, 30 min	(Fang et Jia 1996)
Centrifugation	33 000 ×g, 4 °C 40 min	(Park <i>et al.</i> 2000)
Chauffage	80 °C ; 30 min	(Ge <i>et al.</i> 2007)
Chauffage	80 °C ; 10 min	(Zhang <i>et al.</i> 1999)
Chauffage	100 °C ; 60 min	(Wang <i>et al.</i> 2009)
Chauffage	120 °C ; 60 min	(Ge <i>et al.</i> 2007)
Sonication	37 W ; 1 min	(Dignac <i>et al.</i> 1998)
Sonication	37 W ; 2 min	(Ras <i>et al.</i> 2008)
Sonication	40 W ; 3 min	(Tsuneda <i>et al.</i> 2003)
Sonication	50 W ; 15 s	(Urbain <i>et al.</i> 1993)
REC	70 g.g <sup>-1</sup> PSV, 4 °C, 1 h	(Liu et Fang 2002b)

## II.2. Méthodes chimiques

L'extraction chimique des PEC correspond à l'ajout de réactifs chimiques qui auront différentes actions sur la matrice polymérique des biomasses. L'ajout de ces extractants chimiques est la plupart du temps accompagné d'une centrifugation afin de séparer la fraction de PEC extraits. Le Tableau A<sub>7</sub> présente différents protocoles d'extraction chimique. Parmi les réactifs chimiques couramment utilisés, on trouve :

➤ **Les acides** (acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide trichloroacétique...) : la précipitation en milieu acide des PEC est due à la neutralisation des charges portées par molécules. La répulsion électrostatique entre les molécules diminue grâce à cette neutralisation et permet l'agrégation et la précipitation des PEC.

➤ **Les bases** (hydroxyde de sodium, hydroxyde d'ammonium...) : l'augmentation du pH due à l'ajout d'une base engendre l'ionisation d'un grand nombre de groupements fonctionnels des molécules composant les PEC. Cette ionisation induit une répulsion des molécules ayant la même charge et une solubilisation des PEC, facilitant ainsi leur extraction.

➤ **Les alcools** (éthanol, méthanol, isopropanol...) : les alcools sont surtout utilisés pour l'extraction sélective des polysaccharides qui sont des molécules solubles dans ces

solutions. L'extraction nécessite l'ajout de grandes quantités de solutions alcooliques (environ 3 volumes pour un volume d'échantillon) qui provoque la précipitation des molécules.

➤ **Les agents chélatants** (EDTA, EGTA...) : ces réactifs fixent les cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...) dans la matrice polymérique, fragilisant la structure de la biomasse et facilitant l'extraction des PEC. Toutefois, l'EDTA peut également fixer des cations de la membrane cellulaire provoquant ainsi la fragilisation des membranes, ce qui augmente les risques de lyse cellulaire.

➤ **Les éthers couronnes** : les éthers couronnes se fixent aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  de la matrice, ce qui déstabilise la structure du réseau de polymères.

➤ **Les solutions de sels et tampons phosphates** ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{PO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ...) : En présence de fortes concentrations en sels, les cations pontants de la matrice polymérique sont remplacés par échange d'ions par les cations monovalents  $\text{Na}^+$  qui n'ont pas le pouvoir pontant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Cet échange d'ions fragilise la structure de la biomasse et favorise l'extraction des PEC. Les ions phosphates ont également un pouvoir complexant vis-à-vis des cations pontants, provoquant ainsi la déstabilisation de la biomasse et favorisant la libération des PEC.

➤ **Les aldéhydes** (formaldéhyde, glutaraldéhyde...) : les aldéhydes se fixent aux parois cellulaires en réagissant avec les groupements fonctionnels carbonyles, amines ou hydroxyles. Cette fixation des réactifs à la paroi cellulaire limite la lyse cellulaire et permet la libération des PEC qui ne sont alors plus liés aux cellules.

De nombreux autres réactifs sont utilisés (acétone, formamide, biphosphate de potassium, benzène, phénol, triton X...), les différents réactifs pouvant être combinés entre eux ou avec des méthodes physiques afin d'améliorer l'extraction.

**Tableau A7. Exemples de protocoles d'extraction chimique des PEC**

Méthode d'extraction	Paramètres	Référence
Acide (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2,3 %, 4 °C, 3 h	(Sheng <i>et al.</i> 2005)
Base (NaOH)	1,5 M, 15 min	(Gehr et Henry 1983)
Base (NaOH)	1 M, 4 °C, 3 h	(Sheng <i>et al.</i> 2005)
Base (NaOH)	1 M, 4 h	(Metzger <i>et al.</i> 2009)
Alcool (éthanol)	1 volume, 4 °C, 3 h	(Braissant <i>et al.</i> 2007)
Alcool (95 % éthanol, 5 % méthanol)	4 volumes, 4 °C, 12 h	(Hung <i>et al.</i> 2005)
EDTA	25 mM, 4 °C, 2h	(Matias <i>et al.</i> 2003)
EDTA	10 mM, 4 °C, 30 min	(Bhaskar et Bhosle 2006)
Ether couronne (ether dicyclohexyl-18-couronne-6)	30 mM, pH 8, 3h	(Wuertz <i>et al.</i> 2001)
Tampon phosphate	0,01 M, pH 7, 70 °C, 2 h	(Azeredo <i>et al.</i> 1999)
Tampon Tris/HCl	0,01 M, pH 8, 37 °C, 24 h	(Beech <i>et al.</i> 1999)
Formaldéhyde	0,2 %, 4 °C, 1 h	(Liu et Fang 2002b)
Formaldéhyde	0,2 %, 0 °C, 3 min	(Wang <i>et al.</i> 2005)
Glutaraldéhyde	1,8 %, 4 °C, 12 h	(Azeredo <i>et al.</i> 1999)
Glutaraldéhyde	3 %, 4 °C, 12 h	(Azeredo <i>et al.</i> 1999)
Triton X-100	0,5 %, 1h	(Ras <i>et al.</i> 2008)

### II.3. Méthodes biologiques

Un dernier type d'extraction, l'extraction enzymatique des PEC, existe mais cette technique est spécifique de certains types de molécules et elle est rarement utilisée (Sesay *et al.* 2006). Ainsi, le mélange de protéase, de cellulase et d' $\alpha$ -amylase ajouté à la biomasse provoque l'hydrolyse des liaisons des protéines et des polysaccharides et leur libération de la matrice polymérique. Toutefois, dans les biomasses, il existe une grande variété de liaisons et d'interactions entre les molécules et certaines de ces liaisons et interactions ne sont pas affectées par les enzymes. Cette méthode libère donc peu de PEC de la biomasse. En revanche, l'avantage de l'extraction enzymatique réside dans le fait que cette méthode ne provoque pas de lyse cellulaire au cours de l'extraction.



## II.4. Combinaisons de différentes méthodes

Afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction en augmentant le rendement d'extraction, des protocoles combinent plusieurs méthodes d'extractions. La combinaison de plusieurs méthodes est également utilisée afin de séparer différents types de PEC. La combinaison de ces méthodes peut faire intervenir :

➤ **Des méthodes physiques.** Exemple : utilisation combinée de REC et de la sonication (Jorand *et al.* 1998).

➤ **Des méthodes chimiques.** Exemple : ajout de formaldéhyde pour protéger les cellules de la lyse, suivi d'un traitement alcalin (NaOH) (Metzger *et al.* 2009).

➤ **Diverses méthodes physiques et chimiques.** Exemples : ajout d'un tampon phosphate associée à l'homogénéisation de la biomasse, suivi d'une phase de chauffage (Wang *et al.* 2006) ; ajout de Triton X-100, suivi d'une centrifugation puis répétition des ces deux étapes pour extraire spécifiquement des protéines (Ras *et al.* 2008).

Les PEC sont composés de molécules plus ou moins liées aux cellules dans la biomasse et certains auteurs ont établi des protocoles utilisant différentes méthodes afin de séparer les différentes fractions (Li et Yang 2007; Sun *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Yu *et al.* 2009). Yu *et al.* (2009) ont ainsi déterminé 3 fractions. Les boues mélangées à un tampon phosphate ont subi une première centrifugation (2 000  $\times$ g ; 15 min) et le surnageant est considéré comme la fraction des slimes. Le culot est ensuite mis en suspension dans le même volume de tampon phosphate et subit une deuxième centrifugation (5 000  $\times$ g ; 15 min), le surnageant correspond alors à la fraction de PEC faiblement liés. Le culot est remis en suspension toujours dans le même volume de tampon phosphate et subit un traitement aux ultrasons (480 W, 10 min). Le mélange est centrifugé (20 000  $\times$ g ; 20 min) et le surnageant obtenu correspond à la fraction des PEC fortement liés. Le fractionnement se fait donc en fonction de la force des liaisons des PEC avec les cellules. Un autre fractionnement possible est l'extraction des différentes molécules en fonction des cations inorganiques auxquels elles sont liées (Park et Novak 2007). Ainsi, Park et Novak (2007) ont extrait principalement les PEC liés aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  en utilisant une REC, les PEC liés aux ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  en utilisant des sulfures et les PEC liés aux ions  $\text{Al}^{3+}$  en utilisant une base.

### **III. Séparation et purification des extraits de PEC**

Une fois l'extraction des PEC achevée, la séparation de la biomasse et de la fraction contenant les PEC est effectuée par centrifugation de l'échantillon, la fraction polymérique se trouvant généralement dans le surnageant (excepté dans les méthodes conduisant à la précipitation des PEC). Dans la littérature, il existe de nombreuses variantes des paramètres de cette centrifugation (Tableau A<sub>6</sub>).

Certaines études mettent également en place une étape de purification des extraits de PEC en réalisant des précipitations successives (Denecke 2006), des dialyses (Andersson *et al.* 2009) ou en filtrant les échantillons (Brown et Lester 1980). Il est possible de retrouver ces trois méthodes dans le même protocole (Hung *et al.* 2005). La précipitation des PEC se fait en ajoutant à l'extrait de grandes quantités d'éthanol, de méthanol ou d'acétone ou encore un mélange de ces solvants organiques (Morgan *et al.* 1990). Cette purification se fait alors en précipitant les composés de haut poids moléculaire récupérés ensuite par centrifugation. La dialyse contre de l'eau ultrapure permet l'élimination des sels et des composés de faible poids moléculaire. De plus, les réactifs chimiques peuvent se retrouver dans les extraits de PEC (Comte *et al.* 2006c), une dialyse avec une membrane de seuil de coupure à 3,5 kDa est alors souvent réalisée afin d'éliminer totalement ou en partie ces composés (Andersson *et al.* 2009). Enfin, la filtration à 0,22 µm est utilisée afin d'enlever les résidus de la biomasse qui auraient été extraits en même temps que les PEC.

### **IV. Comparaison des techniques d'extraction**

Il existe donc un grand nombre de protocoles d'extraction des PEC, mais les différentes méthodes n'ont pas la même efficacité d'extraction et peuvent conduire à l'extraction spécifique de certains types de molécules des PEC. Différentes études ont tenté de comparer ces méthodes d'extraction des PEC à partir de cultures de bactéries (Sheng *et al.* 2005; Metzger *et al.* 2009), de biofilms (Azeredo *et al.* 1999; Aguilera *et al.* 2008), de boues activées (Brown et Lester 1980; Comte *et al.* 2006c; Ras *et al.* 2008) ou de boues granulaires (Liu et Fang 2002b; Adav et Lee 2008).

## IV.1. Effets sur la composition des extraits de PEC

Suivant le protocole utilisé pour extraire les PEC à partir de la même biomasse, la quantité totale de PEC extraits varie (Tableau A<sub>8</sub>). De manière générale, les extractions chimiques sont des méthodes plus agressives et permettent l'extraction d'une plus grande quantité de biopolymères (Liu et Fang 2002b; Liu et Fang 2003; Comte *et al.* 2006c). De plus comme le montrent les Tableaux A<sub>8</sub> et A<sub>9</sub>, pour la même méthode d'extraction, la quantité de PEC extraits diffère en fonction de la biomasse d'origine. Ainsi, de plus faibles teneurs en PEC sont extraites à partir de boues granulaires par rapport aux boues activées. En effet, pour le même protocole d'extraction, la dispersion de la biomasse est limitée pour les biomasses granulaires qui ont une structure dense (Fang 2000) contrairement aux floccs. Ainsi, une adaptation du protocole d'extraction est nécessaire en fonction de la biomasse étudiée.

**Tableau A<sub>8</sub>. Exemples de quantités totales de PEC extraits à partir de 3 boues activées par différentes méthodes d'extraction (Ge *et al.* 2007)**

Méthode d'extraction	PEC Boue 1 (mg.g <sup>-1</sup> PSV)	PEC Boue 2 (mg.g <sup>-1</sup> PSV)	PEC Boue 3 (mg.g <sup>-1</sup> PSV)
<b>Centrif.</b>	13,3	22,5	21,5
<b>REC</b>	30,3	48,2	43,1
<b>EDTA</b>	41,9	61,0	64,1
<b>Form. + NaOH</b>	49,9	53,3	51,6

La méthode d'extraction modifie la quantité de PEC extraits mais également la répartition des différents teneurs en composés (protéines, polysaccharides...) (Tableau A<sub>9</sub>). Les études qui ont comparé les protocoles d'extraction ont permis de mettre en évidence certaines tendances concernant l'impact de la méthode sur la composition biochimique des PEC.

Concernant les extractants chimiques, par exemple, l'utilisation de l'EDTA conduit à de fortes teneurs en protéines et substances humiques-like. Néanmoins, cet agent chélatant est connu pour altérer la détermination colorimétrique des protéines, ce qui peut entraîner une surestimation de la quantité de protéines (Brown et Lester 1982; Ras *et al.* 2008). Autre exemple, l'ajout d'hydroxyde de sodium comme extractant entraîne de très fortes concentrations en acides nucléiques (Tableau A<sub>9</sub>) dues à une forte lyse cellulaire lors de l'extraction (Sheng *et al.* 2005). La combinaison du formaldéhyde et de la soude permet alors de limiter cette lyse cellulaire (Liu et Fang 2002b).

**Tableau A<sub>9</sub>. Exemples de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à partir d'une boue activée et d'une biomasse granulaire anaérobie par différentes méthodes d'extraction (Liu et Fang 2002b)**

Méthode d'extraction	Prot. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Polysac. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Subst. Hum. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Uro. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Nuc. (mg.g <sup>-1</sup> boue)
<b>Boue activée</b>					
Centrif.	7,9	7,7	6,4	0,5	0,1
REC	17,6	12,7	16,4	1,2	0,1
EDTA	22,9	12,4	59,2	2,1	0,5
Form. + NaOH	54,6	40,5	50,4	4,2	0,4
<b>Boue granulaire anaérobie</b>					
Centrif.	5,8	4,1	3,1	0,3	< 0,1
REC	10,6	7,9	5,5	0,9	0,1
EDTA	12,0	6,8	24,3	1,2	0,3
Form. + NaOH	42,1	19,1	23,3	2,1	0,2

Concernant les extractions physiques, la faible quantité de PEC extraits par la centrifugation, comparée aux résultats obtenus par les autres méthodes, est due au fait que les PEC fortement liés aux cellules ne sont pas atteints par cette méthode (Comte *et al.* 2006c). Le chauffage, quant à lui, permet l'extraction de fortes quantités de PEC mais la forte concentration en acides nucléiques laisse supposer la lyse de cellules lors de l'extraction (Azeredo *et al.* 1999). La résine échangeuse de cations extrait des quantités de PEC plus importantes que la centrifugation car la double action mécanique et chimique permet la libération des PEC fortement liés à la biomasse qui sont principalement des protéines et des polysaccharides mais n'entraîne pas de lyse cellulaire.

La quantité et la composition des extraits de PEC sont donc très variables suivant les différentes études et dépendent de la biomasse d'origine et de la technique d'extraction. Il est donc nécessaire d'établir des critères de qualité de l'extraction afin de pouvoir comparer les différentes méthodes.

## IV.2. Efficacité de l'extraction

La grande variété de protocoles d'extraction des PEC et l'absence de méthode de référence rendent les résultats des différentes études difficiles à comparer et interpréter. D'après

différents auteurs une bonne extraction est synonyme d'un bon rendement d'extraction, d'une faible lyse cellulaire et de la non-altération des molécules composant les PEC (Gehr et Henry 1983; Liu et Fang 2002b).

#### ***IV.2.a. Le rendement d'extraction***

Le rendement d'extraction est par définition la quantité de PEC extraits en fonction de la quantité de PEC présents dans la biomasse (Wingender *et al.* 1999). Toutefois la concentration en PEC initiale dans la biomasse est généralement inconnue et aucune méthode pour déterminer ce paramètre n'est disponible dans la littérature. Toutefois, Ras (2008) propose une méthode qui combine des extractions répétées ainsi qu'une modélisation pour appréhender la teneur initiale en PEC dans la biomasse. Le rendement d'extraction est donc la plupart du temps ramené à la quantité de PEC extraits en fonction de la matière organique totale de la biomasse. Ce rendement d'extraction s'exprime en pourcentage mais les variables diffèrent en fonction des études. Il peut correspondre au rapport du poids sec de l'extrait de PEC en fonction du poids sec ou du poids sec volatil de la biomasse. Le rendement d'extraction peut aussi s'exprimer en fonction des mesures de carbone organique total et correspond alors au rapport du carbone organique de l'extrait sur le carbone organique de la biomasse. Le Tableau A<sub>10</sub> présente des valeurs de rendement d'extraction pour différentes méthodes et différentes biomasses. Le rendement d'extraction varie en fonction de la méthode utilisée, les extractions chimiques obtenant un meilleur rendement.

***Tableau A<sub>10</sub>. Exemples d'influence de la technique d'extraction sur le rendement d'extraction des PEC***

<b>Méthode d'extraction</b>	<b>Rendement d'extraction (PS PEC/PS biomasse)</b>	
	<b>Boue activée (Comte <i>et al.</i> 2006c)</b>	<b>Culture bactérienne (Metzger <i>et al.</i> 2009)</b>
<b>Centrif.</b>	1,0 %	/
<b>REC</b>	3,1 %	8,8 %
<b>EDTA</b>	19,2 %	14,4 %
<b>Form. + NaOH</b>	47,0 %	16,9 %

### ***IV.2.b. Evaluation de la lyse cellulaire***

La lyse cellulaire entraîne la contamination des extraits de PEC par le matériel intracellulaire. Dans la littérature, différentes méthodes sont proposées pour évaluer cette contamination.

➤ Les acides nucléiques sont des constituants des PEC relargués suite à la mort naturelle des cellules de la biomasse ou excrétés par les cellules lors de leur croissance. Ils sont présents en faible quantité dans la matrice de PEC. La centrifugation étant une méthode réputée non dégradative pour les cellules, la comparaison de la teneur en acides nucléiques des autres méthodes avec celle obtenue avec la centrifugation permet d'avoir une évaluation de la lyse cellulaire. Ainsi, des méthodes utilisant le chauffage ou la soude entraîne une forte extraction des acides nucléiques probablement due à la lyse de cellules (Tableau A<sub>11</sub>).

➤ Le ratio protéines/polysaccharides est souvent utilisé comme indicateur. Ainsi, si ce rapport est trop élevé, il est synonyme de lyse cellulaire. Ce rapport a été utilisé à l'origine pour des biomasses telles que les biofilms ou les cultures de bactéries où les polysaccharides sont les principaux constituants des PEC. Dans ces biomasses, un ratio inférieur à 1 équivaut à une faible lyse cellulaire. Le relargage du matériel intracellulaire riche en protéines conduit à une augmentation de ce ratio. Toutefois, dans des biomasses de type boue activée ou boue granulaire, la quantité de protéines est naturellement plus importante. Ainsi, les ratios sans lyse cellulaire apparente sont compris dans les intervalles 1-2 et 3-6 respectivement pour des boues activées et des boues granulaires (Adav et Lee 2008). Il est donc nécessaire de tenir compte de la biomasse d'origine et de comparer ce ratio avec une méthode qui ne conduit pas à la lyse des cellules (Tableau A<sub>11</sub>).

➤ La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) est une enzyme spécifiquement intracellulaire. La quantification de l'activité enzymatique de la G6P-DH dans les extraits de PEC est utilisée par certains auteurs pour évaluer la lyse des cellules (Frølund *et al.* 1996; Ras *et al.* 2008).

➤ Le 2-céto-3-désoxyoctanoate (KDO) est un saccharide présent dans la constitution de la membrane cellulaire des bactéries Gram négatives (Adav et Lee 2008). Le KDO peut être utilisé comme marqueur de la présence de constituants de la membrane cellulaire dans les extraits et donc comme indicateur de lyse cellulaire (Gehrke *et al.* 1998).

➤ L'adénosine triphosphate (ATP) est un nucléotide intracellulaire. Ainsi, sa détection par bioluminescence dans les échantillons de PEC est un bon indicateur de la contamination

des extraits de PEC par le matériel intracellulaire issu de la lyse bactérienne (Azeredo *et al.* 2003).

**Tableau A<sub>11</sub>. Exemples d'influence de la méthode d'extraction sur la quantité totale de PEC, la quantité d'acides nucléiques et le rapport protéines/polysaccharides dans des échantillons de PEC extraits à partir de culture de *Rhodopseudomonas acidophila* (Sheng *et al.* 2005)**

	PEC total (mg.g <sup>-1</sup> PS)	Ac. Nuc. (mg.g <sup>-1</sup> PS)	Prot./Polys.
<b>Centrif.</b>	12,9	2,6	1,5
<b>Chauffage</b>	71,6	23,6	3,7
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	21,4	4,6	0,6
<b>EDTA</b>	70,3	5,4	9,1
<b>NaOH</b>	159,2	24,9	16,7

#### **IV.2.c. Altération des molécules**

L'altération des molécules composant les PEC est difficile à évaluer. Frølund *et al.* (1996) ont choisi de suivre les profils de poids moléculaires des PEC par chromatographie d'exclusion stérique haute pression pour l'optimisation d'une méthode d'extraction. Certaines méthodes peuvent en effet modifier la conformation de la structure des molécules (*e.g.* hydrolyse par la température, hydrolyse basique, hydrolyse enzymatique). De plus certains réactifs chimiques se complexent fortement avec les molécules des PEC (cas de l'EDTA), ce qui ne permet pas leur dosage par la suite à cause de l'encombrement stérique engendré.

## **V. Méthodes de caractérisation des PEC**

Dans la littérature, de nombreuses techniques de caractérisation des PEC sont recensées suivant le caractère étudié.

### **V.1. Les dosages colorimétriques**

La littérature concernant les PEC fait état de diverses techniques pour déterminer les teneurs des différents composés des PEC. La plupart de ces méthodes sont des dosages colorimétriques (Tableau A<sub>12</sub>). Outre les plus anciennes (Tableau A<sub>12</sub>), de nombreuses autres

méthodes existent afin d'améliorer la fiabilité du dosage et de pallier les interférences pouvant exister. Toutefois, bien que ces méthodes simples soient très usitées, elles présentent des inconvénients. En effet, si l'on prend le cas des protéines, les trois méthodes les plus utilisées pour leur caractérisation sont la méthode de Lowry *et al.* (1961), la méthode de Smith *et al.* (1985) et la méthode de Bradford (1976). Concernant la méthode de Lowry, les substances humiques-like interfèrent dans la détermination des teneurs en protéines nécessitant une modification de la méthode afin d'en tenir compte (Frølund *et al.* 1995). De plus Ras *et al.* (2008) ont montré que cette méthode tend à sous-estimer la réelle teneur en protéines. La méthode de Smith, utilisant l'acide bicinchonique (BCA) comme réactif, permet le dosage des protéines mais également de certains polysaccharides (Wingender *et al.* 2001), ce qui engendre une surestimation de la réelle concentration en protéines (Ras *et al.* 2008). Enfin, la méthode de Bradford ne permet la quantification que d'une partie des protéines. En effet, les petites protéines comportant moins de huit peptides ne sont pas dosées (Wingender *et al.* 2001).

