

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 laboratoire, d'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces quelques années, du Master Recherche à la fin de ma thèse.

K 0 " K n " 2 v c k v " w p g " h k p í

Mes tous premiers sentiments de reconnaissance vont à Messieurs Gilles Guibaud (Monsieur le Professeur) et François Bordas pour m'avoir fait travailler de recherche au cours de ce doctorat. La ~~d~~ **ñ** ~~e~~ **n** ~~e~~ **m** ~~e~~ **n** ~~t~~ **d** ~~u~~ **n** ~~e~~ **t** ~~h~~ ~~è~~ **s** ~~e~~ **s** ~~e~~ **u** ~~l~~ **e** **m** **e** **n** **t** **u** **n** **a** **s** **p** **e** **c** **t** **r** **e** **c** **h** **e** **r** **c** **h** **e** **m** **a** **i** **s** **l** **a** **s** **p** **e** **c** **t** 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 remarques judicieuses. ~~Je tiens à remercier~~ **Q** ~~u~~ **i** ~~tr~~ **o** ~~u~~ **v** **i** **e** **n** **t** **l** **e** **s** **e** **i** **l** **i** **c** **i** **l** **e** **x** **p** **r** **e** **s** **s** **e** **s** **p** **e** **c** **t** **d** **e** **m** **o** **n** **s** **i** **n** **c** **è** **r** **e**

Je souhaite exprimer ma gratitude au Pr. Piet Lens et au Dr. Eric van Hullebusch pour leur aide critique et leur expérience, ~~son aide~~ **l** **o** **r** **s** **i** **d** **e** **s** **q** **u** **a** **u** **s** **é** **a** **n** **c** **e** **s** **d** **e** **M** **E** **B**.

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, qui 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 l'apport.

« Votre vie est dans les autres, et sans les autres votre vie n'est rien » disait Pierre Leroux, je
c o n f i r m e . . . 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, M a r t i n e sans oublier ceux q(u e pu joublier!!!)

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 !!!
M e r c i é g a l e m e n t à C a r i n e , R o m a i n , B e n j a m i n . . .
E n f i n , l ' A s s o c i a t i o n d e s m a n i f e s t a t i o n s e s t i n d i s s o c i a b l e s d e c e t t e
t h è s e . L a s e r j (n o s t e c e p a s P r i s c i l l a) e t l e f r o i d d e s t o u r n o i s d e f o o t a i n s i q u e l e s
r é u n i o n s d a n c i e n s o n t m i s u n p e u d e p i m e n t
p u n c h . . .) .

2. Priscilla folle du désert

U n e p e t i t e p e n s é e t o u t a e s u i v t a u t a u l o n g d e l c e s a n n é e s d e à P r i s
f a c . . . C O P ! ! I P H U S S I E U s e m e n t , u n g r a n d g r a n d g r a n d g r a n d m e r c i p o u r t o n s o u t i e n ,
t e s a v i s , t e s c o u p s d e g u e u l e , t e s n é i s l a t s c
h e u r e u s e m e n t q u o n p a s s e l s t ! ! ! a i (t e t o n n e s e s t m ê m e p a s
bureau)

3. Une famille formidable

M ê m e s i l a t h è s e r e p r é s e n t e 9 9 , 9 9 9 % d e c e
r e t r o u v e r m a f a m i l l e a u c o u r s d e s r e u n e m e n t e s d e
p o u r c o m p r e n d r e c e q u e c e s t , m e r c i d e t o u j
M a m a n , C a t h y , B e r t r a n d e t A d e l i n e , C l a i r e , M a t h i l d e , H é l è n e , M a m i e , T a t i e , G r a n d - M è r e ,
G r a n d - P è r e , M a r i e - H é l è n e e t A l e x , T a t a Y o u , A n n e - M a r i e , P i e r r e , T i l l y e t F a b i e n , F a n y e t
S y l v e s t r e , M a r i e e t J o s e p h , S i m o n , L é a , L u c i e

4. N g u " E q r c k p u " f ø c d q t f

C o m b i e n d e f o r t u n é « T u a s d e l a c h a n c e t u n e s e n c o r e é t u d i a n t » . E t b i e n v o u s
v o y e z b i e n q u e f i n a l e m e n t j ! ! ! ! M a i s s a n s a l e s p o t e s q u e l q u e
a u r a i t é t é b i e n p l u s c o m p l i q u é . M e r c i d e m
m o r a l , d e m a v o i r s u p p o r t é , d e m a v o i r e n c o u
C h r i s t o p h e , A r n u c h e , P J , B e n e c k , A n t h o c h e , J u l e s , M a n o l o , D a m s , J a n e , A
A n g é l i q u e , E v e e t l e s a u t r e s .

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 ! » . P a s d e p r o b l è m e d o n c i n d i g e s t i o n m e r c i à t o u t e s e t à t o u s .

Sommaire

Introduction	1
Partie A : Synthèse Bibliographique	8
Chapitre A-1 : Les polymères extracellulaires (PEC).....	9
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.....n.u.t.r.i.m.e.n.t.s.....e.t.....d...30	nergie
VI.2.b. Maintien de ..l.....h.y.d.r.a.t.a.t.i.o.n...3d	de la b
VI.2.c. Protection de la biomasse	32
VI.2.d. Transfert de gènes dans la biomasse	33
V. Conclusion.....	34
Chapitre A-2 : Extraction et caractérisation des PEC.....	35
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.....t.e.c.h.n.i.q.u.e.s.....d.....e.x.t	43
IV.1. Effets sur la composition des extraits de PEC	44
IV.2. E f f i c a c . i . t . é d . e l e . x . t . r . a . c . t . i . o . n	45
IV.2.a. Le r e n . d . e . m . e . n . t d e . x . t . r . a . c . t . i . o . n	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
Chapitre A-3 : Sorption des éléments métalliques	57
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.1.2. 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.1. Lisotherme de sorption.....	68
IV. Conclusion.....	69
Chapitre A-4 : Conclusion de la synthèse bibliographique	71
Partie B : Matériels et Méthodes	74
Chapitre B-1 : Matériels et produits	75
I. Appareillages	76
II. Produits chimiques.....	77
Chapitre B-2 : Méthodes.....	79
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.3.4. 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	86
V.2. Sorption du plomb et du cadmium par les PEC	87

Partie C : Résultats Expérimentaux 90

**Chapitre C-1 < " E q o r c t c k u q p " f g u " v g e j p k s w g u " r j { u k s w g u
PEC..... 91**

Introduction 92

Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges:
comparison of chemical and physical extraction protocols..... 94

Conclusions 120

Chapitre C-2 : Caractérisation de la fraction minérale associée aux PEC..... 121

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

Chapitre C-3 < " G h h g v u " f g " n ø g z v description des PEC w.t.....n. 151 " r t q r t

Introduction 152

Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric
substances (EPS) from anaerobic granular sludges..... 154

Conclusions 176

Partie D : Discussion, Conclusions et Perspectives 178

Les Polymères Extracellulaires : C o m p o s . i . t . i . o . n . , 180

... E x t r a . c . t . i . o . n 183

... e t R ô l e d a n s l a f i x a t i . o . n d . e . s é . l . é . m 185 t s m é t

Références Bibliographiques 192

Liste des publications et communications 228

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1. Différentes étapes de la formation

PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure A₁. Composition et disposition des PEC solubles et liés (adapté de Wingender *et al.* ; 1999)..... 13

Figure A₂. Mécanismes à l'origine des PEC solubles (2002)..... 15

Figure A₃. Exemples de structure des acides aminés 23

Figure A₄. Représentation schématique de la biogranulation favorisée par la présence de PEC (Higgins et Novak 1997; Liu *et al.* 2004b) 29

Figure A₅. Principaux mécanismes impliqués dans la sorption des éléments métalliques 58

Figure A₆. 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⁻¹ ; métal : 2,2 .10⁻² mol.L⁻¹) (Guibaud *et al.* 2006) 64

PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre C-1 < " E q o r c t c k u q p " f g u " v g e j p k s w g u " r j { u k s w g u
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 < " G h h g v u " f g " n ø g z v t c e v k q p " u w t " n g u " r t q r t

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: site s a s s o c i a t e d w i t h p K a s > 7 , w h i c h a r e n o t c o n s i d e r e d i n t h e c a l c u l a t i o n) 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 D₁. 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 D₂. Composition des échantillons de PEC extraits par (A) centrifugation, par (B) REC, par (C) l'EDTA et par (D) l'association formol + EDTA (répartition en % massique du PS) 184

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)..... 186

Figure D₄. 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 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)..... 189

Liste des Tableaux

PARTIE A : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau A ₁ . Exemples de composition élémentaire de différents échantillons de PEC	16
Tableau A ₂ . Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, lipides PEC issus de différentes biomasses c l é i q u	17
Tableau A ₃ . E x e m p l e s d e t e n e u r s e n p r o t é i n e s , p o l de PEC issus de boues activées traitant différents effluents (Sponza 2002).....	17
Tableau A ₄ . 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 ₅ . Exemples de pK _a déterminés dans des échantillons de PEC extraits de différentes biomasses avec leur nombre de sites et les groupements fonctionnels correspondant	24
Tableau A ₆ . E x e m p l e s d e p r o t o c o l e s d e . x . t . r . a . c . t . i . o n p	39
Tableau A ₇ . E x e m p l e s d e p r o t o c o l e s d e . x . t . r . a . c . t . i . o n p	41
Tableau A ₈ . Exemples de quantités totales de PEC extraits à partir de 3 boues activées par différentes méthodes d e . x . t . r . a . c . t . i . o n (G.e44)	44
Tableau A ₉ . Exemples de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à partir d'une boue activée et d'une biomasse granulada d e x t r a c t i o n (..L.i.u.....e.t.....F.a.n.g.....2.0.0.2.b.).....	45
Tableau A ₁₀ . E x e m p l e s d i n f l u e n c e d e l a t e c h n i q u e des PEC	46
Tableau A ₁₁ . E x e m p l e s d e m é t h o d e d e x t r a c t i o n la quantité d'acides nucléiques et le rapport de PEC extraits à partir de culture de <i>Rhodopseudomonas acidophila</i> (Sheng <i>et al.</i> 2005)	48
Tableau A ₁₂ . Exemples de techniques de dosage des composants des PEC	49
Tableau A ₁₃ . P r i n c i p e s d e s d i f f é r e n t e s t e c h n i q u e s surface des PEC (Boyette <i>et al.</i> 2001; Mikkelsen 2003).....	53
Tableau A ₁₄ . E x e m p l e s d a f f i n i t é s d e d i . f . f . é . r . e . n t e s	59
Tableau A ₁₅ . Exemples de capacités maximales de sorption des PEC issus de diverses biomasses vis-à-vis d'EM lors de tests d s . o . r . p . t i o n m o	60
Tableau A ₁₆ . Principaux groupements fonctionnels des PEC jouant un rôle dans les mécanismes de sorption (Volesky 2007)	62

PARTIE B : MATERIELS ET METHODES

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

PARTIE C : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chapitre C-1 < " E q o r c t c k u q p " f g u " v g e j p k s w g u " r j { u k s w g u 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 ⁻¹ sludge)	105
Table 4. Organic carbon content (mg C.g ⁻¹ DW or mg C.g ⁻¹ VDW) of the EPS extracted from 4 different anaerobic granular sludges	106
Table 5. Nucleic Acids content (mg.g ⁻¹ 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 < " G h h g v u " f g " n ø g z v t c e v k q p " u w t " n g u " r t q r t

Table 1. pK _a 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 : Concanavoline 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'émission citation

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

SEM EDX : Microscope électronique à balayage équipé d'une microsonde X di

SMDE : Mode polarographique à goutte de mercure statique tombante

UAP : Produits associés à l'uti

UASB : Upflow anaerobic sludge blanket

INTRODUCTION

Dans l'environnement, les biofilms se trouvent leur présence à l'intérieur d'hôtes animaux 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 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).

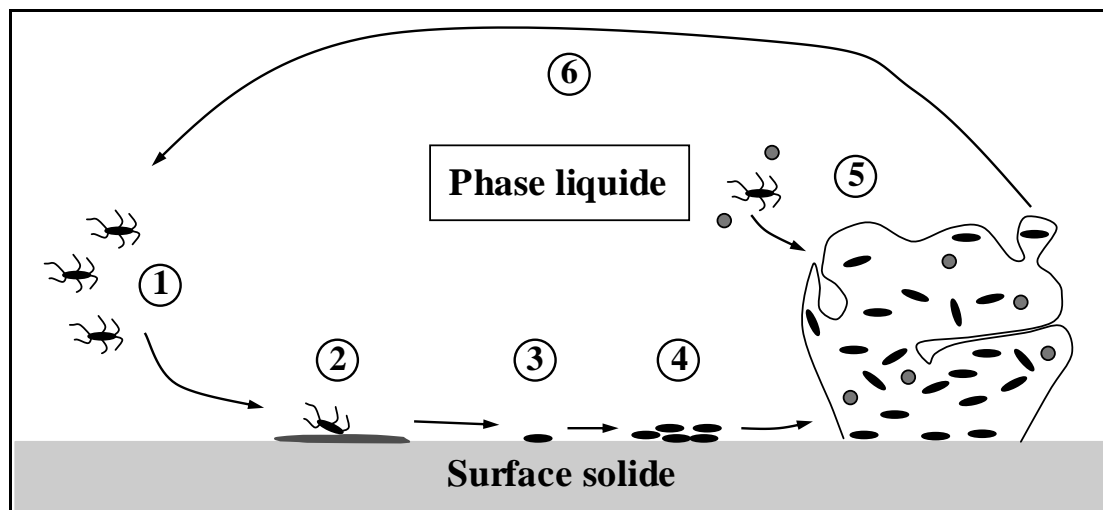


Figure 1. Différentes étapes de la formation des biofilms « " n ø k p v g t h c e g " u q n k j

Dans notre étude, ce solide/liquide qui nous intéresse. La formation de ces biofilms se fait en plusieurs étapes comme le montre la Figure 1 :

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

u Les microorganismes s'adsorbent de manière 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).

v 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).

