



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE Henri POINCARÉ, NANCY I
-1995-

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
 le 27 Octobre 1995

en vue d'obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I

Mention CHIMIE ET MICROBIOLOGIE DE L'EAU

par

Mr Frédéric JORAND



Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies "Chimie et Microbiologie de l'Eau"

Sujet :

STRUCTURE ET PROPRIETES
HYDROPHOBES DES AGREGATS
BACTERIENS DE BOUES ACTIVEES

MEMBRES DU JURY

- Président : BOTTERO J.Y. (Directeur de Recherche CNRS, U.R.A.132, Université d'Aix - Marseille III, Les Milles, France)
- Juges : KEIDING K. (Professeur, Université d'Aalborg, Danemark)
 MANEM J. (Docteur, CIRSEE, Lyonnaise des Eaux, Le Pecq, France)
 BLOCK J.C. (Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy 1, France)
- Rapporteurs : FONTVIEILLE D. (Professeur, Université de Savoie, Chambéry, France)
 NIELSEN P.H. (Professeur, Université d'Aalborg, Danemark)
 VERSTRAETE W. (Professeur, Université de Gent, Belgique)



104 026561 4

Membres du personnel enseignant

DOYENC. VIGNERON

VICE DOYENG. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey
M. BAGREL Alain
Mlle BATT Anne Marie
M. BLOCK Jean Claude
M. BONALY Roger
Mme FINANCE Chantal
Mlle GALTEAU Marie Madeleine
M. HOFFMAN Maurice
M. JACQUE Michel
M. KERGOSIEN Yannick
M. LABRUDE Pierre
M. LALLOZ Lucien
M. LECTARD Pierre
M. LEMAY René
M. LOPPINET Vincent
M. MAINCENT Philippe
M. MARSURA Alain
M. MARTIN Jean Armand
M. MORTIER François
M. NICOLAS Alain
Mme SCHWARTZBROD Janine
M. SCHWARTZBROD Louis
M. SIEST Gérard
M. VIGNERON Claude

Pharmacodynamie
Biochimie fondamentale et clinique, biotechnologies
Toxicologie
Santé et Environnement
Biochimie microbienne
Microbiologie moléculaire
Biochimie
Pharmacie clinique
Pharmacodynamie
Mathématiques - Biophysique
Physiologie
Chimie Organique
Biologie végétale et Cryptogamie
Droit et économie pharmaceutique
Chimie thérapeutique
Pharmacie galénique
Chimie thérapeutique
Chimie minérale et Minéralogie
Pharmacognosie
Chimie analytique et Bromatologie
Bactériologie - Parasitologie
Virologie - Immunologie
Chimie biologique
Hématologie

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M.	BAVEYE Philippe	Santé - Environnement
M.	BODMEIER Roland	Pharmacie Galénique
Mle	CHARGOIS Anne	Pharmacologie
M.	O'KANE Maurice	Biochimie
M.	SHUVAEV Vladimir	Biochimie
Mme	STOJANOV Marina	Biochimie Clinique
Mme	STREIBLOVA Eva	Biochimie microbienne
M.	VAN STRALEN Paul	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen - Sûreté industrielle
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme	HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie clinique
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LARTAUD Isabelle ép. IDJOUADIENE	Pharmacologie
Mme	LEININGER MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE OU INVITE

M.	PURI Rajesh	Biologie cellulaire
----	-------------	---------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	AZRIA	Pharmacologie
M.	BARADEL	Conseils vétérinaires
Mme	BLOCH	Gynécologie
M.	CAMUZEUX	Maintien à domicile
M.	CHARPIGNON	Gestion, commercialisation
M.	DANOUX	Comptabilité
M.	DEMANGE	Pharmacie clinique
M.	DOUCHE	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	EVARD	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	FRANCAIS	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	GABLE	Maintien à domicile
M.	GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme	GILGENKRANTZ	Génétiq
M.	HACHET	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	JACQUOT	Assurance - qualité
M.	JOUAULT	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	LABAEYE	Audiologie
M.	LAMOTTE	Physique (acoustique)
M.	LE FLOC'H	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M.	LEVIN	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	LOUIS	Séméiologie
Mle	MANGIN	Pharmacie clinique
M.	MAUARY	Séméiologie
M.	MAY	Maladies infectieuses
M.	NICOLAY	Anatomie
M.	PARDON	Services de la Distribution pharmaceutique
Mle	PICAUT	Pharmacie clinique
M.	RENAUX	Secourisme
M.	RETOURNARD	Electronique
M.	ROLLET	Secourisme
M.	ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M.	SIMON	Audiologie
M.	TRECHOT	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
M.	TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle	WOLF	Services de la Distribution pharmaceutique

Merci !

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Claude Block pour la confiance qu'il a su exprimer en m'accueillant dans son laboratoire. Son enthousiasme et son dynamisme ont été, et restent sans doute pour tous les chercheurs, le plus fort des stimulants. Son esprit critique et sa rigueur scientifique sont des qualités que je m'efforcerai toujours de suivre. Je tiens à lui exprimer ici ma plus profonde reconnaissance.

Merci à Monsieur Jean-Yves Bottero, pour sa précieuse collaboration et pour le soutien qu'il m'a apporté. Merci d'avoir traversé la France et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Jacques Manem qui a rendu possible cette étude et qui a accepté de la juger. Merci aussi pour ces délicieuses réunions du groupe STEP 2000.

Je tiens à remercier Messieurs Kristian Keiding et Per Halkjær Nielsen pour leur contribution et pour leur accueil chaleureux au sein de leur laboratoire au Danemark. Ils auront apporté l'éclairage nouveau et indispensable nécessaire à la continuité de cette étude.

Merci d'avoir accepté d'être juge et correcteur de ce travail.

Que Messieurs les Professeurs Willy Verstraete et Dominique Fontvieille trouvent ici l'expression de ma considération pour avoir accepté le rôle de correcteur.

A Vincent Urbain, qui m'a initié à "plonger avec délices dans les méandres du floc biologique", je tiens à exprimer toute ma gratitude. J'ai plongé, nagé, exploré et voici le fruit de ces explorations. Le tout était de ne pas s'y noyer ! J'espère y être parvenu.

Merci Vincent pour l'intérêt que tu as sans cesse montré pour ce travail, pour le rôle assidu de correcteur, et de juge, que tu as joué durant ces quatre années.

Mes remerciements vont également à Fabien Thomas pour m'avoir initié aux joies de la granulométrie laser et pour les savants conseils qu'il m'a prodigué tout au long de cette étude.

Merci aussi à tous les chercheurs avec qui j'ai eu l'honneur, le plaisir et la chance de collaborer et en particulier à Florence Zartarian (merci pour les clichés photographiques), à Pascal Guicherd, Frédéric Boué-Bigne, Rikke Palmgren et Abdel Guellil à qui je souhaite le plus grand succès dans ses futures pérégrinations "hydrophobes".

Merci à Gérard Grapin, pour ses explications concernant l'hydraulique et la gestion du réacteur pilote de Maxéville et merci à Sandrine Tricheler pour sa précieuse collaboration.

Merci enfin à la joyeuse équipe du LSE dont l'esprit de solidarité a été un des plus riches soutiens. Merci donc à Barnabé, Sylvain, Sandrine, Anne, Virginie, Sébastien, Abdel et Vincent, du "service actuel", mais aussi à Fafa, Lolo, Vincent, Gégé, Laurent, Carole, Marie-Laure, de "l'ancien service". Je ne saurais terminer sans oublier de remercier la bonne humeur quotidienne de Monique.

En dernier lieu, je tiens à associer ma Mère à ces remerciements pour avoir accepté le travail ingrat de relecture du manuscrit.

Cette étude a bénéficié d'un financement de la société Lyonnaise des Eaux et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



A Alex et sa Maman



TABLE DES MATIERES

Résumé.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	3
Liste des abréviations	6
I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I.1. Présentation du procédé d'épuration par "boues activées".....	10
I.2. Caractérisation microbiologique et physico-chimique des boues activées.....	11
I.2.1. Analyse microbiologique.....	11
I.2.1.1. Les micro-organismes eucaryotes des boues activées.....	11
I.2.1.2. Les micro-organismes procaryotes des boues activées.....	13
I.2.2. Composition physico-chimique globale des boues activées	17
I.2.3. Les polymères exo-cellulaires.....	19
I.2.3.1. Origine des polymères exo-cellulaires.....	19
I.2.3.2. Les techniques d'extraction des polymères exo-cellulaires	20
I.2.3.3. Caractérisation chimique des polymères exo-cellulaires	21
I.2.3.3.1. Analyse élémentaire des exo-polymères	21
I.2.3.3.2. Les différents groupes de macromolécules	22
I.2.3.4. Analyse du poids moléculaire des exo-polymères	30
I.2.4. Organisation générale des floccs de boues activées	31
I.2.4.1. Structure générale.....	31
I.2.4.2. Forme des floccs	32
I.2.4.3. Propriétés physiques.....	33
I.2.4.3.1. Taille et distribution granulométrique des floccs	33
I.2.4.3.2. Surface	35
I.2.4.3.3. Porosité et teneur en eau	35
I.2.4.3.4. Densité.....	36
I.2.4.3.5. Transfert de masse.....	36
I.2.4.3.6. Force de cohésion	36
I.2.5. Décantabilité des agrégats.....	37
I.2.5.1. Vitesse de décantation des floccs	38
I.2.5.2. Les tests de décantabilité.....	38
I.2.5.2.1. L'indice de Mohlman (SVI).....	38
I.2.5.2.2. L'indice de boue avec dilution (DSVI).....	39
I.2.5.2.3. L'indice de boue avec agitation douce (SSVI)	40
I.2.5.2.4. L'indice de qualité de boue (SQI).....	40
I.3. Propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires microbiennes.....	43
I.3.1. L'effet hydrophobe : approche thermodynamique	43
I.3.2. Description de la surface cellulaire des micro-organismes	44
I.3.2.1. Notion de balance hydrophobe/hydrophile	44
I.3.2.2. Répartition des zones hydrophobes à la surface des cellules.....	44
I.3.2.3. Les composés cellulaires hydrophobes de la surface bactérienne.....	46
I.3.3. Les tests de mesure des interactions hydrophobes	50
I.3.3.1. Le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (TAMH)	50
I.3.3.2. Le test d'agrégation saline (TAS).....	52
I.3.3.3. La mesure de l'angle de contact (MAC).....	53
I.3.3.4. La chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH).....	53
I.3.3.5. Adhésion à un solide hydrophobe.....	53
I.3.3.6. Technique de partage de deux phases liquides (TPP).....	53
I.3.3.7. Marquage par des sondes moléculaires hydrophobes.....	54
I.3.3.8. Comparaison des techniques	54
I.3.5. Hydrophobicité des agrégats bactériens.....	56
I.3.5.1. Apport de l'hydrophobicité dans le phénomène d'adhésion/floculation.	56
I.3.5.2. Effet de l'hydrophobicité sur les propriétés des agrégats.....	57
I.3.6. Effets de l'environnement sur l'hydrophobicité des cellules.....	59
I.3.6.1. Variation au cours de la croissance.....	59
I.3.6.2. Effet de la composition du milieu de culture.....	62
I.4. Les propriétés de biosorption des floccs.....	63
I.5. Références.....	66

II. ORGANISATION DES AGREGATS DE BOUES ACTIVEES.....	74
II.1. Introduction générale.....	75
II.2. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs.....	76
II.2.1. Introduction.....	76
II.2.2. Materials and methods.....	77
II.2.3. Results.....	79
II.2.4. Discussion.....	88
II.2.5. References.....	93
II.3. Effet de l'EDTA et des ultrasons sur l'extraction des polymères exo-cellulaires.....	95
II.3.1. Introduction.....	95
II.3.2. Matériel et méthodes.....	95
II.3.3. Résultats.....	97
II.3.4. Discussion.....	99
II.3.5. Conclusion.....	101
II.3.6. Références.....	101
II.4. Conclusion générale.....	102
III. CARACTERISATION HYDROPHOBE/HYDROPHILE DES POLYMERES EXO-CELLULAIRES DE BOUES ACTIVEES.....	103
III.1. Introduction.....	104
III.2. Matériel et méthodes.....	106
III.2.1. Prélèvement et caractérisation des échantillons.....	106
III.2.2. Extraction des exo-polymères.....	106
III.2.3. Caractérisation chimique des exo-polymères.....	107
III.2.4. Fractionnement des exo-polymères.....	107
III.2.4.1. Précipitation des exo-polymères.....	107
III.2.4.2. Adsorption par les résines XAD.....	108
III.3. Résultats.....	110
III.3.1. Caractérisation globale des échantillons de boues activées.....	110
III.3.2. Courbes de percée des résines XAD par les PEC solubles.....	110
III.3.3. Fractionnement des PEC.....	112
III.4. Discussion.....	115
III.5. Conclusion.....	117
III.6. Références.....	117
IV. ADSORPTION DE LA MATIERE ORGANIQUE DES EAUX USEES PAR LES FLOCS BACTERIENS.....	119
IV.1. Introduction.....	120
IV.2. Caractérisation hydrophobe/hydrophile de la matière organique soluble des eaux usées.....	121
IV.2.1. Introduction.....	121
IV.2.2. Matériel et méthodes.....	122
IV.2.2.1. Prélèvements.....	122
IV.2.2.2. Conditionnement des résines Amberlites.....	122
IV.2.2.3. Dosage du carbone organique dissous.....	123
IV.2.2.4. Mesure de l'absorbance aux UV.....	123
IV.2.2.5. Fractionnement de la matière organique dissoute.....	123
IV.2.3. Résultats.....	124
IV.2.3.1. Mise en évidence de l'absence de fraction précipitée à pH acide.....	124
IV.2.3.2. Analyse d'une courbe de percée.....	125
IV.2.3.3. Fractions hydrophobes et hydrophiles.....	126
IV.2.4. Discussion.....	129
IV.3. Propriétés de biosorption des flocs de boues activées.....	131
IV.3.1. Introduction.....	131
IV.3.2. Matériel et méthodes.....	131
IV.3.2.1. Prélèvements des échantillons.....	131
IV.3.2.2. Caractérisation des échantillons.....	131
IV.3.2.3. Concentration des boues.....	132
IV.3.2.4. Dosage des matières en suspension dans les influents.....	132
IV.3.2.5. Mesure de la biosorption.....	132
IV.3.2.6. Estimation des paramètres cinétiques de la biosorption.....	134
IV.3.3. Résultats.....	135
IV.3.3.1. Caractéristiques des échantillons de boues activées.....	135

IV.3.3.2. Effet de la charge sur la biosorption.....	136
IV.3.3.3. Effet de la température et du stockage des échantillons sur la biosorption.....	137
IV.3.3.4. Biosorption et caractéristiques physico-chimiques des boues.....	138
IV.3.4. Discussion.....	139
IV.4. Conclusions et perspectives	141
IV.5. Références.....	141
V. DYNAMIQUE DU FLOC.....	143
V.1. Introduction.....	144
V.2. Variation des caractéristiques du floc en réacteur fermé ("Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria")	145
Abstract.....	146
Introduction.....	146
Materials and methods.....	147
Activated sludge sampling and characterization.....	147
Exopolymer extraction and measurement	147
Octane adhesion test	147
Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains	148
Effect of glucose on the settlement of activated sludge.....	148
Hydrophobicity variation in pure strains during growth	149
Results and discussion	149
Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains of activated sludge.....	149
Effect of glucose on sludge settleability.....	151
Hydrophobicity variation of pure strains during growth	152
References	154
V.3. Variation des caractéristiques du floc en réacteur continu.....	156
V.3.1. Introduction.....	156
V.3.2. Matériel et méthodes.....	157
V.3.2.1. Prélèvement des échantillons.....	157
V.3.2.2. Description du réacteur pilote.....	157
V.3.2.4. Mesure des paramètres	158
V.3.2.5. Observation microscopique des boues	158
V.3.2.6. Analyse statistique.....	158
V.3.3. Résultats	158
V.3.3.1. Caractéristiques générales des boues du pilote.....	158
V.3.3.2. Variation des propriétés de décantation	163
V.3.3.3. Les polymères exo-cellulaires.....	164
V.3.3.4. Variation de l'hydrophobicité intrafloc	164
V.3.4. Discussion.....	166
V.4. Conclusion.....	168
V.5. Références.....	169
CONCLUSION GENERALE.....	170
ANNEXES	173



RESUME

La phase secondaire du traitement des eaux usées par le procédé dit à "boues activées" consiste à séparer par sédimentation la biomasse en suspension de l'eau épurée. L'efficacité de cette étape dépend principalement de la structure physico-chimique des agrégats microbiens ou "flocs". Excepté le développement excessif des micro-organismes filamenteux, les facteurs qui affectent l'organisation de cette structure sont mal connus. L'objectif de cette étude est d'apporter des informations nouvelles quant à la structure des flocs et de rechercher les facteurs qui conduisent à la formation d'agrégats denses facilement sédimentables. L'enjeu est de parvenir à maîtriser la phase de séparation eau-biomasse du traitement biologique des eaux usées.

D'après l'analyse bibliographique les interactions hydrophobes apparaissent clairement comme un facteur clé dans la formation et la cohésion des agrégats microbiens. Par conséquent, l'hydrophobicité a été le fil conducteur de cette étude.