**Tableau A<sub>12</sub>. Exemples de techniques de dosage des composants des PEC**

	Réactifs	Référence
<b>Protéines</b>		
	Réactif de Folin-Ciocalteu	(Lowry <i>et al.</i> 1951)
	Sulfate de cuivre	
	BCA	(Smith <i>et al.</i> 1985)
	Sulfate de cuivre	
	Bleu de Coomassie	(Bradford 1976)
<b>Substances humiques-like</b>		
	Réactif de Folin-Ciocalteu	(Frølund <i>et al.</i> 1995)
<b>Polysaccharides</b>		
	Anthrone	(Gaudy 1962)
	Phénol	(Dubois <i>et al.</i> 1956)
<b>Acides uroniques</b>		
	m-hydroxydiphényle	(Blumenkrantz et Asboe Hansen 1973)
	Sulfamate/m-hydroxydiphényle	(Filisetti-Cozzi et Carpita 1991)
<b>Lipides</b>		
	Vanilline	(Frings et Dunn 1970)
<b>Acides nucléiques</b>		
	Diphénylamine	(Burton 1956)
	4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI)	(Brunk <i>et al.</i> 1979)

Les PEC issus de biomasses épuratoires sont composés de molécules très hétérogènes et cette grande diversité de composés limite l'efficacité de ces méthodes de caractérisation (Ras *et al.*



2008). De plus, différentes études ont mis en avant que les méthodes d'extraction peuvent également affecter la caractérisation colorimétrique des PEC (Brown et Lester 1982; Ras 2008). En effet, la présence de réactifs chimiques dans les extraits de PEC peut affecter le dosage des PEC. Ainsi, l'EDTA qui forme des complexes stables avec les protéines fausse les résultats obtenus pour le dosage des protéines (Brown et Lester 1982). De même, Ras *et al.* (2008) ont montré que l'extraction en utilisant du Triton X ou un tampon Tris engendre une sous-estimation de la teneur en protéines déterminée. Les méthodes ne sont cependant pas affectées de la même manière par la présence d'un réactif donné. Il est donc judicieux de choisir la méthode de caractérisation en fonction de la possible influence des extractants chimiques en solution.

## V.2. Identification des composés des PEC

Certaines études ont également tenté d'identifier les molécules composant les différentes classes de composés des PEC. Pour cela, diverses méthodes sont envisageables :

➤ **Les protéines** : L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) permet de séparer spécifiquement les protéines en fonction de leur poids moléculaire apparent (Andersson *et al.* 2009). Chaque fraction apparaît sous forme de bandes sur le gel d'électrophorèse et l'étude de ces fractions par chromatographie en phase liquide couplée à un tandem de spectromètres de masses (LC-MS/MS) permet l'identification des polypeptides composant ces fractions (Park *et al.* 2008). Park *et al.* (2008) ont ainsi identifié, dans la matrice polymérique de boues activées, la présence de protéines impliquées dans la défense des bactéries, les appendices cellulaires, la membrane externe des cellules, le matériel intracellulaire mais également des protéines issues de l'effluent traité. Dignac *et al.* (1998) ont utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection par fluorimétrie afin de séparer et d'identifier les acides aminés présents dans les extraits de PEC. Ce type d'analyse nécessite l'hydrolyse des protéines ainsi qu'une étape de dérivation afin que les acides aminés acquièrent un caractère fluorophore.

➤ **Les polysaccharides** : La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une méthode très utilisée pour l'identification des polysaccharides. Différents types de GC sont recensés dans la littérature. La GC couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ou à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) permettent la séparation et l'identification des monosaccharides présents dans les extraits en fonction de leur temps de rétention (Dignac *et al.* 1998; Gloaguen *et al.* 2004; Braissant *et al.* 2007). Ces méthodes (GC-MS et GC-FID)

permettent également d'identifier les liaisons existantes entre les monomères dans les extraits (Verhoef *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2009). La chromatographie d'échange d'anions à haute performance couplée à une détection ampérométrique pulsée est également utilisée dans certaines études afin de séparer et d'identifier les polysaccharides (Verhoef *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2009).

➤ **Les lipides** : La littérature comporte des études utilisant les techniques de GC et GC-FID pour l'identification des lipides (Schmidt et Ahring 1994; Dignac *et al.* 1998).

Certaines études ont analysé des extraits de PEC par spectroscopie de fluorescence utilisant une matrice d'excitation-émission (EEM) afin de caractériser les extraits de PEC (Esparza-Soto et Westerhoff 2001; Sheng et Yu 2006a; Adav et Lee 2008). Les spectres obtenus ont mis en évidence trois pics ayant des intensités variables suivant les échantillons et correspondant à des protéines (deux pics) et aux substances humiques-like (un pic). Les auteurs ont donc conclu que cette méthode permet de déterminer des signatures fluorophores des extraits de PEC (Esparza-Soto et Westerhoff 2001) mais la spectroscopie de fluorescence EEM n'est pas un outil adapté pour des analyses quantitatives (Adav et Lee 2008).

### **V.3. Caractérisation de la structure et des propriétés des molécules**

L'étude structurale des molécules composant les PEC peut être envisagée suivant plusieurs paramètres :

➤ **Le poids moléculaire** : La séparation des PEC en fonction de leur poids moléculaire peut être réalisée grâce à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (Garnier *et al.* 2005; Comte *et al.* 2007), à la chromatographie par filtration sur gel (GFC) (Wang *et al.* 2009) ou encore à l'aide de cellules d'ultrafiltration agitées (Esparza-Soto et Westerhoff 2001). La détection, après séparation, peut se faire par spectroscopie UV/visible (Comte *et al.* 2007; Wang *et al.* 2009), infrarouge (Görner *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2005) ou par fluorimétrie (Esparza-Soto et Westerhoff 2001). Toutefois, devant l'hétérogénéité des molécules composant les PEC, l'étude du fractionnement en fonction du poids moléculaire est une méthode qualitative (Görner *et al.* 2003) permettant l'établissement de profils de poids moléculaires des extraits (Wang *et al.* 2009). De plus, dans le cas de l'utilisation de la SEC, des interactions hydrophobes et/ou ioniques ont été observées au cours de la séparation,

altérant ainsi le fractionnement de l'extrait (Simon *et al.* 2009). La technique de fractionnement par couplage flux-force (FFF) est également un outil permettant de séparer simultanément les molécules en fonction de plusieurs paramètres tels que la composition et le poids moléculaire (Messaud *et al.* 2009). Ainsi, la FFF peut être utilisée dans la séparation des protéines ou des polysaccharides (Lambo-Fodje *et al.* 2007).

➤ **La configuration** : La résonance magnétique nucléaire du carbone (NMR  $^{13}\text{C}$ ) ou de l'hydrogène (NMR  $^1\text{H}$ ) sont des méthodes utilisées pour déterminer la structure des molécules (Zhou *et al.* 2001; Gloaguen *et al.* 2004). Les PEC regroupant une grande diversité de molécules, cette technique d'analyse est utilisée pour une détermination qualitative. Toutefois, l'utilisation de la NMR à polarisation croisée avec rotation à l'angle magique (NMR CP-MAS) peut permettre une quantification et une identification des molécules efficaces (Metzger *et al.* 2009).

➤ **Les groupements fonctionnels** : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'identifier les principaux groupements fonctionnels portés par les PEC et ainsi de prédire les composés majeurs (Zhou *et al.* 2001). Cette technique est utilisée de manière qualitative (Beech *et al.* 1999) afin de déterminer des empreintes des différents composés présents dans les extraits (Garnier *et al.* 2005) en raison de la grande diversité de molécules composant les PEC. Ainsi, afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse infrarouge, certains auteurs utilisent une séparation par SEC en amont de la détection par FTIR afin que les fractions analysées contiennent un nombre limité de molécules (Görner *et al.* 2003).

➤ **La charge de surface** : Il existe plusieurs techniques d'analyse qui sont critiquées dans divers articles de la littérature (Boyette *et al.* 2001; Mikkelsen 2003) : la détermination du potentiel zêta, la titration acido-basique, la titration des colloïdes ou l'utilisation du rouge de Ruthénium (Tableau A<sub>13</sub>). Il n'existe donc pas de méthode d'analyse de référence mais Mikkelsen (2003) a établi que, pour l'étude des PEC, la titration des colloïdes semble la plus appropriée tandis que la détermination du potentiel zêta serait plus efficace pour l'étude de la charge de surface des agrégats bactériens.

➤ **L'hydrophobicité** : Il n'existe pas de mesure absolue de l'hydrophobicité mais des mesures relatives. Différentes méthodes sont utilisées dans la littérature : l'adhérence des molécules sur des hydrocarbures tels que l'hexadécane ou l'octane (Boyette *et al.* 2001; Wilén *et al.* 2003a; Zhang *et al.* 2007) ; la détermination de la fixation des composés hydrophobes sur des résines de type XAD à pH acide (Jorand *et al.* 1998) ; la mesure de l'agrégation des sels consistant à la précipitation des molécules hydrophobes par ajout de

sulfate d'ammonium (Park *et al.* 2008; Obuekwe *et al.* 2009) ; la mesure de l'angle de contact du substrat avec une goutte (Bura *et al.* 1998; Liao *et al.* 2001). Toutefois, d'après certains auteurs, cette dernière technique n'est pas adaptée aux suspensions hétérogènes que sont les extraits de PEC (Wilén *et al.* 2003a).

**Tableau A<sub>13</sub>. Principes des différentes techniques utilisées pour l'analyse de la charge de surface des PEC (Boyette *et al.* 2001; Mikkelsen 2003)**

Méthode	Principe	Commentaires
Potentiel zêta ou mobilité électrophorétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesure basée sur la mobilité électrophorétique des composés soumis à un champ électrique</li> <li>- Le potentiel zêta représente le potentiel électrique d'une particule au plan de cisaillement au niveau de la couche diffuse de la surface de la particule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Basé sur un petit nombre de molécules et donc pas représentatif de toute la suspension</li> <li>- Relié mais pas identique au potentiel de surface</li> </ul>
Titration acido-basique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesure la quantité totale des groupements ionisables dans la suspension</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pour une titration acide, titration des acides faibles (participant faiblement à la charge de surface) et des bases faibles (ne participant pas à la charge de surface)</li> <li>- Charge de surface induite par les acides forts parfois sous-estimée</li> <li>- Dans le cas de particules perméables (cas des PEC) la titration n'est pas limitée à la surface</li> </ul>
Titration des colloïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesure basée sur la réaction stœchiométrique entre les charges de surface de la suspension et des réactifs polymériques standards</li> <li>- Titration des groupements de surface positivement et négativement chargés respectivement par des polymères standards anioniques et cationiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les contre-ions fortement liés à certaines charges ne sont pas remplacés, ce qui entraîne une sous-estimation de la charge de surface</li> <li>- Influence de l'encombrement stérique lors du dosage</li> </ul>
Rouge de Ruthénium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mesure basée sur la fixation du colorant aux charges de surface puis l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 537 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusion limitée du colorant dans les couches internes de PEC</li> </ul>

## V.4. Etude in situ des PEC

La détection in situ des PEC dans les biomasses se fait par microscopie. Différentes techniques sont disponibles dans la littérature :

➤ **La microscopie confocale à balayage laser (CLSM)** : Pour cette analyse, le marquage des molécules est nécessaire afin de les détecter. Ainsi, différents colorants sont utilisés dans la littérature afin de pouvoir différencier les protéines (Fluorescéine isothiocyanate-5 ou FITC), les  $\alpha$ -polysaccharides (Concanavoline A ou ConA), les  $\beta$ -polysaccharides (calcofluor blanc), les lipides (rouge Nil), les acides nucléiques (SYTO 63) (Chen *et al.* 2007a; Adav et Lee 2008). Toutefois, il peut y avoir des interférences liées aux autres colorants lors de l'analyse, il est donc nécessaire de bien les sélectionner pour limiter ces interférences (Chen *et al.* 2007b). Cette technique d'analyse permet une visualisation en trois dimensions de la répartition des différentes classes de composés au sein de la biomasse (McSwain *et al.* 2005). La CLSM est utilisée comme une analyse qualitative in situ des PEC, mais une méthode permettant de quantifier les PEC totaux dans la biomasse a été développée (Zhang et Fang 2001). Cette quantification est basée sur l'hypothèse que le poids sec volatil (PSV) de la biomasse correspond à la somme des PSV des cellules et des PEC. Ainsi, la coloration des cellules et l'analyse par CLSM permettent de déterminer le volume que représentent les cellules au sein de la biomasse. La masse des cellules est ensuite déterminée, puis la masse de PEC est calculée. Cette méthode a été utilisée pour déterminer les teneurs en PEC dans des cultures bactériennes (Zhang et Fang 2001) mais également dans des biomasses épuratoires (Liu et Fang 2002b).

➤ **La microscopie électronique en transmission** : les PEC sont marqués avec un colorant (*e.g.* rouge de Ruthénium) et cette analyse permet d'identifier la structure de la matrice polymérique dans la biomasse (Matias *et al.* 2003).

➤ **La microscopie à force atomique** : Cette méthode permet d'observer la topographie de la surface d'un échantillon. Ainsi, elle peut être utilisée pour étudier l'évolution de l'organisation supramoléculaire des PEC après adsorption de cellules sur un support (Van der Aa et Dufrêne 2002).

## VI. Conclusion

Afin d'étudier les PEC, un grand nombre de protocoles d'extraction existent. Toutefois, aucune méthode de référence n'a été mise au point. Les méthodes d'extraction qui peuvent être physiques, chimiques ou enzymatiques conduisent à des compositions différentes des extraits. La composition des échantillons de PEC dépend à la fois de la méthode d'extraction utilisée et de la biomasse d'origine. Les méthodes chimiques permettent de meilleurs rendements d'extraction par rapport aux méthodes physiques mais sont plus agressives et peuvent provoquer un fort taux de lyse cellulaire. De plus, Comte *et al.* (2006b) ont mis en évidence que les réactifs chimiques se retrouvent dans les échantillons de PEC, ce qui peut conduire à une modification des propriétés des échantillons altérant ainsi les analyses ultérieures. L'efficacité de ces techniques concerne à la fois un aspect quantitatif (taux de PEC extraits en fonction de la matière organique de la biomasse) et un aspect qualitatif (contamination par le matériel intracellulaire et altération des molécules), ce qui permet de comparer les résultats obtenus dans les différentes études.

Différentes méthodes de caractérisation des PEC sont recensées dans la littérature. Les dosages colorimétriques sont les techniques les plus utilisées pour quantifier les teneurs des différents composés des PEC. La mise en évidence des influences liées à la présence des extractants chimiques dans les extraits de PEC ou aux autres molécules des PEC a nécessité l'optimisation de ces méthodes afin de limiter ces interférences. Diverses techniques existent également suivant le caractère des PEC étudié (poids moléculaire, structure, localisation dans la biomasse). Toutefois, la grande diversité de molécules qu'englobent les PEC est souvent une limite à ces méthodes de caractérisation.



## ***Chapitre A-3 : Sorption des éléments métalliques***

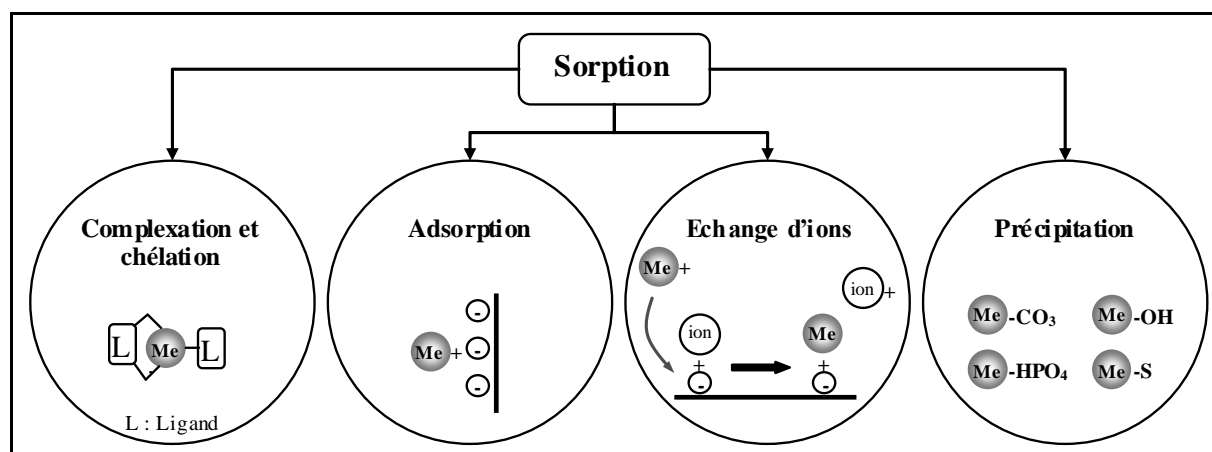
---



## I. Interactions PEC-éléments métalliques

### I.1. Sorption et biosorption

Les eaux usées industrielles et domestiques peuvent être chargées en composés toxiques. La présence de ces contaminants, pouvant être organiques (solvants, pesticides, colorants...) ou inorganiques (fertilisants, éléments métalliques...), est liée aux rejets industriels et domestiques mais également au lessivage des routes et des toitures. Beaucoup de ces composés sont connus pour être toxiques et carcinogènes. Différents procédés sont utilisés afin de traiter ces eaux riches en polluants. Les méthodes physico-chimiques traditionnelles, telles que la précipitation chimique, l'adsorption sur charbon actif, la filtration, les technologies membranaires, les traitements électrochimiques ou l'évaporation, sont souvent critiquées car elles ont un coût élevé, elles ne sont pas écologiques et elles dépendent de la concentration en polluants. De nouvelles méthodes de traitement se sont donc développées, basées sur la capacité du matériel biologique vivant, mort ou inactif à fixer ces composés (Sag et Kutsal 2001).



**Figure A5. Principaux mécanismes impliqués dans la sorption des éléments métalliques**

La biosorption est la propriété qu'ont certains organismes vivants à fixer des ions ou des molécules organiques (Gadd 2009). La biosorption regroupe différents mécanismes de fixation tels que l'absorption, l'adsorption physique, la précipitation ou microprécipitation, la complexation, la chélation, l'échange d'ions... (Figure A5) (Wang et Chen 2009). Ces mécanismes font intervenir différentes interactions physico-chimiques telles que des

interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals, la formation de liaisons covalentes ou de liaisons hydrogènes, des réactions d'oxydoréduction...

Dans la littérature, les auteurs utilisent le terme de « biosorption » pour définir les interactions entre les PEC et les composés organiques ou minéraux. Toutefois, il est plus juste de parler de sorption plutôt que de biosorption, car, dans ce cas, les mécanismes d'absorption n'entrent pas en jeu. **Nous utiliserons donc le terme de « sorption » pour généraliser les interactions des PEC avec d'autres composés dans la suite du manuscrit. Le terme de « biosorption » fera référence aux interactions entre les biomasses et les composés organiques ou minéraux.**

Dans les biomasses, les molécules organiques sont hétérogènes et ces différents mécanismes de sorption ont lieu simultanément : il est donc difficile d'identifier le mécanisme principal. Toutefois, certains auteurs ont mis en évidence que l'échange d'ions pourrait être un des principaux mécanismes de la sorption (Volesky et Holan 1995; Sag et Kutsal 2001; Yuncu *et al.* 2006; Vijayaraghavan et Yun 2008).

Une partie de ce travail de recherche concerne les interactions entre les PEC et les éléments métalliques (EM).

## I.2. Les biomasses et la biosorption des EM

De nombreuses études ont été menées sur les capacités de biosorption des EM par les biomasses, les bactéries, les champignons ou les levures (Tableau A<sub>14</sub>). Leur étude et la compréhension des mécanismes entrant en jeu dans la biosorption ont pour but d'améliorer les procédés de dépollution des eaux et des sols et de déterminer le devenir de ces polluants.

**Tableau A<sub>14</sub>. Exemples d'affinités de différentes biomasses avec les EM**

Biomasses	Affinités suivant l'EM	Références
<b>Boue granulaire anaérobie</b>	Pb>Cd>Cu>Ni	(Hawari et Mulligan 2006)
<b>Boue activée</b>	Cd>Cu>Zn	(Yuncu <i>et al.</i> 2006)
<b>Cyanobactéries</b>		(Yee <i>et al.</i> 2004)
<i>Calothrix</i>	Pb>Cd>Cu	
<b>Bactéries de boue activée</b>		(Sag et Kutsal 1995)
<i>Zoogloea ramigera</i>	Pb>Fe(III)>Ni>Cu	
<b>Champignons microscopiques</b>		(Pan <i>et al.</i> 2009)
<i>Penicillium</i> sp. A1	Pb>Cd>Cu>Zn	
<i>Fusarium</i> sp. A19	Pb>Cd>Cu>Zn	

Le Tableau A<sub>14</sub> présente des exemples de biosorption d'EM par différentes biomasses. Les capacités de biosorption de ces biomasses varient en fonction de l'EM. De plus, Hawari et Mulligan (2006a) ont étudié la biosorption d'EM par des boues granulaires anaérobies et ont observé un relargage d'ions Ca<sup>2+</sup> parallèlement à la biosorption des métaux confirmant le mécanisme d'échange d'ions. Ils ont également analysé la fraction de métal qui a été complexée et celle qui a précipité. Il s'avère que ces trois mécanismes ont lieu simultanément mais dans des proportions différentes suivant l'EM considéré. Ainsi, la biosorption du nickel dans les boues granulaires anaérobies se fait principalement par échange d'ions. Pour le cuivre et le cadmium, 80 % sont adsorbés par échange d'ions et 20 % sont complexés. Enfin, la moitié du plomb est adsorbée par échange d'ions, 20 % sont complexés et les 30 % restants se retrouvent sous forme de précipités. Le rôle majeur du mécanisme d'échange d'ions dans la biosorption d'EM par les boues activées est confirmé par le relargage d'ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> observé par Yuncu *et al.* (2006). Ils ont également noté une augmentation de la teneur en polysaccharides en solution, parallèlement à la biosorption des métaux. Ceci est dû à la fragilisation du floc par l'échange d'ions au niveau de la matrice polymérique, laissant supposer une forte participation des PEC aux mécanismes de sorption par les biomasses.

### I.3. Les PEC et la sorption des EM

**Tableau A<sub>15</sub>. Exemples de capacités maximales de sorption des PEC issus de diverses biomasses vis-à-vis d'EM lors de tests de sorption monoélémentaires**

Biosorbant	Capacité maximale de sorption exprimée en mmol.g <sup>-1</sup> de PEC							Références
	Cd(II)	Co(II)	Cr(III)	Cu(II)	Ni(II)	Pb(II)	Zn(II)	
<b>Boues activées</b>								(Liu <i>et al.</i> 2001)
PEC	8,0	18,7	16,0	17,6	4,3	/	22,6	
<b>Granules aérobies</b>								(Sun <i>et al.</i> 2009)
PEC fortement liés	/	17,0	/	/	/	/	15,3	
PEC faiblement liés	/	84,8	/	/	/	/	99,4	
<b>Bactéries</b>								
<i>Paenibacillus polymyxa</i>								(Martins <i>et al.</i> 2008)
PEC	0,6	/	/	0,3	/	/	0,7	
PEC + cellules	0,5	/	/	0,2	/	/	0,3	
<i>Alteromonas macleodii</i>								(Loaëc <i>et al.</i> 1997)
Polysaccharide	1,0	/	/	/	/	1,5	1,0	

Les PEC ont un rôle protecteur pour les cellules vis-à-vis des EM potentiellement toxiques (Chapitre A-1). Ainsi, en présence d'EM dans le milieu, il a été observé une augmentation de la sécrétion de PEC par les bactéries (Kazy *et al.* 2002; Mikes *et al.* 2005). Une étude sur la localisation d'EM (Ag, Al, Fe, Pb, Zn) au sein de floes de boues activées a montré que ces composés se retrouvent principalement dans la matrice extracellulaire (Leppard *et al.* 2003) confirmant ainsi le rôle des PEC dans la sorption des EM par les biomasses.