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

x Les microorganismes produisent des PEC qui forment une matrice dans laquelle sont imbriquées les cellules. D'autres organismes 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 ».

y Des cellules se détachent du consortium. 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 sont en forme de 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 un stress dû à une modification du milieu (*e.g.* pH, force ionique, température, accès aux nutriments) (Stoodley *et al.* 2005; Huq *et al.* 2008). Toutefois, l'organisation des microorganismes au sein du biofilm, à l'interface à laquelle ils sont en contact avec le milieu (débit, accès aux nutriments...) et également en fonction de la nature du substrat, 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), ils sont également utilisés, inspirés du principe des biofilms, pour la potabilisation de l'eau et le traitement des effluents, par la 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 sont développés sur un support fixe, qu'il soit aérobien ou anaérobie, et peuvent être fixés sur des supports tels que le sable (Lea 2008) ou de charbon actif (Simpson 2008), sous forme de floes (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 ce type de biomasse à dégrader efficacement 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 particulières et sont composées de microorganismes, de PEC *et al.* (1995). Bkati *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. 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. La diversité des microorganismes dépend des conditions opératoires du réacteur (e.g. température, pH...), des nutriments présents. UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket, EGSB – Expanded Granular Sludge Bed (McHugh *et al.* 2003). McHugh *et al.* (2003) ont déterminé cinq 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 dans la granule dépend de la nature du substrat présent. Différentes 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

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 l'organisation des communautés microbiennes (Liu *et al.* 2004). Bien que dans la littérature, les PEC ont été étudiés dans les biomasses épuratoires granulaires anaérobies, cette étape indispensable dans l'étude de ces systèmes de traitement des eaux usées pose le problème de la comparaison des résultats des différents travaux de la littérature. Le premier but de ce travail est de caractériser les PEC issus de boues granulaires anaérobies et la détermination des impacts que peuvent avoir les techniques d'extraction couramment citées dans la littérature. Pour cela, nous avons utilisé quatre boues différentes et testé neuf méthodes d'extraction couramment citées dans la littérature. Ces PEC ont 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 connaître les éléments d'origine 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 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 bioréacteurs (Palet et Paul 2008). La deuxième partie de ce manuscrit traite de la 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 traite de l'impact de la méthode d'extraction sur les résultats obtenus. Nous cherchons 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.

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

Ø 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'analyse sont présentées dans le deuxième chapitre.

Ø 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 sorption des PEC issus des boues granulaires anaérobies 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

s o r p t i o n d u p l o m b e t d u c a d m i u m d a n s l e b u t
capacité des extraits à fixer les éléments métalliques.

Ø 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 (Omoike et Chorover 2004). Ces biopolymères ont été, dans un premier temps, définis comme des polymères « d'origine bactérienne participant 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 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 EPS de 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 pour les 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 dans l'environnement (Wingender *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 Wacker 2005). La présence d'acides nucléiques et de protéines dans les 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'ions 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 (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 des conditions environnementales en modifiant leur métabolisme de sécrétion des PEC. De plus, la communauté bactérienne se compose de microorganismes capables de sécréter des PEC. Il a encore été mis en évidence si la sécrétion de PEC se fait avant ou après la formation 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 (peptidoglycane, 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 leur capacité à adsorber avec la matrice extracellulaire. Elles peuvent être assimilées à des PEC, étant donné qu'elles ont des propriétés similaires à celles des PEC (Sponza *et al.* 1999). même s

II.2. Types de PEC et composition

Par définition les PEC se trouvent à l'extérieur des cellules. Elles sont des 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 bioprocédés est composé 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 A₁). 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 faiblement liés 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. 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 les produits d'hydrolyse des PEC (Cetall 1994; Nielsen et al. 1997).

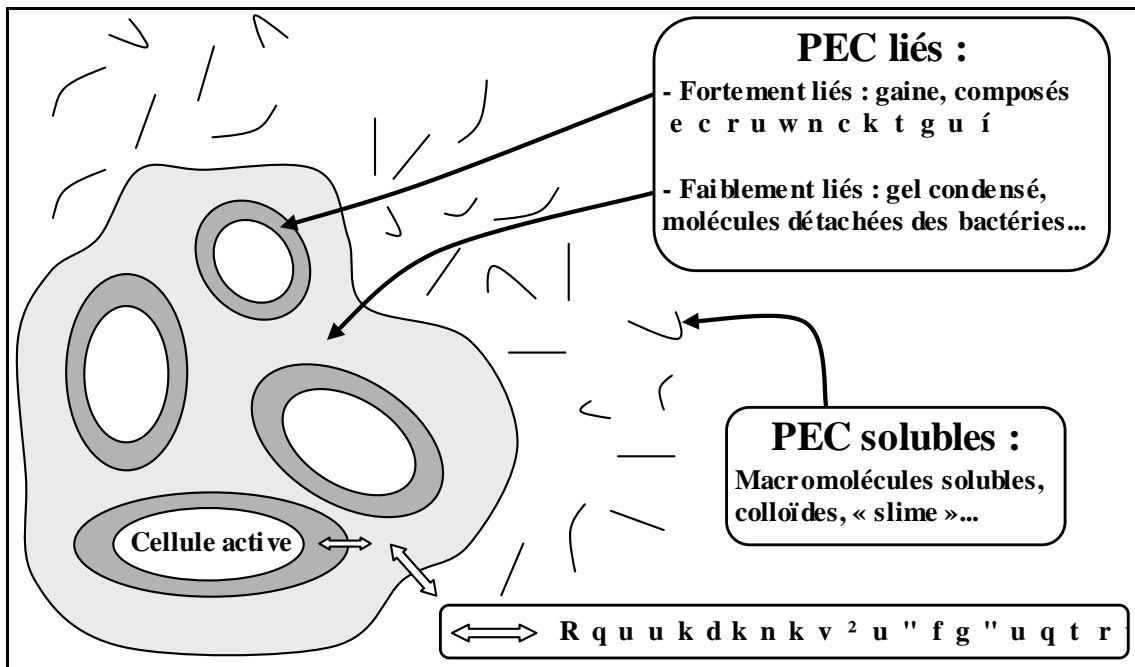


Figure A1. Composition et disposition des PEC solubles et liés (adapté de Wingender *et al.* ; 1999)

Une autre classe de composés PEC est 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'occasion, 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. Ils 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 de substrat. 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 dégradés, l'autre étant l'accepteur d'électrons. Ainsi, les composés sont considérés comme étant des PEC solubles (Figure A₂). Toutefois, ce modèle ne fait pas mention de certains composés. Les 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 composés ont des caractéristiques chimiques similaires mais pas identiques (Tsai *et al.* 2008), mais ces différences peuvent provenir de la définition de ces composés.

De nombreuses théories existent sur l'origine des PEC, 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 *et al.* 1997). Wingender *et al.* (1999) proposent de définir les PEC solubles et liés en fonction du protocole de séparation. La séparation des PEC solubles peut donc se faire avec un procédé simple comme une centrifugation alors que l'extraction des PEC liés, plus fortement associés à la matrice, nécessite des méthodes plus drastiques engendrant une dispersion de la biomasse (*e.g.* sonication, chauffage, réactifs chimiques *p. 8*). Pour l'étude des PEC liés et solubles, les auteurs utilisent des protocoles différents pour extraire les PEC solubles puis une autre pour extraire les PEC liés (Tsai *et al.* 2008). Enfin, la définition des PEC solubles et liés dans la suite du manuscrit.

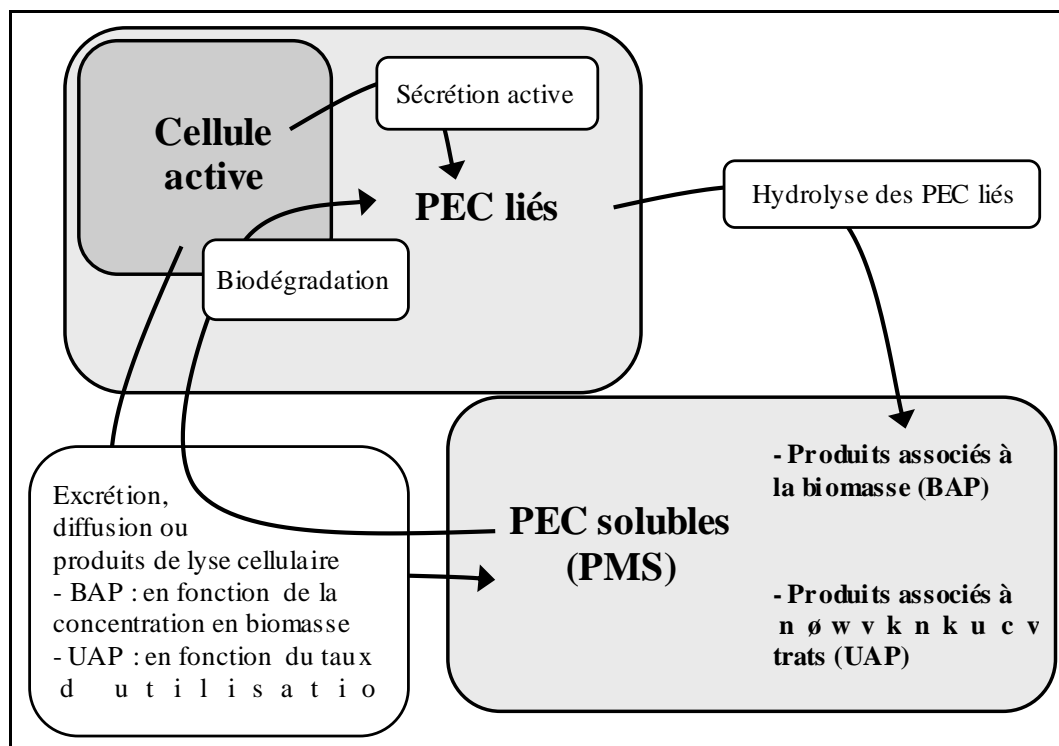


Figure A20 " O ² e c p k u o g u " « " n ø q t k i k p g " f g u " R G E " u q n w d
Rittmann ; 2002)

II.2.b. Composition élémentaire

Les PEC sont des molécules organiques composées de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. 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⁻¹ 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). Certains auteurs, les teneurs en carbone et azote dans les

échantillons de PEC font partie des indicateurs de fortes teneurs en carbone et azote dans un échantillon de PEC implique des PEC relativement purs, sans molécules inorganiques *et al.* (2007). c que l

Tableau A₁. 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
C	61,3 %	60,6 %	35-45 %	8-39 %	/
N	6,1 %	9,2 %	9-11 %	2-9 %	/
P	1,2 %	1,3 %	/	/	/
O	31,5 %	28,4 %	/	/	/
N/C	0,10	0,15	0,17-0,24	0,21-0,25	0,47
O/C	0,51	0,55	/	/	/
P/C	0,02	0,05	/	/	/
N/P	5,53	3,11	/	/	/
H/N	/	/	/	/	29
H/C	/	/	/	/	13

La composition élémentaire des PEC est souvent accompagnée des ratios des différents éléments (Tableau A₄), 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 A₂), la composition du milieu (nature de l'effluent et propriétés physico-chimiques du milieu) (Tableaux A₃ et A₄) ou la nature des microorganismes présents. D'après la littérature biologique 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 A₂). Toutefois, la composition du milieu de croissance est un facteur important dans la composition des PEC. En effet, comme le montre le Tableau A₃, 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 A₄).

Tableau A₂. Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides, substances humiques-like,

de différents effluents au sein de biomasses

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

Tableau A₃. Exemples de teneurs en protéines, polysaccharides et acides nucléiques

de boues activées traitant différents effluents (Sponza 2002)

V { r g u " f ø g h h n	Prot. (mg.g ⁻¹ MVS)	Polysac. (mg.g ⁻¹ MVS)	Acides nuc. (mg.g ⁻¹ 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
S t a t i o n d é p u	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 ³)/(kg/m ³ 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

³ 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 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 unité 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 des acides nucléiques et des protéines 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.

³ *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 nombreuses 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.

³ *Les substances humiques-like*

Dans l'étude de substances humiques, c'est abusif car, par définition, ces molécules proviennent exclusivement des sols polymériques. 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 (Aeyn 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 la adsorption de ces molécules lors 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, amines, lactones,

³ *Les acides nucléiques*

Le dosage des acides nucléiques pratiqué généralement pour 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) 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). À l'origine, les acides nucléiques sont considérés comme étant uniquement des produits de lyse cellulaire. Toutefois, de nombreux microorganismes sécrètent des acides nucléiques qui peuvent se retrouver à des teneurs de 50 % dans les PEC (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. 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).

³ *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 C₆. Les acides uroniques entrent dans la composition de certains polysaccharides, leur apportant une fonction ionisable (Sutherland 2001b).