Le manuscrit est présenté selon cinq chapitres. Le chapitre I est une **analyse bibliographique** qui rassemble les données actuelles sur la structure et les propriétés des agrégats biologiques et sur l'hydrophobicité de surface des micro-organismes.

Le chapitre II traite de l'**organisation des agrégats bactériens**, il décrit au travers d'un modèle l'arrangement des différentes particules et des polymères qui composent le floc.

Dans le chapitre III une **caractérisation des propriétés hydrophobes et hydrophiles des polymères exo-cellulaires** est obtenue.

Le chapitre IV discute des **propriétés d'adsorption de la matière organique des eaux usées par les boues activées** en relation avec leur hydrophobicité.

Enfin, le chapitre V traite de la **dynamique du floc** où les variations des propriétés hydrophobes/hydrophiles des boues activées sont suivies.

Les points essentiels apportés par ces différents chapitres sont les suivants :

Des mesures de granulométrie par diffraction laser, des observations au microscope électronique de coupes de flocs, une étude des cinétiques de relargage des polymères exo-cellulaires et de destruction des flocs par ondes ultrasonores fournissent des informations capitales sur la structure des agrégats de boues activées. Ces agrégats ont une dimension très variable mais une population de "macroflocs" dont la distribution de la taille est centrée autour de 125 µm de diamètre domine. Les macroflocs sont formés par l'assemblage de "microflocs" d'une dizaine de micromètres eux-mêmes constitués de particules plus petites correspondant aux cellules microbiennes. L'étude de la distribution des micro-organismes au sein des agrégats indique que les microflocs proviennent probablement de micro-colonies bactériennes. En outre, contrairement aux macroflocs, la cohésion des microflocs est particulièrement élevée. Cette organisation particulière des agrégats de boues

activées suppose alors que l'intégrité d'une part des macroflocs et d'autre part des microflocs est assurée par différents types de polymères exo-cellulaires.

L'étude des propriétés hydrophobes/hydrophiles des polymères exo-cellulaires extraits des boues activées montre, par une technique de filtration au travers de résines non ioniques, qu'au moins 6 à 8 % (mesurées par dosage du carbone organique dissous) de ces polymères présentent un caractère hydrophobe. En outre, 50 % des polymères précipitent à pH acide (pH = 2). La présence d'une large quantité de glycoprotéines est suggérée par la nature à la fois protéique et glucidique de cette fraction précipitable. Ces observations renforcent l'idée que des hétéropolymères amphiphiles participent à la matrice du floc.

L'analyse de la composition des eaux usées, toujours par filtration au travers de résines non ioniques, indique que 40% des molécules (mesurées par dosage du carbone organique dissous) présentent un caractère hydrophobe et que deux tiers environ de ces molécules sont éliminés par le traitement d'épuration. La capacité des flocs à éliminer par adsorption la matière organique dissoute est estimée en appliquant au laboratoire un test sur une dizaine d'échantillons de boue, qui montre que 60 % du carbone organique dissous peut être éliminé de la phase eau en 1 h à + 4°C. Ces résultats amènent à penser que l'élimination de la pollution dissoute par des phénomènes d'adsorption, où l'effet hydrophobe semble fortement impliqué, doit être considérée comme une des voies essentielles du procédé d'épuration biologique des eaux usées.

L'analyse microbiologique montre qu'au sein des agrégats de boues activées, pourtant largement hydratés, coexistent des bactéries présentant des surfaces hydrophobes et d'autres présentant des surfaces hydrophiles. L'hydrophobicité de certaines des souches est variable au cours de la croissance, les plus fortes variations s'observent généralement durant la phase exponentielle de croissance et sont liées à la disponibilité en substrat ou/et en oxygène. Le suivi des caractéristiques de boues activées cultivées en laboratoire (réacteur fermé supplémenté en glucose) ou provenant d'un réacteur continu de taille industrielle montrent que l'hydrophobicité des boues, mesurée sur le mélange hétérogène des micro-organismes obtenus par dispersion des flocs, ne varie pas de manière importante (coefficient de variation égal à 8%) contrairement aux polymères exo-cellulaires (coefficient de variation égal à 25%). En outre, la qualité de la décantation des boues s'altère avec leur contenu en polymères exo-cellulaires. Par conséquent, l'activité des cellules microbiennes impliquées dans la synthèse des polymères exo-cellulaires peut, plus que la proportion de cellules hydrophobes/hydrophiles, avoir un impact sur la qualité du floc.

Les perspectives d'une telle recherche sont tout à fait intéressantes. Il s'agit, au-delà de la nécessaire amélioration des outils analytiques (analyse et extraction des exo-polymères, caractérisation de l'hydrophobicité...) d'identifier les facteurs qui favorisent directement la croissance des populations bactériennes hydrophobes et/ou la production de polymères exo-cellulaires hydrophobes assurant ainsi une forte cohésion des agrégats.

INTRODUCTION GENERALE

L'épuration des eaux usées par voie biologique date du début du siècle et s'est considérablement développée depuis, surtout après la seconde guerre mondiale. A l'heure actuelle environ 70% des 11000 stations d'épuration de France fonctionnent selon le procédé dit à "boues activées" (Duchêne, 1994).

Le procédé "boues activées" comprend deux étapes essentielles :

– La première consiste à éliminer de la phase eau la pollution (dissoute et particulaire) par les micro-organismes, naturellement présents dans les eaux usées, au travers de phénomènes physico-chimiques tels que l'adsorption et la biodégradation. La croissance des micro-organismes est favorisée par un apport d'oxygène et se produit spontanément sous une forme floculée. Les agrégats formés, dont l'ensemble constitue les boues activées, sont communément appelés "flocs".

– Au cours de la seconde étape, cette biomasse floculée est séparée de l'eau épurée par sédimentation dans un clarificateur.

Le succès de cette seconde étape est en grande partie conditionnée par la structure des flocs. Dans certains cas, un développement excessif de micro-organismes filamenteux affecte la séparation eau-biomasse en provoquant une production abondante de mousses stables ou un foisonnement des boues ("bulking filamenteux") qui altère la structure du floc. En dehors de ces cas particuliers, abondamment décrits dans la littérature (*e.g.* Soddell et Seviour, 1990 ; Jenkins *et al.*, 1993 ; Wanner, 1994), la structure des flocs reste très mal connue. Les micro-organismes formant le floc ("floc forming bacteria") ont en effet reçu beaucoup moins d'attention que les bactéries filamenteuses. Leur étude devient nécessaire. Elle devrait apporter de nouvelles connaissances sur la structure des flocs et sur les facteurs conduisant à la formation de boues de bonne qualité.

Au niveau industriel, l'enjeu est de parvenir à maîtriser la floculation biologique et par conséquent d'assurer le succès de la phase de séparation eau-biomasse.

Depuis une quinzaine d'années, le rôle joué par les interactions hydrophobes sur les mécanismes de floculation et d'adhésion microbiennes fait l'objet d'une attention particulière (Rosenberg et Kjelleberg, 1986). Leur apport dans la structure des flocs de boues activées se devait alors d'être étudié. Une première approche fut réalisée par Urbain *et al.* (1993) qui ont montré l'existence d'une relation entre la capacité de décantation des boues et leur "hydrophobicité intrafloc" appuyant ainsi l'hypothèse que les interactions hydrophobes jouent un rôle clé dans la cohésion des agrégats microbiens de boues activées. Nous avons poursuivi l'étude de l'organisation des flocs de boues activées en gardant l'hydrophobicité comme principal axe de recherche.

Le document est construit selon cinq chapitres. Le premier est une **analyse bibliographique** qui rassemble les données actuelles sur la structure et les propriétés des agrégats biologiques de boues activées. Le second chapitre traite de l'**organisation des agrégats bactériens** au travers d'une étude de dispersion des flocs et d'extraction des polymères exo-cellulaires par les ultrasons. Au terme de ce chapitre, un modèle de structure du floc est proposé. Le chapitre III consiste en une **caractérisation des propriétés hydrophobes et hydrophiles des polymères exo-cellulaires** extraits des boues. Le quatrième chapitre discute des **propriétés d'adsorption de la**

matière organique des eaux usées par les boues activées en relation avec leur hydrophobicité et d'autres propriétés physico-chimiques. Un test d'estimation des propriétés de biosorption des boues est développé dans ce chapitre et la composition hydrophobe/hydrophile de la matière organique des eaux usées est décrite. Enfin, le chapitre V traite de la **dynamique du floc**. La variation des propriétés hydrophobes/hydrophiles des boues activées au cours du temps en réacteur batch et en réacteur continu (réacteur pilote) est étudiée. La coexistence dans les boues activées de souches bactériennes hydrophobes et hydrophiles est mise en évidence ainsi que la variation de leurs propriétés hydrophobes de surface au cours de leur culture en souche pure.

Références :

- DUCHENE Ph. (1994) Biological foam : the cause-effect relationship, test results and combat strategy, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, 239-248.
- JENKINS D., M.G. RICHARD and G.T. DAIGGER (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton, 193 pages.
- ROSENBERG M. and S. KJELLEBERG. (1986) Hydrophobic interactions : role in bacterial adhesion., *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 353-393.
- SODDELL J.A. and R.J. SEVIOUR (1990) Microbiology of foaming in activated sludge plants, *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 145-176.
- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.
- WANNER J. (1994) Activated sludge bulking and foaming control, Technomic Publishing Company, Bâle, Suisse, 327 pages.

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN = acide désoxyribonucléique
ARN = acide ribonucléique
ARNr = acide ribonucléique ribosomique
CIH = chromatographie d'interaction hydrophobe
COD = carbone organique dissous
COT = carbone organique total
DCO = demande chimique en oxygène
DO = densité optique
DSVI = indice de volume de boue diluée
EDTA = acide éthylènediamine tétraacétique
HPLC = chromatographie liquide haute performance
KD = kilodalton
Kow = constante de partage octanol / eau
LTA = acide lipoteichoïque
MAC = test de mesure de l'angle de contact
MES = matières sèches en suspension
MVS = matières volatiles en suspension
PEC = polymères exo-cellulaires
PEG = polyéthylène glycol
PHB = polyhydroxybutyrate
RPM = rotation par minute
SQI = indice de qualité de boue
SSVI = indice de volume de boue agitée
SV₃₀ = volume de boue après trente minutes de décantation
SVI = indice de volume de boue
TAMH = test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures
TAS = test d'agrégation saline
TPP = test de partage de phase
UFC = unité formant colonie

I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE



I.1. Présentation du procédé d'épuration par "boues activées"	10
I.2. Caractérisation microbiologique et physico-chimique des boues activées	11
I.2.1. <u>Analyse microbiologique</u>	11
I.2.1.1. Les micro-organismes eucaryotes des boues activées	11
I.2.1.2. Les micro-organismes procaryotes des boues activées	13
I.2.2. <u>Composition physico-chimique globale des boues activées</u>	17
I.2.3. <u>Les polymères exo-cellulaires</u>	19
I.2.3.1. Origine des polymères exo-cellulaires	19
I.2.3.2. Les techniques d'extraction des polymères exo-cellulaires	20
I.2.3.3. Caractérisation chimique des polymères exo-cellulaires	21
I.2.3.3.1. Analyse élémentaire des exo-polymères	21
I.2.3.3.2. Les différents groupes de macromolécules	22
I.2.3.4. Analyse du poids moléculaire des exopolymères	30
I.2.4. <u>Organisation générale des floccs de boues activées</u>	31
I.2.4.1. Structure générale	31
I.2.4.2. Forme des floccs	32
I.2.4.3. Propriétés physiques	33
I.2.4.3.1. Taille et distribution granulométrique des floccs	33
I.2.4.3.2. Surface	35
I.2.4.3.3. Porosité et teneur en eau	35
I.2.4.3.4. Densité	36
I.2.4.3.5. Transfert de masse	36
I.2.4.3.6. Force de cohésion	36
I.2.5. <u>Décantabilité des agrégats</u>	37
I.2.5.1. Vitesse de décantation des floccs	38
I.2.5.2. Les tests de décantabilité	38
I.2.5.2.1. L'indice de Mohlman (SVI)	38
I.2.5.2.2. L'indice de boue avec dilution (DSVI)	39
I.2.5.2.3. L'indice de boue avec agitation douce (SSVI)	40
I.2.5.2.4. L'indice de qualité de boue (SQI)	40
I.3. Propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires microbiennes	42
I.3.1. <u>L'effet hydrophobe : approche thermodynamique</u>	42
I.3.2. <u>Description de la surface cellulaire des micro-organismes</u>	43
I.3.2.1. Notion de balance hydrophobe/hydrophile	43
I.3.2.2. Répartition des zones hydrophobes à la surface des cellules	43
I.3.2.3. Les composés cellulaires hydrophobes de la surface bactérienne	45
I.3.3. <u>Les tests de mesure des interactions hydrophobes</u>	49
I.3.3.1. Le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (TAMH)	49
I.3.3.2. Le test d'agrégation saline (TAS)	51
I.3.3.3. La mesure de l'angle de contact (MAC)	52
I.3.3.4. La chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)	52
I.3.3.5. Adhésion à un solide hydrophobe	52
I.3.3.6. Technique de partage de deux phases liquides (TPP)	52
I.3.3.7. Marquage par des sondes moléculaires hydrophobes	53
I.3.3.8. Comparaison des techniques	53
I.3.5. <u>Hydrophobicité des agrégats bactériens</u>	55
I.3.5.1. Apport de l'hydrophobicité dans le phénomène d'adhésion/floculation	55
I.3.5.2. Effet de l'hydrophobicité sur les propriétés des agrégats	56
I.3.6. <u>Effets de l'environnement sur l'hydrophobicité des cellules</u>	58
I.3.6.1. Variation au cours de la croissance	58
I.3.6.2. Effet de la composition du milieu de culture	61
I.4. Les propriétés de biosorption des floccs	62
I.5. Références	66

L'analyse bibliographique développée ici tente de rassembler les données actuelles sur la structure et les propriétés des agrégats biologiques de boues activées. Après avoir décrit de manière succincte le procédé d'épuration par boues activées, la composition microbiologique et physico-chimique des boues ainsi que leurs propriétés sont traitées en deuxième partie. La troisième partie est consacrée aux propriétés hydrophobes des boues où les techniques de mesures de l'hydrophobicité sont discutées. L'éventualité du rôle de l'hydrophobicité de surface cellulaire sur les agrégats biologiques est examinée, suivie par l'analyse des différents facteurs la contrôlant. Enfin, en dernière partie les propriétés de biosorption des floccs sont étudiées.

I.1. Présentation du procédé d'épuration par "boues activées"

Le procédé "boues activées" comprend deux étapes essentielles représentées par la Figure I-1. La première consiste à éliminer de la phase eau la pollution (dissoute et particulaire) par les micro-organismes naturellement présents dans les eaux usées. Leur croissance est favorisée par un apport d'oxygène et se produit spontanément sous une forme floculée. Les agrégats formés sont communément appelés "flocs" (flocs, agrégats et boue seront considérés comme des termes synonymes). Au cours de la deuxième étape, la biomasse floculée est séparée de l'eau épurée par sédimentation des agrégats microbiens dans un clarificateur (Figure I-1). La majorité de la biomasse (généralement de l'ordre de 90%) est recyclée en tête du traitement biologique afin de réalimenter le bassin aéré en boue. Une fraction de la biomasse produite est régulièrement soutirée et subit généralement un traitement secondaire (digestion aérobie ou anaérobie, déshydratation...) avant d'être envoyée en décharge ou utilisée en amendement agricole.

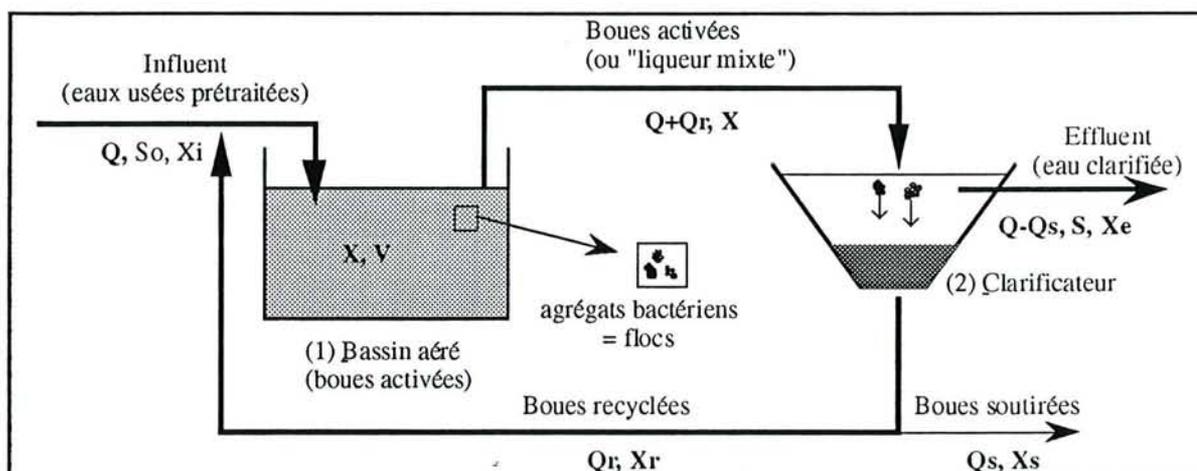


Figure I-1 : Schéma simplifié du traitement des eaux usées par le procédé à "boues activées". Q , Q_r , Q_s = débit respectivement de l'influent, des boues recyclées, des boues soutirées. X , X_i , X_s , X_e , X_r = concentration en matières sèches en suspension respectivement des boues activées, de l'influent, des boues soutirées, de l'effluent et des boues recyclées. S_o = concentration initiale en matière organique. S = concentration résiduelle en matière organique.