Il existe de nombreuses études sur les capacités de sorption des EM par les PEC mais très peu de données sont disponibles sur les PEC issus de biomasses épuratoires granulaires anaérobies. Ces études ont mis en avant des différences quant à l'affinité des PEC suivant le métal étudié et le type de biomasse à partir de laquelle ils ont été extraits (Tableau A<sub>15</sub>). Ainsi, les PEC issus de biomasses épuratoires semblent avoir une plus grande capacité de sorption que les PEC extraits à partir de cultures de pures souches bactériennes (Guibaud *et al.* 2005; Tournay *et al.* 2009). Diverses études ont mis en évidence le rôle important de la composition des PEC dans la sorption (Guibaud *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2006). Ainsi, la plupart des études se focalisent sur les polysaccharides mais Guibaud *et al.* (2003) ont observé une corrélation entre les teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like et la capacité de sorption des EM. La composition des PEC est différente suivant la biomasse d'origine (Chapitre A-1), ce qui va donc influencer la sorption des EM. Cette capacité de sorption plus importante pour les PEC issus de boues peut s'expliquer par le fait que, contrairement aux cultures bactériennes, les bactéries, dans les biomasses épuratoires, ont déjà été en contact avec des polluants et ont sécrété de plus grandes quantités de PEC adaptés pour la stratégie défensive des microorganismes (Guibaud *et al.* 2005). La méthode utilisée pour extraire les PEC de la biomasse peut également avoir un effet sur la capacité de sorption de l'extrait de PEC. En effet, les techniques d'extraction, en modifiant la composition des extraits de PEC, engendrent des capacités de sorption différentes pour les extraits (Comte *et al.* 2006b). L'étude de Sun *et al.* (2009) différencie les capacités de sorption des PEC fortement liés et des PEC faiblement liés aux cellules. Les PEC faiblement liés sont plus réactifs vis-à-vis des EM (Tableau A<sub>15</sub>). D'autres études ont confirmé que les PEC solubles ont une meilleure capacité de sorption que les PEC liés, ce qui est dû à la forte teneur en polysaccharides dans ce type de PEC (Comte *et al.* 2006a). De plus, dans les biomasses, les PEC fortement liés présentent moins de sites de fixation pour les métaux car ils forment une couche liée à la cellule par de fortes interactions (Martins *et al.* 2008). C'est pourquoi en présence des cellules bactériennes, la capacité de sorption des EM par les PEC diminue par rapport à celle des PEC seuls (Tableau A<sub>15</sub>). Certaines études ont comparé la capacité de sorption des bactéries en

présence ou absence de PEC et n'ont pas noté de différences significatives (Ueshima *et al.* 2008; Tourney *et al.* 2009). Ils en ont donc conclu que les PEC ont les mêmes propriétés de sorption que la paroi cellulaire des bactéries.

**Tableau A<sub>16</sub>. Principaux groupements fonctionnels des PEC jouant un rôle dans les mécanismes de sorption (Volesky 2007)**

Groupement	Atome ligand	Biomolécules
Hydroxyle	O	Polysaccharides, acides uroniques, protéines, acides nucléiques, substances humiques-like
Carbonyle	O	Protéines, acides nucléiques
Carboxyle	O	Acides uroniques, polysaccharides, protéines, substances humiques-like
Thiol	S	Protéines
Sulfonate	O	Polysaccharides sulfatés
Thioéther	S	Protéines
Amine	N	Protéines, acides nucléiques
Amine secondaire	N	Protéines, acides nucléiques
Amide	N	Protéines
Imide	N	Protéines
Imidazole	N	Protéines
Phosphate	O	Acides nucléiques
Phosphonate	O	Phospholipides
Phosphodiester	O	Lipopolysaccharides

La sorption des EM par les PEC implique différents mécanismes dont le principal semble être la complexation, basée sur les interactions électrostatiques (Zhang *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009). En effet, les PEC présentent des groupements fonctionnels anioniques ionisables pouvant servir de site de fixation pour les cations métalliques (Tableau A<sub>16</sub>). La littérature rapporte que ce sont principalement les groupements carboxyles et hydroxyles qui sont impliqués dans les liaisons avec les EM (Zhou *et al.* 2009). Toutefois, les EM ont des affinités variables suivant les types de sites de fixation. Ainsi, des EM vont être en compétition pour certains sites (*e.g.* Cd, Cu et Ni), alors que d'autres auront des sites de fixation différents (*e.g.* Zn et Cd) (Zhang *et al.* 2006). Contrairement à Zhang *et al.* (2006), Loaëc *et al.* (1997) ont, quant à eux, conclu que le zinc et le cadmium étaient en compétition pour les mêmes sites. Toutefois, dans les travaux de Loaëc *et al.* (1997), la capacité de sorption de Cd et Zn a été étudiée avec un polysaccharide et cette différence entre les deux études peut s'expliquer par une plus grande affinité entre Cd ou Zn et d'autres composés des PEC. La sorption des EM va donc dépendre à la fois du métal présent et de la composition des PEC. De plus, la sorption des cations métalliques par les PEC étant basée sur la présence de groupements ionisés, les

facteurs environnementaux tels que le pH ou la force ionique du milieu ont un impact sur la capacité de sorption des PEC.

## II. Facteurs influençant la sorption

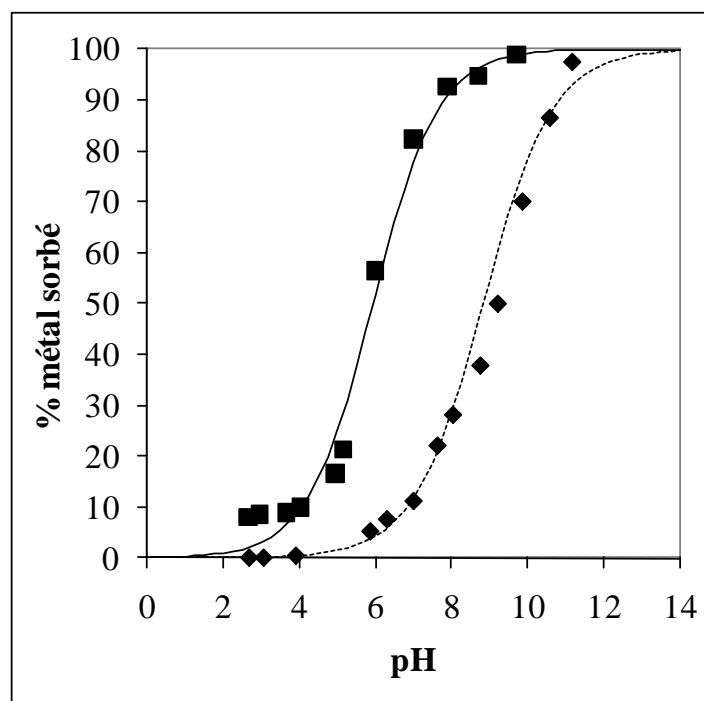
La sorption des EM par les PEC est un ensemble de mécanismes faisant intervenir diverses interactions. Des études ont mis en évidence l'influence de différents facteurs sur les capacités de sorption de PEC :

- Le milieu qui peut affecter à la fois la spéciation des EM et l'ionisation des sites complexant des PEC : pH, force ionique...
- Le métal : spéciation, concentration, densité de charges, présence d'autres cations...
- Les PEC : concentration, composition...

### II.1. Influence liée au milieu

Il est avéré que les propriétés physico-chimiques du milieu peuvent inhiber la sorption des EM par les PEC. Parmi ces propriétés, le pH et la force ionique du milieu ont été les plus étudiés. Au niveau de la sorption, des modifications du pH ont un impact sur l'activité des groupements fonctionnels des PEC et sur la forme du métal en solution (Salehizadeh et Shojaosadati 2003). Différents travaux menés par Guibaud et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence et la modélisation d'un « pH-sorption edge » (Figure A<sub>6</sub>) en étudiant la sorption des EM par les PEC en fonction du pH (Guibaud *et al.* 2006; Guibaud *et al.* 2008). Ils ont observé que la sorption a lieu, suivant ce « pH-sorption edge », sur 4 unités pH (Figure A<sub>6</sub>), ce qui confirme l'hétérogénéité des sites de fixation des PEC. En effet, si les sites étaient homogènes, la sorption aurait été observée sur 1 à 2 unités pH. Par exemple, Guibaud *et al.* (2006) ont observé le « pH-sorption edge » sur une gamme de pH comprise entre pH 4,0 et pH 8,0 pour la sorption du plomb par des PEC et sur une gamme comprise entre pH 6,0 et pH 10,0 pour la sorption du cadmium (Figure A<sub>6</sub>). D'autres études ont déterminé le pH à partir duquel la sorption devient effective. Celui-ci était compris entre 5 et 7 et dépendait du métal étudié. Ainsi, ces valeurs de pH déterminées dans les différentes études sont 4,5 pour le plomb, 5,0 pour le cuivre et 6,0 pour cadmium et le zinc (Salehizadeh et Shojaosadati 2003; Zhou *et al.* 2009). La différence entre les EM est liée à la forme du métal au pH donné et au type de sites de fixation des PEC avec l'EM. En effet, les groupements fonctionnels des PEC,

qui sont de potentiels sites de fixation des EM, sont des groupements ionisables ayant des propriétés acido-basiques. Ainsi, si le pH est supérieur au  $pK_a$ , le groupement est principalement sous forme ionisée et s'il est inférieur, le groupement sera principalement sous la forme protonée (Liu et Fang 2002a). A un pH acide, le groupement est protoné, il y a alors une compétition entre les ions  $H_3O^+$  et les cations métalliques pour se lier aux sites. Les différences observées concernant la gamme de pH du « pH-sorption edge » est liée au fait que les EM sont plus ou moins compétiteurs vis-à-vis des protons. Ainsi, les EM sont d'autant plus compétiteurs que leur affinité avec le ligand est forte. Quand le pH augmente, les sites de fixation se libèrent et les cations métalliques s'accumulent dans la double couche entourant les polyélectrolytes que sont les PEC (Lamelas *et al.* 2006). A des pH basiques, une insolubilisation des EM est observée due à la formation de précipités d'hydroxydes métalliques, ce qui engendre une diminution de la sorption par les PEC (Prado Acosta *et al.* 2005).



**Figure A<sub>6</sub>.** Comparaison des « pH-sorption edges » mesurés (points) et modélisés selon le modèle de Kurbatov (trait) pour des extraits de PEC vis-à-vis du plomb (carré ; trait plein) et du cadmium (losanges, pointillés) (PEC extraits par REC + sonication à partir de boues activées ; PEC :  $8,7 \text{ mg PS.L}^{-1}$  ; métal :  $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) (Guibaud *et al.* 2006)

L'étude de l'impact de la force ionique sur les capacités de sorption des PEC se fait en modifiant les concentrations en électrolytes tels que NaCl, KCl, KNO<sub>3</sub> ou NaNO<sub>3</sub> dans le milieu. Différentes études ont observé une diminution de la sorption parallèlement à l'augmentation de la force ionique (Lamelas *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2009). En effet, l'augmentation de la force ionique provoque une compression de la double couche électronique et modifie le coefficient d'activité des PEC et les constantes apparentes (Miretzky *et al.* 2010). Ces changements de propriétés limitent le transfert des EM de la solution vers la surface des PEC (Zhou *et al.* 2009).

Le pH et la force ionique sont des propriétés étroitement liées qui vont modifier la spéciation des EM en solution et donc les affinités entre le métal et les PEC.

## II.2. Influence liée à l'élément métallique

Divers travaux ont étudié l'influence de la concentration en cations métalliques sur la capacité de sorption des PEC et ont établi des capacités maximales de sorption par les PEC variables suivant le métal considéré (Tableau A<sub>15</sub>). De plus, Zang *et al.* (2006) ont testé des concentrations initiales en cadmium entre 10 et 500 mg.L<sup>-1</sup> avec 0,2 g.L<sup>-1</sup> de PEC. De 10 à 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, la sorption est proche de 100 %. A 150 mg.L<sup>-1</sup>, la sorption diminue à 80 % indiquant une saturation des sites de fixation des PEC disponibles pour le cadmium. Toutefois, au-delà de 150 mg.L<sup>-1</sup>, les auteurs ont observé une augmentation de la capacité de sorption jusqu'à 90 % pour une concentration initiale en métal de 500 mg.L<sup>-1</sup>. Cette augmentation des capacités de sorption des PEC à de fortes concentrations en cadmium est due à la formation de microflocs composés de PEC liés entre eux par les ions cadmium dans lesquels le métal se retrouve piégé.

Suivant les conditions du milieu, la spéciation des éléments métalliques, calculée par des logiciels, varie et le métal peut se trouver sous différentes formes plus ou moins stables telles que Pb<sup>2+</sup>, PbCl<sup>+</sup>, PbCl<sub>2</sub>, PbNO<sub>3</sub><sup>+</sup>, PbOH<sup>+</sup>, Pb(OH)<sub>2</sub>... (Comte *et al.* 2008; Miretzky *et al.* 2010). La forme libre du métal (M<sup>n+</sup>) est celle qui est principalement impliquée dans les mécanismes de sorption avec les PEC (Miretzky *et al.* 2010). Les EM ayant des propriétés différentes en fonction du métal considéré et de sa spéciation dans un milieu donné, la capacité de sorption par les PEC sera donc variable. Dans l'environnement, les EM sont en compétition avec d'autres cations (Ca, Mg, K, Na, autres EM...) durant leur sorption par les PEC. Différentes études ont mis en évidence l'importance de la densité de charge et du rayon



ionique des EM dans les affinités entre les PEC et les métaux. Ainsi, les travaux de Salehizadeh et Shojaosadati (2003), menés sur la sorption à un pH proche de la neutralité de Cu, Pb et Zn par des polysaccharides extracellulaires, ont permis d'établir un classement par ordre d'affinités qui est  $Pb > Cu > Zn$ . Ce classement par affinité avec les PEC est l'inverse de celui obtenu par rapport à la densité de charge des trois EM considérés (densité de charge :  $Pb < Cu < Zn$ ) confirmant l'importance de ce paramètre. L'étude de Prado Acosta *et al.* (2005) sur la sorption du cuivre et du zinc par des polysaccharides a montré que 80 % du cuivre ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu pour  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  de polysaccharides) est adsorbé quand il est le seul EM. L'ajout de zinc à la même concentration engendre une diminution de 50 % de la sorption du cuivre. Cette diminution peut s'expliquer par des affinités proches entre polysaccharides-Cu et polysaccharides-Zn. En effet, les deux EM ont des charges identiques et des rayons ioniques hydratés proches (600 pm). Toutefois, quand le rapport entre la concentration en Zn sur la concentration en Cu augmente, le pourcentage de cuivre sorbé augmente, la sorption du cuivre est donc favorisée dans la liaison avec les polysaccharides, ce qui confirme les résultats obtenus par Salehizadeh et Shojaosadati (2003). Les autres cations non métalliques présents dans le milieu ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ...) sont également en compétition avec les EM pour la fixation aux sites des PEC et l'effet de la présence de ces composés dans le milieu, lié à leurs propriétés telles que la densité de charge ou le rayon ionique, est également à prendre en compte dans l'étude de la fixation des EM par les PEC (Salehizadeh et Shojaosadati 2003; Prado Acosta *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2009).

### **II.3. Influence liée aux PEC**

Comme il a été vu précédemment, la composition des PEC influence leurs capacités de sorption des EM. Ainsi, les protéines, les polysaccharides et les substances humiques-like, qui sont les composés majoritaires des PEC, sont les principales molécules impliquées dans la fixation des métaux par les PEC (Guibaud *et al.* 2003). La technique d'extraction des PEC et la biomasse d'origine des PEC ont un impact sur la composition des PEC. Il sera donc nécessaire d'en tenir compte pour l'étude de la sorption des EM par les PEC. De plus, la concentration initiale en PEC est un paramètre qui peut influencer la capacité de sorption des PEC. En effet, quand la concentration initiale en PEC est importante, la formation de micelles a été observée (Prado Acosta *et al.* 2005). Ces agrégats de PEC dus aux interactions entre les différentes molécules composant les PEC engendrent une diminution du nombre de sites libres pour la fixation des EM et donc une diminution des capacités de sorption des PEC.

Les facteurs influençant les capacités de sorption des PEC sont nombreux et parfois étroitement liés les uns aux autres. Ces facteurs induits par le milieu, le métal et les PEC peuvent inhiber ou favoriser la sorption. Il est donc difficile de comparer les résultats obtenus par les différentes études traitant de la sorption d'EM par les PEC en raison des disparités concernant les conditions expérimentales des analyses qui peuvent fortement affecter la sorption.

### **III. Analyse et modélisation de la sorption**

#### **III.1. Modes opératoires**

Il existe de nombreux protocoles pour l'étude de la sorption mais, concernant les capacités de sorption des EM par les PEC, l'étude en batchs est principalement choisie par les auteurs par commodité. Ainsi, une fois les PEC extraits des biomasses, la solution de PEC est mélangée avec une solution contenant un ou plusieurs EM. Suivant le facteur étudié, la concentration en PEC (Prado Acosta *et al.* 2005), la concentration en métal (Zhang *et al.* 2006), la concentration en sels (Zhou *et al.* 2009), le temps d'équilibre (Bhaskar et Bhosle 2006) ou encore le pH (Guibaud *et al.* 2006) sont les paramètres du mélange qui sont modifiés. Une quantité connue de la solution est alors prélevée et la quantité de métal libre en solution est déterminée principalement par spectrométrie d'absorption atomique (Loaëc *et al.* 1997; Liu *et al.* 2001; Tournay *et al.* 2009), mais également par spectrométrie de résonance paramagnétique électronique (EPR) dans le cas de certains EM comme le zinc (Freire-Nordi *et al.* 2005), par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry) (Ueshima *et al.* 2008) ou par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectroscopy) (Zheng *et al.* 2008). Toutefois, ces techniques d'analyse nécessitent (excepté pour l'EPR) la séparation des PEC liés aux EM et du métal libre. Une étape de centrifugation ou de filtration est donc nécessaire avant analyse. Toutefois, la fraction des PEC dits solubles reste souvent en solution bien qu'elle puisse être liée à des EM. La concentration en métal libre, qui est déterminée, correspond dans ce cas à la fraction libre du métal mais également à une partie de la fraction liée aux PEC solubles. D'autres méthodes, quoique rarement employées, permettent de pallier cette étape de séparation. Ainsi, la potentiométrie utilisant des électrodes sélectives (Lamelas *et al.* 2006) ou la polarographie (Comte *et al.* 2006b) autorisent une analyse directe de la quantité de métal libre ou labile dans les batchs.

## **III.2. Modèles utilisés pour l'étude de la sorption**

### ***III.2.a. La cinétique de sorption***

La cinétique de sorption des EM par les PEC est un paramètre couramment étudié. Cette réaction est rapide, avec un équilibre obtenu après 5 à 10 minutes (Salehizadeh et Shojaosadati 2003; Prado Acosta *et al.* 2005). Divers travaux ont tenté de modéliser la vitesse de réaction par différents modèles cinétiques tels que les modèles de pseudo-premier ordre et pseudo-second ordre de Langergren ou le modèle de diffusion intraparticulaire (Zheng *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2009). Le modèle cinétique de pseudo-second ordre est celui qui correspond le mieux pour décrire la cinétique d'adsorption, ce qui implique que la sorption des EM se fait principalement par des processus chimiques (Zheng *et al.* 2008). Toutefois, la sorption des EM par les PEC regroupe différents mécanismes et ces modèles cinétiques ne peuvent tenir compte de toutes les réactions possibles.

### ***III.2.a. L'isotherme de sorption***

Les résultats de l'analyse de la capacité de sorption des EM par les PEC peuvent se présenter sous la forme d'une isotherme d'adsorption correspondant à la quantité de métal sorbé par masse de PEC en fonction de la quantité de métal en solution non fixée par les PEC. Cette isotherme est ensuite exploitée avec un modèle mathématique. Il existe de nombreux modèles qui sont souvent des relations mathématiques simples caractérisées par un nombre limité de paramètres ajustables permettant une bonne corrélation avec le comportement expérimental. Ces modèles utilisent deux (*e.g.* Langmuir, Freundlich, Temkis), trois (*e.g.* Relich-Peterson, Sips, Khan...) ou quatre paramètres (Vijayaraghavan et Yun 2008). Les modèles de Langmuir et Freundlich sont les plus couramment utilisés dans la modélisation de la sorption des métaux par les PEC. Ces deux modèles permettent de déterminer la capacité de sorption des PEC et les affinités entre l'EM et les PEC. Le modèle de Langmuir est basé sur l'adsorption monocouche sur une surface solide avec un nombre défini de sites identiques et indépendants (Zhou *et al.* 2009). Le modèle de Freundlich est une relation empirique basée sur la distribution hétérogène des sites de fixation actifs sur les PEC (Zheng *et al.* 2008). Le modèle de Freundlich ne reflète pas les mécanismes impliqués mais sert juste à corréler l'isotherme d'adsorption (Kratochvil et Volesky 1998). Toutefois, les hypothèses desquelles découlent ces modèles ne sont pas validées pour la biosorption (Vijayaraghavan et Yun 2008), mais ces

relations mathématiques sont simples, bien établies, peuvent avoir une signification physique (Langmuir) et sont facilement interprétables, ce qui explique leur large utilisation. Les différentes études sur les capacités de sorption des PEC qui ont utilisé ces deux modèles, ont observé une meilleure corrélation des isothermes d'adsorption avec le modèle de Langmuir (Zheng *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2009), ce qui se traduit par la formation d'une monocouche à la surface des PEC. Néanmoins, le modèle de Freundlich conduit également à une bonne corrélation due à l'hétérogénéité des sites de surface des PEC impliqués dans la fixation des EM qui est une des hypothèses à la base de ce modèle (Sun *et al.* 2009). D'autres modèles tels que les modèles graphiques de Chau (détaillée dans le chapitre B-2) et de Ruzic sont également utilisés pour déterminer les quantités totales de ligand dans les extraits de PEC (Guibaud *et al.* 2004).

## **IV. Conclusion**

La sorption est la propriété qu'ont les PEC à fixer des composés organiques ou inorganiques par différents mécanismes tels que la sorption physique, la complexation/chélation, la précipitation ou encore l'échange d'ions. Il est difficile d'établir la réelle part que représente chaque mécanisme dans la sorption en raison des nombreuses interactions possibles et de l'hétérogénéité des PEC. Toutefois, les mécanismes d'échange d'ions et de complexation semblent être les principaux. Les différentes études sur les capacités de sorption des EM par les PEC ont mis en évidence un grand nombre de facteurs liés au milieu, aux EM ou aux PEC qui peuvent influencer la sorption. Ces facteurs rendent difficile la comparaison des résultats obtenus par les différentes études.



***Chapitre A-4 : Conclusion de la synthèse  
bibliographique***

---

Cette synthèse bibliographique a montré que de nombreux articles traitent des polymères extracellulaires. Toutefois, peu de travaux ont étudié les PEC issus de biomasses épuratoires granulaires anaérobies. Les PEC sont des molécules organiques telles que les protéines, les polysaccharides, les acides uroniques, les acides nucléiques, les lipides et les substances humiques-like. La composition des PEC est variable suivant la biomasse d'origine mais surtout suivant le protocole utilisé pour les extraire de ces biomasses. En effet, il n'existe pas de méthode de référence d'extraction des PEC, d'où la difficulté de comparer les résultats obtenus dans la littérature sur la composition des extraits de PEC. De plus, ces protocoles peuvent interférer par la suite dans la caractérisation des PEC et dans l'étude de leurs propriétés. Diverses méthodes de caractérisation des PEC existent. Toutefois, de nombreuses interférences liées à la composition des PEC ou à la présence de réactifs chimiques dans les extraits de PEC ont été observées. Il est donc nécessaire d'en tenir compte lors de l'exploitation des résultats.