³ *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 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 les adhésions aux surfaces (Sand et Gerke 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 être 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

III.1. Poids moléculaire

Les molécules composant les PEC ont des tailles et des poids moléculaires différents. La détermination du poids moléculaire des PEC (SEC). Cette méthode permet de séparer les molécules des PEC par poids moléculaire permettant d'avoir des profils chromatographiques afin d'éviter l'altération (Görner *et al.* 2003; Omoike et al. 2004; Comte *et al.* 2007). La détection par infrarouge couplée aux 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 supérieurs à 1000 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 ont des poids moléculaires compris entre 15 et 300 kDa (Liu *et al.* 2001), ce qui va dans le sens d'une partie 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 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. Cela a 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 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

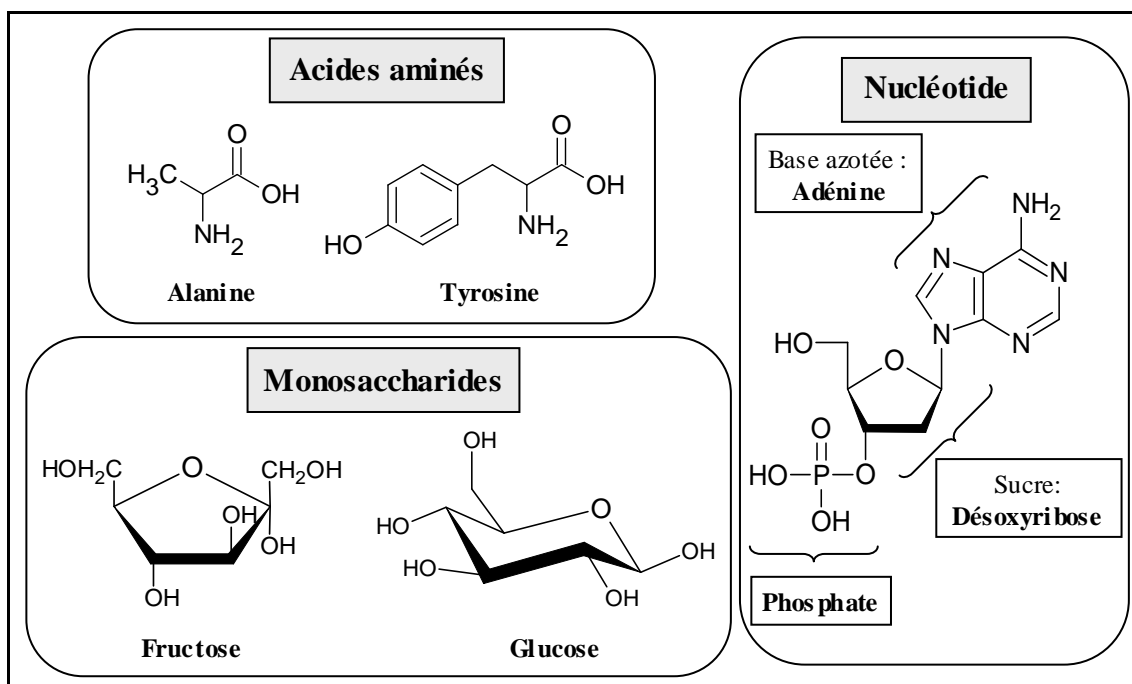


Figure A₃ 0 " G z g o r n g u " f g " u v t w e v w t g " f g u " c e k f g u " c o k
nucléotide

Les molécules composant les PEC ont des structures variées et possèdent des groupements fonctionnels potentiellement ionisables en fonction du pH (Figure A₃). 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. 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 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 A₃) . 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 échantillons différents après une séparation par SEC (Görner *et al.* 2003).

Tableau A₅. Exemples de pK_a 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		Groupement ionisable	Biofilms : SRB	
pK _a	Concentration (mmol.g ⁻¹ PEC)	pK _a	Concentration (mmol.g ⁻¹ PEC)		pK _a	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	Sulfhydryle		
9,8	2,0	9,4	1,4	Amine, phénol		
11,0	5,1	11,0	4,9	hydroxyle		

HPS : boue productrice de biofilm sulfato-réducteur génère, SRB

Ces groupements fonctionnels peuvent être sous forme ionisée ou non en fonction du pH et sont alors des sites de fixation électrostatique des cations métalliques (Liu et Fang 2002a). Ainsi, quand le pH augmente, les fonctions peuvent se déprotoner si la constante d'acidité est inférieure au pH. La détermination des pK_a apparents des PEC se fait généralement à l'aide d'un logiciel *et al.* (1990) ou ProtoFit (Turner et Fein FITEQL 2006) qui fera correspondre au mieux la courbe de titrage avec un modèle. Ces analyses permettent de déterminer les constantes de concentrations en nombre de sites de fixation correspondant à chaque classe de pK_a. Il existe très peu de données concernant les pK_a des PEC, les données sur les parois cellulaires dans les études sur les biofilms (Yee *et al.* 2004; Fein 2006). Le Tableau A₅ présente les résultats obtenus par Liu et Fang (2002a) qui ont déterminé jusqu'à 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 été réalisées 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 pKa 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 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 des biofilms et du 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 la présence de groupements 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 obtenu des coefficients de corrélation de 0,91 (Zhang *et al.* 2007). Concernant la charge de surface des échantillons de PEC extraits à pH 7 (Morgan *et al.* 1990) on a obtenu des valeurs comprises entre -0,2 et -0,9 meq.g⁻¹ PEC par titration des colloïdes. Ces valeurs sont en adéquation avec celles de Mikkelsen (2003) qui sont de -0,4 meq.g⁻¹ PEC lyophilisés et -0,5 meq.g⁻¹ PEC frais déterminées par la même méthode.

La charge de surfaces. 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 interagissent avec l'eau (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 est 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 pour les bactériens (Urbain *et al.* 1993; Jorand *et al.* 1998).

Liao *et al.* (2001) ont montré que principalement l'hydrophobicité est influencée par la teneur en protéines et en polysaccharides plutôt que par la teneur totale en PEC. Ainsi, les protéines ont un effet positif sur l'hydrophobicité, tandis 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 sorbées 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 les 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 (Liao *et al.* 2008) présentes dans la fraction. Les auteurs 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 de polysaccharides liés à des protéines. D'autres études confirment le rôle positif des polysaccharides dans l'hydrophobicité (Liao *et al.* 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 leucine (Zhang *et al.* 2007) et les protéines sont composées d'acides aminés hydrophiles déterminé dans des échantillons extraits à partir de différentes biomasses (boues, cultures de bactéries) que les acides aminés hydrophobes tels que l'alanine représentent une grande quantité des acides 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 formation, le développement et le maintien des biomasses.

IV. Rôles au sein des biomasses

D'après la littérature, les PEC ont, d'un nombre aux propriétés des molécules. Ces rôles vont apporter des 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 physique que ce soit concernant l'adhésion *et al.* 2009), la biofloculation 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-immobilisation des cellules dans une matrice. D'après la littérature, lors de l'agrégation en compte : les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals selon la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, 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 interactions polymériques ont un effet positif. Ainsi, en présence de peu de PEC autour des cellules, l'adhésion est limitée. Cependant, de grandes quantités de PEC autour des cellules 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). Un paramètre important dans la granulation est la charge de surface (Liao *et al.* 2004a). Ainsi, l'augmentation de l'hydrophobicité des cellules favorise la granulation. Les PEC sont composés de molécules hydrophobes et de molécules hydrophiles (polysaccharides) (Dignac *et al.* 1998). La composition des PEC entourant les cellules va donc avoir un impact sur la granulation (Liao *et al.* 2001). Outre la quantité de PEC produite par les bactéries, la composition de ces PEC est donc également importante pour l'agrégation des bactéries. En effet, quand la charge de surface diminue (Liao *et al.* 2006), l'hydrophobicité des cellules augmente. Après l'attachement initial des cellules à la surface, celles-ci commencent à se regrouper grâce aux forces de liaison à l'interface, ce qui favorise l'augmentation de la granulation (Liao *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 A₄). 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 (Yu *et al.* 2001) (Figure A₄). En effet, des études ont montré que la présence de cations divalents dans le milieu tels que Ca²⁺, Mg²⁺ ou Fe²⁺ favorise la granulation (Higgins et Novak 1997; Yu *et al.* 2000). Par exemple, la présence de Ca²⁺ favorise la granulation en stabilisant les 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 A₄).

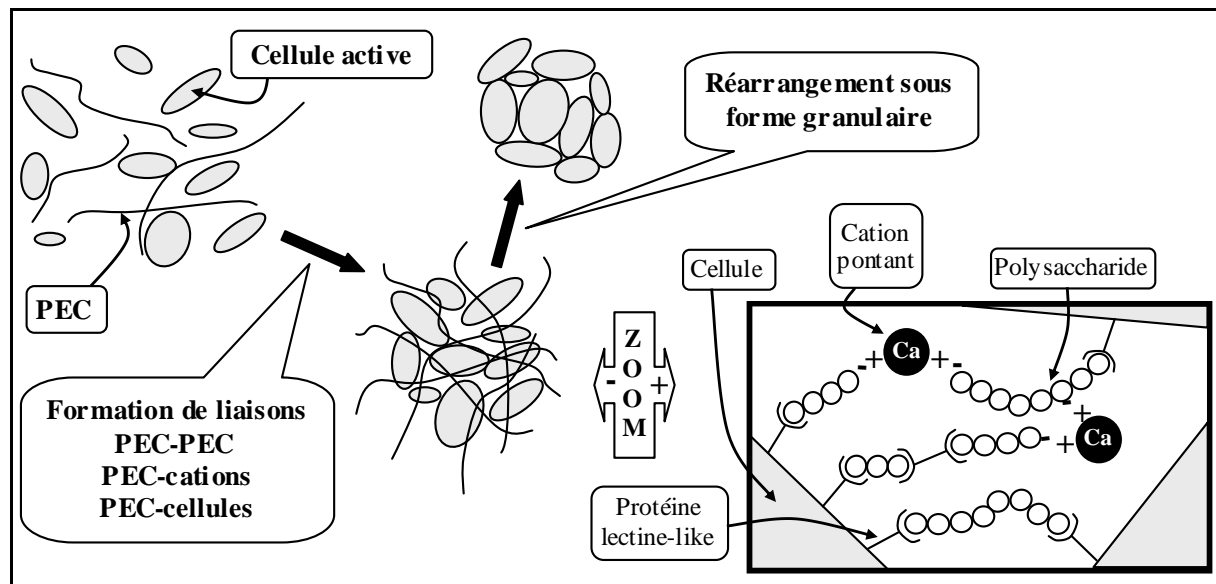


Figure A₄. Représentation schématique de la biogranulation favorisée par la présence de PEC (Higgins et Novak 1997; Liu et al. 2004b)

Par leurs propriétés différentes les polysaccharides

(Liu et al. 2003). La formation des granules est favorisée par l'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 forment également une couche qui entoure la granule (De Beer et al. 1996; Veiga et al. 1997).

La répartition des polysaccharides dans les granules a été étudiée par De Beer et al. (1997) ont mis en évidence que, dans la granule mature, 50 % des polysaccharides sont

présents dans la couche externe et le reste est réparti de manière aléatoire dans la granule. Les polysaccharides qui composent la couche externe sont des

polysaccharides acides liés en chaîne rigide qui sont présents en plus grande quantité

alors que les polysaccharides au cœur sont plus flexibles (Sutherland 2001a). Ces polysaccharides liés en chaîne rigide sont plus présents à la périphérie 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 que 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 conditions hydrodynamiques augmentent dans un réacteur, en réponse au stress, la production de polysaccharides est favorisée (Liu et Fay 2002). Les acides nucléiques sembleraient également avoir un rôle dans le maintien de la structure des biomasses. Il existe actuellement peu de données 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 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 structurel, 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 microorganismes. Les PEC solubles sont recyclés par les bactéries (oxydation) et deviennent des composés donneurs d'électrons (Laspidou et Rittmann 2002). Les composés organiques sécrétés par les bactéries et celles du milieu piégées dans la matrice. Ces composés sont des sources de carbone pour les microorganismes. Dans les 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 est évidente. Dans les boues activées, la quantité de l'activité enzymatique est faible (Frølund *et al.* 1996). Au sein des floes 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 floes a pour 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 diminue également. De même, dans un réacteur biologique à un faible taux de charge organique, il y a une faible activité enzymatique dans les floes et quand ce taux de charge organique augmente, l'activité enzymatique augmente (Frølund *et al.* 1995). L'activité enzymatique dans les floes est donc affectée par les changements de condition du milieu pour les bactéries nécessaires à leur métabolisme.

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

Il existe peu d'études traitant de ce rôle de l'eau dans les biofilms et les biomasses granulaires. Dans les biofilms, l'eau est un 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 par 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 biomasse. En effet, à un pH proche de la neutralité, les PEC sont chargés négativement. Dans les biofilms, 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 les bactéries. 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. *et al.* (2004) ont conclu que les PEC faiblement liés aux cellules ne participent que très peu. 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). Un polysaccharide qui a un rôle structural dans les biofilms mais également dans la rétention de l'eau. Une étude a montré que dans certains algues marines induit l'expression de l'alginate, un polysaccharide qui agit comme un liant et induit la précipitation de l'eau. Ainsi, l'alginate permet de retenir l'eau dans 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) :

Ø La sécrétion d'acides ou de chélateurs induit la précipitation ou la ionisation des composés toxiques.

Ø La sécrétion d'agents chélatants qui vont se lier aux ions métalliques libres afin de diminuer leur biodisponibilité.

Ø La sécrétion de polysaccharides qui vont rendre la paroi cellulaire plus épaisse afin de limiter le transfert des composés toxiques. 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 J u w a r k a r 2 0 0 9) . C e r t a i n e s s o u c h e s b a c t é r i e r é s i s t a n t e s , s o i t s e n s i b l e s *à al.* (2002) ont pu démontrer l'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 (Adav *et al.* 2010) a sélectionné deux espèces concurrentes pourtant présentes simultanément au sein de biomasses. Ils ont observé que la présence de PEC peut supprimer 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 l'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-N i e l s e n 2 0 0 3) m a i s é g a l e m e n t microorganismes au milieu par le transfert de gènes (Nadell *et al.* 2009). Le mécanisme de sécrétion d'ADN extracellulaire est encore l'ADN au cours de leur croissance (Nielsen 2003) et les sont également capables d'intégrer cet ADN extracellulaire. Le but de ce transfert de gènes est l'adaptation de nouvelles compétences (Nadell *et al.* 2009) . La sécrétion d'ADN

nouvelles propriétés au sein des biofilms suggèrent que l'échange de gènes 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 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 biomasse). Il existe de nombreuses méthodes d'extraction et de nombreux protocoles différents sont utilisés. Les trois étapes : la préparation des échantillons, l'extraction 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 ne permet pas d'éviter des changements dans la composition des enzymes, l'activité enzymatique (Wierzbicka *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 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. 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 sont généralement 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 permet de conserver les conditions originales de salinité et de pH de la biomasse (Li et Yang 2007) et ainsi d'atténuer les perturbations des enzymes, 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 concentrations de lavage qui peuvent 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 PEC.