Une station d'épuration par "boues activées" correspond donc à une culture bactérienne en réacteur continu (chemostat) avec recyclage.

I.2. Caractérisation microbiologique et physico-chimique des boues activées.

I.2.1. Analyse microbiologique.

La boue activée représente une communauté microbienne constituée de bactéries floculées, filamenteuses ou libres mais également d'organismes eucaryotes tels que les protozoaires (vorticelles, amibes), les métazoaires (rotifères, nématodes et annélides) et des protistes eucaryotes comme les algues et les champignons (Hughes et Stafford, 1976 ; Védry, 1987 ; Jenkins *et al.*, 1993). Les procaryotes sont, dans les boues, les organismes vivants les plus nombreux (Hughes et Stafford, 1976 ; Jenkins *et al.*, 1993 ; Wagner *et al.*, 1993).

I.2.1.1. Les micro-organismes eucaryotes des boues activées.

Algues et champignons sont rares et semblent ne pas avoir d'incidence majeure sur le procédé d'épuration. Cependant des cas de "bulking", liés à une croissance excessive de certains champignons comme *Cephalosporium* (Pipes, 1978) sont souvent observés sous des pH acides (pH<6) (Aitken *et al.*, 1992). Les algues sont surtout présentes au printemps et en été, elles sont principalement représentées par les espèces du groupe des diatomées (Védry, 1987).

Les eucaryotes les plus typiques des boues activées sont les protozoaires et les métazoaires. Leur présence est facilement révélée au microscope optique. Ce sont des organismes primitifs unicellulaires (protozoaires) ou pluricellulaires (métazoaires) de taille très variable selon les espèces (Tableau I-1) dont le nombre varie de 100 à plus de 100 000 individus par mL de boue ce qui totaliserait près de 5% des matières sèches en suspension (Hughes et Stafford, 1976 ; Jenkins *et al.*, 1993 ; Madoni, 1994). Parmi les 230 espèces de protozoaires recensées, celles appartenant à la classe des ciliés, comprenant les genres *Epistylis*, *Opercularia* et *Vorticella*, sont généralement les plus nombreuses (Madoni, 1994). Cependant, la diversité des espèces et l'abondance des individus sont très sensibles au milieu. Protozoaires et métazoaires deviennent ainsi des bio-indicateurs précieux de la qualité des boues et des caractéristiques de fonctionnement de la station (Madoni *et al.*, 1994). Leur analyse permettrait, d'après Hughes et Stafford (1976), de prédire la qualité de l'effluent dans 80% des cas.

Outre son rôle de bio-indicateur, la microfaune des boues activées est un élément important de l'écologie du floc. Elle est dans la majorité des cas détritivore et/ou consommatrice de bactéries (Tableau I-1). Par conséquent, aussi bien la biomasse floculée que la biomasse non floculée (bactéries et protozoaires libres) ou que les bactéries filamenteuses (Aitken *et al.*, 1992) ou que même les substances dissoutes sont susceptibles d'être consommées par la microfaune. Celle-ci a dans certains cas (Hughes et Stafford, 1976 ; Madoni, 1994) une action déterminante sur la clarification des eaux usées (élimination des bactéries libres) et sur la production de boue par consommation de la biomasse floculée (Ratsak *et al.*, 1994).

Tableau I-1 : Exemples de microfane commune des boues activées d'après Védry (1987), Degrémont (1989), Jenkins *et al.* (1993) et Madoni *et al.* (1993).

Sous-règne	Embranchement	Classe	Ordre	Genre	Observations (taille, niche écologique, conditions de bonne croissance, indications...)
METAZOAIRE	Nématelminthes	Nématodes			100 à 1000 µm, vers ronds lisses, détritivores ou prédateurs de protozoaires, faibles et moyennes charges, caractéristiques des boues en voie de minéralisation
	Annélides	Clitellates	Oligochètes	Aelosoma	1 à 5 mm, détritivores, âge de boue élevé, très faible charge.
	Rotifères				200 à 500 µm, bactériophages ou/et prédateurs de protozoaires, mobilité variable selon les espèces, faible charge et âge de boue élevé, sensibles aux toxiques.
PROTOZOAIRE	Rhizopodes	Amibiens		Amibes	100 µm, bactériophage, surface du floc, résistant à l'anaérobiose, charges élevées.
	Flagellés	Zooflagellés		Bodo	5 µm, pollution dissoute, souvent fixés sur le floc, très abondants, bons indicateurs de la teneur en oxygène
	Infusoires	Ciliés	Holotriches	Litonotus	100 µm, bactériophages et protozoophages, espace interfloc, très mobiles, forte charge
				Coleps	60 µm, prédateurs de protozoaires (vorticelles), très mobiles, moyenne charge, nitrification complète.
				Paramécie	100-200 µm, bactériophages (bactéries libres), faible charge, rares, résistent au manque d'oxygène.
				Péritriches Opercularia, Epistylis, Vorticelles	40 à 100 µm, bactériophages (bactéries libres), fixés aux flocs par un pédoncule, charge moyenne à élevée, très fréquents, généralement caractéristiques d'un milieu bien oxygéné, souvent associés en grappe.
			Hétérotriches	Stentor	400 µm, prédateur de protozoaires, mobile et fixation temporaire, faible charge et âge de boue élevé
			Hypotriches	Aspidisia	40 µm, bactériophages (bactéries agglomérées), "broutent" la surface du floc, très mobiles, surtout moyenne et forte charge, très fréquents
				Euplotes	90 µm, bactériophages (bactéries libres et agglomérées), surface du floc et liquide interfloc, moyenne et forte charge, très mobiles
			Tentaculifères		Acineta, Tokophrya

La présence de prédateurs est de plus un facteur sélectif de la population microbienne. En effet, dans une culture bactérienne mixte de laboratoire, les bactéries ayant un faible taux de croissance sont les plus rapidement éliminées (Sinclair et Alexander, 1989). De même, Gurijala et Alexander (1990) montrent, à partir d'une étude en laboratoire portant sur 12 souches bactériennes, que seules les trois souches présentant une hydrophobicité de surface élevée sont résistantes à la prédation par un protozoaire (*Tetrahymena thermophila*) indépendamment de leur taux de croissance.

1.2.1.2. Les micro-organismes procaryotes des boues activées

Les boues activées sont composées des bactéries constituant le floc ("floc forming bacteria"), de bactéries filamenteuses, également associées aux floccs dans la plupart des cas, et de bactéries libres évoluant dans le liquide interstitiel.

(a) *Diversité des activités métaboliques*

La communauté bactérienne des boues activées est représentée par une grande variété d'espèces majoritairement hétérotrophes (Hughes et Stafford, 1976). Celles-ci sont capables de survivre dans le milieu boues activées grâce à la diversité de leurs activités métaboliques qui leur permet de consommer la pollution dissoute des eaux usées. Certaines de ces activités sont spécifiques d'un type de composé. Une partie de l'activité enzymatique mesurée est le fait d'exo-enzymes retenus dans la matrice de polymères exo-cellulaires du floc (Frølund *et al.*, 1995a). Le Tableau I-2 donne quelques exemples des activités métaboliques des systèmes bactériens des boues activées.

Tableau I-2: Quelques exemples d'activités microbiennes des boues activées.

Activités métaboliques	Micro-organismes (exemples)	Références
Nitrification (oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate NO ₃ ⁻)	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i>	Hughes et Stafford (1976) Rols <i>et al.</i> (1994)
Dénitrification (réduction, en anaérobie, des nitrates en azote gazeux N ₂)	<i>Alcaligenes denitrificans</i> <i>Paracoccus denitrificans</i>	Fass <i>et al.</i> (1994)
Accumulation intracellulaire du phosphate inorganique	<i>Acinetobacter</i>	Cloete et Steyn (1988) Wagner <i>et al.</i> (1994)
Oxydation des sulfures (exemples : thio-cyanates)	<i>Thiobacillus</i> Pseudomonadaceae	Hughes et Stafford (1976)
Elimination des xénobiotiques (exemples des phénols et des pyridines)	Pseudomonadaceae	Hughes et Stafford (1976)

(b) Les bactéries filamenteuses

Les bactéries filamenteuses sont très souvent présentes au sein des floes mais leur croissance excessive entraîne un dysfonctionnement des systèmes d'épuration à boues activées. Pour cette raison elles sont très étudiées et ont fait l'objet de nombreuses publications (*e. g.* Eikelboom et van Buijsen, 1981 cités par Wanner et Grau, 1989 ; Jenkins *et al.*, 1993 ; Wanner, 1994). Selon les types de micro-organismes, la structure du floe est altérée ou une production importante de mousses se produit lorsque leur croissance devient excessive. Dans les deux cas la séparation des solides de l'eau épurée en phase finale du traitement est inefficace.

L'identification des bactéries filamenteuses peut être facilitée par observation de leur caractère morphologique au microscope optique (Jenkins *et al.*, 1993). 25 à 30 types d'organismes filamenteux ont ainsi été observés dans les boues (Wanner et Grau, 1989 ; Jenkins *et al.*, 1993). Les genres les plus fréquents sont *Sphaerotilus*, *Thiothrix*, le type 021N, *Nocardia* et *Microthrix* (Wanner et Grau, 1989, Jenkins *et al.*, 1993). Il existe néanmoins une grande variabilité spatio-temporelle (Wanner et Grau, 1989, Jenkins *et al.*, 1993).

L'étude de ces organismes filamenteux en laboratoire est difficile du fait que la plupart ne sont pas cultivables par les techniques microbiologiques traditionnelles (Soddell et Seviour, 1990; Blackall, 1994). D'une manière générale, la croissance des bactéries filamenteuses serait caractérisée par des vitesses maximales de croissance faibles avec une forte affinité pour le substrat contrairement aux bactéries non filamenteuses du floe (Chudoba *et al.*, 1973). Cela explique que leur développement est favorisé dans des conditions où l'âge des boues est élevé et où les teneurs en nutriments sont faibles (Tableau I-3).

Les organismes filamenteux ont été classés en 4 groupes par Wanner et Grau (1989) selon la nature des dysfonctionnements auxquels ils sont liés et selon les conditions dans lesquelles ils se développent le mieux (Tableau I-3).

Tableau I-3 : Les 4 groupes de micro-organismes filamenteux selon Wanner et Grau (1989).

Groupe I :	<i>zone aérobie à faible teneur en oxygène</i>
Environnement préférentiel : substrats rapidement métabolisables, âge de boue élevé.	
Micro-organismes : <i>Sphaerotilus natans</i> , type 1701, <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	
Groupe II :	<i>zone aérobie mixotrophe</i>
Environnement préférentiel : substrats rapidement métabolisables (spécialement acides organiques de faibles poids moléculaires) et carence nutritive, âge de boue moyen à élevé, sulfites.	
Micro-organismes : type des cyanophycées <i>i.e.</i> : <i>Thiothrix</i> , type 021N, <i>Leucothrix</i>	
Groupe III :	<i>zones aérobies, anaérobie, anoxique</i>
Environnement préférentiel : âge de boue élevé,	
Micro-organismes : <i>Microthrix parvicella</i> , type 009 2, type 0675, type 0041.	
Groupe IV :	<i>micro-organismes formant des mousses</i>
Environnement préférentiel : substrats rapidement métabolisables, âge de boue moyen à élevé.	
Micro-organismes : Actinomycètes (<i>Nocardia</i> ,...), <i>Nostocoida limicola</i> , type 0092 et autres micro-organismes producteurs de surfactants.	

(c) *Les bactéries non filamenteuses*

L'étude des bactéries non filamenteuses est rendue plus difficile parce qu'elles ne sont pas reconnaissables morphologiquement pour la plupart et des techniques plus complexes doivent être mises en œuvre (Tableau I-4). La nécessité d'isoler au préalable les colonies bactériennes sur milieu solide constitue le biais principal de la plupart des techniques présentées dans le Tableau I-4. En effet, moins de 1% du nombre total de bactéries d'un écosystème serait cultivable sur milieu gélosé (Wagner *et al.*, 1993) à cause de l'effet sélectif des milieux de laboratoire (Hughes et Stafford, 1976 ; Collin *et al.*, 1979 ; Thomazeau, 1983 ; Soddell et Seviour, 1990 ; Wagner *et al.*, 1993, 1994). Ce biais conduit à des pertes d'informations parfois importantes. Il est toutefois possible de réduire la pression de sélection en incorporant des boues stérilisées dans le milieu (Gayfords et Richard, 1970 ; Hughes et Stafford, 1976 ; Soddell et Seviour, 1990).

Tableau I-4 : Les différentes approches d'analyse microbiologique qualitative et quantitative des boues activées

Critère d'identification	inconvenients/avantages	Références
Caractères morphologiques et biochimiques (26 critères)	Milieu de culture sélectif. Dispersion des boues difficile/ assez spécifique	Collin <i>et al.</i> (1979)
Profil de gel d'électrophorèse des extraits protéiques de clones	Milieu de culture sélectif. Dispersion des boues difficile/ très forte spécificité	Hantula <i>et al.</i> (1991)
Sonde immunofluorescente	Spectre d'action très étroit / analyse <i>in situ</i>	Cloete et Steyn (1988)
Sonde ARNr fluorescente	Limité aux petits agrégats / Spectre d'action ajustable (de la sous-espèce à l'ordre, la classe ou le règne), forte spécificité	Blackall (1994) Wagner <i>et al.</i> (1993, 1994)
Culture sur milieu nutritif	Milieu de culture sélectif. Dispersion des boues / isolement et multiplication aisés des souches	Banks et Walker (1977) Thomazeau (1983)
Numération par comptage microscopique	Dispersion des boues difficile/ numération des bactéries mortes et vivantes	Urbain <i>et al.</i> (1993) Frølund <i>et al.</i> (1995 a et b)

Wagner *et al.* (1993, 1994) montrent clairement les différences d'interprétation pouvant exister entre deux techniques d'analyse microbiologique. Ainsi les deux groupes de bactéries appartenant à la subdivision β de la classe des *Proteobacteria* (gram négatif) et les bactéries gram positif à ADN riche en bases G+C de la classification de Woese (1985), sont largement majoritaires par analyse *in situ* (sondes fluorescentes d'oligonucléotides d'ARNr) (Figure I-2A). Par contre après isolement sur gélose nutritive, les mêmes groupes deviennent minoritaires (Figure I-2B) *i.e.* la dominance des bactéries gram négatif devient écrasante.

Le second biais lié aux techniques décrites dans le Tableau I-4 est qu'une dispersion préalable des floccs de l'échantillon de boue est nécessaire afin d'isoler correctement les souches ou de faciliter le comptage des bactéries ayant fixé la sonde spécifique. Or, à ce jour, aucun moyen efficace de dispersion des floccs n'a été proposé (Jorand *et al.*, 1995).

Le Tableau I-5 rassemble quelques résultats sur le nombre de bactéries présentes dans les boues et exprime clairement l'étendue des variations existantes due aux différentes techniques et aux différents échantillons.

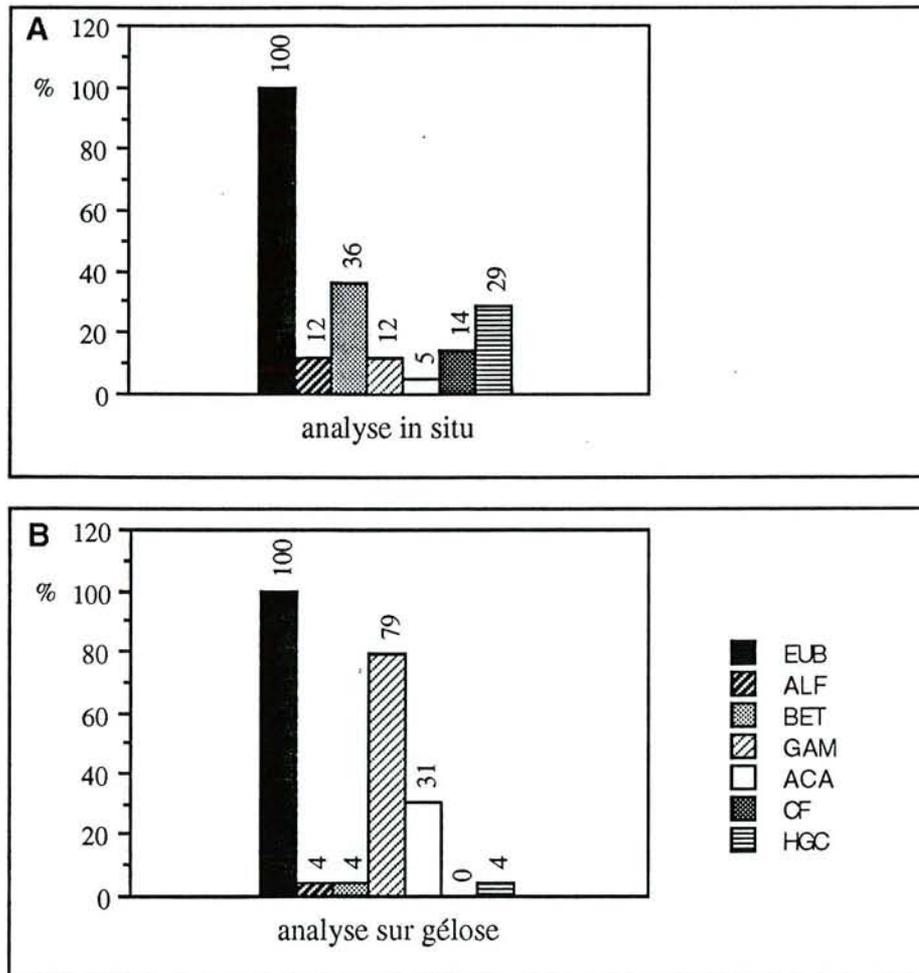


Figure I-2 : Comparaison de la communauté bactérienne d'un échantillon de boue activée prélevé sur un ouvrage de traitement avancé des effluents (bassin aérobie). (A) Structure de la communauté microbienne du procédé d'élimination des phosphates avancé déterminé par hybridation *in situ* à l'aide de sondes d'oligonucléotides. (B) Répartition des saprophytes hétérotrophes déterminés par hybridation sur l'ensemble des isolats obtenus par culture sur gélose (trypticase soja agar) du même échantillon qu'en (A) après dispersion au mixeur. Complémentarité des sondes d'oligonucléotides : EUB, région conservée des ARNr 16S bactériens; ALF, BET et GAM, respectivement région conservée des ARNr 16S de la sous-classe alpha (*Rhizobiaceae*), et ARNr 23S des sous-classes beta (*Alcaligenes*) et gamma (*Pseudomonas*, *E. coli*) de la classe des *Proteobacteria* (gram négatif); ACA, région conservée des ARNr 16S des *Acinetobacter*; CF, région conservée des ARNr 16S des membres du groupe *Cytophaga-Flavobacterium* et HGC, région conservée des ARNr 23S spécifique des bactéries gram positif à ADN riche en bases G+C, d'après Wagner *et al.* (1994).