La première partie de ce travail de recherche a donc été la détermination de l'impact de différentes méthodes d'extraction des PEC couramment utilisées dans la littérature sur la composition des extraits aussi bien d'un point de vue organique que minéral. Ces PEC ont été extraits à partir de boues granulaires anaérobies.

Les PEC ont de nombreuses fonctions au sein des biomasses dues à leurs propriétés physico-chimiques. Leur capacité de sorption leur confère un rôle protecteur pour les cellules dans les biomasses vis-à-vis des composés potentiellement toxiques. Cette sorption est un ensemble de différents mécanismes induisant des interactions entre les PEC et les composés toxiques. De nombreux facteurs influencent les capacités de sorption des PEC, rendant difficile la comparaison des résultats obtenus par les différentes études en raison des différents modes opératoires utilisés.

La deuxième partie de ce travail de recherche a donc été l'étude de cette capacité de sorption des PEC issus des boues granulaires anaérobies avec des éléments métalliques afin de mieux appréhender les mécanismes entrant en jeu et de définir l'impact de la méthode d'extraction utilisée sur les propriétés des extraits de PEC.





## **PARTIE B : MATERIELS ET METHODES**

## ***Chapitre B-1 : Matériels et produits***

---

## I. Appareillages

Dans cette section du manuscrit sont répertoriés les principaux appareils qui ont été utilisés au cours des travaux de recherche (Tableau B<sub>1</sub>). Les méthodes expérimentales seront développées dans le chapitre suivant.

**Tableau B<sub>1</sub> : Liste des appareils utilisés au cours des expériences des travaux de recherche**

<p><b>Extraction des PEC :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-sonication : Sonopuls 70 avec sonde M73, Bandelin</li> <li>-chauffage : bain thermostaté Labo-therm SW-200, Resona Technics Co.</li> <li>-centrifugation : centrifugeuse KR 22i, Jouan</li> </ul> <p><b>Poids sec :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-étuve RO-8, Metrawatt</li> </ul> <p><b>Poids sec volatil :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-four, Firlabo</li> </ul> <p><b>pH :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>pH-mètre micro pH 2000, Crison</li> </ul> <p><b>Dosages colorimétriques:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-spectrophotomètre CADAS 50S, Dr Lange</li> </ul> <p><b>Infrarouge :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-spectromètre infrarouge Spectrum 1000 IR, Perkin-Elmer</li> </ul> <p><b>Carbone organique total :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-COT-mètre Phoenix 8000, Dohrman</li> </ul> <p><b>Minéralisation :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-microonde V3000, Anton Paar</li> </ul> <p><b>Microscopie électronique à balayage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-microscope électronique à balayage couplé à un détecteur de rayons X XL 30, Philips</li> </ul>	<p><b>Dosages acido-basiques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-titrateur automatique 716 DMS Titrino, Metrohm</li> <li>-agitateur à hélice 3 pales 722, Metrohm</li> <li>-stand 727 Ti Stand, Metrohm</li> <li>-électrode pH (pH 0-14/0; 80 °C; KCl 3 mol.L<sup>-1</sup>), Metrohm</li> <li>-thermostat E100, Lauda</li> <li>-logiciel Metrodata 716 DMS Titrino, Metrohm</li> </ul> <p><b>Polarographie :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-stand statique VA 663 à 3 électrodes, Metrohm</li> <li>-électrode de référence 3 M KCl/1 M KNO<sub>3</sub></li> <li>-contre-électrode en platine</li> <li>-électrode de travail à goutte de mercure</li> <li>-potentiostat/galvanostat µAutolab Type III, Metrohm</li> <li>-injecteur automatique Dosimat 765, Metrohm</li> <li>-thermostat E100, Lauda</li> <li>-logiciel GPES (General Purpose for Electrochemical System) Manager Autolab, Metrohm</li> </ul>
---	---

## II. Produits chimiques

Afin de rendre la partie Matériels et Méthodes plus lisible, la liste des produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences est présentée dans le Tableau B<sub>2</sub> qui suit.

**Tableau B<sub>2</sub> : Liste des réactifs chimiques utilisés au cours des expériences des travaux de recherche**

<b>Acétaldéhyde</b> [C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] : 99,5 %, Riedel-de Haën	<b>Glucose</b> [C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ] : 99 %, anhydre, Rectapur, Prolabo
<b>Acide acétique</b> [C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] : 100 %, Normapur, Prolabo	<b>Hepes</b> [C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S] : 99,5 %, Sigma
<b>Acide chlorhydrique</b> [HCl] : 37 %, Normapur, Prolabo	<b>Hydroxyde de sodium</b> [NaOH] : 99 %, Normapur, Prolabo
<b>Acide glucuronique</b> [C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> ] : 99 %, 1 H <sub>2</sub> O, Aldrich	<b>Hydroxyde de sodium</b> [NaOH] : 0,1 M, Normadose, Prolabo
<b>Acides humiques</b> : 96 % Aldrich	<b>Métahydroxydiphényle</b> [C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O] : 90 %, Aldrich
<b>Acide nitrique</b> [HNO <sub>3</sub> ] : 69 %, Normapur, Prolabo	<b>Nitrate de cadmium (II)</b> [Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] : 1000±2 mg.L <sup>-1</sup> dans HNO <sub>3</sub> 0,5M, Merck
<b>Acide nitrique</b> [HNO <sub>3</sub> ] : 0,1 M, Normadose, Prolabo	<b>Nitrate de plomb (II)</b> [Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] : 1000±2 mg.L <sup>-1</sup> dans HNO <sub>3</sub> 0,5M, Merck
<b>Acide orthophosphorique</b> [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] : 85 %, Normapur, Prolabo	<b>Nitrate de potassium</b> [KNO <sub>3</sub> ] : 99,995 %, Fluka
<b>Acide sulfurique</b> [H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] : 98 %, Rectapur, Prolabo	<b>Peroxyde d'hydrogène</b> [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] : 30 %, Normapur, Prolabo
<b>ADN de thymus de veau</b> : 10 mg.mL <sup>-1</sup> , Aldrich	<b>Phénol</b> [C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O] : 99 %, Rectapur, Prolabo
<b>Albumine de sérum bovin</b> : 98 %, Sigma	<b>Réactif de Folin-Ciocalteu</b> : 2 N, Fluka
<b>Azote</b> [N <sub>2</sub> ] : 5.0, Linde	<b>Résine échangeuse de cations</b> : Dowex, 20-50 mesh, Na <sup>+</sup> form, Sigma Aldrich
<b>Bromure de potassium</b> [KBr] : pureté pour analyse infrarouge, Normapur, Prolabo	<b>Sulfate de cuivre (II)</b> [CuSO <sub>4</sub> ] : 99 %, 5 H <sub>2</sub> O, Normapur, Prolabo
<b>Carbonate de sodium</b> [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] : 99,95 %, Fischer Scientific	<b>Tartrate double de sodium et potassium</b> [C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ] : 99 %, 4 H <sub>2</sub> O, Normapur, Prolabo
<b>Diphénylamine</b> [C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N] : 98 %, Fluka	<b>Tétraborate de sodium</b> [Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ] : 99 %, 10 H <sub>2</sub> O, Normapur, Prolabo
<b>EDTA</b> [C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ] : 99 %, 2 H <sub>2</sub> O, Normapur, Prolabo	<b>Vanilline</b> [C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ] : 99 %, Rectapur, Prolabo
<b>Ethanol</b> [C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O] : 96 %, Elvetec	
<b>Formaldéhyde</b> [CH <sub>2</sub> O] : 36,5 %, Rectapur, Prolabo	



## ***Chapitre B-2 : Méthodes***

---

## I. Les boues granulaires anaérobies

Les boues granulaires sont issues de 4 réacteurs biologiques anaérobies traitant des effluents industriels ou synthétiques (Tableau B<sub>3</sub>). Les boues ont été conservées à 4 °C en condition anaérobie jusqu'à leur utilisation. Les boues ont été stockées dans des flacons remplis d'eau du robinet afin d'éviter le contact des boues avec l'air et de ne pas modifier leur composition.

*Tableau B<sub>3</sub>. Origines des boues granulaires anaérobies utilisées au cours des expériences*

Boue	Réacteur anaérobie	Type d'effluent traité	Activité métabolique
Eerbeek	UASB	Effluent de papeterie	Activité méthanogène et conditions sulfato-réductrices
Emmtec	UASB	Effluent synthétique SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /éthanol	Activité méthanogène et conditions sulfato-réductrices
Nedalco	EGSB	Effluent de distillerie (alcool)	Activité méthanogène
Revico	Digesteur anaérobie	Vinasses de Cognac	Activité méthanogène

Pour l'extraction des PEC 150 mL de granules ont été échantillonnés puis rincés deux fois à l'eau déminéralisée.

## II. Extraction des PEC

Suite à une étude bibliographique des techniques d'extraction des PEC existantes, 9 protocoles couramment utilisés ont été sélectionnés : 5 méthodes physiques dont une méthode de « contrôle » et 4 méthodes chimiques. Chaque protocole a été réalisé en duplicats pour chaque boue. L'étape de centrifugation est commune à tous les protocoles et permet de séparer les PEC de la biomasse. L'extraction des PEC en utilisant uniquement la centrifugation sera donc la méthode dite de « contrôle » pour comparer les résultats des autres protocoles.

## II.1. Extractions physiques

5 protocoles d'extraction physique ont été testés :

❖ **Centrifugation** (Liu et Fang 2002b) : la boue est centrifugée à 20 000 ×g pendant 20 minutes à 4 °C.

❖ **Sonication** (Dignac *et al.* 1998) : la boue est fractionnée en 3 échantillons de 50 mL qui subissent une sonication à 37 W pendant 1 min. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

❖ **Résine échangeuse de cations + sonication** (Dignac *et al.* 1998) : la boue est soumise à un traitement aux ultrasons comme précédemment (1 min, 37 W). La résine échangeuse de cations est ensuite ajoutée à la boue dans une proportion de 70 g de résine par g de poids sec volatil de la boue. Le mélange est agité 1 h à 600 tr.min<sup>-1</sup> avec un agitateur orbital. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

❖ **Résine échangeuse de cations** (Liu et Fang 2002b) : la boue est mélangée à une résine échangeuse de cations dans les mêmes conditions que précédemment (70 g résine.g<sup>-1</sup> PSV boue). Le mélange est agité 1 h à 600 tr.min<sup>-1</sup>. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

❖ **Chauffage** (Zhang *et al.* 1999) : la boue est chauffée au bain marie pendant 10 minutes à 80 °C. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

## II.2. Extractions chimiques

4 protocoles d'extraction chimique ont été testés :

❖ **Formaldéhyde + chauffage** (Fang et Jia 1996) : 0,06 mL de formaldéhyde à 36,5 % sont ajoutés à la boue. Le mélange est stocké 1 h à 4 °C puis chauffé au bain marie 10 min à 80 °C. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).



❖ **Formaldéhyde + NaOH** (Liu et Fang 2002b) : le formaldéhyde est ajouté à la boue comme précédemment (0,06 mL, 36,5 %). Après 1 h à 4 °C, 60 ml de Soude à 1 N sont incorporés et le mélange est stocké 3 h à 4 °C. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

❖ **Ethanol** (Rätto *et al.* 2006) : L'échantillon est tout d'abord centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C). Trois volumes d'éthanol glacial sont ajoutés au surnageant récupéré et le mélange est stocké une nuit à 4 °C. Le précipité de PEC est ensuite collecté après une centrifugation de 15 min à 4 000 ×g.

❖ **Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)** (Liu et Fang 2002b) : 150 mL d'EDTA à 2 % sont ajoutés à la boue et le mélange est stocké 3 h à 4 °C. L'échantillon est ensuite centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

Excepté pour la méthode utilisant l'éthanol, le surnageant suite à la centrifugation est récupéré en tant qu'extrait de PEC et il est conservé à -18 °C.

L'utilisation de l'éthanol comme extractant est appliquée dans la littérature pour extraire spécifiquement les polysaccharides des biomasses. Nous avons utilisé cette méthode afin de vérifier si d'autres composés étaient extraits simultanément à partir des biomasses granulaires.

La quantité de boue Emmtec étant limitée, seulement 4 techniques d'extraction des PEC ont été testées : la centrifugation, la résine échangeuse de cations, le chauffage et l'association chauffage et formaldéhyde.

### **II.3. Détermination du poids sec (PS) et du poids sec volatil (PSV)**

Le poids sec (PS) et le poids sec volatil (PSV) des boues et des échantillons de PEC extraits ont été déterminés. Pour la détermination du PS, les échantillons ont été séchés à l'étuve à 105 °C pendant 24 h. Les échantillons secs ont alors subi une calcination au four à 550 °C pendant 2 h et le PSV correspond à la perte de masse des échantillons après ces 2 h. Le PSV

représente la fraction organique du poids sec de l'échantillon, la fraction minérale correspondant à la différence (PS – PSV).

## II.4. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des différentes méthodes a été calculé et correspond au rapport PS PEC/PS boue. Il permet de définir la qualité de l'extraction en fonction de la quantité de poids sec extraite.

## III. Caractérisation des PEC

Les PEC sont des molécules organiques. Dans un premier temps, nous avons caractérisé ces composés organiques (caractérisation biochimique, COT, analyse infrarouge) afin de comparer l'effet des différentes méthodes d'extraction sur la composition des PEC.

### III.1. Composition biochimique des extraits de PEC

La composition biochimique des PEC a été déterminée par des dosages colorimétriques pour mesurer les teneurs en protéines, substances humiques-like, polysaccharides, acides uroniques, lipides et acides nucléiques (Tableau B<sub>4</sub>). Chaque dosage a été réalisé en triplicats.

**Tableau B<sub>4</sub>. Caractéristiques des dosages colorimétriques utilisés pour la détermination de la composition biochimique des PEC**

	Longueur d'onde (nm)	Réactifs	Etalon	Références
Protéines	650	Réactif de Folin CuSO <sub>4</sub> 0,5 %	Albumine de sérum bovin	(Lowry <i>et al.</i> 1951) (Frølund <i>et al.</i> 1995)
Substances humiques-like	650	Réactif de Folin	Acides humiques	(Frølund <i>et al.</i> 1995)
Polysaccharides	492	Phénol 5 % Acide sulfurique 95 %	Glucose	(Dubois <i>et al.</i> 1956)
Acides uroniques	520	Tétraborate de sodium 12,5 mM Acide sulfurique 95 %	Acide glucuronique	(Blumenkrantz et Asboe Hansen 1973)
Acides nucléiques	600	Diphénylamine 0,6 % Acide sulfurique 95 %	ADN de thymus de veau	(Burton 1956)
Lipides	540	Vanilline 0,6 % Acide phosphorique 85 % Acide sulfurique 95 %	Huile d'olive commerciale	(Frings et Dunn 1970)

Les teneurs en protéines et substances humiques-like ont été corrigées suivant la méthode de Frølund *et al.* (1995). Cette correction est due à la surestimation de la teneur en protéines avec la méthode de Lowry *et al.* (1951) en présence de substances humiques-like. De même les teneurs en polysaccharides et acides uroniques ont été corrigées suivant le protocole mis en place par Blumenkrantz et Asboe Hansen (1973) à cause des interférences respectives de ces deux types de composés lors des dosages colorimétriques.

### **III.2. Analyse infrarouge**

L'analyse infrarouge permet de déterminer les groupements fonctionnels présents dans les échantillons de PEC. Les PEC ont tout d'abord été lyophilisés. Une petite quantité de PEC lyophilisés (environ 1 mg) a été mélangée puis broyée avec environ 180 mg de KBr. Le mélange homogène est ensuite placé sous presse pendant 10 min pour former une pastille qui sera ensuite analysée. L'analyse infrarouge se fait à l'aide d'un spectromètre infrarouge. La décomposition des spectres se fait par la caractérisation de bandes à certains nombres d'onde correspondant à l'absorbance de groupements fonctionnels que l'on peut attribuer aux différentes molécules des PEC.

### **III.3. Carbone organique total (COT)**

La teneur en carbone organique total a été mesurée en triplicats dans les échantillons de PEC grâce à un COT-mètre.

## **IV. Fraction minérale associée aux PEC**

La détermination des ratios des fractions organiques et minérales a mis en évidence une part non négligeable de composés inorganiques associés aux PEC dans les extraits. La seconde partie de ce travail de recherche a donc été la caractérisation de cette fraction minérale et la détermination des effets de la technique d'extraction sur sa composition.

### **IV.1. Teneurs en composés minéraux**

La teneur en composés inorganiques a été mesurée dans les boues et dans les extraits de polymères. Les échantillons ont été minéralisés puis analysés.

### ***IV.1.a. Minéralisation***

Avant la minéralisation, les échantillons de boues ont subi une étape de rinçage à l'eau déminéralisée. Les granules ont ensuite été centrifugées deux fois à 500 tr.min<sup>-1</sup> pendant 5 min et le culot, composé des granules humides, a été récupéré.

2 mL de peroxyde d'hydrogène, 1 mL d'acide nitrique et 3mL d'acide chlorhydrique ont ensuite été ajoutés aux granules et aux extraits de PEC afin de dissoudre la matière organique. Le mélange a dégazé pendant 24 h. La dernière étape de la minéralisation est le traitement aux microondes. Un programme de 45 min a été choisi :

- une rampe de 5 min pour atteindre la puissance de 1 400 W
- une puissance de 1 400 W pendant 20 min
- 20 min de refroidissement de l'échantillon

Les échantillons ont ensuite été complétés à 50 mL avec de l'eau déminéralisée et filtrés grâce à des filtres seringues à membrane en nitrate de cellulose de 0,22 µm de diamètre de pore.

### ***IV.1.b. Analyse***

Les minéralisats de boues et d'extraits de PEC ont ensuite été envoyés au laboratoire ACME Analytical Laboratories Ltd. (Vancouver, Canada) qui a réalisé la mesure des teneurs de 34 éléments minéraux dans les échantillons (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Si, Te, Ti, Tl, U, V, W et Zn) par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) et ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry).

## **IV.2. Microscopie électronique à balayage**

Afin de déterminer les composés inorganiques solides présents dans les extraits de PEC, une analyse par microscopie électronique à balayage a été réalisée.

Dans un premier temps, les extraits de polymères ont été déposés directement sur la lame de verre puis séchés à température ambiante. Dans un deuxième temps, les extraits ont été filtrés sur un filtre à membrane en nitrate de cellulose de 0,22 µm de diamètre de pore et rincés avec 500 mL d'eau déminéralisée afin d'éliminer les composés organiques solubles et les ions solubles qui pourraient former des précipités minéraux lors du séchage de l'extrait. Les filtres sont ensuite séchés à température ambiante et placés sur des lames de microscope.

Avant l'analyse microscopique, les lames ont été métallisées avec de l'or et du palladium. La fine couche de métal ainsi formée permet de rendre les échantillons conducteurs. L'analyse microscopique s'est faite grâce à un microscope électronique à balayage équipé d'une microsonde X dispersive en énergie (SEM-EDX) (SerMiEL, Université de Limoges). Ce détecteur permet de déterminer la composition élémentaire des composés observés au microscope.

## **V. Propriétés des PEC**

La dernière partie du travail de recherche a été la détermination des propriétés d'adsorption des PEC extraits à partir de biomasses granulaires anaérobies avec des éléments métalliques (Pb et Cd). Les constantes d'acidité des échantillons de PEC ont d'abord été déterminées par titrage acido-basique puis une campagne d'analyses polarographiques sur les capacités de sorption des PEC avec les éléments métalliques a été menée.

### **V.1. Constantes d'acidité des extraits de PEC**

Les propriétés acido-basiques des PEC ont été déterminées grâce à un titrage acido-basique. Des solutions de 50 mL contenant 0,25 g PS PEC.L<sup>-1</sup> ont été préparées et placées dans une cellule thermorégulée à 20 °C. Dans un premier temps, le dosage acide a été effectué par une solution d'acide nitrique à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (Normadose) grâce à un titrateur automatique. Le dosage s'est fait sous agitation permanente et sous atmosphère d'azote. Le pH initial est le pH de l'échantillon après une phase de stabilisation du pH d'une heure permettant le dégazage et la stabilisation des échanges gazeux dans la solution. La même opération a ensuite été effectuée pour le dosage par de la soude à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (Normadose). Les dosages ont été gérés par le logiciel Metrodata 716 DMS Titrino. Le dosage a été effectué en mode dynamique, c'est-à-dire que l'ajout de l'acide ou de la base varie en fonction des variations du pH (faibles ajouts quand forte variation du pH). Les paramètres utilisés sont une dérive du signal de 2 mV.min<sup>-1</sup> et un débit maximal de 5 mL.min<sup>-1</sup>.

Les courbes de titrages ont ensuite été modélisées en utilisant le logiciel ProtoFit (Version 2.1) afin de déterminer les constantes d'acidité (pK<sub>a</sub>) et le nombre de sites de fixation qui leur correspondent. Les paramètres sélectionnés sont une surface spécifique de 1 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, le modèle

d'adsorption non-électrostatique et le modèle de Davies concernant le coefficient d'activité. Durant la modélisation, nous avons testé la corrélation de chaque courbe de titrage et du modèle avec deux, trois et quatre  $pK_a$ , suite à la caractérisation des groupements fonctionnels des extraits par l'analyse infrarouge. Le nombre de  $pK_a$  engendrant la meilleure corrélation a ensuite été sélectionné pour chaque échantillon.

## V.2. Sorption du plomb et du cadmium par les PEC

La capacité de sorption du plomb et du cadmium par les PEC a été étudiée par titrage polarographique. Le principe de cette méthode réside dans la quantification du métal libre en solution en présence de PEC après l'ajout de volumes connus du métal (Guibaud *et al.* 2004). L'analyse polarographique est gérée via le logiciel GPES (General Purpose for Electrochemical System) Manager Autolab. La méthode expérimentale est décrite ci-dessous.

### ➤ Conditions opératoires

Dans la cellule de mesure thermorégulée à 20 °C :

- 1 mL d'électrolyte,  $KNO_3$  à 1 M
- 10 mL de tampon Hepes à 0,5 M et pH7
- 10 mL d'eau déminéralisée
- 1 mL d'extrait de PEC

Ajouts automatisés de 10  $\mu$ L à 1 mL, gérés par le logiciel, des solutions contenant les cations métalliques dans la cellule de mesure :

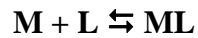
- solution de  $Pb(NO_3)_2$  à  $10^{-3}$  M
- solution de  $Cd(NO_3)_2$  à  $10^{-3}$  M

### ➤ Paramètres de mesure

- mode polarographique à goutte de mercure statique tombante (SMDE)
- gamme de potentiel scanné de -0,2 à -0,8 V avec Pb et Cd observés respectivement à environ -0,4 V et -0,6 V
- taille des gouttes de mercure intermédiaire
- temps de chute de goutte de 1 s

Suite à une étape d'optimisation du temps de contact, la solution est agitée et soumise à un bullage d'azote pendant 15 min avant chaque mesure, afin que la sorption des PEC et du métal soit totale. Après chaque ajout, la mesure est réalisée en duplicat.

Lors de la sorption des PEC avec le métal libre, l'équilibre théorique de complexation entre les PEC et le métal associé à la loi d'action de masse, qui suppose la formation de complexes 1:1 entre les PEC et le métal, peut être décrit par :



avec M : métal libre ; L : ligand libre (PEC) et ML : complexe métal-ligand

Ainsi, le nombre de sites de fixation entre les PEC et le métal a ensuite été calculé par la méthode de linéarisation de Chau. Cette méthode s'appuie sur la régression linéaire  $[M] = f([M_T])$  des derniers points de la courbe où le métal n'est plus fixé par les PEC, [M] étant la concentration en métal libre et  $[M_T]$  la concentration en métal total ajouté. Cette droite linéarisée a une équation de la forme  $[M] = a[M_T] + b$ . Par extrapolation, la concentration en ligand totale correspond à  $[L_T] = -b/a$

Les échantillons de PEC contiennent à l'origine du plomb et du cadmium. Néanmoins, ces teneurs en Pb et Cd sont très faibles donc la quantité de sites de fixation des PEC initialement occupés n'a pas été prise en compte.