Pour des biomasses de type granulaire, qui ont des structures denses et compactes, une étape d'homogénéisation mécanique du échantillon favorise (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 (physico-chimique, chimique) (utilisation de bases, d'acides, de la biomasse). Certains protocoles combinent également différentes techniques. Pour une même méthode, différentes variantes sont mentionnées dans la littérature (Tableaux A₆ et A₇) 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 destinées à l'extraction des PEC 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.

II.1. Méthodes physiques

Les méthodes physiques d'extraction des PEC visent à libérer les PEC. Des exemples de conditions expérimentales sont présentés dans le Tableau A₆. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

Ø N c " e g p v t k h w i c v k q p " g v ù n ø w n v t a e g p v h k h w i d v a l
moins dégradative pour séparer les PEC de la biomasse. Dans les études comparant différentes techniques d'extraction des PEC, « 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 de liés.

Ø **Le chauffage** : le chauffage de la biomasse qui peut se faire dans un 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 est trop élevée.

Ø **La sonication** : 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 destruction des PEC. Toutefois, cette méthode est moins efficace sur les biomasses granulaires en raison de la forte densité de certaines granules compactes.

Ø **Le broyage** : le broyage des biomasses est mécanique et permet de casser la structure pour libérer les PEC. On utilise un homogénéisateur automatique ou de billes de verre incorporées à l'agitateur placé sous agitation.

Ø **Les résines échangeuses 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 la matrice polymérique. L'échange des ions Na^+ initialement liés à la résine contre des cations mono-, di- ou trivalents de la matrice polymérique. Les ions Ca^{2+} ou 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'extraction chimique de PEC est préférée ou combinée aux méthodes physiques.

Tableau A6 "Gz g o r n g u " f g r a c t i o n t p h y s i q u e e t d e R E C u " f o g z

O ² v j q f g " f ø	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 ⁻¹ PSV, 4 °C, 1 h	(Liu et Fang 2002b)

II.2. Méthodes chimiques

L' extraction P EcCh i m i q u e s p e n s e à l' ajout de réactifs différents actions sur la matrice polymérique chimiques est la plupart du temps accompagné de PEC extraits. Le Tableau A7 présente différents protocoles les réactifs chimiques couramment utilisés, on trouve :

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

Ø **Les bases** (hydroxyde de sodium) : l'ajout d'une base engendre l'ionisation des groupes 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.

Ø **Les alcools** (éthanol, méthanol) : les alcools sont surtout utilisés pour l'extraction sélective des polysaccharides.

solutions. Les extraits des quantités de solutions salines (environ 3 volumes pour un volume d'échantillon) qui

Ø **Les agents chélatants** (EDTA, EDTA) : Ces réactifs fixent les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) dans la matrice, fragilisant la structure de la biomasse et facilitant l'extraction, de sorte que les protéines se libèrent plus facilement de la membrane cellulaire provoquant ainsi la fragilisation des membranes, ce qui augmente les risques de lyse cellulaire.

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

Ø **Les solutions de sels et tampons phosphates** (NaCl , Na_2PO_3 , NaH_2PO_4 ...) : En présence de fortes concentrations en sels, les cations pontants de la matrice polymérique sont remplacés par échange d'ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Cet échange d'ions fragilise la structure de la biomasse et favorise la libération 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.

Ø **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 des méthodes physiques afin d'améliorer l'ex

Tableau A70 " G z g o r n g u " f g " r t q v q e q n g u " f ø g z v t c e v k q p " e

O ² v j q f g " f ø g	Paramètres	Référence
Acide (H ₂ SO ₄)	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 est spécifique de certains types de molécules et elle est rarement utilisée (Sesay *et al.* 2006).

Ainsi, le mélange de ~~amylase~~ ajouté à la biomasse provoque l'ultra-lyse et l'hydrolyse des liaisons des protéines et des liaisons polymériques. Toutefois, dans les biomasses, il existe une grande variété de liaisons et d'interactions entre 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 provoque pas de lyse cellulaire au cours de l'extraction.

II.4. Combinaisons de différentes méthodes

Afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction, les protocoles combinent plusieurs méthodes. Une méthode est également utilisée afin de séparer différents types de PEC. La combinaison de ces méthodes peut faire intervenir :

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

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

Ø **Diverses méthodes physiques et chimiques.** Exemples : ajout d'un tampon phosphate associé à l'ultrasonique et au chauffage (Wang *et al.* 2006) ; ajout de Triton X-100, suivi d'une centrifugation en 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 ×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 ×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 ×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 des différents types de 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 Ca^{2+} et Mg^{2+} en utilisant une REC, les PEC liés aux ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en utilisant des sulfures et les PEC liés aux ions Al^{3+} en utilisant une base.

III. Séparation et purification des extraits de PEC

Une fois l'extraction des PEC achevée, la séparation des PEC est effectuée par centrifugation de l'échantillon, 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 A₆).

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 de mélanges 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 composés de 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 les composés de poids moléculaire inférieur à 3,5 kDa (Comte *et al.* 2009). Enfin, la filtration à 0,22 µm est utilisée afin d'éliminer les cellules bactériennes. Les composés de poids moléculaire supérieur à 0,22 µm ont été extraits en même temps que les PEC.

IV. Comparaison des techniques d'extraction

Il existe donc un grand nombre de méthodes différentes pour l'extraction des PEC, mais les différentes méthodes n'ont pas la même efficacité d'extraction. La spécificité de certaines méthodes est liée à la nature des molécules des PEC. Différentes études ont tenté de comparer ces méthodes d'extraction de cultures de bactéries (Sheng *et al.* 2005), de biofilms (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 A₈). De manière générale, les extractions chimiques sont des méthodes plus agressives et permettent l'extraction de plus de biopolymères (Liu et Fang 2002b; Liu et Fang 2003; Comte *et al.* 2006c). De plus comme le montrent les Tableaux A₈ et A₉, pour la même quantité de PEC extraits, les extraits diffèrent en fonction de la biomasse d'où ils sont extraites à partir de boues granulaires par rapport aux boues activées. En effet, pour le même protocole d'extraction, les biomasses granulaires qui ont une structure dense (Fang 2000) contrairement aux floccs. Ainsi, une adaptation du protocole d'extraction est nécessaire.

Tableau A₈. Exemples de quantités totales de PEC extraits à partir de 3 boues activées par O₂ v j q f g " f ø

O ₂ v j q f g " f ø	PEC Boue 1 (mg.g ⁻¹ PSV)	PEC Boue 2 (mg.g ⁻¹ PSV)	PEC Boue 3 (mg.g ⁻¹ PSV)
Centrif.	13,3	22,5	21,5
REC	30,3	48,2	43,1
EDTA	41,9	61,0	64,1
Form. + NaOH	49,9	53,3	51,6

La méthode d'extraction modifie la quantité de différents composés (Liu et Fang 2002b). Les études qui ont comparé les protocoles en évidence certaines tendances concernant l'impact de la méthode de sur la composition des extraits. Concernant les extractants chimiques, par exemple, les extraits obtenus avec EDTA ont 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, le ajout d'un extractant entraîne de très fortes concentrations en acides nucléiques (Tableau A₉) dues à une forte lyse cellulaire lors de l'extraction (Liu et Fang 2002b). La combinaison du formaldéhyde et de la soude permet alors de limiter cette lyse cellulaire (Liu et Fang 2002b).

Tableau A9. Exemples de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à

r c t v k t " f ø w p g " d q w g " c e v k x 2 g " g v " f ø w p g " d k q o c u u g "
*f ø g z v t c e v k q p " * N k w " g v " H c p i " 4 2 2 4 d +*

Méthode f ø g z v t c	Prot. (mg.g ⁻¹ boue)	Polysac. (mg.g ⁻¹ boue)	Subst. Hum. (mg.g ⁻¹ boue)	Ac. Uro. (mg.g ⁻¹ boue)	Ac. Nuc. (mg.g ⁻¹ boue)
Boue activée					
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
Boue granulaire anaérobie					
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 des acides nucléiques (Comte *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 même 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, donc nécessaire d'établir des critères de comparaison entre différentes méthodes.

IV.2. Efficacité de l'extraction

La grande variété de protocoles d'extraction des PEC et les résultats obtenus rendent les résultats des différentes études

différents auteurs une bonne extraction est 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 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 dans la littérature. Toutefois Ras (2008) propose une méthode qui combine des extractions répétées pour appréhender la teneur initiale en PEC dans la biomasse. Le rendement d'extraction est le rapport entre la quantité de PEC extraits et la quantité de PEC initiale dans la biomasse. Ce rendement d'extraction est différent en fonction des études. Il peut être exprimé en fonction du poids sec ou du poids sec volatil de la biomasse. Le rendement d'extraction peut aussi s'exprimer en fonction du carbone organique de la biomasse. Le Tableau A₁₀ présente des valeurs de rendement d'extraction pour différentes méthodes et différentes biomasses. Le rendement d'extraction est généralement plus élevé pour les méthodes utilisées, les extractions chimiques obtenant un meilleur rendement.

Tableau A₁₀ "G z g o r n g u " f ø k p h n w g p e g u t l f rendement' v g e j p k s w g " f ø g z v t c e v k q p " f g u " R G E

Méthode f ø g z v t c e	T g p f g o g p v " f ø g z v t (PS PEC/PS biomasse)	
	Boue activée (Comte <i>et al.</i> 2006c)	Culture bactérienne (Metzger <i>et al.</i> 2009)
Centrif.	1,0 %	/
REC	3,1 %	8,8 %
EDTA	19,2 %	14,4 %
Form. + NaOH	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.

Ø 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 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 A₁₁).

Ø 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 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 la méthode qui ne conduit pas à la lyse des cellules (Tableau A₁₁).

Ø La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) est une enzyme spécifiquement intracellulaire. La quantification 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).

Ø 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).

Ø La dénosine triphosphatase intracellulaire (iNTPase) est une enzyme qui est présente dans les cellules. 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 A11 : Extraction sur la quantité totale de PEC des extraits de PEC extraits à partir de culture de *Rhodopseudomonas acidophila* (Sheng *et al.* 2005)

	PEC total (mg.g ⁻¹ PS)	Ac. Nuc. (mg.g ⁻¹ PS)	Prot./Polys.
Centrif.	12,9	2,6	1,5
Chauffage	71,6	23,6	3,7
H₂SO₄	21,4	4,6	0,6
EDTA	70,3	5,4	9,1
NaOH	159,2	24,9	16,7

IV.2.c. Altération des molécules

L'altération des molécules composées (Azeredo *et al.* 1996) des PEC choisis de suivre les profils de poids moléculaire haute pression pour l'optimisation 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, de qui ne permet pas leur dosage par la technique engendré. a use de l'encombrement

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 A12). Outre les plus anciennes (Tableau A12), de nombreuses autres

m é t h o d e s e x i s t a n t e s l a f i a b i l i t é d u d o s a g e e t d e p a r t i e s i n t e r f é r e n c e s p o u v a n t exister. Toutefois, bien que ces méthodes simples soient très usitées, elles présentent des inconvénients. En effet, si l'on prend le cas des protéines 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 *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 utilise le réactif de Biuret (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 petites protéines comportant moins de huit peptides ne sont pas dosées (Wingender *et al.* 2001).

Tableau A12. Exemples de techniques de dosage des composants des PEC

Réactifs	Référence
Protéines	
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)
Substances humiques-like	
Réactif de Folin-Ciocalteu	(Frølund <i>et al.</i> 1995)
Polysaccharides	
Anthrone	(Gaudy 1962)
Phénol	(Dubois <i>et al.</i> 1956)
Acides uroniques	
m-hydroxydiphényle	(Blumenkrantz et Asboe Hansen 1973)
Sulfamate/m-hydroxydiphényle	(Filisetti-Cozzi et Carpita 1991)
Lipides	
Vanilline	(Frings et Dunn 1970)
Acides nucléiques	
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

2008). De plus, différentes études ont mis 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 résultats obtenus pour le dosage des protéines (Brown et Lester 1982). De même, Ras *et al.* (2008) ont montré que Triton X 100 engendre une sous-estimation de la teneur en protéines déterminée. Les méthodes ne sont cependant pas affectées de la même manière par la présence de ces extractants. Il est donc conseillé 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 différentes classes de composés des PEC. Pour cela, diverses méthodes sont envisageables :

Ø **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'analyse de ces fractions est effectuée 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 de surface. Park *et al.* (1998) ont utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection par fluorimétrie afin d'identifier les acides aminés présents dans les extraits de PEC. Ce type d'analyse nécessite une dérivation afin que les acides aminés acquièrent un caractère fluorophore.

Ø **Les polysaccharides** : La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une méthode très utilisée pour l'identification des polysaccharides 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 monomères dans les extraits lipidiques (Verhoef *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2009). La chromatographie de performance couplée à une détection ampérométrique pulsée est également utilisée dans certaines études afin de séparer et d'identifier les lipides (Verhoef *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2009).

Ø **Les lipides** : La littérature comporte des études utilisant les techniques de GC et GC-FID pour l'identification des lipides (Schofield *et al.* 1998).

Certaines études ont analysé des extraits de PEC par spectroscopie de fluorescence utilisant une matrice-émission (EM) 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 EM n'est pas un outil adapté pour des analyses.

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

L'étude structurale des molécules composant les PEC nécessite de définir les paramètres :

Ø **Le poids moléculaire** : La séparation des PEC en fonction de leur poids moléculaire peut être réalisée par électrophorèse sur gel (SE) (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 SEC (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). Toute fois, l'étude du fractionnement en fonction de la taille des molécules composant les PEC, l'étude du fractionnement en fonction de la charge par une méthode qualitative (Görner *et al.* 2003) permettant l'établissement des poids moléculaires des extraits (Wang *et al.* 2009). De plus, dans le cas de fortes interactions hydrophobes et/ou ioniques ont été observées au cours de la séparation,

altérant ainsi le 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).