Tableau I-5 : Nombre total de bactéries dans les boues activées. MVS = matières volatiles en suspension, UFC = unité formant colonie

Nombre de bactéries	Techniques utilisées	Références
0,5 10 ¹¹ cellules g ⁻¹ MVS (10 ⁷ cellules mL ⁻¹)	Dispersion aux ultrasons et numération des UFC	Banks et Walker (1977)
2,5 10 ⁷ cellules mL ⁻¹	"	Williams <i>et al.</i> (1970)
2,5 10 ¹² cellules g ⁻¹ MVS	Dispersion aux ultrasons, comptage direct (acridine orange)	Urbain <i>et al.</i> (1993)
5 10 ¹¹ cellules g ⁻¹ MVS	Dispersion par piston Téflon et comptage direct (acridine orange)	Frølund <i>et al.</i> (1995b)

Le genre *Zooglea* a été longtemps considéré comme le micro-organisme principalement responsable de l'organisation du floc. Or il est reconnu maintenant que son abondance est souvent le fait de cas particuliers et que bien d'autres micro-organismes constituent le floc (Hughes et Stafford, 1976 ; Jenkins *et al.*, 1993). Les genres dominants comprendraient les *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Zooglea*, *Micrococcus* et *Kurthia* (Hughes et Stafford, 1976 ; Collin *et al.*, 1979 ; Jenkins *et al.*, 1993 ; Wagner *et al.*, 1993, 1994). Les genres dominants dans la phase eau seraient, selon Hantula *et al.* (1991), les mêmes que ceux de la phase floculée. La diversité des espèces varie selon la nature des eaux usées (Morfaux et Albagnac, 1979) ou dans le temps selon des facteurs non identifiés (Hantula *et al.*, 1991). Ainsi une espèce dominante peut en quelques semaines devenir indétectable par les méthodes classiques d'analyse (Hantula *et al.*, 1991). Mais il est très probable, comme l'ont montré les travaux de Wagner *et al.* (1993, 1994), que la dominance supposée de certaines espèces soit uniquement liée à la sélectivité des méthodes d'identification.

L'analyse microbiologique des boues reste donc très complexe principalement du fait des techniques microbiologiques classiques bien souvent inadaptées à l'étude d'un tel écosystème. Les nouvelles techniques faisant appel à la génétique pourront peut-être éclaircir une partie du puzzle boue activée.

I.2.2. Composition physico-chimique globale des boues activées

Les boues activées sont constituées d'une phase liquide (eau interstitielle) et d'une phase solide (agrégats). Les teneurs en matières solides présentes dans les boues sont généralement déterminées par dosage des matières sèches en suspension (MES) *i.e.* par pesée après séchage à 105°C des solides récupérés par centrifugation ou par filtration. D'autre part les matières volatilisées par chauffage à 550°C sont assimilées aux matières organiques et le résidu sec à 550°C aux matières minérales. Toutefois à 550°C une partie des matières minérales peut se décomposer et une partie des matières organiques peut ne pas être gazéifiée à 550°C (cas de certains complexes organo-métalliques) (Degrémont, 1989). Malgré ces risques d'erreur, le taux de matières volatiles en suspension (MVS) peut être considéré comme une valeur approchée de la matière organique.

Les teneurs en MES varient globalement de 1 à 8 g L⁻¹ selon les paramètres hydrauliques du réacteur et les conditions environnementales. A titre d'exemple, les valeurs en MES et en MVS des boues mesurées à la station de Maxéville (cf. Chapitre V) et celles obtenues par Urbain *et al.* (1993) à partir de 7 stations différentes sont représentées dans le Tableau I-6.

Les matières organiques et les sels oxydables des boues peuvent être mesurés par la demande chimique en oxygène (DCO) qui représente la consommation à chaud en oxygène par le dichromate

de potassium. Cette mesure est également très souvent utilisée pour représenter les matières oxydables des eaux en général, cependant l'oxydation est souvent incomplète et la mesure du carbone organique dissous ou total est préférable, l'oxydation étant plus complète (Degrémont, 1989). Quelques données caractéristiques de ces deux paramètres sont représentées au Tableau I-6.

Tableau I-6 : Valeurs caractéristiques des matières sèches de boues activées.

Echantillons	MES (g L ⁻¹)	MVS (% des MES)	DCO (mg d'O ₂ g ⁻¹ MES)	COD (mg C L ⁻¹)
Station de Maxéville	3,5±0,9 (n=13)	71±5% (n=12)	1230±50 (n=4)	7±2 (n=8)
Moyenne de 7 stations d'épuration (Urbain et al., 1993)	3,7±1,4	77±7%	n.d.	n.d.

n.d. = non déterminé

MES = matières en suspension ; MVS = matières volatiles en suspension ; DCO = demande chimique en oxygène ; COD = carbone organique dissous (<0,45µm).

Une composition élémentaire moyenne des boues est donnée dans le Tableau I-7. Cette analyse est caractéristique de la matière organique étant donné le contenu élevé en oxygène, mais doit être considérée avec prudence car elle n'est qu'une approximation.

Tableau I-7 : Analyse élémentaire (% des MES) de 16 échantillons de boues activées (d'après Urbain *et al.*, 1993). Cendres = résidus sec à 550°C.

Cendres	C	H	O	N
23±7%	40±4%	6±1%	24±4%	7±1

nb : $O = 100 - (C + N + H + \text{cendres})$

Il existe peu de données d'analyse minérale des boues activées. Néanmoins cette analyse est souvent effectuée sur les boues traitées (*i.e.* après digestion aé – ou anaérobie, déshydratation...) destinées à l'épandage agricole (Verstraete et vanVaerenbergh, 1986) pour déterminer la qualité de la boue et sa toxicité par son contenu en métaux lourds. D'autres minéraux comme le calcium, sont par contre recherchés dans les boues à cause de leur rôle dans la structure du floc (Eriksson et Härdin, 1984 ; Bruus *et al.*, 1992 ; Urbain *et al.*, 1993). Le Tableau I-8 donne un exemple de la composition minérale d'une boue activée et montre la dominance du calcium, du fer et du phosphore.

Le contenu en protéines, substances humiques, polysaccharides et acides uroniques de boues provenant de deux stations d'épuration différentes a été déterminée par Frølund *et al.* (1995b) (Tableau I-9). Les protéines représentent le compartiment le plus important des quatre groupes chimiques dosés, ce qui est typique des cultures cellulaires (Ingraham *et al.*, 1983). Les substances humiques qui ont probablement été apportées par l'influent, représentent dans cet exemple près de la moitié des protéines, ce qui montre alors la place importante que peut prendre les composés venant des eaux usées.

Tableau I-8 : Analyse minérale d'une boue activée concentrée à 13 g L⁻¹, pH = 7,2 (d'après Bruus *et al.*, 1992).

Surageant	mg g ⁻¹ MES	mM
Ca ²⁺	8	2,5 mM
Mg ²⁺	1,5	0,8 mM
K ⁺	2,1	0,7 mM
Na ⁺	10	5 -6 mM
Boue + surageant		
Ca	47	15,3 mM
Mg	4	2,1 mM
K	3,6	1,2 mM
Fe	74	17,3 mM
P	31	13 mM
SO ₄ ²⁻	-	1 mM
PO ₄ ³⁻	-	0,15 mM
Cl-	-	9 mM

Tableau I-9 : Quantités totales de polymères dosés dans deux types de boues activées. Données en mg g⁻¹ de matières volatiles en suspension (MVS) (d'après Frølund *et al.*, 1995b).

	Protéines	Subs.humiques	Polysaccharides	Acides uroniques
Boue 1 (MVS=59%)	523±8	230±20	181±11	21±3
Boue 2 (MVS=63%)	462±25	176±26	179±13	20±4

I.2.3. Les polymères exo-cellulaires

L'observation au microscope optique des floccs en présence d'encre de chine (Jenkins *et al.*, 1993) ou au microscope électronique après marquage (Bleich et Nehrkorn, 1989 ; Zartarian *et al.*, 1994 ; Jorand *et al.*, 1995) révèle la présence de polymères entre les particules primaires du flocc (Figure I-3). Ces polymères sont habituellement désignés sous le terme d'exo-polymères ou de polymères exo- (ou extra) cellulaires (PEC). Ils constituent une matrice de nature chimique très complexe qui a un impact direct sur les propriétés du flocc. L'analyse des constituants de cette matrice est alors essentielle dans l'étude de la structure du flocc.

I.2.3.1. Origine des polymères exo-cellulaires

Les polymères exo-cellulaires produits par des cultures pures de bactéries sont habituellement des polysaccharides (Sutherland, 1994). Pour cette raison semble-t-il les recherches sur les exo-polymères ont longtemps été limitées, sauf exception, à l'étude de la fraction glucidique (*e.g.* : Forster, 1971 ; Steiner *et al.*, 1976 ; Chao et Keinath, 1979 ; Beccari *et al.*, 1980 ; Sheintuch *et al.*, 1986 ; Horan et Eccles, 1986 ; Andreadakis, 1993). Or, dans les systèmes bactériens agrégés (boues

activées, biofilms) les exo-enzymes excrétés (Frølund *et al.*, 1995a) et le contenu cellulaire provenant de la lyse des cellules mortes (Bryers et Mason, 1987) renforcent la matrice de polymères existant. La nature des exo-polymères des boues ne se limite donc pas aux polysaccharides mais concerne tous les autres constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines et lipides) excrétés ou provenant de la lyse cellulaire (Nishikawa et Kuriyama, 1968 ; Sato et Ose, 1980 ; Vallom et McLoughlin, 1984 ; Kakii *et al.*, 1984 ; Goodwin et Forster, 1985 ; Morgan *et al.*, 1990 ; King et Forster, 1990 ; Eriksson et Alm, 1991 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1995 ; Frølund *et al.*, 1995 a et b). De plus, de par la nature des eaux usées (Nielsen *et al.*, 1992 ; Raunkjaer *et al.*, 1994) et des capacités d'adsorption des floes (Pujol et Canler, 1992 ; Torrijos *et al.*, 1994), une fraction des exo-polymères, dont probablement les substances humiques, provient des eaux usées.

I.2.3.2. Les techniques d'extraction des polymères exo-cellulaires

L'ensemble des techniques d'extraction des polymères exo-cellulaires suit généralement le même schéma : i) préparation des boues : lavage ou élimination du surnageant après centrifugation ou après décantation puis resuspension dans de l'eau distillée, une solution tampon ou saline ou encore un agent d'extraction ; ii) destructuration des agrégats et extraction des polymères ; iii) séparation des polymères de la biomasse en suspension (cellules et floes non dispersés) par centrifugation (10000 à 50000 g) ; et iv) conditionnement et/ou purification de l'extrait en vue des analyses ultérieures (congélation, lyophilisation et précipitation par des solvants).

De ces quatre phases, celle de destructuration du floe, très variable selon les auteurs, semble la plus déterminante. Elle fait appel à des traitements physiques (mécaniques ou thermiques), chimiques ou une combinaison des deux.

Les méthodes physiques les plus couramment employées utilisent les ultrasons, le piston Potter, le broyage (mixeur) parfois associé à des billes de verre pour augmenter les forces de cisaillement, ou encore le traitement thermique (bain à 80°C ou bouillonnant ou autoclavage).

En ce qui concerne les méthodes chimiques, des bases fortes (NaOH ou NH₄OH, 0,5 à 2 M) , des chélatants (EDTA) ou des résines échangeuses de cations (résine Dowex) sont mises en présence des boues sous agitation. Des surfactants (Lubrol W, Triton X, Tween 80) ou des dispersants (citrate, pyrophosphate de sodium) sont également utilisés pour désagréger les floes et extraire les exo-polymères.

La technique idéale devrait permettre de récupérer la totalité des exo-polymères sans provoquer de destruction cellulaire et sans altérer les polymères. Toutefois, la mise en évidence de la lyse cellulaire dans les boues activées est difficile car la présence de nombreux produits d'autolyse interdit l'utilisation des composés cellulaires comme marqueurs de lyse. De plus, la structure floeculée des boues entraîne une sous estimation du nombre de cellules obtenues par comptage en microscopie optique. Urbain (1992) a passé en revue la plupart des techniques d'extraction des exo-polymères. Brown et Lester (1980) et Rudd *et al.* (1983) ont comparé les résultats obtenus avec différentes

techniques. Ces travaux montrent qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de méthode universelle d'extraction des exo-polymères de boues. Les résultats de la littérature doivent donc être considérés avec prudence. Ainsi, les traitements très alcalins (Kiff et Thompson, 1979 ; Brown et Lester, 1980) ou par l'EDTA en conditions alcalines (pH=10) (Nishikawa et Kuriyama, 1968 ; Kakii *et al.*, 1984) sont fortement destructeurs des cellules bactériennes cultivées en souches pures (Brown et Lester, 1980 ; Eriksson et Axberg, 1981). La centrifugation ne permet pas d'arracher les polymères du floc (Novak et Haughan, 1981). L'énergie nécessaire pour casser entièrement les floes par les ultra-sons, et notamment les microflocs, semble supérieure à celle permettant de lyser les cellules bactériennes (Jorand *et al.*, 1995). Enfin les techniques d'extraction peuvent revêtir un caractère sélectif étant donné que d'une espèce bactérienne à l'autre la force de résistance à la lyse est différente (White et Marcus, 1988). L'extraction "chirurgicale" des exo-polymères apparaît alors irréaliste et les conditions donnant le meilleur compromis entre l'extraction des polymères et la destruction des cellules devront être recherchées.

I.2.3.3. Caractérisation chimique des polymères exo-cellulaires

I.2.3.3.1. Analyse élémentaire des exo-polymères

Les substances extraites des boues sont constituées d'un mélange de macromolécules comprenant des protéines, des substances humiques, des acides nucléiques, des polysaccharides et des lipides. Il existe probablement de nombreuses associations entre ces différents groupes chimiques formant alors des hétéropolymères (lipopolysaccharides, glycoprotéines, lipoprotéines...). En effet, des peptides et/ou des glucides rentrent souvent dans la composition des substances humiques (Beckett, 1990) et il est reconnu que les micro-organismes contiennent des quantités importantes d'hétéropolymères comme par exemple les lipopolysaccharides membranaires (3 % du poids sec chez *E. coli*, Ingraham *et al.*, 1983) ou les glycoprotéines de surface (Sleytr et Messner, 1983). Néanmoins peu de données sont disponibles à propos des hétéropolymères des boues activées. A notre connaissance, seuls Horan et Eccles (1986) ont recherché et montré la présence de glycoprotéines dans un extrait purifié d'exo-polymères de boues activées.

L'analyse élémentaire des exo-polymères de boues activées montre des teneurs élevées en oxygène, ce qui implique la présence de nombreuses fonctions oxygénées et par conséquent la nature plutôt hydrophile de ces polymères (Tableau I-10).

Tableau I-10 : Analyse élémentaire d'exo-polymères extraits de boues activées en % de la masse sèche des exo-polymères (cendres = résidus sec à 550°C).