## **PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

***Chapitre C-1 : Comparaison des techniques physiques  
et chimiques d'extraction des PEC***

---

## **Introduction**

La littérature compte un nombre important de travaux traitant des PEC. Ces études concernent principalement les PEC issus de biofilms et de boues activées, mais peu de données sont disponibles concernant les PEC issus de boues granulaires anaérobies. Il n'existe pas de protocole de référence d'extraction des PEC et de nombreuses techniques ont été répertoriées. Les techniques peuvent être chimiques (utilisant un extractant chimique), physiques (déstabilisant physiquement la structure de la biomasse) ou encore enzymatiques. La littérature met en avant le manque de technique de référence. En effet, les techniques d'extraction ont des efficacités variables et peuvent affecter la composition des PEC, il est donc difficile de comparer les différentes études. L'objectif de cette partie du travail de recherche a donc été de voir comment la composition des PEC issus de biomasses granulaires anaérobies est affectée par différentes méthodes d'extraction. Pour cela, nous avons sélectionné quatre boues granulaires anaérobies utilisées dans le traitement biologique d'effluents variés. Nous avons ensuite testé plusieurs techniques d'extraction couramment utilisées dans la littérature afin d'évaluer leur influence sur la composition des PEC extraits à partir de ces biomasses. Nous avons ainsi comparé quatre protocoles d'extraction physique (sonication, chauffage, résine échangeuse de cations avec et sans étape de sonication) et quatre protocoles d'extraction chimique (EDTA, éthanol, formaldéhyde associé au chauffage ou à de la soude) sur les quatre boues. Enfin, une extraction en utilisant uniquement la centrifugation sert de méthode de comparaison, car la même étape de centrifugation se retrouve dans chaque protocole. Afin de comparer ces méthodes, nous avons calculé les rendements d'extraction obtenus et caractérisé chaque extrait de PEC. Pour cela, nous avons déterminé la composition biochimique des extraits de PEC, calculé la teneur en carbone organique et évalué la lyse cellulaire par la teneur en acides nucléiques et le ratio protéines/polysaccharides. Enfin, une analyse infrarouge des extraits de PEC a permis de confirmer la présence des molécules composant les PEC et d'identifier les extractants chimiques au sein des extraits.



## **Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols**

d'Abzac, P.<sup>1</sup>, Bordas, F.<sup>1</sup>, van Hullebusch, E.<sup>2</sup>, Lens, P.N.L.<sup>3</sup> and Guibaud G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, Université de Limoges, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France

[paul.dabzac@etu.unilim.fr](mailto:paul.dabzac@etu.unilim.fr), [francois.bordas@unilim.fr](mailto:francois.bordas@unilim.fr), [gilles.guibaud@unilim.fr](mailto:gilles.guibaud@unilim.fr),

<sup>2</sup> Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Environnement, EA 4119, 5 bd Descartes, 77454 Marne la Vallée Cedex 2, France

[Eric.vanHullebusch@univ-mlv.fr](mailto:Eric.vanHullebusch@univ-mlv.fr)

<sup>3</sup> Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Biotechnion Bomenweg, 2, 6700 EV Wageningen, the Netherlands

[piet.lens@wur.nl](mailto:piet.lens@wur.nl)

\* corresponding author

**Applied Microbiology and Biotechnology**

**2010, Vol. 85 (5), pp. 1589-1599**

*DOI 10.1007/s00253-009-2288-x*

## Conclusions

L'étude de plusieurs protocoles d'extraction a mis en évidence leurs effets sur la composition des extraits de PEC, aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif. Ainsi, les méthodes chimiques sont les plus efficaces pour extraire de grandes quantités de PEC des boues granulaires. Toutefois, différentes analyses ont révélé la présence des réactifs chimiques utilisés lors de l'extraction dans les échantillons de PEC. Ces réactifs peuvent interagir avec les molécules des PEC et ainsi modifier leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. De plus, un composé comme l'EDTA affecte la caractérisation des PEC et donc biaise les résultats obtenus. Les échantillons de PEC extraits physiquement présentent, quant à eux, peu de différences sur le plan quantitatif. La sonication a un effet quasi nul sur l'efficacité de l'extraction. En effet, contrairement aux biofilms ou aux boues activées, les granules sont des biomasses compactes, ce qui limite l'efficacité de cette méthode. L'importance de la conformation des granules se retrouve également au niveau de la lyse cellulaire. En effet, cette étude a montré que les méthodes utilisées n'engendrent pas de lyse cellulaire anormale. La forte densité des granules est alors une protection pour les cellules dans des conditions défavorables comme les conditions d'extraction des PEC. Enfin, sur l'aspect qualitatif des extraits de PEC, certaines méthodes tendent à favoriser l'extraction de certains types de molécules par rapport aux autres, ce qui peut avoir un impact sur les propriétés des échantillons de PEC.

Les résultats de ce premier travail ont également montré que la composition des PEC extraits à partir des boues granulaires anaérobies est en accord avec les résultats obtenus par les études traitant des PEC issus d'autres types de biomasses. Les protéines, les polysaccharides et les substances humiques-like sont les molécules majoritaires composant les PEC. On trouve également en moindre quantité des acides uroniques, des acides nucléiques et des lipides. La part de chaque catégorie de molécules varie cependant suivant la boue étudiée, en raison de l'influence des caractéristiques de l'effluent traité sur la composition des molécules organiques des PEC.

La fraction organique des extraits de PEC est donc affectée à la fois par l'origine de la boue mais également par la méthode d'extraction utilisée.

***Chapitre C-2 : Caractérisation de la fraction minérale  
associée aux PEC***

---

## Introduction

Au sein des biomasses, les PEC forment une matrice dans laquelle des composés inorganiques sont piégés et peuvent jouer le rôle de cations pontants entre les molécules organiques. Les PEC sont définis comme des polymères organiques mais de récents travaux ont mis en évidence la présence de composés minéraux sous forme particulière dans des échantillons de PEC extraits à partir de boues activées (Guibaud *et al.* 2009). Aucune étude n'a encore caractérisé cette fraction minérale qui peut avoir une influence sur les propriétés déterminées sur les extraits de PEC.

La deuxième partie de ce travail de recherche s'est donc attachée à caractériser cette fraction minérale associée aux molécules organiques dans les échantillons de PEC. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la fraction minérale des quatre boues granulaires anaérobies étudiées afin de mieux appréhender le devenir de ces composés minéraux lors de l'extraction des PEC. La composition de la fraction minérale des extraits de PEC a ensuite été déterminée (ICP-MS et ICP-OES) et une étude microscopique (SEM-EDX) de ces extraits a permis de mettre en évidence et de caractériser les particules minérales solides dans les extraits. Enfin, nous avons tenté de déterminer l'influence que peut avoir la méthode d'extraction sur la composition de cette fraction minérale en comparant les résultats obtenus pour les différents protocoles d'extractions.





## **Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges**

Paul d'Abzac<sup>1</sup>, François Bordas<sup>1</sup>, Emmanuel Joussein<sup>1</sup>, Eric van Hullebusch<sup>2</sup>, Piet N. L. Lens<sup>3</sup> and Gilles Guibaud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, Université Limoges, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France, <sup>2</sup>Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Environnement, 5 bd Descartes, 77454 Marne la Vallée Cedex 2, France, <sup>3</sup>Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Biotechnion Bomenweg, 2, 6700 EV Wageningen, the Netherlands

\* Corresponding author: phone: (+33) 555-457-428; fax: (+33) 555-457-203

E-mail address: [gilles.guibaud@unilim.fr](mailto:gilles.guibaud@unilim.fr)

**Environmental Science & Technology**

**2010, Vol. 44 (1), pp. 412-418**

*DOI 10.1021/es901912g-0013-936X*

## Conclusions

Suivant la boue étudiée, la fraction minérale représente une part variable de la biomasse. De nombreux composés inorganiques sont présents dans cette fraction et la composition de cette fraction, différente en fonction de la boue étudiée, est influencée par les caractéristiques de l'effluent traité. Toutefois, les fortes teneurs en calcium et fer confirment leur rôle dans la granulation et le maintien de la structure des granules. Ces composés sont intégrés dans les granules et liés fortement à la matrice polymérique.

Cette deuxième partie du travail de recherche a permis l'identification d'une fraction minérale non négligeable au sein des extraits de PEC. La fraction minérale peut représenter jusqu'à 80 % du poids sec des échantillons, mais dans les différentes études de la littérature sur les PEC, elle est complètement ignorée. La part de la fraction minérale dans les extraits est variable suivant la boue, mais nos travaux n'ont pas mis en évidence de relation directe avec la teneur de la fraction minérale des boues granulaires. Différents cations inorganiques en concentrations variables suivant la boue sont présents dans les extraits de PEC. Les ratios des éléments minéraux sont différents de ceux des boues, ce qui laisse supposer des affinités variables des composés inorganiques avec les molécules des PEC. Toutefois, comme dans les boues, de fortes teneurs en calcium et fer ont été mesurées dans les extraits de PEC : cela confirme les fortes interactions entre les PEC et ces cations pontants dans la matrice polymérique. Ces travaux ont également montré que la fraction minérale se présente sous une forme ionique complexée aux PEC et une forme solide adsorbée aux molécules organiques composant les PEC. Parmi la fraction solide, des particules de calcites, d'hydroxyapatites ou encore de sulfures de fer ont été identifiées et ces particules sont souvent associées à des éléments métalliques.

Tout comme dans la première partie des travaux, l'étude de l'influence des méthodes d'extraction a montré que les techniques affectent quantitativement et qualitativement la fraction minérale des extraits de PEC. Excepté l'utilisation de résines échangeuses de cations, les méthodes physiques modifient l'aspect quantitatif de la fraction minérale mais pas les proportions des composés minéraux. Les extractions chimiques et la CER affectent en revanche le ratio des éléments minéraux. Certaines méthodes ont une influence directe (CER, éthanol, soude) sur la composition en contaminant les échantillons de PEC par des éléments inorganiques apportés par l'extractant ou en capturant certains composés inorganiques de la matrice polymérique. L'influence peut également être indirecte. Par exemple, l'extraction à

l'aide de soude modifie les conditions du milieu et l'augmentation du pH engendre la dissolution de certains complexes inorganiques et la formation de précipités lors de l'extraction.

La fraction minérale des extraits de PEC est donc affectée à la fois par les caractéristiques de l'effluent traité mais également par le protocole d'extraction utilisé.



***Chapitre C-3 : Effets de l'extraction sur les propriétés  
de sorption des PEC***

---

## **Introduction**

Les deux premières parties du travail de recherche ont montré les influences de l'origine de la boue granulaire et de la technique d'extraction sur la composition des fractions organiques et minérales des extraits de PEC. Les différents résultats tirés de la synthèse bibliographique ont mis en évidence une corrélation entre la composition des PEC et leurs propriétés physico-chimiques.

Cette dernière partie des travaux est focalisée sur les propriétés de sorption des PEC extraits à partir de boues granulaires anaérobies et s'articule selon trois axes. Dans un premier temps, nous avons tenté d'identifier et de quantifier les groupements fonctionnels que portent les PEC et qui peuvent entrer en jeu dans les mécanismes de sorption. Pour cela, nous avons réalisé une étude infrarouge des extraits de PEC et nous avons également déterminé les constantes d'acidité de ces extraits suite à des dosages acido-basiques et à la modélisation, à l'aide du logiciel ProtoFit, des courbes obtenues. Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur les capacités de sorption des éléments métalliques, et plus particulièrement du plomb et du cadmium, par les PEC. Cette partie a été réalisée par des titrages polarographiques par le plomb et le cadmium des différents extraits de PEC. Enfin, dans un troisième temps, nous avons étudié l'impact des techniques d'extraction sur les propriétés de sorption des PEC. Le but final de cette partie du travail de recherche est de mieux appréhender les interactions entre les éléments métalliques et les PEC issus de biomasses granulaires anaérobies et également d'attirer l'attention des chercheurs sur les conséquences de la technique d'extraction vis-à-vis des propriétés physico-chimiques que l'on peut attribuer aux PEC.





**Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges.**

Paul d'Abzac<sup>a</sup>, François Bordas<sup>a</sup>, Eric van Hullebusch<sup>b</sup>, Piet N.L. Lens<sup>c</sup> and Gilles Guibaud<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA 4330, Université de Limoges, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France

<sup>b</sup> Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Environnement, EA 4508, 5 bd Descartes, 77454 Marne la Vallée Cedex 2, France

<sup>c</sup> Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Biotechnion Bomenweg, 2, 6700 EV Wageningen, the Netherlands

\* corresponding author Tel.: +33 5 55 45 74 28; fax: +33 5 55 45 72 03.

E-mail address: gilles.guibaud@unilim.fr (G. Guibaud).

**Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**

Submitted: 13 April 2010

*COLSUB-D-10-00014R1*

## Conclusions

Ces travaux ont mis en évidence la présence de groupements fonctionnels ionisables dans les échantillons de PEC issus de boues granulaires anaérobies. L'étude infrarouge des extraits montre que les molécules organiques portent des groupements ionisables. La composition des PEC, et donc l'origine de la boue, influence la quantité et les types de groupements dans les extraits de PEC. Les groupements identifiés tels que les fonctions carboxyles, aminos ou encore hydroxyles sont à mettre en relation avec les constantes d'acidité déterminées dans les extraits de PEC. Nous avons déterminé quatre constantes d'acidité différentes au sein des extraits de PEC :  $pK_{a1}$  (~ 4-6) associé aux groupes carboxyles,  $pK_{a2}$  (~ 7) associé aux groupes phosphoriques,  $pK_{a3}$  (~ 8-10) et  $pK_{a4}$  (~ 10) associés aux groupes amines, phénols et hydroxyles. Le pH du milieu est un facteur important à prendre en compte dans l'étude des propriétés de sorption des PEC car, suivant le pH, les groupements seront protonés ou déprotonés et auront donc des réactivités différentes suivant leur état.

L'étude de la sorption du plomb et du cadmium a été réalisée à pH 7. Ce sont donc les groupements carboxyles et phosphoriques qui sont déprotonés et donc les sites les plus favorables pour la sorption. A pH 7, le plomb présente une plus grande affinité que le cadmium avec les PEC. En effet, la constante de sorption du plomb est supérieure à celle du cadmium. Ces travaux suggèrent également que les mécanismes de sorption avec les PEC de ces deux composés sont différents. Ainsi, à ce pH, le cadmium est beaucoup moins compétitif que le plomb vis-à-vis des protons pour se lier aux PEC. Les propriétés de sorption du plomb avec les PEC semblent en relation avec le nombre de sites total que présentent les PEC alors que pour le cadmium, la capacité de sorption semble être en relation avec la proportion de la fraction organique au sein des extraits.

La comparaison des résultats obtenus pour les échantillons de PEC extraits par les différentes techniques confirme le fait que la méthode d'extraction affecte les propriétés des PEC. Cette influence peut tout d'abord être liée à la composition des PEC. Ainsi, certaines extractions vont favoriser l'extraction de composés (protéines ou polysaccharides, PEC solubles ou PEC liés) plus ou moins réactifs dans les mécanismes de sorption et modifier les propriétés des PEC. Les modifications structurales des PEC liées à l'extraction, telles que la modification de la conformation due à l'hydrolyse des molécules ou l'encombrement stérique dû aux interactions entre les réactifs chimiques et les molécules, influencent également les capacités

de sorption des PEC. Enfin, la présence, dans les échantillons de PEC, des réactifs chimiques utilisés lors de l'extraction a également un impact sur les propriétés des extraits. En effet, les extractants utilisés peuvent avoir des propriétés complexantes avec les EM ou modifier les conditions du milieu. Il est donc difficile de dissocier la part liée aux réactifs et celle liée aux PEC dans les propriétés des extraits. Ces résultats excluent donc l'utilisation d'extractions chimiques dans l'étude des propriétés de sorption des PEC.

L'origine de la boue mais également la technique d'extraction utilisée sont donc des facteurs à prendre en compte dans l'étude des interactions entre les PEC et les EM, car ces paramètres affectent les propriétés des extraits de PEC. Cette partie des travaux a montré qu'il n'y a pas de technique d'extraction idéale pour l'étude des propriétés des PEC, il est donc nécessaire d'évaluer les conséquences possibles de l'extraction sur les propriétés des extraits.

**PARTIE D : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES**



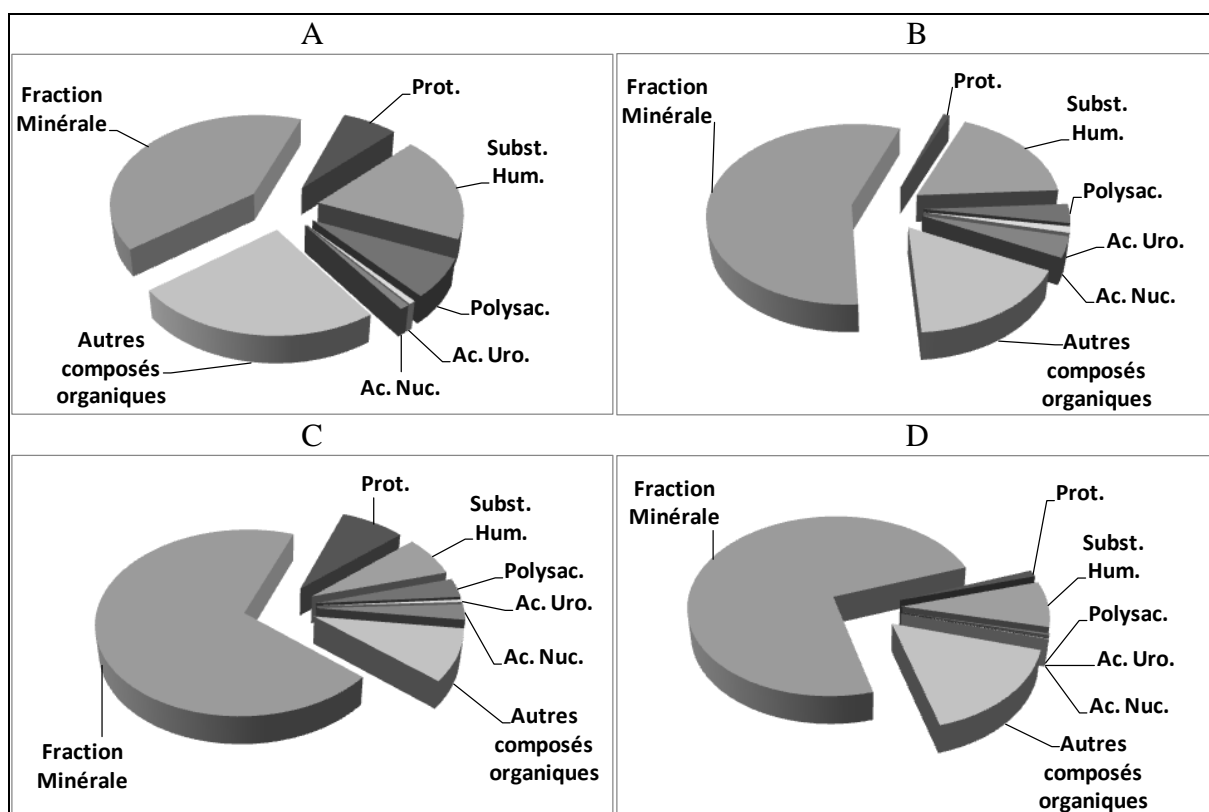
## Les Polymères Extracellulaires : Composition, ...

La littérature concernant les polymères extracellulaires est riche. La synthèse bibliographique a montré un intéressement croissant des recherches au cours des dernières années dû à l'importance de ces molécules organiques dans les biomasses. Toutefois, les études se sont concentrées sur les PEC issus de boues activées, de biofilms et de cultures bactériennes. Devant le peu de données concernant les PEC provenant de biomasses granulaires, nous avons voulu apporter notre contribution à ce domaine en développant les recherches sur les PEC issus de boues granulaires anaérobies. Afin d'étayer nos résultats et d'avoir une vision plus large des PEC au sein des biomasses granulaires, nous avons travaillé sur quatre boues granulaires anaérobies issues de différents bioréacteurs (UASB, EGSB, digesteur anaérobie) traitant des effluents variés (papeterie, distillerie, vinasses).

Les PEC sont composés, par définition, de différentes molécules organiques. Notre étude a montré que, comme dans les autres types de biomasses, les PEC issus de boues granulaires anaérobies contiennent principalement des protéines, des polysaccharides et des substances humiques-like et en moindre mesure, des acides uroniques et des acides nucléiques (Figure D<sub>1</sub>). Les teneurs en lipides n'ont pu être déterminées car elles étaient en dessous des limites de quantification de la méthode colorimétrique utilisée. En effet, la faible quantité de lipides est due à leur biodégradation par les microorganismes des granules dans les conditions anaérobies. Dans les cultures bactériennes, les polysaccharides sont les composés majoritaires (Zhang *et al.* 1998; Sims *et al.* 2000) et dans les boues activées ce sont les protéines (McSwain *et al.* 2005; Comte *et al.* 2006c). Nos résultats ont mis en évidence des différences sur ce point, les substances humiques-like représentant la part la plus importante parmi les molécules organiques identifiées des PEC. L'importance des teneurs en substances humiques-like peut être due à l'âge beaucoup plus élevé des biomasses dans ce type de réacteurs, comparé aux réacteurs utilisant les boues activées. Néanmoins, la comparaison des résultats obtenus pour les quatre boues granulaires étudiées montre des différences sur la quantité de PEC mais également sur la part que représente chaque type de molécules dans la composition des PEC. Ceci confirme l'influence des conditions du milieu et de la composition de l'effluent sur la composition des PEC (Sponza 2002).

La Figure D<sub>1</sub> montre également qu'une partie de la fraction organique des extraits de PEC n'a pas été caractérisée. Plusieurs explications peuvent alors être données. Tout d'abord cette

fraction non identifiée peut correspondre à des molécules organiques issues de l'effluent traité qui ont été piégées dans la matrice polymérique des granules et ont été extraites avec les PEC. Cette fraction peut également être composée de molécules des PEC qui n'ont pas été identifiées lors de la caractérisation. En effet, les méthodes colorimétriques utilisées pour quantifier les différentes molécules sont basées sur le dosage des fonctions de ces composés qui se complexent aux réactifs chimiques induisant une coloration de l'échantillon variable en fonction de la concentration du composé étudié. Toutefois, devant l'hétérogénéité des molécules des PEC et les interférences possibles des autres types de molécules, comme l'a souligné le travail de Ras *et al.* (2008), il se peut que cette technique engendre une sous-estimation des teneurs des différents composés.



**Figure D<sub>1</sub>. Composition des échantillons de PEC extraits par centrifugation à partir des 4 boues granulaires anaérobies (A-Eerbeek ; B-Emmtec ; C-Nedalco ; D-Revico) (répartition en % massique du PS)**

Nos travaux ont également mis en évidence une fraction minérale non négligeable dans les extraits de PEC (Figure D<sub>1</sub>) et ont permis sa caractérisation. Aucune étude n'a précédemment été menée sur cette fraction minérale associée aux PEC extraits. Pourtant, de nombreux composés inorganiques ont été détectés dans les échantillons de PEC. Les éléments majeurs

sont le sodium, le calcium et le potassium mais certains éléments métalliques et métalloïdes sont également présents dans les extraits de PEC, tels que le fer ou l'aluminium. Ces résultats confirment donc les fortes interactions entre les PEC et les éléments inorganiques au sein des granules. En effet, les cations divalents et trivalents comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$  ont un rôle de cations pontants entre les molécules des PEC dans la matrice polymérique, ce qui permet un renforcement de la structure de la granule. Ces composés sont issus de l'effluent donc la teneur des composés minéraux associés aux PEC dépend de la nature de l'effluent traité. L'analyse microscopique des PEC a révélé que la fraction minérale se trouve sous deux formes dans les échantillons de PEC : une forme ionique probablement associée aux molécules organiques par des interactions avec les groupements fonctionnels des PEC et une forme solide. Parmi les particules solides, nous avons identifié des particules de calcite, d'hydroxyapatite ou encore de quartz. Différentes études ont conclu que, dans les biomasses, le matériel bactérien affecte la formation et le polymorphisme des particules de carbonates de calcium (Braissant *et al.* 2007; Dupraz *et al.* 2009; Tourney et Ngwenya 2009). Ainsi, la présence de PEC dans l'environnement bactérien induirait l'initialisation de la précipitation de ces carbonates, ce qui pourrait être une des origines de ces particules dans les granules.