Ø **La configuration** : La résonance magnétique nucléaire du carbone ($\text{NMR } ^{13}\text{C}$) ou de l'hydrogène ($\text{NMR } ^1\text{H}$) 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. Toutefois, la technique de 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).

Ø **Les groupements fonctionnels** : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'identifier les principaux groupements fonctionnels des 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, 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).

Ø **La charge de surface** : Il existe plusieurs techniques décrites dans divers articles de la littérature (Boyette *et al.* 2001; Mikkelsen 2003) : la détermination du potentiel zêta, la titration acido-basique, la titration du rouge de Ruthénium (Tableau A₁₃). Il n'existe donc pas de méthode standardisée. Mikkelsen (2003) a établi que, pour l'étude des PEC, la titration acido-basique est la plus appropriée tandis que la détermination du potentiel zêta serait plus efficace pour la mesure de la charge de surface des agrégats bactériens.

Ø **Nécessité de méthodes de mesure** : Il n'existe pas de mesure absolue de la charge de surface des agrégats bactériens. Différentes méthodes sont utilisées dans la littérature : la mesure de la charge de surface des agrégats bactériens sur des hydrocarbures (Zhang *et al.* 2001; que l'on trouve dans 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 la charge de surface des agrégats bactériens par précipitation.

sulfate de calcium (Obiakuwa *et al.* 2009); la mesure de l'angle du substrat avec une goutte (Bura *et al.* 1998; Liao *et al.* 2001). Toutefois, d'après les auteurs, cette dernière technique n'est pas adaptée pour l'extraction de PEC (Wilén *et al.* 2003a).

Tableau A130 "Rt k p e k r g u " f g u " f k h h ² t g p v g u " v g e j p k s w g u "
surface des PEC (Boyette *et al.* 2001; Mikkelsen 2003)

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

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 :

Ø **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-polysaccharides (Concanavaleine A ou ConA) , les 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 ces interférences (Chen *et al.* 2007b). Cette technique d'analyse 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 volume (PSV) de la biomasse correspond à la somme des PSV des cellules et des PEC. Ainsi, la coloration des cellules et des PEC permet de déterminer le volume que par C 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).

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

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

VI. Conclusion

Afin d'étudier les PEC, on ne grad de Toutefois, aucune méthode de référence n'a été mise au point. Les méthodes être physiques, chimiques ou enzymatiques conduisent à des compositions différentes des extraits. La composition des échantillons de utilisée et de la biomasse d'origine. Les rendements d'extraire par les 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 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 également suivant le caractère des PEC étudié (poids moléculaire, structure, localisation dans la biomasse). Toutefois, la grande diversité des 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 inorganiques (fertilisants, éléments métalliques) ou organiques (pesticides, produits 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, les technologies membranaires, les traitements avancés, 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).

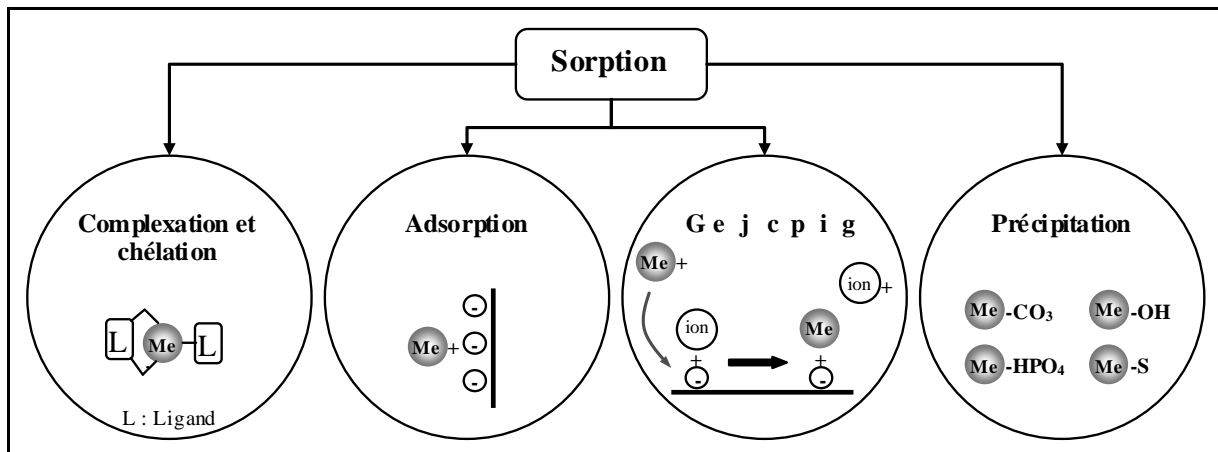


Figure A5. Principaux mécanismes impliqués dans la sorption des éléments métalliques

La biosorption est la propriété qu'ont certaines molécules organiques (Gadd 2009). La biosorption regroupe différents mécanismes de fixation tels que la précipitation ou microprécipitation, l'adsorption, la complexation, la chélation (Wang et Chen 2009). Ces différents 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'oxydation et de réduction.

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 en jeu. **Nous utiliserons donc le terme de « sorption » pour généraliser les interactions f g u " R G E " c x g n e p o s é s d a n s l a s u i t t e d u m a n u s c r i t . L e t e r m e d e « 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 les 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 A₁₄). Leur étude et la compréhension des mécanismes entrant en jeu sont nécessaires pour les procédés de dépollution des eaux et des sols et de déterminer le devenir de ces polluants.

Tableau A₁₄0 " G z g o r n g u " f ø c h h k p k v 2 u " f g " f k h h 2 t g p v g u " d

Biomasses	Affinités suivant n ø G O	Références
Boue granulaire anaérobie	Pb>Cd>Cu>Ni	(Hawari et Mulligan 2006)
Boue activée	Cd>Cu>Zn	(Yuncu <i>et al.</i> 2006)
Cyanobactéries		(Yee <i>et al.</i> 2004)
<i>Calothrix</i>	Pb>Cd>Cu	
Bactéries de boue activée		(Sag et Kutsal 1995)
<i>Zoogloea ramigera</i>	Pb>Fe(III)>Ni>Cu	
Champignons microscopiques		(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 A₁₄ présente des exemples de biosorption et des capacités de biosorption de ces biomasses. Mulligan (2006a) ont étudié par des boues granulaires anaérobies et EM observé un Fe^{2+} parallèlement à la biosorption des métaux confirmant le mécanisme d'échange d'ions. Ils ont également complexée et celle qui a précipité. Il s'avère que ces trois mécanismes mais dans des proportions différentes suivant dans les boues granulaires anaérobies se fait pour le cuivre et le cadmium, 80 % sont adsorbés par échange ionique, la moitié du plomb est adsorbée par échange ionique et se retrouvent sous forme de précipité. La biosorption de EM par les boues actives et Mg^{2+} est 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 ionique, laissant supposer une forte participation des PEC aux mécanismes de sorption par les biomasses.

I.3. Les PEC et la sorption des EM

Tableau A₁₅. Exemples de capacités maximales de sorption des PEC issus de diverses biomasses vis-à-vis de $Cd(II)$, $Co(II)$, $Cr(III)$, $Cu(II)$, $Ni(II)$, $Pb(II)$ et $Zn(II)$.

Biosorbant	Capacité maximale de sorption exprimée en $mmol.g^{-1}$ de PEC							Références
	Cd(II)	Co(II)	Cr(III)	Cu(II)	Ni(II)	Pb(II)	Zn(II)	
Boues activées								(Liu <i>et al.</i> 2001)
PEC	8,0	18,7	16,0	17,6	4,3	/	22,6	
Granules aérobies								(Sun <i>et al.</i> 2009)
PEC fortement liés	/	17,0	/	/	/	/	15,3	
PEC faiblement liés	/	84,8	/	/	/	/	99,4	
Bactéries								
<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 y a la sécrétion de PEC par les bactéries (Kazy *et al.* 2002; Mikes *et al.* 2005). Une étude sur la localisation d'EM dans les 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 métaux étudiés et le type de biomasse à partir de laquelle ils ont été extraits (Tableau A₁₅). 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; Tourney *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 importante pour les PEC issus de boues épuratoires (Chapitre A-1), ce qui va donc influencer la sorption des EM. Cette capacité de sorption plus importante pour les PEC issus de boues épuratoires, 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 impact sur la capacité de sorption des PEC. En effet, les techniques d'extraction, engendrent des capacités de sorption différentes pour les extraits (Comte *et al.* 2006b). L'étude de Comte *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 A₁₅). D'autres études ont confirmé que les PEC faiblement liés ont une plus grande 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, dans les biomasses bactériennes, la capacité de sorption des EM par les PEC diminue par rapport à celle des PEC seuls (Tableau A₁₅). Certaines études ont comparé la capacité de sorption des bactéries en

présence ou absence de PEC et n'ont pas été notés (Zhang *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009). Ils en ont donc conclu que les PEC ont les mêmes propriétés de sorption que la paroi cellulaire des bactéries.

Tableau A₁₆. 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 A₁₆). 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 auroient des sites de fixation pour 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 ce part d'une plus grande affinité entre Cd ou Zn et 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 de sorption de PEC :

Ø Le milieu qui peut affecter à la fois le métal et les sites de sorption des PEC : pH, force ionique...

Ø Le métal : spéciation, concentration, densité...

Ø 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 des groupes 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 d'un « pH-sorption edge » (Figure A₆) 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 A₆), ce qui confirme l'hétérogénéité des sites de sorption. Si le milieu est homogène, 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 A₆). 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 sur les 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 déprotonée, 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 sont plus facilement adsorbés par les polyélectrolytes que sont les PEC (Lamelas *et al.* 2006). A des pH basiques, une insolubilisation des EM est observée due à la précipitation des hydroxydes métalliques, ce qui engendre une diminution de la sorption par les PEC (Prado Acosta *et al.* 2005).

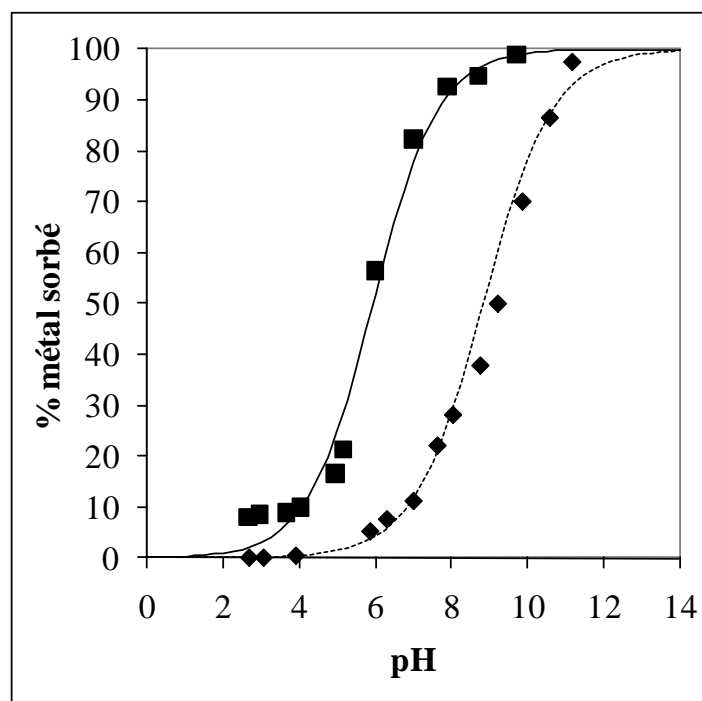


Figure A₆. Comparaison des « pH-sorption edges » mesurés (points) et modélisés selon le modèle de Kurbatov (trait) pour des extraits de PEC vis-à-vis du plomb (carré ; trait plein) et du cadmium (losanges, pointillés) (PEC extraits par REC + sonication à partir de boues activées ; PEC : $8,7 \text{ mg PS.L}^{-1}$; métal : $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) (Guibaud *et al.* 2006)

L'étude de l'impact des concentrations en électrolytes tels que NaCl, KCl, KNO₃ ou NaNO₃ dans le milieu. Différentes études ont observé une diminution de la sorption parallèlement à l'augmentation de la force ionique (Miretzky *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2009). En effet, l'augmentation de la force ionique provoque une diminution du coefficient de distribution (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 cadmium sur la capacité de sorption des PEC et ont établi des capacités maximales de sorption par les PEC variables suivant le métal considéré (Tableau A₁₅). De plus, Zang *et al.* (2006) ont testé des concentrations initiales en cadmium entre 10 et 500 mg.L⁻¹ avec 0,2 g.L⁻¹ de PEC. De 10 à 100 mg Cd.L⁻¹, la sorption est proche de 100 %. A 150 mg.L⁻¹, 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⁻¹, les auteurs ont observé une augmentation de la capacité de sorption jusqu'à 90 % pour une concentration de 500 mg.L⁻¹. 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 Pb²⁺, PbCl⁺, PbCl₂, PbNO₃⁺, PbOH⁺, Pb(OH)₂... (Cormaier *et al.* 2008; Miretzky *et al.* 2010). La forme libre du métal (Mⁿ⁺) 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 le cas d'une compétition avec d'autres cations (Ca, Mg, Pb) sur les PEC, différentes études ont mis en évidence

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 de classer par ordre décroissant d'affinité $Pb > Cu > Zn$. Ce classement par ordre décroissant est celui obtenu par rapport à la densité de charge des trois EM considérés (densité de charge : $Pb < Cu < Zn$) confirmant les résultats de Prado Acosta *et al.* (2005) et par ailleurs sur la sorption du cuivre et du zinc par des polysaccharides a montré que 80 % du cuivre (50 mg.L^{-1} de Cu pour $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de polysaccharides) est adsorbé et 20 % de zinc à la même concentration engendre une diminution de 50 % de la sorption du cuivre. Cette diminution peut s'expliquer par la compétition des sites de fixation des 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 pour la fixation aux sites des PEC et leur affinité relative dépend de 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 (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 de séparation de la biomasse d'origine des PEC ont un impact important sur la sorption des EM par les PEC. De plus, l'étude de l'influence de 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 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 des EM par les PEC, l'étude en batch est la plus courante et la plus 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 al.* 2006) 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 (Liu *et al.* 2001; Tourney *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 ne permettent pas de distinguer le métal lié aux PEC 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 suspension et peut 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 qui n'est pas liée à un EM. Les techniques 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 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 sous la forme d'une isotherme d'adsorption corrigée par la 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 (Vijayaragavan 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 suppose une sorption sur une 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 d'adsorption (Kochvil et Wolesky 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 avec le modèle de Langmuir (Zheng *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2009), ce qui se traduit par la forme de la surface des PEC. Néanmoins, le modèle de Freundlich conduit également à une bonne corrélation due à l'hétérogénéité des sites de fixation des sites EM qui est une des hypothèses à la base de ce modèle (Sun *et al.* 2009). D'autres modèles 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 par différents mécanismes tels que la sorption physique, la complexation/chélation, la précipitation ou encore l'échange d'ions. Chaque mécanisme dans la sorption en raison des nombreuses interactions possibles et de l'hétérogénéité. Toutefois, les mécanismes de diffusion et de sorption 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 surtout suivant le protocole utilisé pour la méthode de référence d'extraction, ce qui explique 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 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 difficile l'exploitation des résultats.