Echantillon	C	H	O	N	Cendres
Boue activée (Forster, 1976)*	29,74%	6,45%	58,05%	5,76%	n.s.
Boue activée acclimatée (n=2) (Sato et Ose, 1980)**	36,2±0,5%	5,4±0,1%	40,2±1%	5,1±0,5%	13,2±0,1%

* : calculs non détaillés

** : O=100-(H+C+N+cendres)

L'extrait d'exo-polymères contient une proportion non négligeable de minéraux qui représentent 11 à 34 % de la masse sèche des PEC (Sato et Ose, 1980 ; Morgan *et al.*, 1990). Les minéraux les plus abondants de l'extrait sec d'exo-polymères sont le calcium, le phosphore et le fer (Tableau I-11).

Tableau I-11 : Concentration des éléments minéraux contenus dans les polymères exo-cellulaires (PEC) de boues activées. Obtenus par spectrophotométrie de flamme et par analyse aux rayons X (d'après Morgan *et al.*, 1990).

Echantillon	PEC (mg g ⁻¹ MES)	Cendres (% des PEC)	Concentration en éléments prédominants (µg g ⁻¹ PEC)					
			Na	Mg	P	K	Ca	Fe
Boue de labo. (alimentée en eaux usées)	70	34%	3,45	21,12	937,3	31,01	1999	99,93
Boue de station	90	18%	5,60	31,72	535,4	16,79	530	16,79

I.2.3.3.2. Les différents groupes de macromolécules

Le Tableau I-12 présente une liste non exhaustive de la composition en macromolécules des polymères exo-cellulaires des boues obtenues d'après l'analyse des données de la littérature. Les techniques utilisées sont systématiquement indiquées. Il ressort de cette analyse que les macromolécules les plus souvent dosées par les auteurs sont les protéines, les polysaccharides et les acides nucléiques dont principalement l'ADN. Les protéines apparaissent comme le groupe dominant avec 14 à 530 mg g⁻¹ MES puis les polysaccharides avec 7 à 139 mg g⁻¹ et enfin l'ADN qui est obtenu en concentrations nettement moins variables avec 4 à 16 mg g⁻¹ (Tableau I-12). Le Tableau I-12 témoigne en outre du manque d'informations à propos des autres macromolécules comme les acides humiques ou les lipides qui, bien qu'apparemment présentes en quantités significatives, sont très rarement dosées.

(a) Les polysaccharides

D'après Forster (1971) les exo-polysaccharides des boues sont constitués de sucres neutres et d'acides uroniques. Le Tableau I-13 donne la composition en monomères d'exo-polysaccharides extraits de boues activées. Le D-galactose, D-glucose, D-mannose et des acides uroniques sont les monomères principaux des exo-polysaccharides des boues et aussi des exo-polysaccharides bactériens en général (Sutherland, 1994). Les pentoses sont rares dans les exo-polysaccharides bactériens (Sutherland, 1994). Ils sont pourtant rapportés dans la fraction d'exo-polymères des boues (Forster, 1976 ; Steiner *et al.*, 1976 ; Kakii *et al.*, 1984). Ils proviendraient pour la plupart de la dégradation des acides nucléiques libérés lors de l'autolyse des cellules (Kakii *et al.*, 1984 ; Horan et Eccles, 1986).

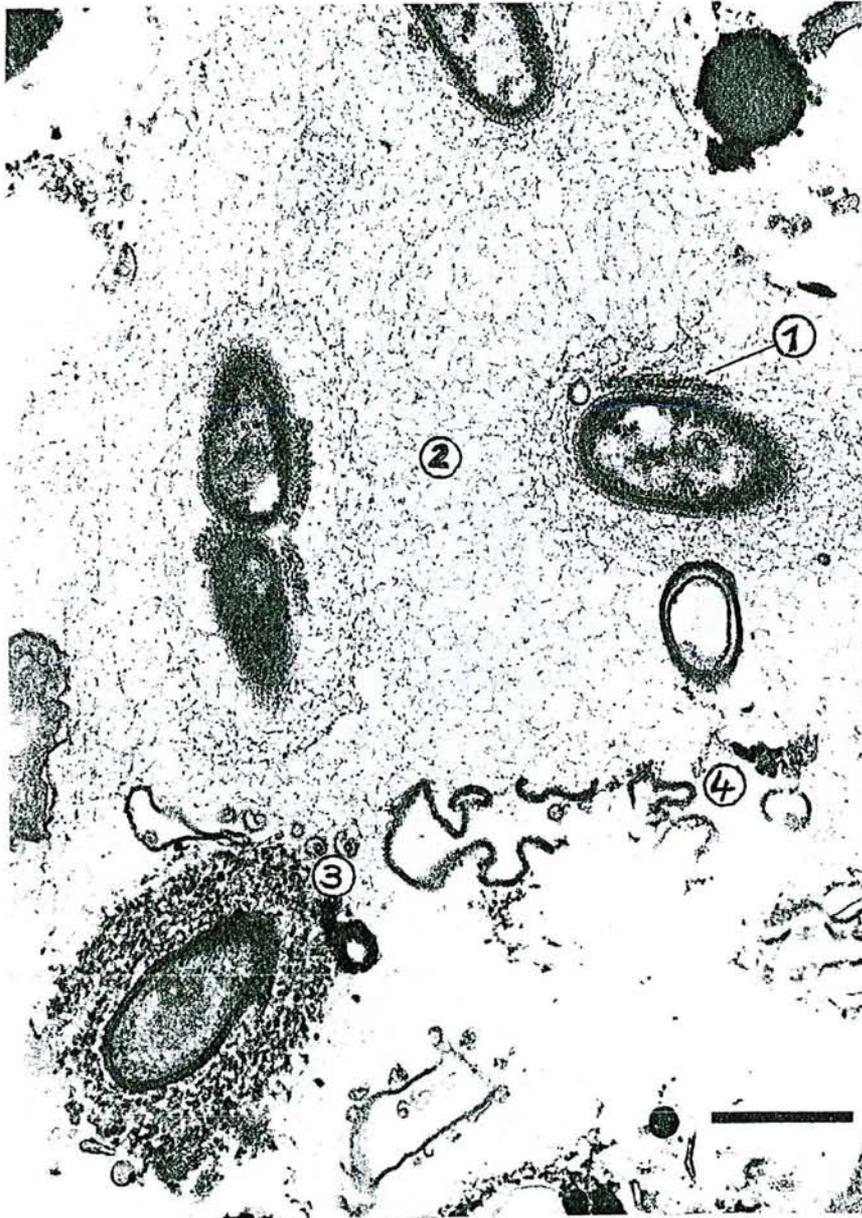


Figure I-3 : Photographie en microscopie électronique d'une coupe ultrafine de floc de boue activée montrant le réseau de polymères exo-cellulaires et les particules bactériennes. (1), zone de polymères condensés à proximité d'une paroi cellulaire ; (2) contacts entre polymères d'aspect identique ou (3) différent ; (4), fragments cellulaires ou autres particules. Les polymères sont très diffus et il n'est pas possible de savoir de quel micro-organisme ils proviennent. Barre = 0,5 μm (d'après Bleich et Nehr Korn, 1989).

Tableau I-12 : Nature et quantité des exo-polymères extraits des boues activées selon divers auteurs et diverses méthodologies.

Technique d'extraction	Exopolymères (mg g ⁻¹ MES)				Masse totale	Type d'échantillon, Remarques	Références
	Prot.	Polys.	A.D.N.	Autres			
Centrifugation 24000g/15 min	nd	nd	nd	nd	2-7 mg L ⁻¹ COT	boue acclim.	Magara <i>et al.</i> (1976)
NH ₄ OH 2M 2/1 vol., centri.20 min.	nd	19 à 65 (D)	nd	nd	nd	boue acclim. MES = 1.5 g L ⁻¹	Chao et Keinath (1979)
Ebullition/1h, centri.10000g/15min préc. éthanol/acétone	nd	ns (D)	nd		12+3% MES 17±2% MES	boue acclim. (n=9)	Beccari <i>et al.</i> (1980)
	nd	ns (D)	nd				
NaOH 0,1N, centri.10000g/10 min.(a)	22±6% (L)	29±2% (A)	15±4% (I)	ARN = 22±5%		boue acclim. (n=3) boue acclim. (n=2) <i>E. coli</i>	Sato et Ose (1980)
NaOH 2N, centri. 10000g/10 min.	5±1%	21±2%	10±2%	ARN = 26±1%			
NaOH 2N, centri. 10000g/10 min.	16%	23%	53%	ARN = 6%			
EDTA 3mM/3h, centri.14000g/20min	ns (b)(L)	24±4 (D)	4,3±0,7 (Ds)	nd	nd	boue activée (n=9) MES=8,2 g L ⁻¹	Brown et Lester (1980)
NaOH, 2M/5h, centri. 2000g.	530±43	63±11	13±1	nd	nd		
Autoclavage, centri.8000g/10min.	75±13	20±4	3,7±0,3	nd	nd	<i>K. aerogenes</i> (n=9)	
NaOH, 2M/5h, centri. 2000g.	252±13	12±1	8±2	nd	nd		
Autoclavage, centri.8000g/10min.	50±1	114±10	6±0,3	nd	nd		
EDTA 3mM/3h, centri.14000g/20min	nd	139±18	9±1	nd	nd		
NaOH 0,5N/12h, centri., précip.HCl	nd	nd	nd	Substances humiques = 17±6% du COT extraits		boues digérées	Riffaldi <i>et al.</i> (1982)
Résine Dowex 1/10 vol. (centri. 33000g/20 min.)	pH=7	57	15 (D)	nd	nd	boue activée (n=3) EPr=23% total prot. EPs=10% total sucres	Rudd <i>et al.</i> (1983)
	pH=4	44	17	nd	nd		
	pH=9	62	9	nd	nd		
Dowex 1/1 vol.		148	39	nd	nd		
NaOH 2N		136	65	nd	nd		
Autoclave 10min		86	29	nd	nd		
Centrifugation 32000g	Prot+Polys+A.N.= 88% du total des PEC dont ADN = 10 à 30% (D, L, Ds)				nd	boue acclim.	Vallom et McLoughlin (1984)
EDTA 60mM, NaOH pH=10	15±3 (L)	6,7±0,5 (A)	6±2 (Ds)	ARN=20±2	nd	boue activée (n=3)	Kakii <i>et al.</i> (1984)
Traitement thermique 80°C/1h, centri, extraction par solvants	ns	19±3% COT (D)	ns	lipides=12±4% COT	1600-2300 mg COT L ⁻¹	boue activée	Goodwin et Forster (1985)

(...)

(suite du Tableau I-12)

Traitement thermique 100°C/1h, centri.	nd	ns (A)	nd	nd	nd	boue activée	Forster (1985)
NH ₄ OH 1N, mixeur, dialyse	nd	16-125 (D)	nd	nd	nd	boue acclim. MES= 0,5-4,8 g L ⁻¹	Sheintuch <i>et al.</i> (1986)
80°C/1h, centrif.6000g/10 (a) min+propanol	10,6% (L)	66% (D)	8%	ARN=16%	57 mg	boue activée	Horan et Eccles (1986)
	nd	nd	nd	ac. uroniques=12 à 20% des sucres totaux		boue activée (n=5)	
80°C, centri10000 RPM éthOH/acétone	14.1 (L)	23,9 (D)		non identifié = 40%	9% MES et COT = 27,5 mg.g ⁻¹ MES	boue activée (MES=4.8g L ⁻¹) cendres=18% des PEC	Morgan <i>et al.</i> (1990)
Sonde ultrasons 60W min/100mL	30 (L)	13 (D)	nd	nd	nd	boue acclim. (MES=1,6 g L ⁻¹)	King et Forster (1990)
Mixeur/2 min., centrifugation 4000 RPM/30min idem + 2,4 mM d'EDTA	21±10 (B)	8±4 (A)	nd	ns	nd	boue activée (n=7)	Eriksson et Alm (1991)
	15 à 70	7 à 20	nd	nd	nd		
Sonde ultrasons, 100W.min./10mL centrifugation 20000g/20 min.	112±13 (B) 44±45	19±1 (D) 14±6	8,8±0.2 (Ds) 16±5	nd nd	nd nd	boue activée (n=3) MES= 1 à 7 g L ⁻¹ (n=16)	Urbain <i>et al.</i> (1993)
Dowex 60g, agitation 600 RPM/1h et centri. 12000g/15min (b)	64,1 (L) 75,2	6,8 (A) 8,8	nd nd	ac. uroniques = 3,2 ; subst. humiques=50 ac. uroniques = 3,3 ; subst. humiques=80		boue activée boue activée	Frølund et Keiding (1994)
Sonde ultrasons, 37W min/50 mL centri 20000g/30 min.	30-50 (B)	10-15 (D)	10-15 (Ds)	nd	10% des MVS	boue activée (n=6) MES = 3 à 5 g.L ⁻¹	Jorand <i>et al.</i> (1995)
Dowex 75g, 900RPM/17h (b) centri. 12000g/15min.	243±7 (L) 210	48±1 (A) 42	16 13	ac.uroniques=6 ; subst.humiques=130 ac.uroniques=7 ; subst.humiques=180		boue activée boue activée	Frølund <i>et al.</i> (1995b)

(a) = en % de la masse sèche des exopolymères extraits

(b) = en mg g⁻¹ des matières volatiles en suspension

Légende : nd = non dosé, ns = dosé mais valeur inexploitable ou non signalée, MES = matières sèches en suspension, COT = carbone organique total, PEC = polymères exo-cellulaires, EPs = exopolysaccharides, EPr = exoprotéines, boue acclim. = boue activée cultivée au laboratoire, SVI = indice de volume de boues (sludge volume index), PHB = polyhydroxybutyrate.

Abréviations des dosages colorimétriques :

B= réaction au bleu de Coomassie (Bradford, 1976), C= réaction au carbazole, Ds= réaction à la diphenylamine (Dische, 1930), D= réaction au phénol sulfurique (Dubois, 1956), A= réaction à l'antrone (Dreywood, 1946 cité par Frølund et Keiding, 1994), L= réaction de biuret et au réactif de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951), I = réaction à l'indole (Sato et Ose, 1980).

Dans la cellule bactérienne, les acides uroniques se rencontrent quasiment exclusivement dans les exo-polysaccharides et en majorité dans les exo-polysaccharides acides où ils représentent 20 à 25% du poids moléculaire (Bengtsson, 1991 ; Sutherland, 1994). Ils seraient les principaux composés ionogéniques des exo-polymères et contribueraient à la charge globale du floc (Steiner *et al.*, 1976 ; Forster, 1976 ; Horan et Eccles, 1986).

Tableau I-13 : Composition en monomères des exo-polysaccharides extraits de boues activées (d'origine urbaine).

Composants	Extraction à l'EDTA+NaOH, analyse par HPLC (Kakii <i>et al.</i> , 1984)	Extraction thermique, analyse par HPLC (Horan et Eccles, 1986)
Acide glucuronique	8	12±4
Acide galacturonique	n.s.	5±2
Arabinose	6	n.s.
Fucose	11	n.s.
Galactose	21,5	35±11
Glucose	19,5	25±6
Mannose	15	23±8
Rhamnose	14	n.s.
Xylose	5	n.s.
Total	100	100

n.s. = non signalé

Les exo-polysaccharides sont dosés la plupart du temps selon deux techniques ; la réaction à l'antrone (Gaudy, 1962 cité par Frølund *et al.*, 1994) et la réaction au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956) qui sont spécifiques des glucides (pentoses, hexoses, acides uroniques, oses aminés...). Ces deux méthodes donnent des résultats similaires sur les exo-polymères de boues activées (Brown et Lester, 1980 ; Frølund *et al.*, 1995b).

D'après les données rassemblées dans le Tableau I-12 provenant des résultats obtenus par de nombreux auteurs, les exo-polysaccharides représenteraient 7 à 139 mg équivalent glucose g⁻¹ des MES des boues. Cependant, ces valeurs pourraient être sous-estimées principalement du fait que le glucose est utilisé comme molécule de référence dans l'expression des résultats. En effet, Horan et Eccles (1986) montrent qu'en utilisant des polymères (caragennane ou polysaccharides bactériens) plutôt que du glucose libre comme standard les quantités obtenues sont trois fois inférieures (Figure I-4). L'hydrolyse peut être incomplète et de plus l'absorbance n'étant pas la même pour tous les glucides la quantité de sucres dosée peut être différente selon la composition des polysaccharides (Dubois *et al.*, 1956).

Les acides uroniques par contre peuvent être surestimés principalement à cause de la présence des sucres neutres qui interfèrent dans les méthodes de dosage au carbazole et à l'orcinol (Dische, 1947 et Brown, 1946 cités par Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973). Cependant, Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) montrent qu'en utilisant l'hydroxydiphényl comme réactif, le dosage des acides uroniques devient plus spécifique et plus sensible.