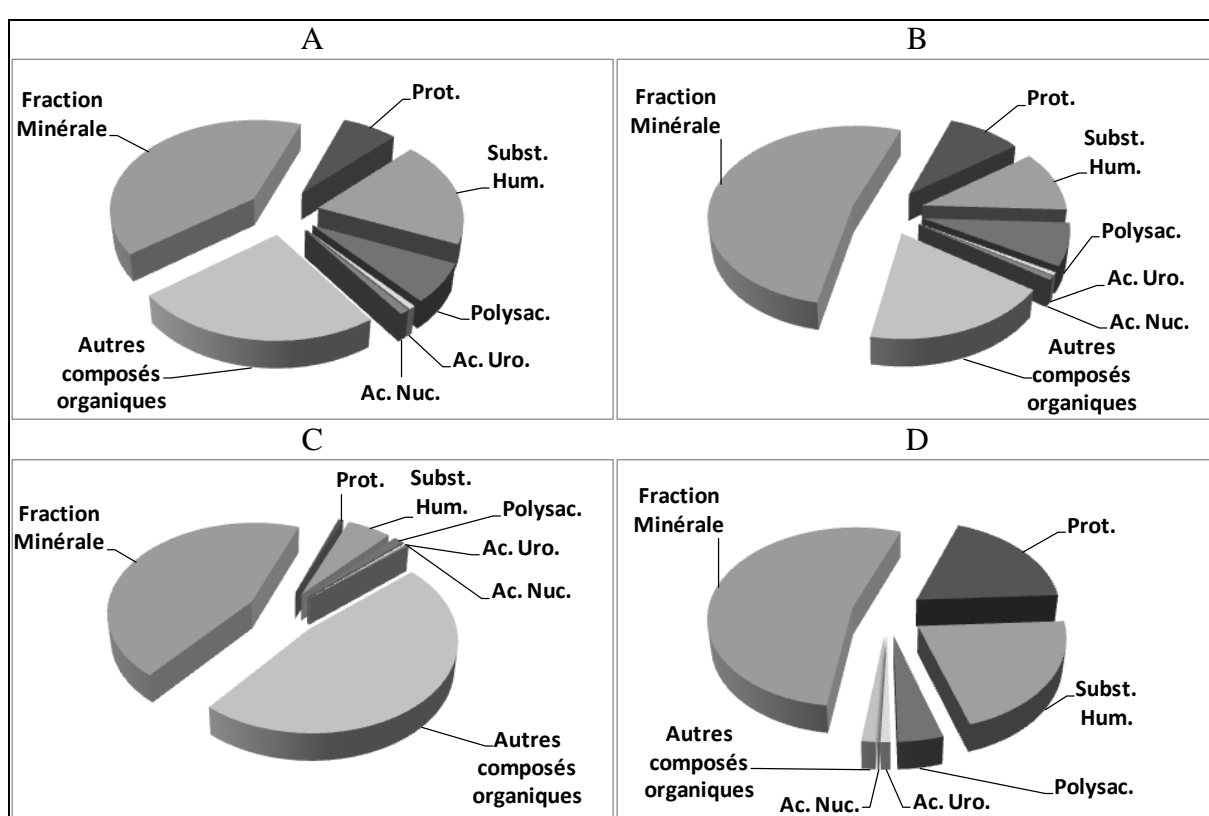
La définition fondamentale des PEC les considère comme des polymères organiques. Dans les biomasses, ces molécules organiques sont complexées ou adsorbées avec des éléments minéraux. L'étude des PEC nécessite leur extraction des biomasses. Toutefois, nous avons mis en évidence qu'une partie de la fraction minérale des granules est extraite parallèlement et se retrouve dans les échantillons de PEC. Cette fraction minérale a un rôle essentiel dans le maintien de la structure de la matrice polymérique des biomasses. L'étude des propriétés des PEC regroupe donc les propriétés physico-chimiques des fractions organiques et minérales. Cette fraction minérale n'a jamais été considérée dans les différents travaux de recherche et il est donc légitime de se poser la question de savoir si la fraction minérale contribue aux propriétés attribuées aux PEC, suite aux différents résultats obtenus. Cette fraction minérale étant étroitement liée aux molécules organiques, il serait nécessaire d'en tenir compte dans la définition et les propriétés des PEC. Toutefois, il est essentiel d'approfondir les connaissances sur la fraction minérale dans des échantillons de PEC issus d'autres types de biomasses afin de pouvoir tirer des conclusions plus générales.



## ... Extraction ...

L'extraction est une étape indispensable dans l'étude des propriétés des PEC et la littérature rassemble un grand nombre de protocoles, qu'ils soient physiques ou chimiques. Aucune technique d'extraction n'a encore été définie comme méthode de référence d'extraction des PEC. Le manque de protocole de référence d'extraction nécessite la définition de critères de comparaison de l'efficacité de l'extraction. Afin de comparer l'efficacité de l'extraction des PEC à partir des biomasses granulaires anaérobies, nous avons testé neuf de ces méthodes couramment utilisées dans la littérature, parmi lesquelles l'utilisation de la centrifugation seule, qui est considérée comme la méthode de « contrôle » notamment pour s'assurer de l'absence d'un taux de lyse cellulaire anormal durant l'extraction. Différentes études s'accordent à dire que la technique d'extraction affecte la composition de la fraction organique des PEC (Wingender *et al.* 1999; Liu et Fang 2002b; Comte *et al.* 2006c) et nos résultats le confirment (Figure D<sub>2</sub>). La fraction organique mais également la fraction minérale diffèrent quantitativement et qualitativement en fonction de la technique d'extraction considérée.

Nos travaux ont montré que les protocoles d'extraction chimique conduisent à l'extraction de plus grandes quantités de PEC. Toutefois, nous avons obtenu des valeurs anormalement élevées pour le rendement d'extraction (> 100 %) et pour la teneur en carbone organique (> 1 g C. g<sup>-1</sup> PS) dans certains de ces extraits de PEC. L'analyse infrarouge des extraits a permis de confirmer la contamination des échantillons par les réactifs chimiques utilisés lors de l'extraction. Ces réactifs chimiques se retrouvent en grandes quantités dans certains échantillons (Figure D<sub>2</sub>.C) et peuvent affecter la caractérisation et les propriétés attribuées aux extraits. La composition des PEC est moins affectée par les extractions physiques. En effet, la structure dense et compacte des granules et la présence d'une importante fraction minérale dans les granules limitent les effets de ces techniques. Ces travaux ont également montré que certaines méthodes favorisent l'extraction de certains composés des PEC, altérant ainsi la représentativité des extraits vis-à-vis des PEC dans la granule. La fraction minérale dans les extraits de PEC est également affectée par la technique d'extraction. Ainsi, certains protocoles (résine échangeuse de cations, soude, EDTA, éthanol) ont un impact direct sur la composition des PEC extraits en raison de l'apport de composés inorganiques (Na, Ca...) par le réactif chimique ou la résine. L'utilisation d'une REC engendre également le piégeage des ions Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et de cations métalliques par la résine, diminuant significativement les teneurs de ces composés dans les extraits.



**Figure D<sub>2</sub>. Composition des échantillons de PEC extraits par (A) centrifugation, par (B) REC, par (C) l'EDTA et par (D) l'association formaldéhyde et soude à partir de la boue Eerbeek (répartition en % massique du PS)**

Dans la plupart des études sur les PEC, l'efficacité des techniques d'extraction est basée sur le rendement d'extraction et la détection de la lyse cellulaire à un taux anormal engendrée par la méthode. Dans notre cas, suite aux différents protocoles testés, nous n'avons pas observé de taux de lyse cellulaire anormal. Pourtant, certaines techniques d'extraction que nous avons utilisées (*e.g.* chauffage...) sont connues pour provoquer un taux de lyse cellulaire anormal dans les boues activées et les biofilms. Cela peut s'expliquer par la structure dense des granules de la biomasse qui est un moyen de protection pour les cellules. Notre étude a également montré que la présence des réactifs chimiques biaise les rendements d'extraction. Les paramètres d'efficacité couramment utilisés sont donc limités au regard de nos résultats, ce qui engendre une comparaison difficile des résultats de la littérature. Devant les problèmes dus à l'extraction, deux attentes sont donc à combler dans l'étude des PEC :

➤ La définition claire des paramètres d'efficacité des méthodes d'extraction incluant, par exemple, le rendement d'extraction, le taux de lyse cellulaire, l'absence ou la présence de réactifs chimiques dans les extraits, la représentativité des extraits vis-à-vis des PEC de la biomasse originale et la fraction minérale.

➤ Le développement d'une méthode d'extraction de référence répondant aux paramètres d'efficacité définis au préalable, et applicable aux différents types de biomasse afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par d'autres techniques d'extraction.

### **... et Rôle dans la fixation des éléments métalliques (EM).**

La dernière partie de nos travaux est l'étude des capacités de sorption des EM par les PEC. La synthèse bibliographique a montré que cette sorption est liée aux interactions possibles entre les groupements fonctionnels des molécules organiques des PEC et les EM. L'analyse infrarouge a confirmé la présence dans les extraits de PEC de groupements carboxyles, carbonyles, amines, amides, hydroxyles et phosphoriques souvent évoqués dans la littérature comme impliqués dans ces interactions. Les dosages acido-basiques réalisés par la suite ont permis de déterminer quatre constantes d'acidité ( $pK_a$ ) distinctes qui sont associées à ces groupements dans les extraits de PEC :

➤ Le  $pK_{a1}$  (~ 4-6) est attribué aux groupements carboxyles des protéines, des polysaccharides, des acides uroniques et des substances humiques-like.

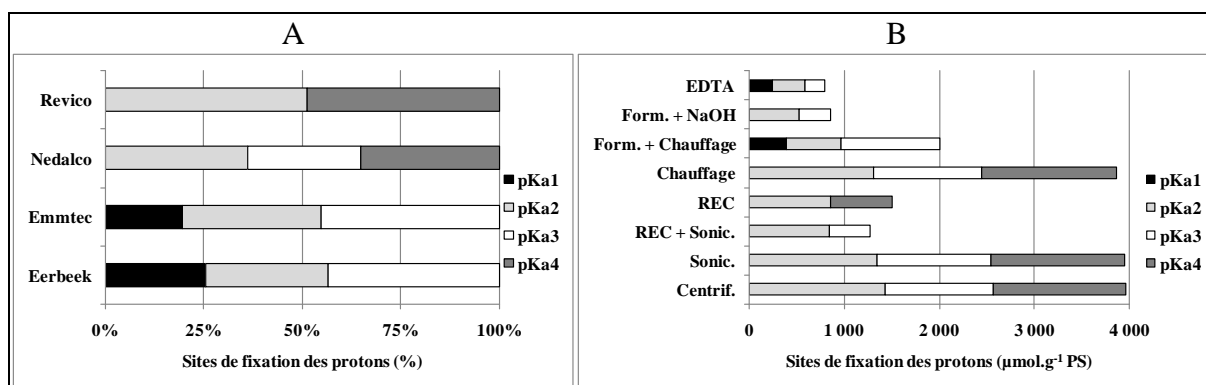
➤ Le  $pK_{a2}$  (~ 7) est attribué aux groupements phosphoriques des acides nucléiques.

➤ Le  $pK_{a3}$  (~ 8-10) est attribué aux groupements phénoliques des substances humiques-like.

➤ Les  $pK_{a3}$  et  $pK_{a4}$  (~ 10) étant très proches, ils peuvent être attribués aux groupements amines des protéines et des acides nucléiques ainsi qu'aux groupements hydroxyles des protéines, des polysaccharides, des acides uroniques, des acides nucléiques et des substances humiques-like.

Notre étude a mis en évidence que ces constantes d'acidité ainsi que le nombre de sites de fixation des protons qui leur sont associés varient dans les extraits en fonction de l'origine de la boue et de la technique d'extraction employée (Figure D<sub>3</sub>). En effet, ces deux paramètres affectent les teneurs des différentes molécules organiques des PEC modifiant ainsi les propriétés de l'extrait. Toutefois, il est difficile d'établir une corrélation simple entre les propriétés acido-basiques déterminées et la composition des PEC en raison de l'hétérogénéité des molécules. Un autre paramètre à prendre en compte est la contamination des extraits par les réactifs chimiques utilisés pour l'extraction, ce qui peut modifier les capacités de sorption des PEC. En effet, les complexes formés entre les PEC et ces réactifs peuvent limiter l'accès

d'autres composés aux sites de fixation à cause de l'encombrement stérique et de la compétition entre les espèces (*e.g.* formaldéhyde). De plus, certains protocoles d'extraction modifient les conditions du milieu comme le pH ou la force ionique qui sont des facteurs affectant les mécanismes de sorption. Enfin, certains réactifs chimiques utilisés lors de l'extraction et présents dans les extraits de PEC ont des propriétés complexantes (*e.g.* EDTA) qui peuvent affecter les propriétés de l'extrait. Il est alors difficile d'identifier la part liée au réactif et celle liée aux PEC dans l'étude des propriétés des échantillons de PEC.



**Figure D3. Ratios des sites de fixation des protons en fonction du  $pK_a$  qui leur correspondent dans les échantillons de PEC extraits par centrifugation (exprimé en %) (A) et nombre de sites de fixation des protons dans les échantillons de PEC extraits à partir de la boue Nedalco (exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  PS) (B)**

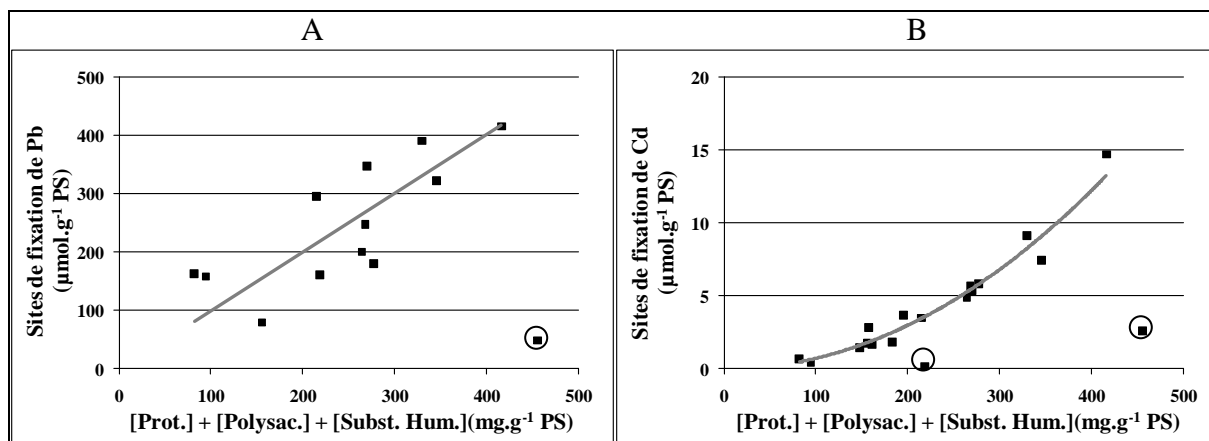
Dans les extraits, nous avons mis en évidence la présence d'éléments minéraux liés aux PEC. Cette fraction minérale a des effets sur les capacités de sorption des extraits. Tout d'abord, elle peut affecter négativement la sorption par des phénomènes de compétition avec les EM. Par exemple, la présence de sels dans les extraits induit une compétition entre les cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) et les EM pour atteindre les sites de fixation des PEC. La présence de sels provoque également la formation de complexes entre l'EM et les chlorures, ce qui restreint sa capacité à se lier aux PEC (Bhaskar et Bhosle 2006; Harmita *et al.* 2009). Les particules minérales solides, quant à elles, augmentent les capacités de sorption des extraits. En effet, lors de leur identification, nous avons observé différents EM (Mn, Fe, Cu, Ti, Al) liés ou composant ces particules solides. Deux mécanismes sont évoqués dans la littérature sur la sorption des EM avec les particules de calcite et d'apatite. Le premier est la complexation de surface et le deuxième est l'échange d'ions (le cation métallique remplace un atome de calcium dans la structure de la particule) (Al-Degs *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2008). De plus, diverses études ont montré, lors d'études de sorption-désorption du cadmium avec de la calcite, qu'une large

proportion du cadmium sorbé est retenu de manière irréversible par le minéral (Shirvani *et al.* 2006). Les particules de quartz présentes dans les extraits sont également capables de fixer les cations métalliques par adsorption de surface (Metreveli *et al.* 2009). Enfin, différents oxyhydroxydes de métaux ont été observés dans les extraits de PEC. Des études ont mis en évidence que la présence d'oxyhydroxydes de fer engendre une augmentation de la sorption du plomb sur des phases minérales (Zhuang et Yu 2002; Sipos *et al.* 2009). Une étude récente a également observé que de fortes teneurs en fer, aluminium et manganèse dans les extraits de PEC favorisent la capacité de sorption des PEC vis-à-vis du plomb et du cadmium (Guibaud *et al.* 2009). Dans les boues anaérobies, les sulfures de métaux représentent une part importante de la fraction minérale (Zandvoort *et al.* 2006a). Toutefois, lors de notre étude microscopique, nous n'avons pas observé de particules composées de sulfures et la caractérisation de la fraction minérale n'a pas mis en évidence de très fortes teneurs en soufre. Il est donc probable que ces sulfures, au sein des granules, sont moins fortement liés aux PEC que des particules de calcite par exemple. De plus, dans les granules, ces sulfures se trouvent sous forme de précipités ou de complexes dissous avec des EM (Zandvoort *et al.* 2006a). Certaines techniques d'extraction peuvent engendrer la précipitation de ces sulfures qui sont séparés des PEC lors de la centrifugation. De plus, l'extraction et le stockage des PEC se font en aérobiose, ce qui a pu conduire à l'oxydation des sulfures extraits.

Dans la littérature, de nombreuses études ont révélé des affinités variables des PEC avec les éléments métalliques (Comte *et al.* 2006c; Pal et Paul 2008; Joshi et Juwarkar 2009). Toutefois, les mécanismes de sorption sont encore mal identifiés. Nos travaux ont donc tenté de comparer les capacités de sorption des PEC vis-à-vis du plomb et du cadmium afin de mieux appréhender les interactions entrant en jeu. Les résultats obtenus ont confirmé qu'une plus grande quantité de plomb est capable de se fixer aux PEC, comparé au cadmium. Ceci est dû à la plus forte affinité du plomb par rapport au cadmium vis-à-vis des PEC.

Le nombre de sites de fixation pour les deux EM étudiés en fonction des teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like pour les échantillons de PEC extraits physiquement est présenté à la figure D<sub>4</sub>. Dans ces extraits, les réactifs chimiques sont absents et n'affectent donc pas la sorption des éléments métalliques. Toutefois, les résultats obtenus pour certains échantillons de PEC extraits par une étape de chauffage (points entourés sur la Figure D<sub>4</sub>) montrent que cette technique peut affecter les propriétés des extraits. En effet, l'hydrolyse des molécules à forte température lors de l'extraction peut modifier leur

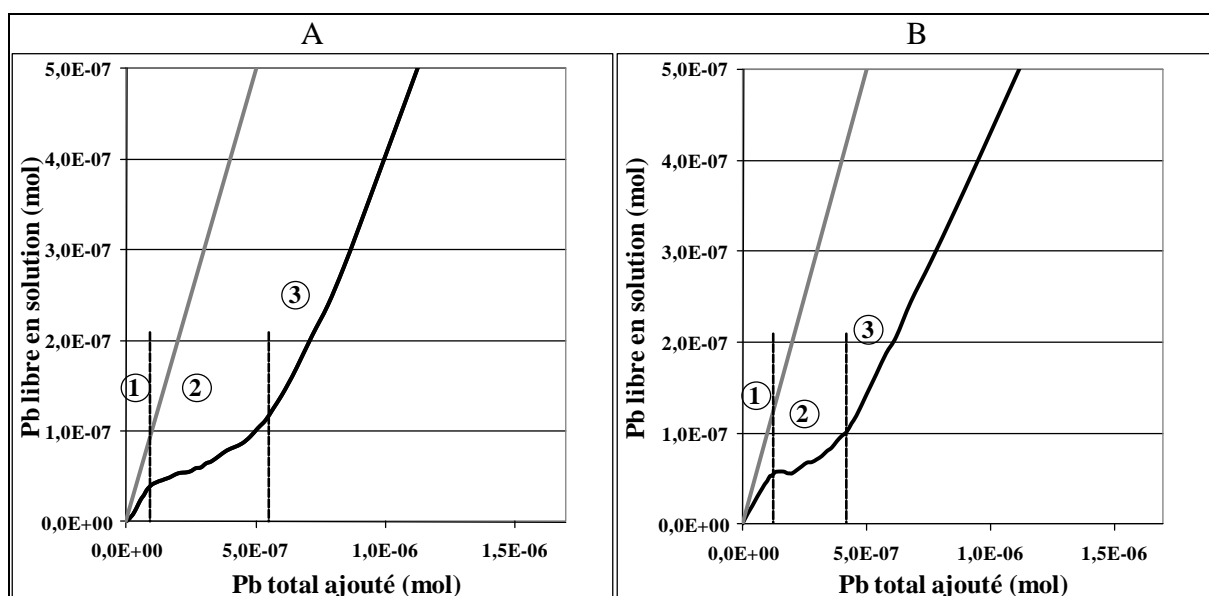
conformation (McSwain *et al.* 2005), ce qui peut engendrer une diminution de l'accessibilité des EM aux sites de fixation des PEC. Bien que les points relatifs à cette technique d'extraction soient présents sur la Figure D<sub>4</sub>, nous n'en avons pas tenu compte pour déterminer la courbe de tendance.



**Figure D<sub>4</sub>. Nombre de sites de fixation de Pb (A) et Cd (B) en fonction de la somme des teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like dans les échantillons de PEC extraits par les méthodes physiques des 4 boues granulaires (exprimé en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  PS) (courbe grise : courbe de tendance)**

Concernant les autres méthodes physiques, l'affinité des PEC vis-à-vis du plomb est proportionnelle à la composition des extraits de PEC. Pour le cadmium, jusqu'à une concentration des PEC de  $200 \text{ mg.g}^{-1}$  PS, le nombre de sites disponibles pour le métal augmente faiblement. Puis, au-dessus de  $200 \text{ mg.g}^{-1}$  PS, le nombre de site augmente plus fortement. Ce phénomène peut être dû à l'implication de différents mécanismes dans la sorption. Le cadmium est connu pour avoir une faible affinité avec les PEC, comparé à d'autres éléments minéraux (Pb, Ca, Zn, Fe...). Dans les échantillons présentant de faibles teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like, la compétition entre les différents éléments minéraux défavorise la fixation des ions  $\text{Cd}^{2+}$ . Quand la concentration des molécules organiques augmente, les PEC présentent alors plus de sites disponibles pour le cadmium. Il est possible que la forte concentration de PEC provoque, en présence d'EM, des phénomènes de microfloculation engendrant une augmentation de la fixation du cadmium (Sun *et al.* 2009). La tendance dans le cas du cadmium n'est pas observée pour le plomb, probablement en raison du nombre de sites de fixation dix fois plus important. En effet, nous avons pu observer la probabilité de l'implication de différents mécanismes au cours de la campagne d'analyses polarographiques concernant le plomb.