La première partie de ce travail de recherche a étudié différentes méthodes d'extraction des PEC et leur composition des extraits aussi bien qu'ont été un point de vue les 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 étudié les interactions des PEC issus des boues granulaires anaérobies avec des éléments métalliques afin de mieux appréhender les mécanismes entrant en jeu et les méthodes utilisées 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 B₁). Les méthodes expérimentales seront développées dans le chapitre suivant.

Tableau B₁ : Liste des appareils utilisés au cours des expériences des travaux de recherche

<p>Extraction des PEC :</p> <ul style="list-style-type: none"> -sonication : Sonopuls 70 avec sonde M73, Bandelin -chauffage : bain thermostaté Labo-therm SW-200, Resona Technics Co. -centrifugation : centrifugeuse KR 22i, Jouan <p>Poids sec :</p> <ul style="list-style-type: none"> -étuve RO-8, Metrawatt <p>Poids sec volatil :</p> <ul style="list-style-type: none"> -four, Firlabo <p>pH :</p> <ul style="list-style-type: none"> pH-mètre micro pH 2000, Crison <p>Dosages colorimétriques:</p> <ul style="list-style-type: none"> -spectrophotomètre CADAS 50S, Dr Lange <p>Infrarouge :</p> <ul style="list-style-type: none"> -spectromètre infrarouge Spectrum 1000 IR, Perkin-Elmer <p>Carbone organique total :</p> <ul style="list-style-type: none"> -COT-mètre Phoenix 8000, Dohrman <p>Minéralisation :</p> <ul style="list-style-type: none"> -microonde V3000, Anton Paar <p>Microscopie électronique à balayage :</p> <ul style="list-style-type: none"> -microscope électronique à balayage couplé à un détecteur de rayons X XL 30, Philips 	<p>Dosages acido-basiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> -titrateur automatique 716 DMS Titrino, Metrohm -agitateur à hélice 3 pales 722, Metrohm -stand 727 Ti Stand, Metrohm -électrode pH (pH 0-14/0; 80 °C; KCl 3 mol.L⁻¹), Metrohm -thermostat E100, Lauda -logiciel Metrodata 716 DMS Titrino, Metrohm <p>Polarographie :</p> <ul style="list-style-type: none"> -stand statique VA 663 à 3 électrodes, Metrohm -électrode de référence 3 M KCl/1 M KNO₃ -contre-électrode en platine -électrode de travail à goutte de mercure -potentiostat/galvanostat µAutolab Type III, Metrohm -injecteur automatique Dosimat 765, Metrohm -thermostat E100, Lauda -logiciel GPES (General Purpose for Electrochemical System) Manager Autolab, Metrohm
---	---

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 B₂ qui suit.

Tableau B₂ : Liste des réactifs chimiques utilisés au cours des expériences des travaux de recherche

Acétaldéhyde [C ₂ H ₄ O] : 99,5 %, Riedel-de Haën	Glucose [C ₆ H ₁₂ O ₆] : 99 %, anhydre, Rectapur, Prolabo
Acide acétique [C ₂ H ₄ O ₂] : 100 %, Normapur, Prolabo	Hepes [C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S] : 99,5 %, Sigma
Acide chlorhydrique [HCl] : 37 %, Normapur, Prolabo	Hydroxyde de sodium [NaOH] : 99 %, Normapur, Prolabo
Acide glucuronique [C ₆ H ₁₀ O ₇] : 99 %, 1 H ₂ O, Aldrich	Hydroxyde de sodium [NaOH] : 0,1 M, Normadose, Prolabo
Acides humiques : 96 % Aldrich	Métahydroxydiphényle [C ₁₂ H ₁₀ O] : 90 %, Aldrich
Acide nitrique [HNO ₃] : 69 %, Normapur, Prolabo	Nitrate de cadmium (II) [Cd(NO ₃) ₂] : 1000±2 mg.L ⁻¹ dans HNO ₃ 0,5M, Merck
Acide nitrique [HNO ₃] : 0,1 M, Normadose, Prolabo	Nitrate de plomb (II) [Pb(NO ₃) ₂] : 1000±2 mg.L ⁻¹ dans HNO ₃ 0,5M, Merck
Acide orthophosphorique [H ₃ PO ₄] : 85 %, Normapur, Prolabo	Nitrate de potassium [KNO ₃] : 99,995 %, Fluka
Acide sulfurique [H ₂ SO ₄] : 98 %, Rectapur, Prolabo	R g t q z { f g " f ø [H₂O₂] : t qoi 30p Normapur, Prolabo
ADN de thymus de veau : 10 mg.mL ⁻¹ , Aldrich	Phénol [C ₆ H ₆ O] : 99 %, Rectapur, Prolabo
Albumine de sérum bovin : 98 %, Sigma	Réactif de Folin-Ciocalteu : 2 N, Fluka
Azote [N ₂] : 5.0, Linde	Résine échangeuse de cations : Dowex, 20-50 mesh, Na ⁺ form, Sigma Aldrich
Bromure de potassium [KBr] : pureté pour analyse infrarouge, Normapur, Prolabo	Sulfate de cuivre (II) [CuSO ₄] : 99 %, 5 H ₂ O, Normapur, Prolabo
Carbonate de sodium [Na ₂ CO ₃] : 99,95 %, Fischer Scientific	Tartrate double de sodium et potassium [C ₄ H ₄ KNaO ₆] : 99 %, 4 H ₂ O, Normapur, Prolabo
Diphénylamine [C ₁₂ H ₁₁ N] : 98 %, Fluka	Tétraborate de sodium [Na ₂ B ₄ O ₇] : 99 %, 10 H ₂ O, Normapur, Prolabo
EDTA [C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈] : 99 %, 2 H ₂ O, Normapur, Prolabo	Vanilline [C ₈ H ₈ O ₃] : 99 %, Rectapur, Prolabo
Ethanol [C ₂ H ₆ O] : 96 %, Elvetec	
Formaldéhyde [CH ₂ 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 B₃). Les boues ont été conservées à 4 °C en condition anaérobie jusqu'à leur utilisation. Les boues du robinet afin de ne pas modifier leur composition.

Tableau B₃. Origines des boues granulaires anaérobies utilisées au cours des expériences

Boue	Réacteur anaérobie	V { r g " f ø g h h }	Activité métabolique
Eerbeek	UASB	Effluent de papeterie	Activité méthanogène et conditions sulfato-réductrices
Emmtec	UASB	Effluent synthétique SO ₄ ²⁻ /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 granule l'eau déminéralisée.

II. Extraction des PEC

Suite à une étude bibliographique existante, les 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 permet de séparer les PEC de la biomasse. L'extraction par centrifugation sera donc la méthode dite de « contrôle » pour comparer les résultats des autres protocoles.

II.1. Extractions physiques

5 p r o t o c o l p h y s i q u e o n t é t é t e s t é s a c t i o n

³ **Centrifugation** (Liu et Fang 2002b) : la boue est centrifugée à 20 000 ×g pendant 20 minutes à 4 °C.

³ **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 centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

³ **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⁻¹ avec un agitateur orbital. L'échantillon est centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

³ **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⁻¹ PSV boue). Le mélange est agité 1 h à 600 tr.min⁻¹. L'échantillon est centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C).

³ **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 p r o t o c o l e s d e x t r a c t i o n c h i m i q u e o n t é t é t e s t é s a c t i o n

³ **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 minutes à 80 °C. L'échantillon est centrifugé (20 min, 20 000 ×g, 4 °C). ensuite centrifugé

³ **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 m̄h, h à 4 20 000 ×g, 4 °C).

³ **Ethanol** (Rätto *et al.* 2006) : L échantillon est tmin̄t ou t d 20 000 ×g, 4 °C) . Trois volumes d éthanol glacial so 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.

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

Excepté pour la méthode utilisant l éthanol , le en tant qu extrait-18&PÇ. PEC et il est conservé

L utilisation de l éthanol comme extractant spécifiquement les polysaccharides des biomasses. Nous avons utilisé cette méthode afin de vérifier si d autres composés étaient extra

La quantité de boue Emmtec étant limitée , s été testées : la centrifugation , la résine échangeu 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 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 correspondant à la différence (PS –PSV).

II.4. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé et correspond au rapport des PS PEC/PS boue. Il permet de définir la qualité du 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 de

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 B₄). Chaque dosage a été réalisé en triplicats.

Tableau B₄. 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 ₄ 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 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

La analyse infrarouge détermine les groupements fonctionnels présents dans les échantillons de PEC. Les PEC ont tout d'abord été 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. La analyse infrarouge de la composition des spectres se fait par la corrélation de l'absorbance de groupement à 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 de

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 déminéralisation. Les granules ont ensuite été centrifugés deux fois à 500 tr.min⁻¹ pendant 5 min et le culot, composé des granules humides, a été récupéré.

2 mL de peroxyde d'hydrogène, chlorhydrique et acide 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 :

Ø une rampe de 5 min pour atteindre la puissance de 1 400 W

Ø une puissance de 1 400 W pendant 20 min

Ø 20 min de refroidissement de l'échantillon

Les échantillons ont ensuite été complétés 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 ets ad laboratoirerACMB s de 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 de eau déminéralisée afin d'éliminer les solubles qui pourraient former des précipités sont ensuite séchés à température ambiante et placés sur des lames de microscope.

Avant l'analyse microscopique, les lames ont une fine couche de métal ainsi formée permet de microscopique est faite grâce à un microscope à sonde 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 des PEC extraits à partir de biomasses granulaires anaérobies avec des éléments métalliques (Pb et Cd). Les constantes d'acidité ont été déterminées par titrage acido-basique puis une campagne d'analyses 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⁻¹ 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 (Normadose) grâce à un titrateur automatique. Le dosage se fait sous agitation permanente de l'échantillon après une phase de dégazage et après 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⁻¹ (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 a lieu quand forte variation du pH). Les paramètres utilisés sont une dérive du signal de 2 mV.min⁻¹ et un débit maximal de 5 mL.min⁻¹.

Les courbes de titrages ont ensuite été modélisées en utilisant le logiciel ProtoFit (Version 2.1) afin de déterminer le nombre de sites de fixation qui leur correspondent. Les paramètres sélectionnés sont une surface spécifique de 1 m².g⁻¹, le modèle

de adsorption électrostatique et le modèle de Davi
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 générant la meilleure corrélation. Le n
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 (set all 2004) j o u t d e
L'analyse polarographique GPES (General Purpose Electrochemical System) Manager Autolab. La méthode expérimentale est décrite ci-dessous.

Ø Conditions opératoires

Dans la cellule de mesure thermorégulée à 20 °C :

1 mL de 0,1 M r o l y t e , K N O

10 mL de tampon Hepes à 0,5 M et pH 7

10 mL d'eau déminéralisée

1 mL x t r a i t d e P E C

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

s o l u t i o n d e $Pb(NO_3)_2$ à 10^{-3} M

s o l u t i o n d e $Cd(NO_3)_2$ à 10^{-3} M

Ø Paramètres de mesure

m o d e p o l a r o g r a p h i q u e à g o u t t e d e m e r c u r e s t a t i q u e t o m b a n t e (S M D E)

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

t a i l l e d e s g e n é r a t e u r s d e m e r c u r e i n t

temps de chute de goutte de 1 s

S u i t e à u n e é t a p e d o p l a s o l u t i o n e s t a g i t é e e t s o u m i s e à u n e m p s d
b u l l a g e d a z o t a n t c h a q u e m e s u r e , t a f i n q u e l a s o r p t i o n d e s P E C e t d u
métal soit totale. Après chaque ajout, la mesure est réalisée en duplicat.

Lors de la sorption des PEC avec le métal libre, l'équation théorique de complexation entre les PEC et le métal masses qui suppose la formation de complexes 1:1 entre les PEC et le métal, peut être décrit par :



avec M : metal 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 de régression linéaire consiste à tracer $[M] = f([M_T])$ des derniers points de la courbe où le métal n'est plus fixé, 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 néanmoins, des 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 nombreux protocoles ont été développés. 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, ce qui rend donc difficile de comparer les différentes études. L'objectif de cette recherche a donc été de voir comment la composition des PEC issus de biomasses granulaires anaérobies est affectée par différentes méthodes. Nous avons sélectionné quatre boues granulaires anaérobies utilisées dans le traitement biologique des effluents. Nous avons ensuite testé plusieurs techniques d'extraction couramment utilisées dans la littérature afin d'évaluer l'efficacité de chacune à partir de ces biomasses. Nous avons ainsi comparé quatre protocoles (sonication, chauffage, résine échangeuse de cations avec et sans étape de sonication) et quatre protocoles d'extraction chimique (EDTA, EDTA avec 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 les extraits. 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 composées de liaisons chimiques au sein des extraits.