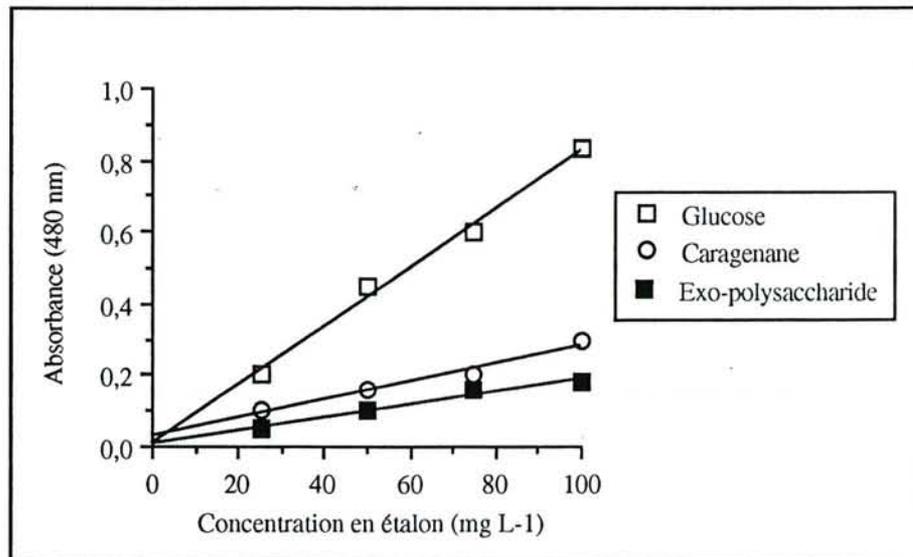


Figure I-4. : Réponse du dosage des sucres totaux au phénol sulfurique selon différents étalons glucidiques : glucose, caragénane ou exo-polysaccharides bactériens (*P. stutzeri*) (d'après Horan et Eccles, 1986).

(b) Les protéines

Tout comme les exo-polysaccharides, les quantités de protéines rapportées dans la littérature doivent être considérées avec prudence. En effet, il existe de grandes variations selon la méthode de dosage utilisée (Davis, 1988 ; Eriksson et Alm, 1991 ; Raunkjaer *et al.*, 1994). Deux méthodes sont principalement utilisées pour doser les protéines : la méthode de Lowry *et al.* (1951) au réactif de Folin-Ciocalteu et la méthode de Bradford (1976) au bleu de Coomassie. La première méthode est sensible mais peu spécifique tandis que la seconde est peu sensible mais fortement spécifique (Davis, 1988).

La méthode au réactif de Folin réagit à de nombreux composés dont certains sont souvent présents dans les solutions tampons ou d'extractants (EDTA, TRIS, surfactants) ou naturellement présents dans l'échantillon (substances humiques, acides nucléiques, sucres,...) (Peterson, 1979 ; Davis, 1988). Cependant, les interférences peuvent être en partie éliminées par précipitation à l'acide trichloroacétique et centrifugation (Sigma diagnostics, 1989 ; Raunkjauer *et al.*, 1994). Les interférences causées par les acides humiques pourraient être éliminées en suivant le protocole décrit par Frølund *et al.* (1995 a et b).

Le choix du standard ne semble pas essentiel. En effet, en se référant à l'indice 100 obtenu avec l'albumine sérique bovine, la moyenne des résultats obtenus avec 27 protéines est de 105 ± 24 mg L⁻¹ (Davis, 1988). Par contre, avec la méthode de Bradford, la valeur obtenue n'est plus que de 50 ± 2 mg L⁻¹ (Davis, 1988) ce qui explique les plus faibles valeurs des contenus en protéines des PEC obtenues avec cette méthode plutôt qu'avec celle de Lowry (Eriksson et Alm, 1991 ; Frølund *et al.*, 1995 a et b ; Jorand *et al.*, 1995).

Dans le pool des exo-protéines extraites des boues Frølund *et al.* (1995a) ont identifiés

plusieurs activités enzymatiques parmi lesquelles l'activité estérasique est dominante.

(c) Les acides nucléiques

Les acides nucléiques sont fréquemment dosés dans les exo-polymères (Tableau I-12) et ont depuis longtemps été décrits dans la matrice exo-cellulaire (Nishikawa et Kuriyama, 1968 ; Pavoni *et al.*, 1971). La matière organique des boues de station contiendrait près de 2 à 9% d'ADN (Nishikawa et Kuriyama, 1968 ; Vallom et Mc Loughlin, 1984 ; Liebeskind et Dohmann, 1994 ; Jorand *et al.*, 1995) ce qui est supérieur aux teneurs obtenues à partir de cultures pures (2 à 4%, Donkersloot *et al.*, 1972 ; Platt *et al.*, 1985 ; Ingraham *et al.*, 1983).

La présence d'ADN exo-cellulaire dans d'autres écosystèmes a été également rapportée par Ogram *et al.* (1987) qui dosent 1 µg d'ADN exo-cellulaire g⁻¹ de sédiment de marais, de mer ou de réservoir d'eau potable.

Les ARN sont dosés dans des proportions beaucoup plus importantes que l'ADN des polymères exo-cellulaires (Tableau I-12). Ainsi Nishikawa et Kuriyama (1969) dosent dans la matière organique des boues 10% d'ARN et Horan et Eccles (1986) obtiennent 20% d'ARN dans les exo-polymères. Ces résultats semblent logiques étant donné que les ARN représentent près de 20% du poids sec cellulaire (Ingraham *et al.*, 1983).

L'ADN est souvent dosé par la méthode colorimétrique à la diphénylamine de la réaction de Dische (1930 cité par Deriaz *et al.*, 1949). L'étalon généralement utilisé est l'ADN de thymus de veau à cause de son faible coût. Burton (1956) et Liebeskind et Dohmann (1994) ont montré que les résultats étaient identiques en utilisant de l'ADN bactérien, phagique ou d'eucaryote. D'autre part, la méthode est suffisamment sensible, d'après les données de Deriaz *et al.* (1949) et Burton (1956), pour que les autres macromolécules (*e.g.* polysaccharides) aux concentrations où elles sont dans les boues n'interfèrent pas avec la réaction de dosage.

(d) Les lipides

Peu d'études se sont attachées à doser les lipides dans les exo-polymères, sans doute à cause de l'absence d'une méthodologie simple. Les lipides sont extraits par des solvants organiques puis sont analysés par spectroscopie infrarouge après plusieurs fractionnements (Goodwin et Forster, 1985 ; Raunkjauer *et al.*, 1994).

Les polyhydroxybutyrates (PHB) sont parmi les lipides (esters d'acide gras, famille des étholides, Louisot, 1969) ceux qui ont attiré le plus d'attention. Ce sont des lipides de stockage communs aux bactéries des boues activées (Forster, 1976) et à d'autres écosystèmes (Bengtsson, 1991). Ils sont surtout produits en conditions de famine (Forster, 1976 ; Bengtsson, 1991) mais aussi préférentiellement par certaines bactéries lorsqu'elles sont adsorbées (Bengtsson, 1991). Ils sont parfois rencontrés dans le pool d'exo-polymères et ont été mis en cause dans les phénomènes de floculation (Hughes et Stafford, 1976). Forster (1976) ne constate toutefois aucune relation entre la

capacité de floculation des boues et leur contenu en PHB. De plus, Goodwin et Forster (1985) ne retrouvent pas les PHB dans la fraction lipidique des exo-polymères. Des triglycérides et un type d'ester conjugué ont partiellement été identifiés sur les 12 ± 4 % de lipides (mg de Carbone pour 100 mg de Carbone organique total) dans les exo-polymères extraits par Goodwin et Forster (1985) à partir de 3 échantillons de boues activées.

(e) *Les substances humiques*

Les substances humiques sont des composés organiques de composition chimique hétérogène, de couleur jaune, brune, noire ou rouge et de poids moléculaire élevé (0,7 à 300 KD) qui sont présents dans la plupart des écosystèmes (Dewalle et Chian, 1974 ; Aiken, 1985 ; Steinberg et Muenster, 1985 ; Rehbut et Lurie, 1993). Elles seraient le produit de la décomposition microbienne de la matière organique et pourraient être relarguées du compartiment intracellulaire après la lyse des cellules (Dewalle et Chian ; 1974). Leur structure n'est pas exactement définie. Elles sont constituées d'un arrangement de cycles aromatiques, d'esters aliphatiques plus ou moins conjugués présentant selon leur origine des groupements carboxyles et carbonyles en nombre variable (Steinberg et Muenster, 1985). La Figure I-5 montre deux structures possibles de substances humiques dont l'une a été obtenue à partir de boues activées.

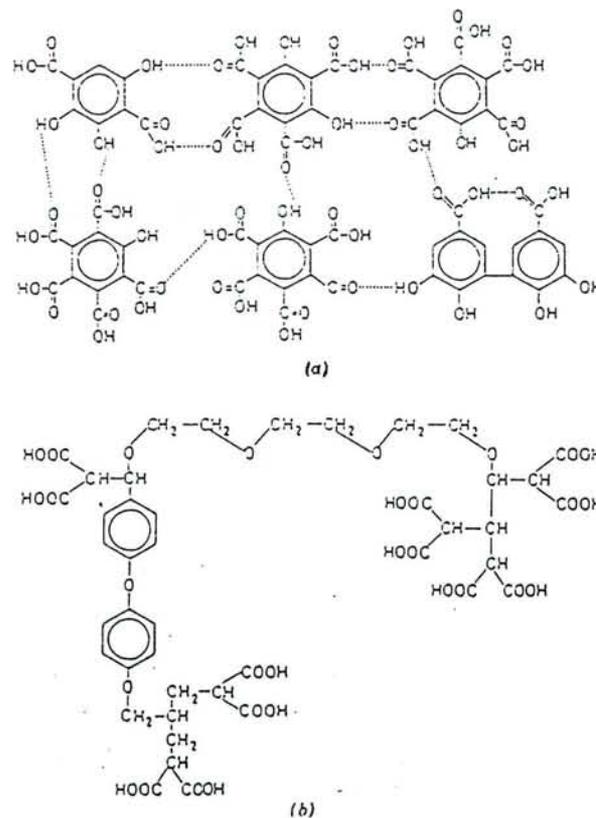


Figure I-5. : Structures hypothétiques de substances humiques d'eau douce (a) (Gamble et Schnitzer, 1974) et de boues activées (b) (Bergmann, 1978) cités par Steinberg et Muenster (1985).

D'après Steinberg et Muenster (1985), le degré d'aromaticité diminue inversement avec le rapport substances humiques autochtones/substances humiques allochtones. Riffaldi *et al.* (1982) montrent que les substances humiques des boues secondaires sont plus aromatiques et/ou de taille plus petite que les substances humiques du sol. Par ailleurs, la structure moléculaire proposée par Bergmann (cité par Steinberg et Muenster, 1985) (Figure I-5b) présente une aromaticité plus faible que les substances humiques classiques (Steinberg et Muenster, 1985) suggérant que les substances humiques des boues activées sont relativement "jeunes".

Le problème lié à l'étude des substances humiques est leur caractérisation. En effet il n'existe pas de méthode simple de dosage principalement du fait qu'elles n'ont pas de formule moléculaire exacte. Les fonctions aromatiques des substances humiques interfèrent dans le dosage de Lowry mais pas dans celui de Bradford (Eriksson et Alm, 1991 ; Raunkjaer *et al.*, 1994). Les quantités de protéines dosées selon Lowry sont systématiquement plus élevées que celles dosées selon Bradford (Eriksson et Alm, 1991 ; Frølund *et al.*, 1995b ; Jorand, 1995 non publié). Eriksson et Alm (1991) considèrent que la concentration en acides humiques dans les PEC correspond à la différence entre les quantités de protéines dosées selon Lowry avec celles dosées selon Bradford. Ils obtiennent ainsi 4 à 19 mg d'acides humiques g⁻¹ de MES de boue. Cependant cette approche est critiquable car d'autres facteurs que l'interférence des acides humiques peuvent être à l'origine de l'écart entre les deux méthodes, notamment la différence d'absorption des protéines des PEC par rapport au standard (albumine sérique de veau) qui peut varier, à concentration égale, du simple au double avec la méthode de Bradford (Davis, 1988).

Frølund *et al.* (1995 a et b) dosent la concentration en acides humiques en se basant sur le principe du dosage de Lowry après modification du réactif et à partir d'un étalon d'acide humique. De cette manière, les auteurs obtiennent 50 à 180 mg g⁻¹ MES de substances humiques (Tableau I-12). Ils montrent par ailleurs que les substances humiques sont assez faciles à extraire des boues.

I.2.3.4. Analyse du poids moléculaire des exo-polymères

Le poids moléculaire des exo-polymères extraits de boues activées a été peu étudié. C'est pourtant selon Forster (1976, 1985) et Horan et Eccles (1986) un facteur important de la structure et des propriétés du floc. Les procédures d'extraction peuvent apporter un biais dans cette analyse, certaines méthodes pouvant hydrolyser partiellement les polymères (Forster, 1976). Horan et Eccles (1986) obtiennent 3 pics majeurs à partir d'exo-polysaccharides purifiés provenant de boues de 5 stations d'épuration : 1600 KD–2000 KD ; 400 KD–800 KD et 120 KD–400 KD. N'obtenant pas de fraction ayant un poids moléculaire inférieur à 120 KD, ils considèrent que leur méthode n'entraînerait pas de dégradation significative des exo-polymères contrairement à Forster (1976) qui obtient 15 % de composés ≤ 10KD mais à partir de l'extrait brut de PEC (Tableau I-14).

Tableau I-14 : Résultats du fractionnement de polymères de boues activées par ultrafiltration (Forster, 1976).

Poids moléculaire des fractions	% du poids sec
≥ 100.000 D	59%
100.000 – 10.000 D	19%
≤ 10.000 D	15%
Recouvrement	93%

I.2.4. Organisation générale des floccs de boues activées

Les agrégats biologiques des systèmes d'épuration à boues activées sont constitués de micro-organismes, de particules minérales et de débris organiques noyés dans une matrice hydratée de polymères exo-cellulaires. Outre la nature des différents constituants c'est aussi leur organisation tridimensionnelle qui gouvernent les propriétés physiques du floc. Dans ce paragraphe nous tenterons de définir la structure générale des floccs puis les différents paramètres physiques qui les caractérisent.

Diverses définitions du floc biologique sont proposées dans la littérature. Selon la revue de Li et Ganczarzyk (1986), certains auteurs considèrent que le terme de floc concerne les agrégats d'une taille supérieure à 20 µm ou ceux ayant un nombre limité de particules primaires (*e.g.* : >10). D'autres auteurs définissent deux types de particules, d'une part les "floccs" qui correspondent à n'importe quelle association de particules primaires et, d'autre part les "agrégats" qui correspondent aux groupements des floccs les uns avec les autres (van Leussen, 1988). Mais le plus souvent, et c'est ce que nous considérerons, les termes floccs et agrégats sont interchangeableables.

I.2.4.1. Structure générale

Les agrégats (de sols, de boues, de sédiments...) ont généralement plusieurs niveaux de structuration. Ainsi van Leussen (1988) distingue 4 types d'agrégats : les particules primaires (l'élément de base), les *flocculi*, les floccs puis les agrégats (Figure I-6). Les "agrégats" n'auraient qu'une existence transitoire, lors de la sédimentation par exemple où les forces de cisaillement sont suffisamment faibles pour permettre leur formation. Les "flocculi", ou "microfloccs", ont été mis en évidence récemment par observation en microscopie électronique. Cela suggère que certains sont des microcolonies bactériennes (Bleich et Nehrkorn, 1989 ; Li et Ganczarzyk, 1990 ; Jorand *et al.*, 1995). La présence de cellules isolées dans le gel extra-cellulaire est également mise en évidence. L'association des *flocculi* entre eux forme le floc dont la taille est de l'ordre de la centaine de µm (Li et Ganczarzyk, 1986, 1991 ; Jorand *et al.*, 1995). Li et Ganczarzyk (1990) montrent que la structure et la distribution des bactéries dans le floc ne sont pas uniformes et de larges espaces vides (remplis d'eau) représentent 25 à 65% de la surface totale de la section du floc.

Les bactéries filamenteuses se rencontrent dans tous les types de boues, à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des floccs. Elles renforceraient la cohésion du floc en formant une armature et faciliteraient le piégeage des cellules libres (Parker *et al.*, 1972 ; Jenkins *et al.*, 1993) mais leur présence n'est pas essentielle à la formation des floccs comme le montre Wanner et Grau (1989).

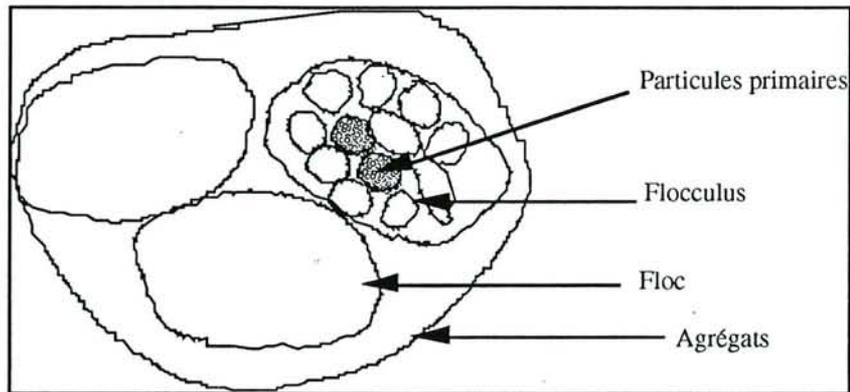


Figure I-6 : Représentation schématique de la structure d'un floc montrant les différents niveaux d'agrégation (adapté de van Leussen, 1988).

I.2.4.2. Forme des floccs

En fonction des conditions du milieu (temps de séjour des boues, charge organique...), la forme des floccs est plus ou moins irrégulière (branchée, sphérique, allongée) avec une structure interne susceptible de se modifier (Figure I-7) et un contour toujours irrégulier. La géométrie euclidienne s'avère insuffisante pour la définir (Logan et Wilkinson, 1991). C'est pourquoi la géométrie fractale, qui permet de décrire la structure d'objets irréguliers, devient de plus en plus utilisée pour l'étude des agrégats en général.