Sur la Figure D5, sont représentées les quantités de plomb libre en fonction de la quantité totale de plomb ajoutée dans la cellule de mesure. Dans un premier temps, une faible quantité de plomb se fixe aux PEC (①), puis, dans un deuxième temps, la sorption du plomb augmente fortement (②). Enfin, la sorption diminue lentement jusqu'à ce que tous les sites de fixation des PEC soient occupés (③). Deux paramètres entrent en jeu pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, la faible sorption initiale du plomb peut être due à la compétition entre les éléments minéraux présents dans l'extrait de PEC et le plomb quand il est présent en très faibles quantités, puis, quand la quantité de plomb augmente, l'équilibre est déplacé et favorise la fixation du plomb. Il est également à prendre en compte que différents sites de fixation sont impliqués dans la sorption du plomb par les PEC.



**Figure D5. Quantité de Pb libre en solution (mol) dans la cellule de mesure, déterminée par polarographie, en fonction de la quantité totale de Pb ajoutée dans la cellule (mol) avec (courbe noire) ou sans (courbe grise) PEC (extraits par (A) REC de la boue Eerbeek et (B) chauffage de la boue Revico) (volume initial dans la cellule de mesure : 23 mL ; concentration initiale en PEC : (A)  $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$  et (B)  $0,29 \text{ mg.mL}^{-1}$  ; pH 7,0 ; 20 °C)**

Nos travaux ont donc confirmé l'influence de l'extraction sur les propriétés de sorption des PEC. Ainsi, les méthodes d'extraction chimique ne sont pas à utiliser dans le but d'étudier les propriétés des PEC car il est difficile de déterminer la réelle contribution des PEC, en raison des interférences liées aux réactifs chimiques présents dans les extraits qui peuvent avoir des propriétés complexantes ou modifier les conditions du milieu (pH, force ionique...). Nos résultats ont mis en évidence que les molécules organiques sont impliquées dans la sorption

des EM mais également que la fraction minérale des extraits peut jouer un rôle dans la fixation des EM. Il est donc nécessaire maintenant de déterminer la contribution réelle de chaque fraction dans les mécanismes de sorption. Ces mécanismes sont divers (adsorption, complexation, précipitation...) mais pas encore réellement identifiés. Une étude approfondie sur l'importance de chaque mécanisme dans le processus de fixation des EM est à envisager bien qu'elle soit difficile en raison des nombreux paramètres à prendre en compte (pH, force ionique, température, fraction minérale, composition des PEC, EM impliqué, compétition entre les éléments minéraux...).

L'extraction est donc une étape clé dans l'étude des PEC. Elle a une influence aussi bien sur le plan de la composition des extraits que sur leurs propriétés. Ce travail de thèse a confirmé le problème engendré par le manque de technique de référence d'extraction, soulignant la difficulté de comparaison des résultats obtenus suite aux diverses extractions. Toutefois, il n'existe pas une technique d'extraction des PEC idéale permettant d'obtenir un échantillon représentatif qualitativement et quantitativement des PEC de la biomasse et de leurs propriétés physico-chimiques et n'induisant pas de contamination de l'extrait par des réactifs chimiques et des composés inorganiques. Toutefois, chaque méthode permet d'accéder à des informations différentes sur les PEC. L'utilisation d'un protocole d'extraction conduisant au fractionnement des PEC suivant le paramètre étudié et combinant plusieurs méthodes semble donc plus appropriée pour l'étude des PEC. Chaque technique utilisée ne doit alors pas affecter les analyses dans la suite de l'étude menée. Ce fractionnement peut se faire suivant la sélectivité des molécules extraites par les méthodes, la position dans la matrice polymérique (PEC solubles et PEC liés), le caractère hydrophobe ou hydrophile des PEC, les affinités des PEC avec certains composés minéraux des granules...





## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



**-A-**

- Adav S.S., Lee D.J. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* 154(1-3): 1120-1126.
- Adav S.S., Lee D.J., Lai J.Y. (2010). Aerobic granules with inhibitory strains and role of extracellular polymeric substances. *Journal of Hazardous Materials* 174(1-3): 424-428.
- Aguilera A., Souza-Egipsy V., San Martín-Úriz P., Amils R. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(6): 1079-1088.
- Ahimou F., Semmens M.J., Haugstad G., Novak P.J. (2007). Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9): 2905-2910.
- Aksu Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochemistry* 40(3-4): 997-1026.
- Al-Degs Y.S., El-Barghouthi M.I., Issa A.A., Khraisheh M.A., Walker G.M. (2006). Sorption of Zn(II), Pb(II), and Co(II) using natural sorbents: Equilibrium and kinetic studies. *Water Research* 40(14): 2645-2658.
- Allan V.J.M., Callow M.E., Macaskie L.E., Paterson-Beedle M. (2002). Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology* 148(1): 277-288.
- Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* 59(4): 1114-1128.

- Andersson S., Dalhammar G., Land C.J., Kuttuva Rajarao G. (2009). Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(3): 535-543.
- Aquino S.F., Stuckey D.C. (2003). Production of soluble microbial products (SMP) in anaerobic chemostats under nutrient deficiency. *Journal of Environmental Engineering* 129(11): 1007-1014.
- Aquino S.F., Stuckey D.C. (2004). Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* 38(2): 255-266.
- Arabi S., Nakhla G. (2008). Impact of protein/carbohydrate ratio in the feed wastewater on the membrane fouling in membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science* 324: 142-150.
- Azeredo J., Henriques M., Sillankorva S., Oliveira R. (2003). Extraction of exopolymers from biofilms: The protective effect of glutaraldehyde. *Water Science and Technology*. 47: 175-179.
- Azeredo J., Lazarova V., Oliveira R. (1999). Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: A comparative study. *Water Science and Technology* 39(7): 243-250.
- Azeredo J., Oliveira R. (2000). The role of exopolymers in the attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. *Biofouling* 16(1): 59-67.

## **-B-**

- Barker D.J., Stuckey D.C. (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research* 33(14): 3063-3082.
- Batstone D.J., Keller J. (2001). Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research* 35(7): 1723-1729.

- Beech I., Hanjagsit L., Kalaji M., Neal A.L., Zinkevich V. (1999). Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology* 145(6): 1491-1497.
- Bhaskar P.V., Bhosle N.B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* 88(1): 45-53.
- Bhaskar P.V., Bhosle N.B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International* 32(2): 191-198.
- Bhatti Z.I., Furukawa K., Fujita M. (1995). Comparative composition and characteristics of methanogenic granular sludges treating industrial wastes under different conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(3): 273-280.
- Binet R., Létoffé S., Ghigo J.M., Delepelaire P., Wandersman C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters - A review. *Gene* 192(1): 7-11.
- Blumenkrantz N., Asboe Hansen G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54(2): 484-489.
- Böckelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T.R., Wecke J., Lawrence J.R., Szewzyk U. (2006). Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters* 262(1): 31-38.
- Boyette S.M., Lovett J.M., Gaboda W.G., Soares J.A. (2001). Cell surface and exopolymer characterization of laboratory stabilized activated sludge from a beverage bottling plant. *Water Science and Technology* 43(6): 175-184.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.

Braissant O., Decho A.W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K.M., Visscher P.T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5(4): 401-411.

Brassard P., Kramer J.R., Collins P.V. (1990). Binding site analysis using linear programming. *Environmental Science and Technology* 24(2): 195-201.

Brown M.J., Lester J.N. (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology* 40(2): 179-185.

Brown M.J., Lester J.N. (1982). Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. I. Effects of metal concentration. *Water Research* 16(11): 1539-1548.

Brunk C.F., Jones K.C., James T.W. (1979). Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Analytical Biochemistry* 92(2): 497-500.

Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (1998). Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Science and Technology* 37(4-5): 325-333.

Burton K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal* 62: 315-323.

**-C-**

Cadoret A., Conrad A., Block J.C. (2002). Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1-2): 179-186.

- Chai X., Takayuki S., Cao X., Guo Q., Zhao Y. (2007). Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere* 69(9): 1446-1453.
- Chang Chien S.W., Wang M.C., Huang C.C., Sessaiah K. (2007). Characterization of humic substances derived from swine manure-based compost and correlation of their characteristics with reactivities with heavy metals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(12): 4820-4827.
- Chang W.S., Van De Mortel M., Nielsen L., De Guzman G.N., Li X., Halverson L.J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology* 189(22): 8290-8299.
- Characklis W.G., Wilderer P.A. (1989). The structure and function of biofilms. The structure and function of biofilms, Wiley; Dahlem Workshop Reports, Life Sciences Research Report, 46.
- Chen J.H., Lion L.W., Ghiorse W.C., Shuler M.L. (1995). Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research* 29(2): 421-430.
- Chen M.Y., Lee D.J., Tay J.H. (2007a). Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(6): 1463-1469.
- Chen M.Y., Lee D.J., Tay J.H., Show K.Y. (2007b). Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(2): 467-474.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006a). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41(4): 815-823.



- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006b). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> complexation. *Enzyme and Microbial Technology* 38(1-2): 246-252.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006c). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology* 38(1-2): 237-245.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2007). Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials* 140(1-2): 129-137.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *Journal of Hazardous Materials* 151(1): 185-193.
- Conrad A., Kontro M., Keinänen M.M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L., Block J.C. (2003). Fatty Acids of Lipid Fractions in Extracellular Polymeric Substances of Activated Sludge Floccs. *Lipids* 38(10): 1093-1105.
- Cox J.S., Smith D.S., Warren L.A., Ferris F.G. (1999). Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environmental Science and Technology* 33(24): 4514-4521.

## **-D-**

- D'Abzac P., Bordas F., Joussein E., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G. (2010a). Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environmental Science and Technology* 44(1): 412-418.

- D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G. (2010b). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: Comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1589-1599.
- Dautin N., Bernstein H.D. (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annual Review of Microbiology*. 61: 89-112.
- De Beer D., O'Flaherty V., Thaveesri J., Lens P., Verstraete W. (1996). Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46(2): 197-201.
- Denecke M. (2006). Protein extraction from activated sludge. *Water Science and Technology* 54(1): 175-181.
- Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P. (1998). Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* 38(8-9 -9 pt 7): 45-53.
- Dittrich M., Sibling S. (2005). Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 286(2): 487-495.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Dupraz C., Reid R.P., Braissant O., Decho A.W., Norman R.S., Visscher P.T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* 96(3): 141-162.

**-E-**

Eboigbodin K.E., Biggs C.A. (2008). Characterization of the extracellular polymeric substances produced by *Escherichia coli* using infrared spectroscopic, proteomic, and aggregation studies. *Biomacromolecules* 9(2): 686-695.

Esparza-Soto M., Westerhoff P.K. (2001). Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. *Water Science and Technology* 43(6): 87-95.

**-F-**

Fang H.H.P. (2000). Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects. *Water Science and Technology* 42(12): 201-208.

Fang H.H.P., Chan K.Y., Xu L.C. (2000). Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods* 40(1): 89-97.

Fang H.H.P., Jia X.S. (1996). Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludges. *Biotechnology Techniques* 10(11): 803-808.

Fang L., Cai P., Chen W., Liang W., Hong Z., Huang Q. (2009). Impact of cell wall structure on the behavior of bacterial cells in the binding of copper and cadmium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 347(1-3): 50-55.

Fein J.B. (2006). Thermodynamic Modeling of Metal Adsorption onto Bacterial Cell Walls: Current Challenges. *Advances in Agronomy* 90: 179-202.

Fermoso F.G., Collins G., Bartacek J., O'Flaherty V., Lens P. (2008). Acidification of methanol-fed anaerobic granular sludge bioreactors by cobalt deprivation: Induction and microbial community dynamics. *Biotechnology and Bioengineering* 99(1): 49-58.

- Fernández N., Díaz E.E., Amils R., Sanz J.L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology* 56(1): 121-132.
- Filisetti-Cozzi T.M.C.C., Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197(1): 157-162.
- Finlayson J.C., Liao B., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (1998). The relationship between the structure of activated sludge flocs and the sorption of hydrophobic pollutants. *Water Science and Technology* 37(4-5): 353-357.
- Flemming H.C., Wingender J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43(6): 1-8.
- Foster L.J.R., Moy Y.P., Rogers P.L. (2000). Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. *Biotechnology Letters* 22(22): 1757-1760.
- Fowle D.A., Fein J.B. (2000). Experimental measurements of the reversibility of metal-bacteria adsorption reactions. *Chemical Geology* 168(1-2): 27-36.
- Francioso O., Sánchez-Cortés S., Casarini D., Garcia-Ramos J.V., Ciavatta C., Gessa C. (2002). Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration. *Journal of Molecular Structure* 609(1-3): 137-147.
- Freire-Nordi C.S., Vieira A.A.H., Nascimento O.R. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: An EPR study. *Process Biochemistry* 40(6): 2215-2224.
- Frings C.S., Dunn R.T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53(1): 89-91.
- Frølund B., Griebe T., Nielsen P.H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(4): 755-761.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30(8): 1749-1758.

**-G-**

Gadd G.M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(1): 13-28.

Gadd G.M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156(3): 609-643.

Garnier C., Görner T., Guinot-Thomas P., Chappe P., de Donato P. (2006). Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry. *Water Research* 40(16): 3115-3122.

Garnier C., Görner T., Lartiges B.S., Abdelouhab S., De Donato P. (2005). Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research* 39(13): 3044-3054.

Gatsos X., Perry A.J., Anwari K., Dolezal P., Wolyneć P.P., Likić V.A., Purcell A.W., Buchanan S.K., Lithgow T. (2008). Protein secretion and outer membrane assembly in *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiology Reviews* 32(6): 995-1009.

Gaudy A.F., Jr. (1962). Colorimetric determination of protein and carbohydrate. *Industrial Water and Wastes* 7: 17-22.

Ge L., Deng H., Wang H., Ma L., Liu Y. (2007). Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in activated sludges. *Fresenius Environmental Bulletin* 16(3): 299-303.

Geesey G.G. (1982). Microbial exopolymers : ecological and economic considerations. *ASM News* 48: 9-14.

- Gehr R., Henry J.G. (1983). Removal of extracellular material. Techniques and pitfalls. *Water Research* 17(12): 1743-1748.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., Sand W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2743-2747.
- Gessesse A., Dueholm T., Petersen S.B., Nielsen P.H. (2003). Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research* 37(15): 3652-3657.
- Giannakopoulos E., Drosos M., Deligiannakis Y. (2009). A humic-acid-like polycondensate produced with no use of catalyst. *Journal of Colloid and Interface Science* 336(1): 59-66.
- Gloaguen V., Ruiz G., Morvan H., Mouradi-Givernaud A., Maes E., Krausz P., Strecker G. (2004). The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: An NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydrate Research* 339(1): 97-103.
- Goller C.C., Romeo T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 37-66.
- Görner T., De Donato P., Ameil M.H., Montarges-Pelletier E., Lartiges B.S. (2003). Activated sludge exopolymers: Separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research* 37(10): 2388-2393.
- Gouzenes E. (2006). La méthanisation pour traiter les effluents industriels. *Info Eau Adour Garonne* 94: 12-13.
- Guibaud G., Bordas F., Saaid A., D'Abzac P., Van Hullebusch E. (2008). Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 63(1): 48-54.

- Guibaud G., Comte S., Bordas F., Dupuy S., Baudu M. (2005). Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59(5): 629-638.
- Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. (2003). Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52(10): 1701-1710.
- Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. (2004). Use of a polarographic method to determine copper, nickel and zinc constants of complexation by extracellular polymers extracted from activated sludge. *Process Biochemistry* 39(7): 833-839.
- Guibaud G., van Hullebusch E., Bordas F. (2006). Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. *Chemosphere* 64(11): 1955-1962.
- Guibaud G., van Hullebusch E., Bordas F., d'Abzac P., Joussein E. (2009). Sorption of Cd(II) and Pb(II) by exopolymeric substances (EPS) extracted from activated sludges and pure bacterial strains: Modeling of the metal/ligand ratio effect and role of the mineral fraction. *Bioresource Technology* 100(12): 2959-2968.
- Gupta S.K., Gupta S.K. (2005). Morphological study of the granules in UASB and hybrid reactors. *Clean Technologies and Environmental Policy* 7(3): 203-212.

**-H-**

- Hall-Stoodley L., Stoodley P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology* 13(1): 7-10.
- Harmita H., Karthikeyan K.G., Pan X. (2009). Copper and cadmium sorption onto kraft and organosolv lignins. *Bioresource Technology* 100(24): 6183-6191.

- Hawari A.H., Mulligan C.N. (2006). Biosorption of lead(II), cadmium(II), copper(II) and nickel(II) by anaerobic granular biomass. *Bioresource Technology* 97(4): 692-700.
- Higgins M.J., Novak J.T. (1997). Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering* 123(5): 479-485.
- Hoa P.T., Nair L., Visvanathan C. (2003). The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water SA* 29(4): 437-442.
- Hsieh C., Liu C.J., Tseng M.H., Lo C.T., Yang Y.C. (2006). Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. *Enzyme and Microbial Technology* 39(3): 434-439.
- Hsieh K.M., Murgel G.A., Lion L.W., Shuler M.L. (1994). Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: 1. Observation and modeling of cell growth, attachment, and production of extracellular polymer. *Biotechnology and Bioengineering* 44(2): 219-231.
- Huffman S.W., Lukasiewicz K., Geldart S., Elliott S., Sperry J.F., Brown C.W. (2003). Analysis of microbial components using LC-IR. *Analytical Chemistry* 75(17): 4606-4611.
- Hulshoff Pol L.W., De Castro Lopes S.I., Lettinga G., Lens P.N.L. (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Research* 38(6): 1376-1389.
- Hung C.C., Santschi P.H., Gillow J.B. (2005). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. *Carbohydrate Polymers* 61(2): 141-147.
- Huq A., Whitehouse C.A., Grim C.J., Alam M., Colwell R.R. (2008). Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology* 19(3): 244-247.



**-I-**

Imachi H., Sekiguchi Y., Kamagata Y., Ohashi A., Harada H. (2000). Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3608-3615.

**-J-**

Jahn A., Nielsen P.H. (1995). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Science and Technology*. Noordwijkerhout, Neth, Pergamon Press Inc. 32: 157-164.

Janecka J., Jenkins M.B., Brackett N.S., Lion L.W., Ghiorse W.C. (2002). Characterization of a *Sinorhizobium* isolate and its extracellular polymer implicated in pollutant transport in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68(1): 423-426.

Janssen A.J.H., Lens P.N.L., Stams A.J.M., Plugge C.M., Sorokin D.Y., Muyzer G., Dijkman H., Van Zessen E., Luimes P., Buisman C.J.N. (2009). Application of bacteria involved in the biological sulfur cycle for paper mill effluent purification. *Science of the Total Environment* 407(4): 1333-1343.

Jefferson K.K., Cerca N. (2006). Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 341: 119-126.

Jha B., Basha S., Jaiswar S., Mishra B., Thakur M.C. (2009). Biosorption of Cd(II) and Pb(II) onto brown seaweed, *Lobophora variegata* (Lamouroux): Kinetic and equilibrium studies. *Biodegradation* 20(1): 1-13.

Jia X.S., Fang H.H.P., Furumai H. (1996). Surface charge and extracellular polymer of sludge in the anaerobic degradation process. *Water Science and Technology* 34(5-6 -6 pt 3): 309-316.

- Jin B., Wilén B.M., Lant P. (2004). Impacts of morphological, physical and chemical properties of sludge flocs on dewaterability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal* 98(1-2): 115-126.
- Jonas R., Farah L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59(1-3): 101-106.
- Jong T., Parry D.L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37(14): 3379-3389.
- Jorand F., Boué-Bigne F., Block J.C., Urbain V. (1998). Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Science and Technology* 37(4-5): 307-315.
- Joshi P.M., Juwarkar A.A. (2009). In Vivo Studies to Elucidate the Role of Extracellular Polymeric Substances from *Azotobacter* in Immobilization of Heavy Metals. *Environmental Science & Technology*.

**-K-**

- Kassam Z.A., Yerushalmi L., Guiot S.R. (2003). A market study on the anaerobic wastewater treatment systems. *Water, Air, and Soil Pollution* 143(1-4): 179-192.
- Kazy S.K., Sar P., Singh S.P., Sen A.K., D'Souza S.F. (2002). Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(6): 583-588.
- Keiding K., Wybrandt L., Nielsen P.H. (2001). Remember the water - A comment on EPS colligative properties. *Water Science and Technology*. 43: 17-23.

- Klausen M., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50(1): 61-68.
- Klock J.H., Wieland A., Seifert R., Michaelis W. (2007). Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: Characterisation and isolation method optimisation. *Marine Biology* 152(5): 1077-1085.
- 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 Science and Technology*. 43: 49-57.
- Kratochvil D., Volesky B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 16(7): 291-300.
- Kumar A.S., Mody K., Jha B. (2007). Bacterial exopolysaccharides--a perception. *Journal of basic microbiology* 47(2): 103-117.
- Kuo W.C., Parkin G.F. (1996). Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distribution and nickel-chelating properties. *Water Research* 30(4): 915-922.

**-L-**

- Lambo-Fodje A.M., Leeman M., Wahlund K.G., Nyman M., Öste R., Larsson H. (2007). Molar mass and rheological characterisation of an exopolysaccharide from *Pediococcus damnosus* 2.6. *Carbohydrate Polymers* 68(3): 577-586.
- Lamelas C., Benedetti M., Wilkinson K.J., Slaveykova V.I. (2006). Characterization of H<sup>+</sup> and Cd<sup>2+</sup> binding properties of the bacterial exopolysaccharides. *Chemosphere* 65(8): 1362-1370.

- Lartiges B.S., Deneux-Mustin S., Villemin G., Mustin C., Barres O., Chamerois M., Gerard B., Babut M. (2001). Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine River. *Water Research* 35(3): 808-816.
- Laspidou C.S., Rittmann B.E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36(11): 2711-2720.
- Lea M. (2008). Biological sand filters: Low-cost bioremediation technique for production of clean drinking water. *Current Protocols in Microbiology*(SUPPL. 9).
- Lenz M., Hullebusch E.D.V., Hommes G., Corvini P.F.X., Lens P.N.L. (2008). Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Research* 42(8-9): 2184-2194.
- Leppard G.G., Droppo I.G., West M.M., Liss S.N. (2003). Compartmentalization of Metals within the Diverse Colloidal Matrices Comprising Activated Sludge Microbial Flocs. *Journal of Environmental Quality* 32(6): 2100-2108.
- Li X.Y., Yang S.F. (2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research* 41(5): 1022-1030.
- Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J. (1998). Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of Bacteriology* 180(20): 5478-5483.
- Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research* 35(2): 339-350.
- Liao B.Q., Allen D.G., Leppard G.G., Droppo I.G., Liss S.N. (2002). Interparticle interactions affecting the stability of sludge flocs. *Journal of Colloid and Interface Science* 249(2): 372-380.

- Ling Lin F., Zi Rong X., Wei Fen L., Jiang Bing S., Ping L., Chun Xia H. (2007). Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances* 25(1): 1-12.
- Liss S.N., Droppo I.G., Flannigan D.T., Leppard G.G. (1996). Floc architecture in wastewater and natural riverine systems. *Environmental Science and Technology* 30(2): 680-686.
- Liu H., Fang H.H.P. (2002a). Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering* 80(7): 806-811.
- Liu H., Fang H.H.P. (2002b). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95(3): 249-256.
- Liu W.T., Chan O.C., Fang H.H.P. (2002). Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research* 36(7): 1767-1775.
- Liu Y., Fang H.H.P. (2003). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33(3): 237-273.
- Liu Y., Lam M.C., Fang H.H.P. (2001). Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology* 43(6): 59-66.
- Liu Y., Tay J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36(7): 1653-1665.
- Liu Y., Tay J.H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22(7): 533-563.
- Liu Y., Xu H.L., Yang S.F., Tay J.H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research* 37(3): 661-673.

Liu Y., Yang S.F., Tay J.H., Liu Q.S., Qin L., Li Y. (2004a). Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology* 34(5): 371-379.

Liu Y.Q., Liu Y., Tay J.H. (2004b). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(2): 143-148.