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

d A b z¹, Bordas, P¹, van Hullebusch, E. ², Lens, P.N.L. ³ and Guibaud G.^{1*}

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

paul.dabzac@etu.unilim.fr, francois.bordas@unilim.fr, gilles.guibaud@unilim.fr,

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

Eric.vanHullebusch@univ-mlv.fr

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

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 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 d'interagir avec les molécules des PEC et ainsi modifier leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. De plus, un composé comme l'EDTA affecte les résultats obtenus. Les échantillons de PEC extraits physiquement présentent, quant à eux, peu de différences sur le plan quantitatif. La forte densité des granules est alors une protection pour les cellules dans des conditions défavorables comme les conditions d'extraction des extraits de PEC, certaines méthodes tendent à extraire plus 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 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 organique des PEC.

La fraction organique des extraits de PEC est déterminée 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 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 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 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 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'Amé¹, François Bordas¹, Emmanuel Joussein¹, Eric van Hullebusch², Piet N. L. Lens³ and Gilles Guibaud^{1*}

¹Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, Université Limoges, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France, ²Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Environnement, 5 bd Descartes, 77454 Marne la Vallée Cedex 2, France, ³Sub-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

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, 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 non négligeable au sein des extraits de PEC 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 aucune 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 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 d'extraction a montré qualitativement et qualitativement la fraction minérale des extraits de PEC. Excepté les méthodes physiques modifient l'aspect des 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 éléments de la matrice polymérique. L'influence peut être également

l a i d e d e s o u d e m o d i f i e l e s c o n d i t i o n s d u
dissolution de certains complexes inorganiques et la formation de précipités lors de
l e x t r a c t i o n .

La fraction minérale des extraits de PEC est donc affectée à la fois par les caractéristiques de

l e f f l u e n t t r a i t é m a i s é g a l e m e n t p a r l e p r o t

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

Introduction

Les deux premières parties du travail de recherche ont porté sur la caractérisation de la teneur en 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 nous avons tenté d'identifier et de quantifier les fractions organiques et minérales des 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 bases et à la modélisation, à l'aide du logiciel ProtoFit, des courbes de sorption concentrées 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 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 les conséquences de la -à-vis des propriétés physico-chimiques qui peuvent attribuer aux PEC.

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

P a u l d, François Bordas^a, Eric van Hullebusch^b, Piet N.L. Lens^c and Gilles Guibaud^{a*}

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

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

^c 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. Les analyses montrent que les molécules organiques portent des groupements ionisables. La composition des PEC, et donc l'influence la quantité et les types de groupements dans les extraits de PEC. Les groupements identifiés tels que les fonctions carboxyles, amines ou encore hydroxyles sont à mettre en relation avec les extraits de PEC. Nous avons identifiés quatre groupes de pKa dans les 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 les 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 Pb^{2+} et Cd^{2+} à pH 7 montre que 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 influence la composition des PEC. Ainsi certaines extractions favorisent l'extraction de composés (protonés ou non) plus ou moins réactifs dans les mécanismes de sorption et modifier les propriétés des PEC. Les modifications structurales des PEC, telles que la modification de la conformation de la chaîne polymérique à l'hydrolyse des molécules ou les 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. 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 réactifs chimiques dans l'extraction des PEC affectent les propriétés des extraits. L'origine de la boue mais également la technique de prise en compte dans l'étude de ces paramètres affectent les propriétés des extraits de PEC. Cette partie des travaux a pour but de développer une technique d'extraction idéale pour l'étude et d'évaluer les conséquences possibles de l'extraction.

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

Les Polymères Extracellulaires : Composition, í

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 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. Dans le cadre 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 D₁). Les teneurs en lipides n'ont pu être déterminées par 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 dans les PEC. L'humique-like peut être due à l'âge beaucoup plus élevé 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 de culture sur la composition des PEC (Sponza 2002).

La Figure D₁ montre également qu'une partie de la composition des PEC n'a pas été caractérisée. Plusieurs explications

fraction non identifiée peut correspondre à des molécules organiques issues de l'effluent qui ont été piégées dans la matrice polymérique des granules et ont été extraites avec les PEC.

Cette fraction peut également être composée d'éléments non identifiés 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 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.

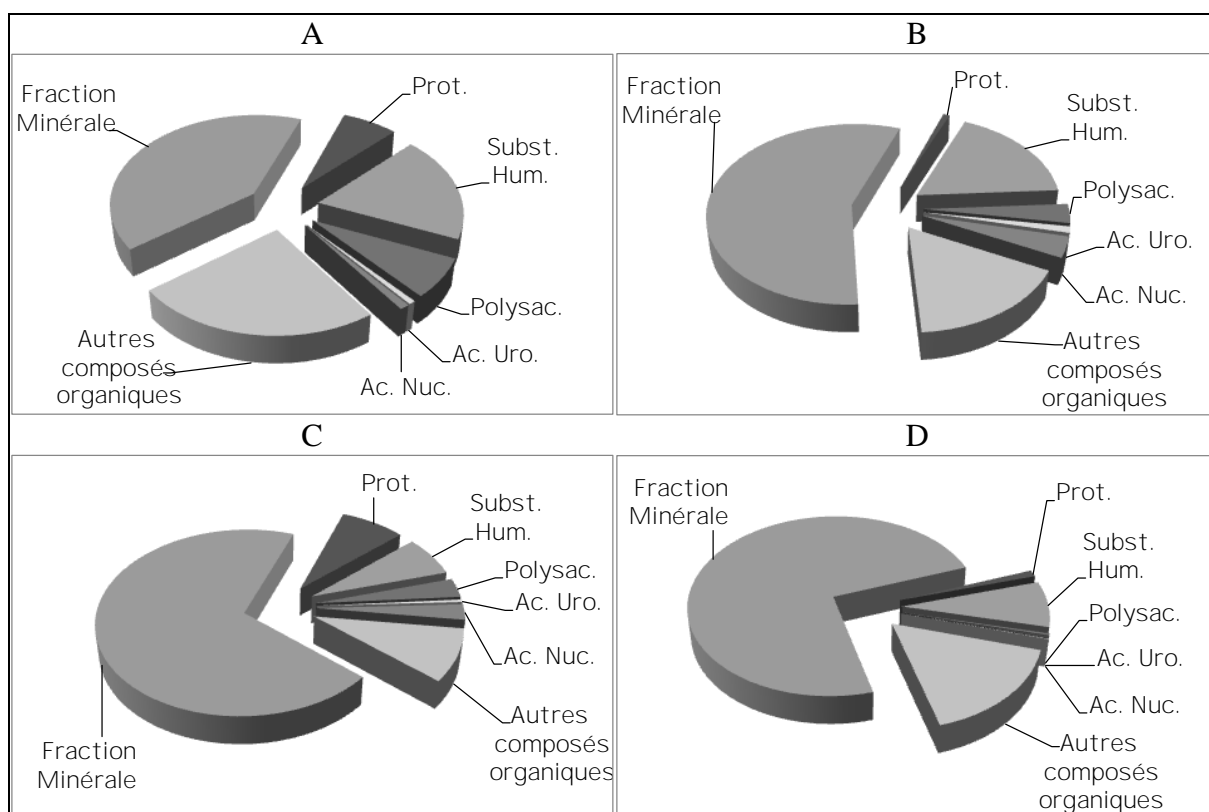


Figure D₁. Composition des échantillons de PEC extraits par centrifugation à partir des 4 boues granulaires anaérobies (A-Eerbeek ; B-Emmtec ; C-Nedalgo ; D-Revico) (répartition en % massique du PS)

Nos travaux ont également mis en évidence une fraction minérale non négligeable dans les extraits de PEC (Figure D₁) et ont permis sa caractérisation. Une analyse a 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 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ou 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 matrice. Donc la teneur des composés minéraux associée à la fraction minérale traitée. La composition 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, de hydroxyapatite ou encore de quartz. Différents facteurs du 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 affecte la formation 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 biomasses a toutefois permis en évidence qu'une partie de la fraction minérale 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. PEC regroupe donc les propriétés physico-chimiques des fractions organiques et minérales. Cette fraction minérale n'a jamais été considérée dans la définition des PEC, 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, elle doit être prise en compte dans la définition et les propriétés des PEC. Toutefois, les résultats obtenus sur la fraction minérale dans des échantillons de biomasses ne permettent pas de pouvoir tirer des conclusions plus générales.

1 Extraction

L'extraction est une étape indispensable dans l'analyse d'un grand nombre de protocoles, que ce soit pour la technique d'extraction par solvant ou par extraction à l'eau. Le manque de protocole de référence d'extraction nécessite la comparaison de l'efficacité de l'extraction. Pour l'extraction de PEC à partir des biomasses granulaires anaérobies, nous avons testé neuf de ces méthodes couramment utilisées dans la littérature, par laquelle on considère que la méthode de « contrôle » notamment pour l'analyse d'un d'analyse cellulaire anormal durant l'extraction, que la technique d'extraction affecte la composition des PEC (Wingender *et al.* 1999; Liu et Fang 2002b; Comte *et al.* 2006c) et nos résultats le confirment (Figure D₂). La fraction organique mais également la fraction minérale diffèrent quantitativement et qualitativement en fonction de la méthode utilisée. Nos travaux ont montré que les protocoles d'extraction qui donnent les plus grandes quantités de PEC. Toutefois, nous avons obtenu des valeurs anormalement élevées pour le rendement d'extraction (> 100 g⁻¹%) et pour la fraction de PS) dans certains de ces extraits de PEC. Ces résultats confirment la contamination des échantillons par les réactifs chimiques utilisés lors de l'extraction. Ces réactifs chimiques se retrouvent dans les extraits de PEC (Figure D₂.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 les granules limitent les effets de ces techniques. Ces travaux ont également montré que certaines méthodes favorisent l'extraction de PEC, ce qui affecte la représentativité des extraits vis-à-vis des PEC dans la granule. La fraction minérale dans les extraits de PEC est également affectée. Ainsi, certains protocoles par lesquels on extrait les PEC (résine échangeuse de cations, soude, EDTA, éthanol) ont un impact direct sur la composition des PEC extraits en raison de la présence de réactifs chimiques ou de la résine. L'utilisation d'une résine échangeuse de cations (RCC) pour éliminer les ions Mg²⁺ et de cations métalliques par la résine, diminuant significativement les teneurs de ces composés dans les extraits.

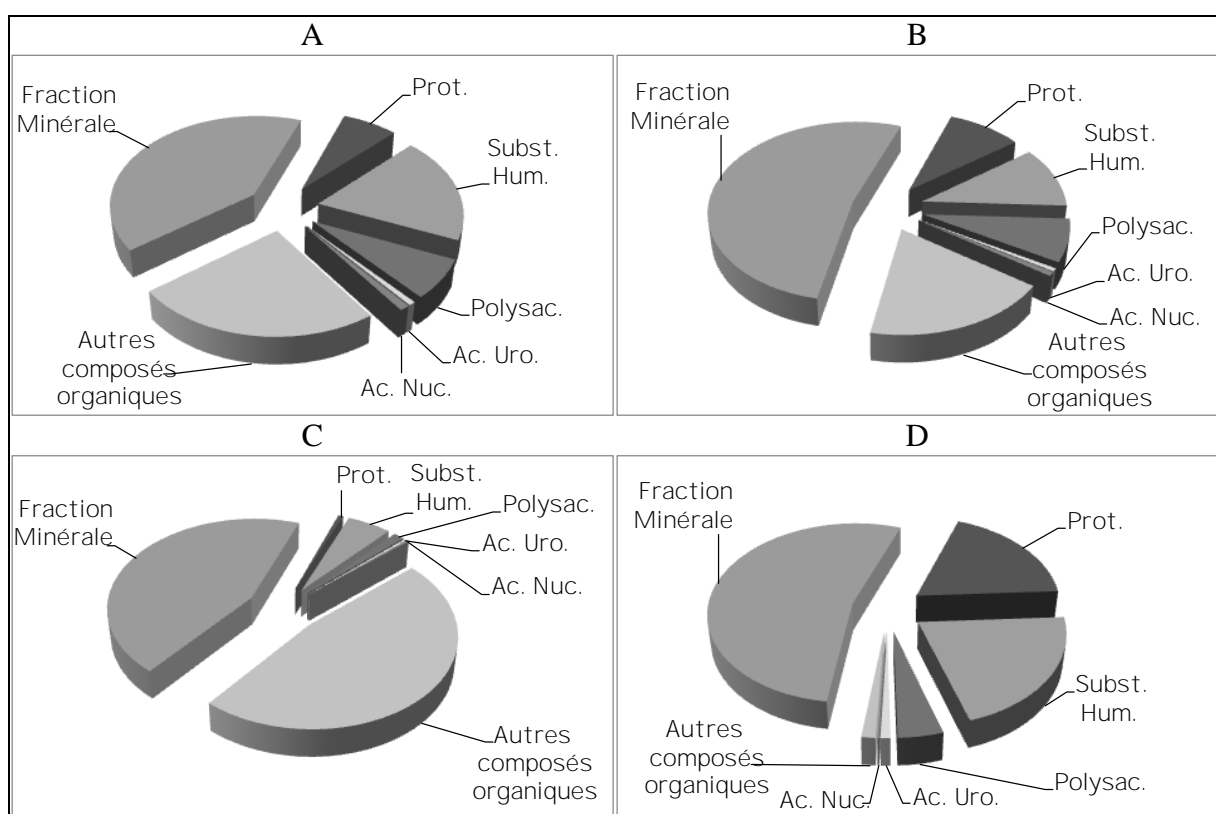


Figure D2. Composition des échantillons de PEC extraits par (A) centrifugation, par (B)

TGE, par (C) E + nøGFVC, par (D) nøGFVC + nøcuvkcvkq Erbeek (répartition en % massique du PS)

Dans la plupart des études sur les PEC, l'efficacité des techniques de rendement d'extraction et la détection de la méthode. Dans notre cas, suite aux différents taux de lyse cellulaire anormal. Pourtant, utilisées (e.g. chauffage...) sont connues pour provoquer dans les boues activées et le surnatant des ms. Ces granules de la biomasse qui est un moyen de protection pour les cellules. Notre étude a également montré que la présence des réactifs chimiques dans les extraits, la représentativité des extraits vis-à-vis des PEC de la biomasse originale et la fraction minérale.