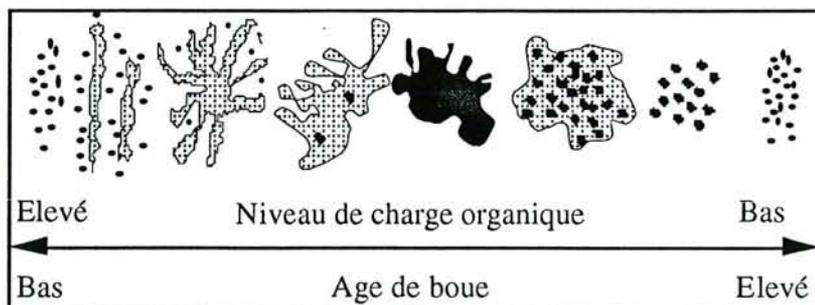


Figure I-7 : Représentation "empirique" des différentes structures des floccs de boues activées par les bactéries formant le floc (adapté de Eriksson *et al.*, 1992).

Un fractal se définit comme étant un objet de forme irrégulière qui répond à la loi d'autosimilarité quelle que soit l'échelle d'observation. La dimension fractale est la grandeur qui permet de quantifier la tortuosité des objets. Li et Ganczarzyk (1990) ont montré la nature fractale de la morphologie et du contour de coupes de floccs de boues activées. Logan et Wilkinson (1991) ont montré que pour des agrégats de micro-organismes cultivés en souche pure, leur dimension fractale était fonction du type de micro-organisme ou des conditions d'agitation des cultures. La dimension fractale permet ainsi de montrer que la densité des floccs placés en condition d'agitation élevée est plus

forte que celle des floccs placés sous une agitation douce. Zartarian *et al.* (1994) ont obtenu une dimension fractale d'un microfloc de boue activée caractéristique d'un arrangement compact de particules et correspondant à une croissance de l'agrégat par division cellulaire. Au-delà de la simple description de leur irrégularité, la théorie des fractals permet non seulement d'approcher les caractéristiques physiques des agrégats (densité, porosité...) mais aussi les mécanismes de leur formation.

I.2.4.3. Propriétés physiques

I.2.4.3.1. *Taille et distribution granulométrique des floccs*

La forme très irrégulière des floccs de boues activées rend difficile le choix d'une dimension permettant de caractériser leur tailles. Une technique très répandue, car ne nécessitant pas de matériel sophistiqué, consiste à compter les floccs et à les dimensionner à l'aide d'un microscope optique (Magara *et al.*, 1976 ; Galil *et al.*, 1991 ; Rasmussen *et al.*, 1994). Cependant, l'erreur causée par l'appréciation non objective de l'oeil humain peut être un biais important lié à cette technique et difficile à maîtriser. L'analyse granulométrique doit alors être obtenue par des techniques plus objectives telles que l'utilisation du compteur Coulter, des systèmes d'analyse automatique d'image ou l'analyse granulométrique par diffraction laser. La dimension obtenue par ces types d'appareils est le diamètre équivalent des particules considérées, c'est à dire le diamètre de la sphère ayant la même surface que la projection du flocc (Figure I-8).

Le compteur Coulter détermine le nombre et la taille de particules en suspension qui en passant au travers d'un orifice placé entre deux électrodes, augmentent la résistance du fluide. L'amplitude de la variation est proportionnelle au volume des particules et le nombre de variations indique le nombre de particules (Cassellas-Salha, 1979 ; Li et Ganczarzyk, 1991). L'inconvénient d'un tel système est qu'il n'est pas applicable aux particules très poreuses selon Li et Ganczarzyk (1991) qui ne l'utilisent que pour les floccs de taille inférieure à 10 µm dont la porosité est considérée comme très faible.

Le système d'analyse d'image a également été utilisé par Li et Ganczarzyk (1991). Les floccs sont stabilisés dans de la gélose en boîte de Pétri. Le système d'analyse parcourt un certain volume de l'échantillon et détermine automatiquement les dimensions des floccs dans un plan donné, à savoir i) plus grande longueur, ii) plus petite largeur, iii) surface projetée et, iv) périmètre projeté. A partir de ces valeurs, l'appareil peut donner le diamètre équivalent et le diamètre moyen du flocc. Le diamètre moyen est obtenu par la somme de la plus grande longueur et de la plus petite largeur du flocc divisée par deux (Figure I-8).

La granulométrie laser est basée sur le principe de la diffraction des particules. L'angle de diffraction étant différent selon la taille de la particule, l'énergie collectée à différents angles donne la répartition granulométrique des particules (Cassellas-Salha, 1979).

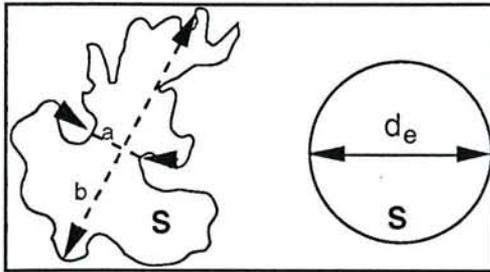


Figure I-8 : Détermination des dimensions d'un floc : $d = (a+b)/2$ où a = plus petite largeur du floc, b = plus grande longueur du floc, d = diamètre moyen du floc, d_e = diamètre équivalent *i.e.* diamètre de la sphère ayant la même surface que le floc (S).

La distribution de la taille des particules permet d'avoir une vision correcte de la granulométrie des boues. Du fait de l'importance de l'écart de taille des particules (0,5 à >1000 μm , Li et Ganczarzyk, 1986), le choix d'intervalles de classes non équidistants apparaît nécessaire (Li et Ganczarzyk, 1991). Le rapport de l'intervalle d'une classe par le milieu de la classe doit être constant pour toutes les classes pour absorber l'erreur possible créée par le choix des intervalles de classe. Li et Ganczarzyk (1991) utilisent pour cela une progression géométrique de facteur 2 pour définir les intervalles de classes utilisés pour présenter la distribution des tailles.

La distribution des tailles peut être représentée selon plusieurs paramètres :

- nombre de particules
- surface des particules
- masse des particules
- volume des particules

Li et Ganczarzyk (1991) ont étudié les quatre types de distribution en utilisant un compteur Coulter pour les particules de taille inférieure à 10 μm et un système d'analyse d'image pour les particules supérieures à 10 μm . Les distributions par la surface, la masse et le volume sont obtenues par modélisation mathématique à partir des distributions par le nombre. 33 échantillons de boues activées d'origine urbaine ont été étudiés. Une distribution par le nombre, typique de ces échantillons, montre la prédominance écrasante des particules de petite taille : 95% sont inférieures à 2 μm (Figure I-9). Par contre, les distributions par le volume, la surface et la masse montrent la prédominance des particules >10 μm . Près de 80% du volume des particules de boues est occupé par des floes >128 μm . La biomasse est donc principalement représentée par ces particules à qui une attention particulière doit être prêtée.

Le nombre de floes > 10 μm diminue avec l'augmentation de leur taille selon une distribution log-normale ($r > 0,95$) dans 70 à 80% des cas ($n=33$). Cela contredit les conclusions de Parker *et al.* (1972) qui observaient une distribution bimodale des floes avec une disparité des particules appartenant à l'intervalle 5-25 μm .

L'utilisation de la diffraction laser a donné des résultats similaires à ceux de Li et Ganczarzyk (1991) à savoir plus de 80% du volume occupé par les floes > 10 μm (Jorand *et al.*, 1995).

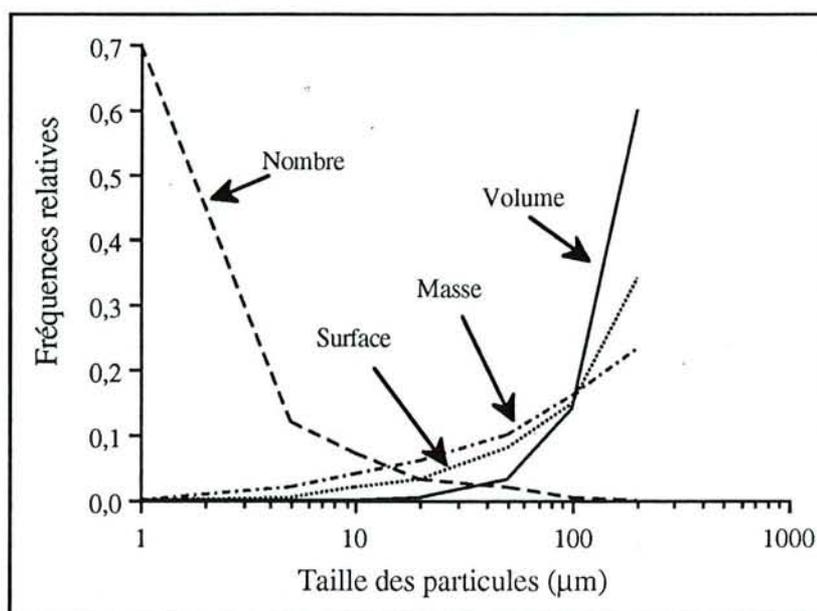


Figure I-9 : Représentation de la distribution de la taille des floes de boues activées par leur nombre, leur masse, leur surface et leur volume (adapté de Li et Ganczarzyk, 1991).

I.2.4.3.2. Surface

La notion de surface est très différente selon que l'irrégularité du floe et sa porosité sont considérées. En tenant compte de la porosité, Smith et Coackley (1984) obtiennent 120 à 142 m² g⁻¹ de boue en utilisant un colorant et sa surface spécifique d'adsorption. En tenant compte des deux orientations possibles du colorant (couchée ou debout) la surface est de 60 ou 189 m² g⁻¹ selon Andreadakis (1993). Par contre, Finstein et Heukelekian (1967) obtiennent seulement 0,9 à 8 m² g⁻¹ en considérant le floe comme un objet lisse et non poreux. La différence de surface obtenue entre les deux approches reflète l'importante surface interne du floe.

I.2.4.3.3. Porosité et teneur en eau

La porosité des floes rapportée dans la littérature varie de 80-99% (Li et Ganczarzyk, 1986 ; Logan et Hunt, 1988 ; Andreadakis, 1993) et augmente avec la taille des floes (Li et Ganczarzyk, 1986 ; Tambo et Wang, 1993).

La teneur en eau des floes est associée à leur porosité. Ainsi, 82 à 95% du volume des floes serait occupé par de l'eau (Li et Ganczarzyk, 1986). La teneur en eau des boues conditionne la phase finale du traitement des boues, à savoir leur déshydratabilité. Les trois formes de l'eau classiquement décrites : l'eau libre, l'eau interstitielle adsorbée et l'eau liée sont contenues dans les floes dans un rapport de 20:2:2,5 (Li et Ganczarzyk, 1986). Mais seule l'eau interstitielle et l'eau liée sont considérées comme faisant partie intégrante du floe.

Heukelekian et Weisberg (1956) montrent une relation entre l'eau liée et la décantation des

boues ce qui suggère que le taux d'hydratation des boues contrôle leurs propriétés de décantation.

1.2.4.3.4. Densité

La forte teneur en eau des floccs suppose que leur densité est proche de celle de l'eau. Les valeurs rapportées par la littérature se situent entre 1,01 et 1,09 (Tableau I-15).

Tableau I-15 : Densité des floccs de boues activées

Densité	Echantillons	Techniques	Références
1,09	Boues de station d'épuration	Mesure indirecte, calcul à partir des densités cellulaires, du volume de boue et de la densité du milieu.	Li et Ganczarzyk (1986)
1,015-1,034	Boues de laboratoire	Mesure indirecte, calcul à partir de la densité de la boue sèche.	Andreadakis (1993)
1,05±0,01	Boues de 7 stations d'épuration	Mesure directe par centrifugation en gradient de densité	Dammel et Schroeder (1991)

Magara *et al.* (1976) et Andreadakis (1993) montrent que la taille moyenne des floccs augmente avec la diminution de la densité moyenne des floccs ce qui confirme le modèle de Tambo et Wang (1993) qui relie l'augmentation de la porosité (ou du contenu en eau) avec la densité et la taille des floccs. La densité élevée des microfloccs est suggérée par plusieurs études qui montrent une augmentation de la décantabilité lorsque la structure secondaire du flocc est détruite (Banks et Walker, 1977 ; Bruus *et al.*, 1992).

1.2.4.3.5 Transfert de masse

Logan et Hunt (1988) émettent l'hypothèse qu'en milieu turbulent, un flux de liquide irriguerait les floccs du fait de leur très forte porosité. Le transport du substrat aux cellules dans ces agrégats poreux peut être dominé par le flux de fluide au travers de l'agrégat plutôt que par la diffusion moléculaire. La présence de tels "canaux" est confirmée par Li et Ganczarzyk (1988, 1990).

1.2.4.3.6. Force de cohésion

La force de cohésion des agrégats biologiques se révèle souvent plus élevée que celle des floccs minéraux formés par coagulation en présence d'électrolytes par exemple. Li et Ganczarzyk (1986) rapportent que la cohésion des floccs de boues activées est trois à six fois plus élevée que celle de floccs d'aluminium. Cette force de cohésion serait due aux exo-polymères qui apportent une élasticité au système (van Leussen, 1988) ainsi qu'aux bactéries filamenteuses qui soutiennent la structure du flocc en jouant le rôle d'armature (Parker *et al.*, 1972).

La résistance des floccs aux forces de cisaillement est généralement testée sous l'effet de forces de cisaillement croissantes engendrées par l'agitation (Parker *et al.*, 1972 ; Galil *et al.*, 1991 ; Das *et al.*, 1993) ou par des ultrasons (King et Forster, 1990 ; Morgan et Forster, 1992) représentées par G

qui traduit le gradient de vitesse du fluide :

$$G = (P/\gamma V)^{0,5} \quad (1)$$

où P = puissance reçue ("input") (W ou $m^2 \text{ kg s}^{-3}$)

γ = viscosité dynamique ($\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

et V = volume de liquide en agitation (m^3)

La taille des flocs diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (Parker *et al.*, 1972) et consécutivement une augmentation du nombre de particules en suspension dans le surnageant est observée (Das *et al.*, 1993). Parker *et al.* (1972) et Galil *et al.* (1991) montrent qu'avec $G < 70 \text{ s}^{-1}$ (soit 5 W m^{-3}), la floculation des boues (acclimatées au laboratoire) est optimale, au-delà il y aurait altération des flocs. Cependant Das *et al.* (1993) obtiennent une altération des flocs seulement pour des valeurs de $G > 150 \text{ s}^{-1}$ avec des boues de station. Les valeurs de G classiquement obtenues dans des bassins d'aération de boues se situent entre 88 et 220 s^{-1} (Das *et al.*, 1993). Il semble alors que les flocs dans les bassins d'aération soient peu ou pas altérés par l'agitation. En fait selon Parker *et al.* (1972), l'agitation aurait principalement pour effet d'éroder le floc, sa cohésion étant suffisamment importante pour résister à de telles gradients de vitesse. Des énergies beaucoup plus élevées sont alors nécessaires pour casser la structure du floc. Ainsi, une agitation à 800 RPM pendant au moins trois heures permet de casser complètement le floc selon Li et Ganczarzyk (1986). Par les ultrasons, des flocs de boues de laboratoire sont détruits à partir d'énergie correspondant à 9 J mL^{-1} (King et Forster, 1990) ou à partir de 34 J mL^{-1} pour des boues de stations (Jorand *et al.*, 1995). Les flocs sont alors détruits en microflocs beaucoup plus résistants et seulement altérés par érosion même sous 180 J mL^{-1} (Jorand *et al.*, 1995).

Les caractéristiques physiques des flocs de boues activées sont résumées dans le Tableau I-16.

Tableau I-16 : Résumé des caractéristiques physiques du floc.

Paramètres	Valeurs typiques	Références
Taille	100 - 200 μm	Li et Ganczarzyk (1991)
Densité	1,05	Dammel et Schroeder (1991)
Teneur en eau liée	100-300 % des MES	Heukelakian & Weisberg (1956)
Porosité	85-99%	Smith et Coackley (1984)
Dimension fractale (masse \propto taille)	1,4 à 2,8	Li et Ganczarzyk (1989)
Surface interne	100-200 $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	Smith et Coackley (1984) Andreadakis (1993)

I.2.5. Décantabilité des agrégats

En fin de traitement, la sédimentation permet de séparer l'eau épurée des matières solides en suspension. La qualité de l'épuration dépend donc de la capacité des flocs à décanter, son étude est alors essentielle.

I.2.5.1. Vitesse de décantation des floccs

Li et Ganczarczyk (1987) se sont intéressés aux vitesses de décantation de floccs introduits dans une colonne d'eau de 50 cm de hauteur. Ces vitesses sont déterminées en mesurant la distance parcourue par un flocc en un temps donné à l'aide de photographies en lumière stroboscopique. Elles augmentent avec la taille des floccs (coefficients de corrélation de 0,75 pour le diamètre de la section des floccs et de 0,90 pour leur longueur). Les vitesses de décantation varient de 0,5 à 2,0 mm s⁻¹ (1,8 à 7,2 m h⁻¹) pour des floccs de diamètre compris entre 50 et 700 µm et pour des longueurs de floccs comprises entre 100 et 1500 µm. Cependant la relation liant la taille des floccs avec leur vitesse de décantation ne s'accorde pas avec la loi de Stokes. La cause majeure étant certainement la variabilité de la densité d'un flocc à l'autre et l'irrégularité de leur forme (Li et Ganczarczyk, 1987).