Loaëc M., Olier R., Guezennec J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* 31(5): 1171-1179.

Lopes S.I.C., Capela M.I., van Hullebusch E.D., van der Veen A., Lens P.N.L. (2008). Influence of low pH (6, 5 and 4) on nutrient dynamics and characteristics of acidifying sulfate reducing granular sludge. *Process Biochemistry* 43(11): 1227-1238.

Lorenz M.G., Wackernagel W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58(3): 563-602.

Lores E.M., Pennock J.R. (1998). The effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu and Zn to dissolved organic matter. *Chemosphere* 37(5): 861-874.

Lowry O., Rosebrough N., Fan A., Randall R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

## **-M-**

Mah T.F.C., O'Toole G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9(1): 34-39.

Martins P.S.D.O., De Almeida N.F., Leite S.G.F. (2008). Application of a bacterial extracellular polymeric substance in heavy metal adsorption in a co-contaminated aqueous system. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(4): 780-786.

Matias V.R.F., Cammarota M.C., Sant' Anna Jr G.L. (2003). Extraction of activated sludge bacteria exopolymers by ultrasonication. *Biotechnology Letters* 25(16): 1351-1356.

- McHugh S., Carton M., Mahony T., O'Flaherty V. (2003). Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters* 219(2): 297-304.
- McSwain B.S., Irvine R.L., Hausner M., Wilderer P.A. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 1051-1057.
- Messaud F.A., Sanderson R.D., Runyon J.R., Otte T., Pasch H., Williams S.K.R. (2009). An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 34(4): 351-368.
- Metreveli G., Abbt-Braun G., Frimmel F.H. (2009). Influence of NOM on the Mobility of Metal(loid)s in Water-Saturated Porous Media. *Aquatic Geochemistry*: 1-16.
- Metzger U., Lankes U., Fischpera K., Frimmel F.H. (2009). The concentration of polysaccharides and proteins in EPS of *Pseudomonas putida* and *Aureobasidium pullulans* as revealed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(1): 197-206.
- Mikes J., Siglova M., Cejkova A., Masak J., Jirku V. (2005). The influence of heavy metals on the production of extracellular polymer substances in the processes of heavy metal ions elimination. *Water Science and Technology* 52(10-11): 151-156.
- Mikkelsen L.H. (2003). Applications and limitations of the colloid titration method for measuring activated sludge surface charges. *Water Research* 37(10): 2458-2466.
- Miretzky P., Muñoz C., Carrillo-Chavez A. (2010). Cd (II) removal from aqueous solution by *Eleocharis acicularis* biomass, equilibrium and kinetic studies. *Bioresource Technology* 101(8): 2637-2642.
- Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 255-261.

Morgan J.W., Forster C.F., Evison L. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research* 24(6): 743-750.

Nadell C.D., Xavier J.B., Foster K.R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 33(1): 206-224.

**-N-**

Naja G., Mustin C., Berthelin J., Volesky B. (2005). Lead biosorption study with *Rhizopus arrhizus* using a metal-based titration technique. *Journal of Colloid and Interface Science* 292(2): 537-543.

Nakanishi K., Solomon P.H., Eds. (1977). *Infrared absorption spectroscopy*. San Francisco, Holden-Day, Inc.

Namkung E., Rittmann B.E. (1986). Soluble microbial products (SMP) formation kinetics by biofilms. *Water Research* 20(6): 795-806.

Ni B.J., Zeng R.J., Fang F., Xu J., Sheng G.P., Yu H.Q. (2009). A novel approach to evaluate the production kinetics of Extracellular Polymeric Substances (EPS) by activated sludge using weighted nonlinear least-squares analysis. *Environmental Science and Technology* 43(10): 3743-3750.

Nicolella C., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 80(1): 1-33.

Nielsen P.H., Jahn A., Palmgren R. (1997). Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* 36(1): 11-19.

Nikolaev Y.A., Plakunov V.K. (2007). Biofilm-"city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76(2): 125-138.



Nowack B., Sigg L. (1996). Adsorption of EDTA and metal-EDTA complexes onto goethite. *Journal of Colloid and Interface Science* 177(1): 106-121.

**-O-**

O'Flaherty V., Collins G., Mahony T. (2006). The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. Re-views in *Environmental Science and Biotechnology* 5(1): 39-55.

Obuekwe C.O., Al-Jadi Z.K., Al-Saleh E.S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63(3): 273-279.

Omoike A., Chorover J. (2004). Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules* 5(4): 1219-1230.

**-P-**

Pal A., Paul A.K. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: Central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48(1): 49-64.

Pan R., Cao L., Zhang R. (2009). Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *Journal of Hazardous Materials* 171(1-3): 761-766.

Park C., Novak J.T. (2007). Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods. *Water Research* 41(8): 1679-1688.

Park C., Novak J.T., Helm R.F., Ahn Y.O., Esen A. (2008). Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Research* 42(14): 3879-3889.

Park Y.S., Kim D.S., Park T.J., Song S.K. (2000). Effect of extracellular polymeric substances (EPS) on the attachment of activated sludge. *Bioprocess Engineering* 22(1): 1-3.

Parker D.L., Mihalick J.E., Plude J.L., Plude M.J., Clark T.P., Egan L., Flom J.J., Rai L.C., Kumar H.D. (2000). Sorption of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* f. *flos-aquae* strain C3-40. *Journal of Applied Phycology* 12(3-5): 219-224.

Prado Acosta M., Valdman E., Leite S.G.F., Battaglini F., Ruzal S.M. (2005). Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(6-7): 1157-1163.

., Brauchi S., Reyes J.G., Chamy R. (2003). Dynamics of extracellular polymeric substances in UASB and EGSB reactors treating medium and low concentrated wastewaters. *Water Science and Technology* 48(6): 41-49.

## **-Q-**

Quarmby J., Forster C.F. (1995). An examination of the structure of UASB granules. *Water Research* 29(11): 2449-2454.

## **-R-**

Ras M. (2008). Mise au point et validation d'une procédure d'extraction de Substances Polymériques Extracellulaires : Application à la caractérisation d'agrégats microbiens issus des procédés de traitement des eaux. *Génie des Procédés et de l'Environnement*. Toulouse (France), Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (France). Thèse de Doctorat: 158.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Spérandio M., Lefebvre D. (2008). Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Research* 42(8-9): 1867-1878.

- Raszka A., Chorvatova M., Wanner I. (2006). The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 34(5): 411-424.
- Rätto M., Verhoef R., Suihko M.L., Blanco A., Schols H.A., Voragen A.G.J., Wilting R., Siika-Aho M., Buchert J. (2006). Colanic acid is an exopolysaccharide common to many enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33(5): 359-367.
- Réveillé V., Mansuy L., Jardé E., Garnier-Sillam E. (2003). Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: Lipids and humic acids. *Organic Geochemistry* 34(4): 615-627.
- Roberson E.B., Firestone M.K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1284-1291.
- Roberts I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 50: 285-315.
- Roest K., Heilig H.G.H.J., Smidt H., De Vos W.M., Stams A.J.M., Akkermans A.D.L. (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic and Applied Microbiology* 28(2): 175-185.

**-S-**

- Sag Y., Kutsal T. (1995). Biosorption of heavy metals by *Zoogloea ramigera*: Use of adsorption isotherms and a comparison of biosorption characteristics. *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 60(1-3): 181-188.
- Sag Y., Kutsal T. (2001). Recent trends in the biosorption of heavy metals: A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6(6): 376-385.

- Salehizadeh H., Shojaosadati S.A. (2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Research* 37(17): 4231-4235.
- Sand W., Gehrke T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157(1): 49-56.
- Schmidt J.E., Ahring B.K. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42(2-3): 457-462.
- Schmidt J.E., Ahring B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 49(3): 229-246.
- Seghezzi L., Zeeman G., Van Lier J.B., Hamelers H.V.M., Lettinga G. (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65(3): 175-190.
- Sesay M.L., Özcengiz G., Dilek Sanin F. (2006). Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Research* 40(7): 1359-1366.
- Sheng G.P., Yu H.Q. (2006a). Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research* 40(6): 1233-1239.
- Sheng G.P., Yu H.Q. (2006b). Relationship between the extracellular polymeric substances and surface characteristics of *Rhodopseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(1): 126-131.
- Sheng G.P., Yu H.Q., Yu Z. (2005). Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(1): 125-130.

- Shirvani M., Kalbasi M., Shariatmadari H., Nourbakhsh F., Najafi B. (2006). Sorption-desorption of cadmium in aqueous palygorskite, sepiolite, and calcite suspensions: Isotherm hysteresis. *Chemosphere* 65(11): 2178-2184.
- Simon S., Pairo B., Villain M., D'Abzac P., Hullebusch E.V., Lens P., Guibaud G. (2009). Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technology* 100(24): 6258-6268.
- Simpson D.R. (2008). Biofilm processes in biologically active carbon water purification. *Water Research* 42(12): 2839-2848.
- Sims I.M., Middleton K., Lane A.G., Cairns A.J., Bacic A. (2000). Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of members of the Poaceae. *Planta* 210(2): 261-268.
- Sipos P., Németh T., Kis V.K., Mohai I. (2009). Association of individual soil mineral constituents and heavy metals as studied by sorption experiments and analytical electron microscopy analyses. *Journal of Hazardous Materials* 168(2-3): 1512-1520.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1): 76-85.
- Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M., Cescutti P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: Isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology* 51(2-3): 105-111.
- Sobeck D.C., Higgins M.J. (2002). Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research* 36(3): 527-538.
- Sponza D.T. (2002). Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems. *Process Biochemistry* 37(9): 983-998.

- Sponza D.T. (2003). Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 32(3-4): 375-385.
- Steinberger R.E., Holden P.A. (2005). Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 5404-5410.
- Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85(28).
- Sun X.-F., Wang S.-G., Zhang X.-M., Paul Chen J., Li X.-M., Gao B.-Y., Ma Y. (2009). Spectroscopic study of Zn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> binding to extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic granules. *Journal of Colloid and Interface Science* 335(1): 11-17.
- Sutherland B.W., Toews J., Kast J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *Journal of Mass Spectrometry* 43(6): 699-715.
- Sutherland I.W. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology* 147(1): 3-9.
- Sutherland I.W. (2001b). Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology* 43(6): 77-86.

**-T-**

- Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology* 33(3): 222-226.
- Tourney J., Ngwenya B.T. (2009). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO<sub>3</sub> morphology and polymorphism. *Chemical Geology* 262(3-4): 138-146.

Tourney J., Ngwenya B.T., Fred Mosselmanns J.W., Magennis M. (2009). Physical and chemical effects of extracellular polymers (EPS) on Zn adsorption to *Bacillus licheniformis* S-86. *Journal of Colloid and Interface Science* 337(2): 381-389.

Tsai B.N., Chang C.H., Lee D.J. (2008). Fractionation of soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Environmental Technology* 29(10): 1127-1138.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223(2): 287-292.

Turner B.F., Fein J.B. (2006). Prototit: A program for determining surface protonation constants from titration data. *Computers and Geosciences* 32(9): 1344-1356.

## -U-

Ueshima M., Ginn B.R., Haack E.A., Szymanowski J.E.S., Fein J.B. (2008). Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72(24): 5885-5895.

Urbain V., Block J.C., Manem J. (1993). Biofloculation in activated sludge: An analytic approach. *Water Research* 27(5): 829-838.

## -V-

Van De Mortel M., Halverson L.J. (2004). Cell envelope components contributing to biofilm growth and survival of *Pseudomonas putida* in low-water-content habitats. *Molecular Microbiology* 52(3): 735-750.

Van der Aa B.C., Dufrière Y.F. (2002). In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23(2-3): 173-182.

- Van Hullebusch E.D., Gieteling J., Van Daele W., Defrancq J., Lens P.N.L. (2007). Effect of sulfate and iron on physico-chemical characteristics of anaerobic granular sludge. *Biochemical Engineering Journal* 33(2): 168-177.
- Van Hullebusch E.D., Zandvoort M.H., Lens P.N.L. (2004). Nickel and cobalt sorption on anaerobic granular sludges: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79(11): 1219-1227.
- Van Langerak E.P.A., Ramaekers H., Wiechers J., Veeken A.H.M., Hamelers H.V.M., Lettinga G. (2000). Impact of location of CaCO<sub>3</sub> precipitation on the development of intact anaerobic sludge. *Water Research* 34(2): 437-446.
- Veiga M.C., Jain M.K., Wu W.M., Hollingsworth R.I., Zeikus J.G. (1997). Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 403-407.
- Velasco S., Årsköld E., Paese M., Grage H., Irastorza A., Rådström P., van Niel E.W.J. (2006). Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. *International Journal of Food Microbiology* 111(3): 252-258.
- Verhoef R., De Waard P., Schols H.A., Rätto M., Siika-aho M., Voragen A.G.J. (2002). Structural elucidation of the EPS of slime producing *Brevundimonas vesicularis* sp. isolated from a paper machine. *Carbohydrate Research* 337(20): 1821-1831.
- Vijayaraghavan K., Yun Y.S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26(3): 266-291.
- Vi ., Chamy R. (2006). Effect of addition of an exogenous exopolymeric substance in UASB and EGSB reactors. *Water Science and Technology* 54: 25-31.
- Vlyssides A., Barampouti E.M., Mai S. (2009). Influence of ferrous iron on the granularity of a UASB reactor. *Chemical Engineering Journal* 146(1): 49-56.
- Volesky B. (2007). Biosorption and me. *Water Research* 41(18): 4017-4029.



Volesky B., Holan Z.R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11: 235-250.

Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14(7): 2535-2554.

**-W-**

Wang J., Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* 27(2): 195-226.

Wang Z., Liu L., Yao J., Cai W. (2006). Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere* 63(10): 1728-1735.

Wang Z., Wu Z., Tang S. (2009). Extracellular polymeric substances (EPS) properties and their effects on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Water Research* 43(9): 2504-2512.

Wang Z.W., Liu Y., Tay J.H. (2005). Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(4): 469-473.

Welman A.D., Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 21(6): 269-274.

Wilén B.M., Jin B., Lant P. (2003a). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research* 37(9): 2127-2139.

Wilén B.M., Jin B., Lant P. (2003b). Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. *Water Science and Technology* 47(12): 95-103.

Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: characterisation, structure and function*. New York, Springer.

Wingender J., Strathmann M., Rode A., Leis A., Flemming H.C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology* 336: 302-314.

Wolfstein K., Stal L.J. (2002). Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: Effect of irradiance and temperature. *Marine Ecology Progress Series* 236: 13-22.

Wuertz S., Spaeth R., Hinderberger A., Griebe T., Flemming H.C., Wilderer P.A. (2001). A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology* 43(6): 25-31.

**-Y-**

Yao L., Ye Z.f., Tong M.p., Lai P., Ni J.r. (2009). Removal of  $\text{Cr}^{3+}$  from aqueous solution by biosorption with aerobic granules. *Journal of Hazardous Materials* 165(1-3): 250-255.

Yee N., Benning L.G., Phoenix V.R., Ferris F.G. (2004). Characterization of Metal-Cyanobacteria Sorption Reactions: A Combined Macroscopic and Infrared Spectroscopic Investigation. *Environmental Science and Technology* 38(3): 775-782.

Yu G.H., He P.J., Shao L.M. (2009). Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability. *Bioresource Technology* 100(13): 3193-3198.

Yu H.Q., Fang H.H., Tay J.H. (2000). Effects of  $\text{Fe}^{2+}$  on sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Science and Technology*. Noordwijkerhout, Neth, Int Water Assoc. 41: 199-205.

Yu H.Q., Tay J.H., Fang H.H.P. (2001). The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research* 35(4): 1052-1060.

Yuncu B., Sanin F.D., Yetis U. (2006). An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 137(2): 990-997.

**-Z-**

Zandvoort M.H., van Hullebusch E.D., Feroso F.G., Lens P.N.L. (2006a). Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. *Engineering in Life Sciences* 6(3): 293-301.

Zandvoort M.H., van Hullebusch E.D., Gieteling J., Lens P.N.L. (2006b). Granular sludge in full-scale anaerobic bioreactors: Trace element content and deficiencies. *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 337-346.

Zeng W., Qiu G., Zhou H., Liu X., Chen M., Chao W., Zhang C., Peng J. Characterization of extracellular polymeric substances extracted during the bioleaching of chalcopyrite concentrate. *Hydrometallurgy* 100(3-4): 177-180.

Zevenhuizen L.P.T.M., Faleschini P. (1991). Effect of the concentration of sodium chloride in the medium on the relative proportions of poly- and oligo-saccharides excreted by *Rhizobium meliloti* strain YE-2SL. *Carbohydrate Research* 209(C): 203-209.

Zhang D., Wang J., Pan X. (2006). Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials* 138(3): 589-593.

Zhang L., Feng X., Zhu N., Chen J. (2007). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology* 41(5): 551-557.

Zhang T., Fang H.H.P. (2001). Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 23(5): 405-409.

- Zhang X., Bishop P.L., Kinkle B.K. (1999). Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology* 39(7): 211-218.
- Zhang X., Bishop P.L., Kupferle M.J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* 37(4-5): 345-348.
- Zheng Y., Fang X., Ye Z., Li Y., Cai w. (2008). Biosorption of Cu(II) on extracellular polymers from *Bacillus* sp. F19. *Journal of Environmental Sciences* 20(11): 1288-1293.
- Zhou L.X., Liang J.R., Zhan X.H., Wong J.W.C. (2001). Fractionation and characterization of sludge bacterial extracellular polymers by FT-IR, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR. *Water Science and Technology* 44(10): 71-78.
- Zhou W., Wang J., Shen B., Hou W., Zhang Y. (2009). Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72(2): 295-302.
- Zhu R., Yu R., Yao J., Mao D., Xing C., Wang D. (2008). Removal of Cd<sup>2+</sup> from aqueous solutions by hydroxyapatite. *Catalysis Today* 139(1-2): 94-99.
- Zhuang J., Yu G.R. (2002). Effects of surface coatings on electrochemical properties and contaminant sorption of clay minerals. *Chemosphere* 49(6): 619-628.



## **LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**



## **PUBLICATIONS**

### **2010**

Peveré A., D'Abzac P., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G., Effect of substrate feeding on viscosity evolution of anaerobic granular sludges, *Water Science and Technology*, 62, 132-139, (*Impact factor 2008 : 1,005*).

D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G., Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from anaerobic granular sludges, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80, 161-168, (*Impact factor 2008 : 2,593*).

D'Abzac P., Bordas F., Joussein E., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G., (2010), Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges, *Environmental Science and Technology*, 44, 412-418, (*Impact factor 2008 : 4,458*).

D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G., (2010), Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1589–1599, (*Impact factor 2008 : 2,569*).

### **2009**

Guibaud G., Van Hullebusch E., Bordas F., D'Abzac P., Joussein E., (2009), Sorption of Cd(II) and Pb(II) by exopolymeric substances (EPS) extracted from activated sludges and pure bacterial strains: Modeling of the Metal/Ligand ratio effect and role of the mineral fraction, *Bioresource Technology*, 100, 2959–2968, (*Impact factor 2008 : 4,453*).

Simon S., Païro B., Villain M., D'Abzac P., Van Hullebusch E., Lens P., Guibaud G., (2009), Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges, *Bioresource Technology*, 100, 6258–6268 (*Impact factor 2008 : 4,453*).

### **2008**

Guibaud G.; Bordas F.; Saaid A.; D'Abzac P.; Van Hullebusch E., (2008), Effect of pH on Cadmium and Lead binding by Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, 48–54 - (*Impact factor 2008 : 2,593*).



## COMMUNICATIONS

### *Orales dans des congrès internationaux*

Guibaud G., Bourven I., D'Abzac P., Villain M., Bordas F., Simon S., Joussein E., van Hullebusch E., Lens P. N. L., New approaches to better characterize Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted by various methods from biofilms sampled from wastewater treatment processes. – ACE, “European Meeting on Environmental Chemistry 10”, Limoges (France), 02-05 December 2009.

D'Abzac P., Bordas F., Simon S., Joussein E., Villain M., van Hullebusch E., Lens P. N. L., Guibaud G., Characterization of biochemical and mineral fractions of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from anaerobic granular sludge by different extraction methods – IWA, « Biofilm processes: fundamentals to applications », Davis (USA), 13-16 September 2009.

D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Pevere A., Guibaud G., Effets des techniques d'extraction sur la composition des PEC issus de boues granulaires anaérobies. - 7e Congrès International du GRUTTE sur « Monitoring and Behaviour of Contaminants in the Environment Treatment, analysis, quality and sustainable management », Pau (France), 29-31 Octobre 2007.

### *Par affiche dans des congrès internationaux*

Pevere A., D'Abzac P., van Hullebusch E., Lens P. N. L., Guibaud G., Effect of substrate feeding on viscosity evolution of anaerobic granular sludges. – IWA, « Biofilm processes: fundamentals to applications », 13-16 September 2009, Davis (USA).

D'Abzac P., Bordas F., van Hullebusch E., Lens P.N.L., Pevere A., Guibaud G., Effect of Extraction Method on Composition and Metal Binding Ability of Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Anaerobic Granular Sludge. - 8th European Meeting on Environmental Chemistry, 5 - 8 Décembre 2007, Inverness (Scotland).



## **Résumé**

Les boues granulaires anaérobies, utilisées principalement pour le traitement des eaux usées industrielles, sont considérées comme des biofilms particuliers. Les polymères extracellulaires (PEC) représentent une fraction importante des biofilms. Ils ont divers rôles aussi bien structurels que de protection pour les microorganismes, mais peu de données sont disponibles dans la littérature sur les PEC extraits à partir des biomasses épuratoires granulaires anaérobies. Il existe de nombreuses méthodes d'extraction des PEC, à la fois physiques et chimiques, mais aucune méthode de référence n'a été développée. Le but de ce travail a été d'identifier l'influence de plusieurs méthodes d'extraction sur la composition et les propriétés de sorption des PEC issus de boues granulaires anaérobies. Les techniques chimiques permettent d'extraire de plus grandes quantités de PEC. Toutefois, certains réactifs chimiques utilisés se retrouvent dans les extraits et peuvent affecter la caractérisation des PEC et les propriétés de sorption des extraits. La composition des extraits de PEC diffère en fonction de l'origine de la boue et de la méthode d'extraction utilisée. Une fraction minérale sous forme dissoute, associée à la fraction organique, mais également sous forme de particules solides a été mise en évidence dans les extraits. La présence de ces minéraux peut également avoir une influence sur les propriétés de sorption des échantillons de PEC vis-à-vis des éléments métalliques. De nombreux paramètres sont donc à prendre en compte dans l'étude des propriétés des PEC.

## **Mots clés**

Polymères extracellulaires (PEC), boues granulaires anaérobies, techniques d'extraction, fraction organique, fraction minérale,  $pK_a$ , sorption des éléments métalliques

## **Abstract**

Anaerobic granular sludges, mainly used to treat industrial wastewaters, are considered as particular biofilms. Extracellular polymeric substances (EPS) represent a large part of the biofilms, where they have different functions such as structural or protective roles. Few data are available in the literature concerning the EPS extracted from anaerobic granular sludges. Various physical and chemical methods are used to extract EPS from biomasses, but no standard technique was developed. The aim of this work was to identify how several extraction techniques can affect the composition and the metal binding properties of the EPS from anaerobic granular sludges. Chemical methods lead to the extraction of larger amounts of EPS. However, some chemicals, used to extract EPS, were detected in the EPS samples. They may affect the characterization of the EPS and the binding properties of the extracts. The composition of the EPS differs depending on the origin of the sludge and the extraction method used. A mineral fraction, associated with the organic fraction in the extracts, was highlighted. This mineral fraction was found as soluble ions and as solid particles. These mineral elements can affect the metal binding properties of the EPS extracts. Thus, various parameters have to be taken into account in the studies of the EPS properties.

## **Keywords**

Extracellular polymeric substances (EPS), anaerobic granular sludges, extraction techniques, organic fraction, mineral fraction,  $pK_a$ , metal binding