Ø Le développement d'une méthode d'extraction par paramètres deffic, applicable aux différents types de biomasse à l'ab l afin de pouvoir comparer les résultats.

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

La dernière partie de nos travaux est l'étude de la synthèse bibliographique a montré que cette sorption est liée aux interactions possibles entre les groupements fonctionnels des molécules. 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 qu'il y a des associations distinctes entre ces différents groupements dans les extraits de PEC :

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

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

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

Ø Les pK_{a3} et pK_{a4} (~ 10) étant très proches, ils peuvent être attribués aux groupements amines des protéines et des acides, et des 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 de fixation des protons qui leur sont liées sont associées à la boue et de la technique. En effet, ces deux paramètres ne peuvent pas affecter les teneurs des différentes molécules organiques des PEC modifiant ainsi les propriétés de l'extrait. La corrélation simple entre les propriétés acido-basiques déterminées et la composition des molécules. Un autre paramètre à prendre en compte est la contamination des extraits par les réactifs chimiques, ce qui peut modifier les capacités de sorption des PEC. En effet, les complexes formés entre

d'autres composés aux sites de fixation à compétition entre les espèces (e.g. formaldéhyde). De plus, certains 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'élution et présents dans les extraits de PEC ont des propriétés complexantes (e.g. EDTA) qui peuvent affecter les propriétés de l'extrait et celle liée aux sites de fixation des EM.

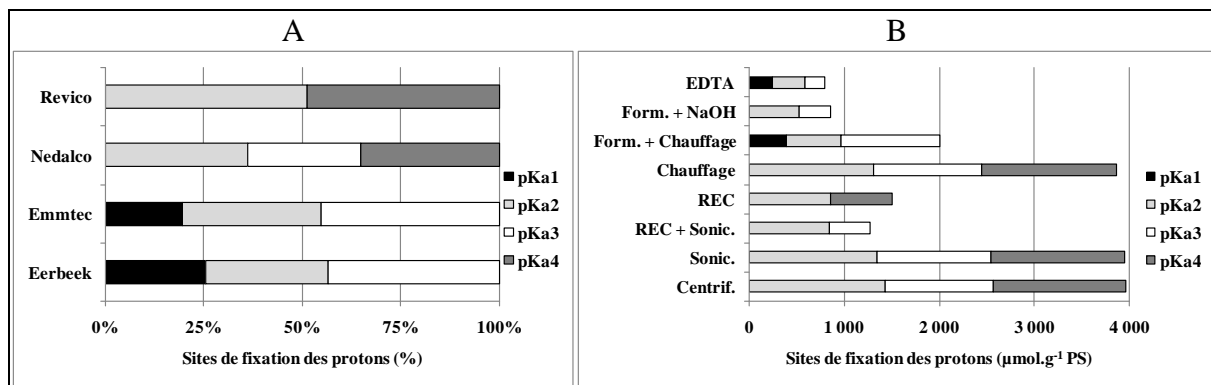


Figure D3. Ratios des sites de fixation des protons en fonction du pK_a qui leur correspondent dans les échantillons de PEC extraits par centrifugation (exprimé en %) (A) et nombre de sites de fixation des protons dans les échantillons de PEC extraits à partir de la boue Nedalco (exprimé en $\mu\text{mol.g}^{-1}$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

Dans les extraits, nous avons mis en évidence... 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 (Na^+ , K^+) et les EM pour atteindre les sites de fixation des PEC. La présence de sels provoque également la formation de complexes entre les 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 l'échange d'ions (le cation mé... structure de la particule) (Al-Degs *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2008). De plus, diverses études ont montré, lors d'études de sorption, que le maximum de sorption est atteint avec de

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 engendre une augmentation de la sorption de 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 particularité dans la caractérisation de la fraction minérale. 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 de ces sulfures qui sont éventuellement séparés des PEC lors de la centrifugation. Dans un environnement aérobiose, ce qui a pu conduire à l'oxydation.

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. Il a été observé 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 D₄. Dans ces extraits, les réactifs chimiques sont absents et n'affectent donc pas les résultats obtenus. Cependant, pour certains échantillons de PEC extraits par une étape de chauffage (points entourés sur la Figure D₄) montrent que cette technique peut affecter les propriétés des extraits. En effet, la hydrolyse des molécules à forte température

conformation (McSwain *et al.* 2005), ce qui peut engendrer une disponibilité des EM aux sites de fixation des PEC. Bien que les points relatifs à cette technique d'extraction soient 4, présentés dans la Figure 4, il est possible de déterminer la courbe de tendance.

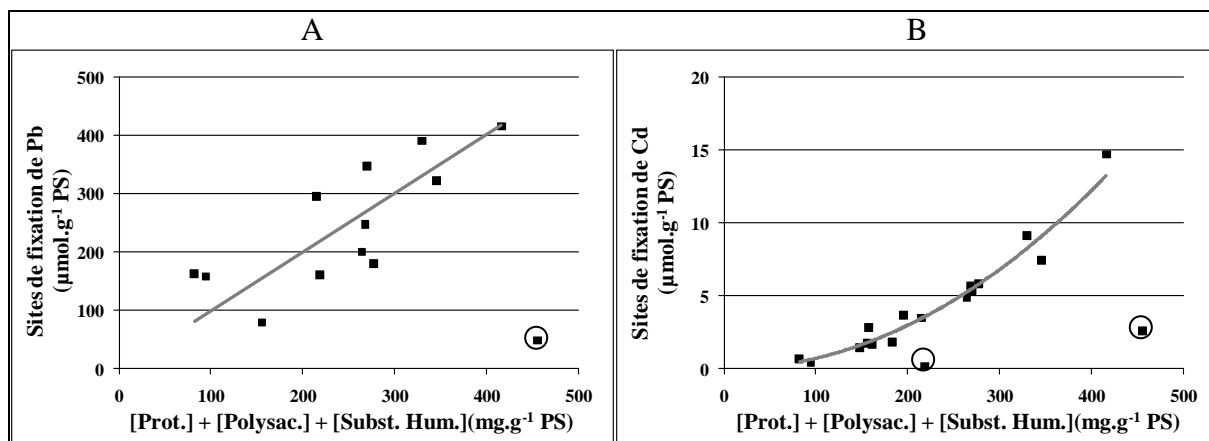


Figure D4. Nombre de sites de fixation de Pb (A) et Cd (B) en fonction de la somme des teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like dans les échantillons de PEC extraits par les méthodes physiques des 4 boues granulaires (exprimé en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ PS) (courbe grise : courbe de tendance)

Concernant les autres méthodes de dosage, la proportionnalité à la composition des extraits est plus marquée. À une concentration des PEC de 200 mg.g^{-1} PS, le nombre de sites disponibles pour le métal augmente faiblement. Puis, au-dessus de 200 mg.g^{-1} PS, le nombre de site augmente plus fortement. Ce phénomène peut être dû à l'implication de différents phénomènes de sorption. Le cadmium est connu pour avoir une faible affinité avec les PEC, comparé à d'autres éléments minéraux (Pb, Ca, Zn, Fe...). En augmentant les teneurs en protéines, polysaccharides et substances humiques-like, la compétition entre les différents éléments minéraux défavorise la fixation des ions 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 des molécules organiques engendre des phénomènes de microfloculation engendrant une augmentation de la fixation du cadmium (Sun *et al.* 2009). La tendance dans le cas du cadmium est 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 phénomènes de sorption lors de la campagne d'analyses polarographiques concernées.

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 (t), puis, dans un deuxième temps, la sorption du plomb augmente fortement (u). Enfin, la sorption diminue lentement jusqu'à ce que les PEC soient occupés (v). Deux paramètres entrent en jeu pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, la faible sorption initiale de plomb est due à la présence d'éléments minéraux présents dans l'extrait de boue en faibles quantités, puis, quand la quantité de plomb augmente, cela 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.

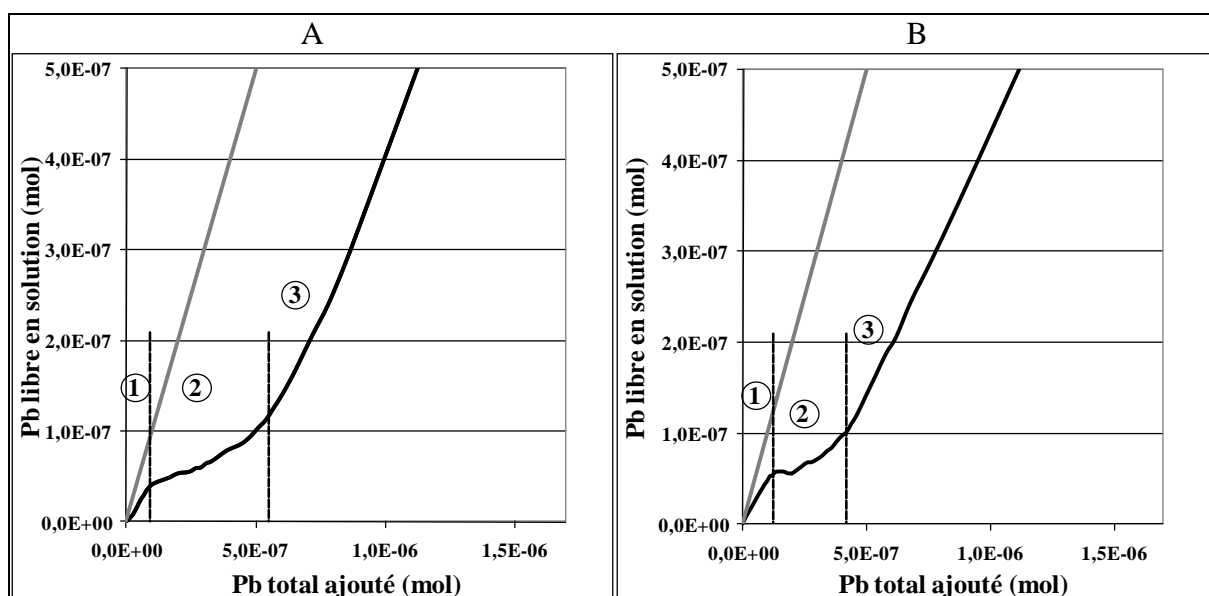


Figure D5. Quantité de Pb libre en solution (mol) dans la cellule de mesure, déterminée par polarographie, en fonction de la quantité totale de Pb ajoutée dans la cellule (mol) avec (courbe noire) ou sans (courbe grise) PEC (extraits par (A) REC de la boue Eerbeek et (B) chauffage de la boue Revico) (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'absence de sorption de plomb par les PEC. Ainsi, les méthodes d'extraction chimique ne sont pas adaptées pour caractériser 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 de mesure. 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 connus sur l'importance de chaque mécanisme dans l'ensemble. Bien qu'elle soit difficile en raison des nombreux paramètres (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 de la composition des extraits et sur leurs propriétés. Ce travail de thèse a confirmé le problème engendré par le manque de technique de référence de extraction, soulignant la difficulté de comparaison des résultats obtenus suite aux diverses extractions. Toutefois, il n'existe pas encore de méthode standardisée permettant d'obtenir un extrait représentatif qualitativement et quantitativement des PEC de la biomasse et de leurs propriétés physico-chimiques et n'induisant pas de contamination chimique et des composés inorganiques. Toutefois, il existe de nombreuses informations différentes sur les PEC. L'utilisation d'un fractionnement des PEC suivant le paramètre étudié et combinant plusieurs méthodes semble donc plus appropriée pour l'étude des PEC. Il est important d'affecter les analyses dans la suite de l'étude en tenant compte de 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 Pb²⁺ and Cd²⁺ 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., Sibler 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.

G a t s o s X . , P e r r y A . J . , A n w a r i K . , D o l e z a l
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.
- Hoang 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⁺ and Cd²⁺ 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 ¹³C 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-

R a s M . (2 0 0 8) . M i s e a u p o i n t e t v a l i d a t i o n
Polymériques Extracellulaires : Application à la caractérisation d'agrégats
issus des procédés de traitement des eaux
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 Zn²⁺ and Co²⁺ 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 CaCO₃ morphology and polymorphism. *Chemical Geology* 262(3-4): 138-146.

Tourney J., Ngwenya B.T., Fred Mosselms 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). Bioflocculation 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 CaCO₃ 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 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 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, ¹³C-NMR, ¹H-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 Cd²⁺ 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

P e v e r e A . , D A b z a c P . , V a n H u l l e b u c h E . , L e
feeding on viscosity evolution of anaerobic granular sludges, *Water Science and Technology*,
62, 132-139, (*Impact factor 2008 : 1,005*).

D A b z a c P . , B o r d a s F . , V a n H u l l e b u c h E . , L e
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 A b z a c P . , B o r d a s F . , J o u s s e i n E . , V a n H u l
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 A b z a c P . , B o r d a s F . , V a n H u l l e b u c h E . , L e
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

G u i b a u d G . , V a n H u l l e b u c h E . , J o u s s e i n E . , (2009) S o r p t i o n o f
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*).

S i m o n S . , P a i r o B . , V i l l a i n M . , D A b z a c P . ,
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

G u i b a u d G . ; B o r d a s F . ; S a a i d A . ; D A b z a c P .
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., 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., 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., Peverre A., Guibaud G., Joussein E., Lens P. N. L., Les techniques d'extraction sur la composition des EPS. – 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

Peverre A., D Abzac P., van Hullebusch E., Lens P. N. L., Effect of 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., 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 physiques et chimiques, mais aucune méthode de référence n'a été développée. Ce travail a été réalisé pour identifier l'influence de plusieurs propriétés de sorption des PEC issus de boues granulaires anaérobies. Les techniques chimiques permettent d'extraire de 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 utilisée. Les PEC sont extraits 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 doivent être pris en compte lors de l'étude des propriétés des PEC.

Mots clés

Polymères extracellulaires (PEC), boues granulaires anaérobies, 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