La détermination des vitesses de décantation des floccs, dans leur individualité, demande beaucoup de manipulations et n'est sans doute pas représentative de la décantation des boues dans les ouvrages de la station. Habituellement ce sont des tests rapides et simples à mettre en oeuvre qui sont utilisés.

I.2.5.2. Les tests de décantabilité

L'objectif des tests est de caractériser l'aptitude des boues à la décantation en calculant un indice. L'indice de Mohlman ou "Sludge Volume Index" (SVI) est la base de tous les autres tests qui sont l'indice de boue ou "Diluted Sludge Volume Index" (DSVI), le "Stirred Sludge Volume Index" (SSVI) et le "Sludge Quality Index" (SQI).

I.2.5.2.1. *L'indice de Mohlman*

L'indice est obtenu en divisant le poids des matières sèches par le volume de boue décantée après 30 min et est exprimé en mL g⁻¹ MES. Pour réaliser l'expérience dans de bonnes conditions le diamètre des éprouvettes doit être constant et leur hauteur doit être de 30 cm au minimum (Dick et Vesilind, 1969). De plus la température doit être contrôlée puisque l'indice peut varier de 15 à 20% au cours d'une variation de température de 10 à 40°C (Dick et Vesilind, 1969).

L'indice de Mohlman varie classiquement de 50 à 400 mL g⁻¹ et il est généralement admis que des indices <150 mL g⁻¹ caractérisent une aptitude correcte des boues à décanter. Cependant l'indice présente de nombreuses imperfections ; notamment il ne tient pas suffisamment compte de la vitesse de décantation. Ainsi deux boues ayant pourtant le même indice SVI peuvent avoir des vitesses de décantation différentes (Figure I-10). L'indice SVI ne tient pas compte non plus de la turbidité du surnageant. Or c'est un critère d'appréciation de la séparation eau/solides en suspension. Mais l'imperfection la plus importante sans doute, tient du fait que l'indice SVI varie en fonction de la concentration en matières en suspension (Figure I-11). En effet, à fortes concentrations, les

interactions entre particules sont telles que la sédimentation est freinée. Le test doit alors être standardisé afin de réaliser l'étude à teneur en boue constante. Dans ce but, l'indice de Mohlman a été modifié et trois nouveaux tests de décantation ont été mis au point.

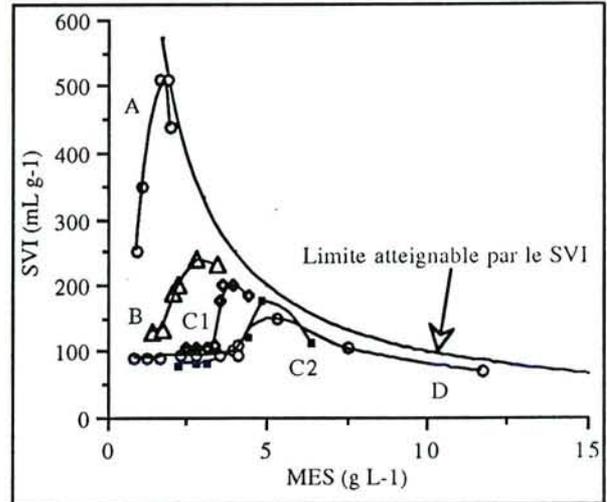
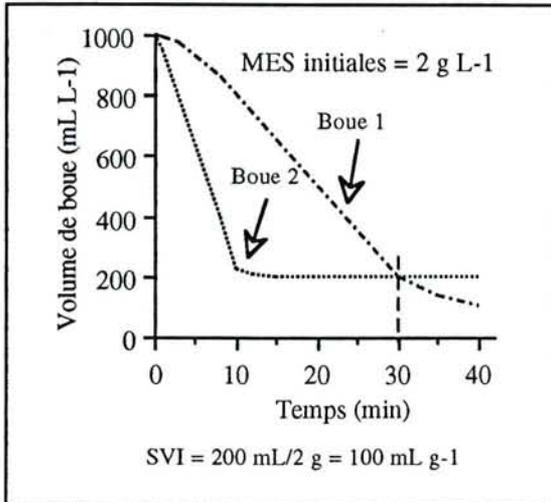


Figure I-10 : Représentation du volume de boue décanté en fonction du temps pour deux boues activées présentant des qualités de décantation différentes mais avec des valeurs de SVI identiques (d'après Dick et Vesilind, 1969).

Figure I-11 : Variation du SVI en fonction de la teneur en matières en suspension (MES) de 5 boues activées (A, B, C1, C2, D) (d'après Dick et Vesilind, 1969).

1.2.5.2.2. L'indice de boue avec dilution (DSVI)

L'indice de boue avec dilution ou "Diluted Sludge Volume Index" (DSVI) a d'abord été développé en Allemagne par Stobbe (1969, cité par Hultman *et al.*, 1991).

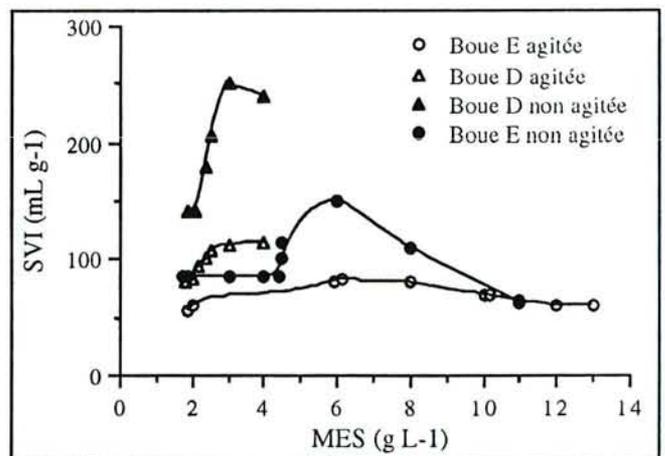
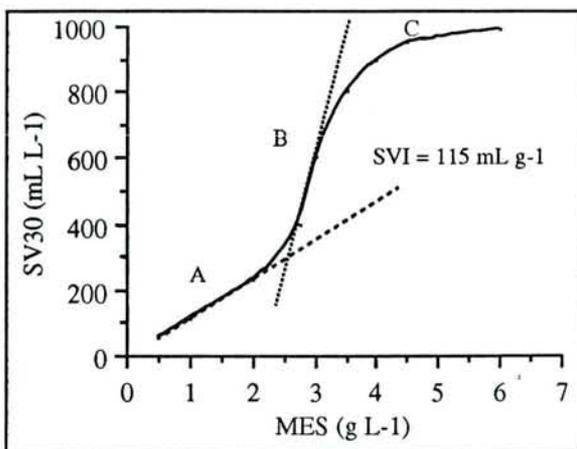


Figure I-12 : Variation du volume de boue décantée après 30 min (SV₃₀) en fonction de la teneur en matières en suspension (MES).

Figure I-13 : Variation de SVI mesuré avec ou sans agitation de la boue en fonction de la concentration en matières en suspension (MES) de deux boues activées (d'après Dick et Vesilind, 1969).

La variation du volume de boue décantée après 30 min (SV_{30}) en fonction de la concentration en matières en suspension (MES) est représentée par la Figure I-12. La partie "A" de la courbe est linéaire signifiant que la teneur en MES n'influence pas la capacité à décanter des boues dans cet intervalle. Cette zone linéaire est située, quelles que soient les boues, pour des valeurs de SV_{30} inférieures à 250 mL. Le DSVI correspond alors à la valeur de SVI (SV_{30}/MES) dans cette zone. Des dilutions sont réalisées pour les boues ayant des $SV_{30} > 300-250$ mL jusqu'à ce que le SV_{30} soit compris dans la zone linéaire. Les dilutions sont généralement réalisées avec l'effluent de décantation secondaire ou avec de l'eau du réseau.

I.2.5.2.3. L'indice de boue avec agitation douce

Afin de reproduire au mieux les conditions de décantation dans les clarificateurs, l'éprouvette graduée utilisée pour la mesure des indices de décantation peut être équipée d'un système permettant une agitation lente des boues (environ 1 RPM) (Dick et Vesilind, 1969). L'agitation réduit l'effet de paroi et de la concentration en MES sur les valeurs de SVI mais de manière différente selon les boues (Figure I-13). Généralement le test est tout de même effectué à teneurs en MES constantes afin d'éliminer totalement leur effet. Les MES sont ajustées à $3,5 \text{ g L}^{-1}$ ce qui par ailleurs nécessite de connaître leur valeur à l'avance. L'indice est appelé $SSVI_{3,5}$ pour "Stirred Specific Volume Index". Ce test a été développé par White (1975, cité par Hultman *et al.*, 1991) et est particulièrement utilisé au Royaume Uni.

I.2.5.2.4. L'indice de qualité de boue

Fitch et Kos (1976) ont mis au point une méthode de calcul permettant d'établir un nouvel indice appelé SQI ("Sludge Quality Index") qui permet de réduire l'effet des MES sur la décantation.

Les variations de l'indice de Mohlman (ou SVI) en fonction de la concentration en MES de cinq boues différentes sont représentées par la Figure I-11. Fitch et Kos idéalisent cette relation en une courbe où ils déterminent trois domaines : i) un domaine où SVI est indépendant des MES (segment : "ordonnée à l'origine - point A", Figure I-14, correspondant à la zone A de la Figure I-12), ii) un domaine où SVI augmente quasiment linéairement avec les MES jusqu'à ce que SV_{30} soit compris entre 800 et 900 mL (segment "A-B", Figure I-14, correspondant à la zone B de la Figure I-12) et iii) un domaine où SVI diminue avec l'augmentation des MES (zone non linéaire au-delà du point B, Fig. I-14 correspondant à la zone C de la Figure I-12). Il est à noter que l'emplacement des points "A" et "B" est différent selon les boues.

Fitch et Kos montrent alors que la partie linéaire "B" des courbes représentant la variation de SV_{30} en fonction des MES (Figure I-12) convergent toutes vers la même ordonnée à l'origine (point "J", Figure I-15). Cette relation se vérifie lorsque les valeurs de SV_{30} sont comprises entre 300 et 800 mL. Fitch et Kos établissent ainsi pour cet intervalle une relation liant SVI, SV_{30} et les MES des

boues :

$$SQI = \frac{200 + \frac{SV_{30}}{3}}{MES}$$

Pour les boues ayant une valeur de $SV_{30} < 300$ mL, l'indice SQI est calculé de la même manière que l'indice SVI. Pour $SV_{30} > 800$ mL la boue doit être diluée afin d'obtenir un $SV_{30} < 800$ mL.

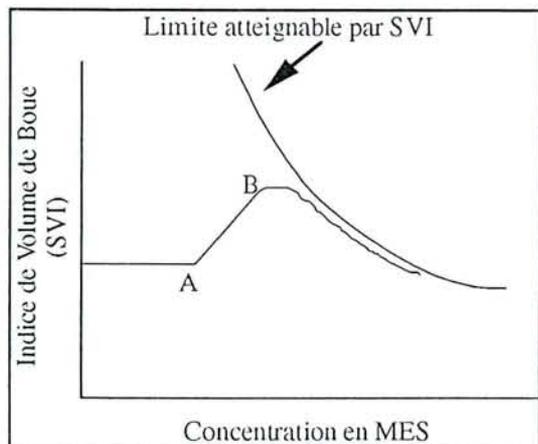


Figure I-14 : Relation caractéristique entre l'indice SVI et les teneurs en matières en suspension (d'après Fitch et Kos, 1976).

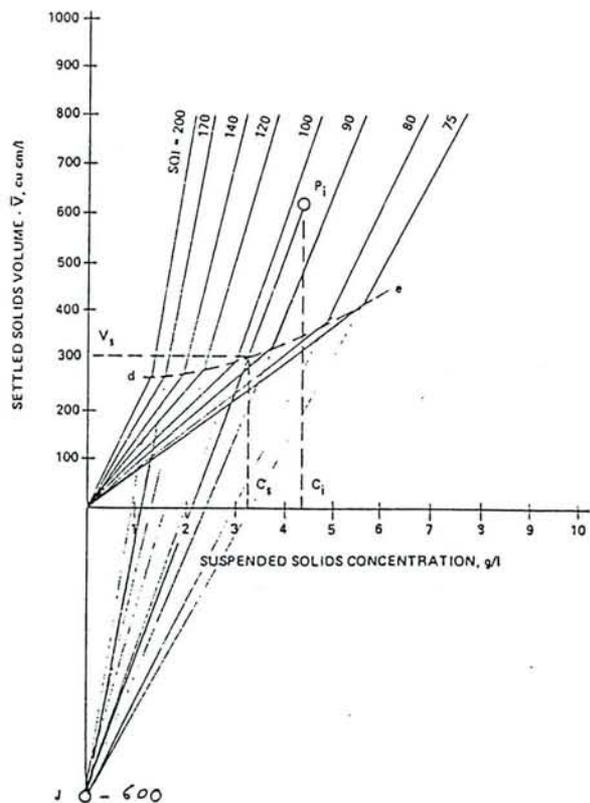


Figure I-15 : Corrélation générale pour l'indice SQI. "Settled solids volume" = volume de boue décantée (d'après Fitch et Kos, 1976).

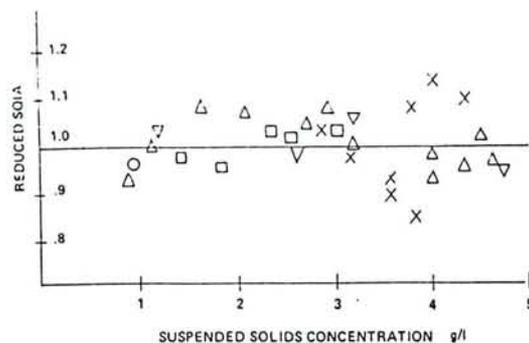


Figure I-16 : Variation du rapport SQI/SQIm (reduced SQIA) en fonction des teneurs en matières en suspension de 5 boues utilisées par Dick et Vesilind (1969) (d'après Fitch et Kos, 1976).

Fitch et Kos (1976) vérifient leur relation en utilisant les valeurs de Dick et Vesilind (1969). Pour chaque concentration en MES des boues, ils calculent un indice SQI et pour chaque indice un rapport SQI/SQIm. SQIm représentant la moyenne de tous les indices SQI d'une boue à diverses concentrations en MES. Les rapports SQI/SQIm étant très proches de 1 (0,9 à 1,1) l'indice SQI peut être considéré comme n'étant pas ou peu sensible aux variations de concentration en MES de l'échantillon de boue (Figure I-16).

L'intérêt du test de Fitch et Kos est qu'il permet d'utiliser les indices de Mohlman des études antérieures ou de tout autres études utilisant SVI comme indice de décantation, à condition de connaître les valeurs de SV_{30} ou des MES.

Hultman *et al.* (1991) ont comparé les quatre indices décrits ci-dessus (SVI, DSVI, SSVI et SQI). Leurs travaux confirment la non-adéquation de l'indice SVI à cause de l'effet trop important des MES. Ils proposent d'utiliser l'un des trois autres indices (DSVI, SSVI ou SQI) et d'abandonner l'indice SVI. Les trois indices retenus montrent pris deux à deux des corrélations linéaires supérieures à 80 % tout en réduisant de façon notable l'effet des MES sur la décantation des boues (Hultman *et al.*, 1991). Cependant, l'appréciation de la capacité des boues à sédimenter reste globale au travers de ces indices. La vitesse de décantation ainsi que la turbidité du surnageant permettraient d'obtenir une meilleure caractérisation de la qualité des boues.

I.3. Propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires microbiennes

I.3.1. L'effet hydrophobe : *approche thermodynamique*

Le terme "hydrophobe" traduit littéralement par "aversion de l'eau" n'est pas suffisant pour en apporter une définition claire. L'hydrophobicité se manifeste par la relative insolubilité des composés non polaires en milieu aqueux et par leur agrégation, par l'incapacité des surfaces hydrophobes à être mouillée par l'eau et par leur tendance à se partager préférentiellement avec un solvant autre que l'eau ou à rester au contact d'un gaz ou d'un solide plutôt qu'à celui de l'eau (Duncan-Hewitt, 1990). Magnusson (1980), Rosenberg et Kjelleberg (1986), en citant les travaux de Tanford (1973), décrivent par une approche thermodynamique le phénomène qui conduit à la formation d'interactions hydrophobes.

Les molécules d'eau ont la propriété de former des liaisons hydrogène les unes avec les autres ce qui influence fortement leur comportement à l'approche d'une autre molécule incapable de créer de telles liaisons. Les zones apolaires (hydrophobes) sont incapables de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. Les molécules d'eau à proximité des zones apolaires se réorganisent en une structure nettement plus ordonnée qu'auparavant ce qui thermodynamiquement est défavorable, le système ayant acquis un niveau énergétique plus élevé d'après l'équation de Gibbs (1) :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Où ΔG = variation d'énergie libre, ΔH = variation d'enthalpie, T = température, ΔS = variation d'entropie.

Une augmentation de l'ordre (création de liaison hydrogène par exemple) crée une diminution de l'entropie (ΔS négatif) et donc une augmentation de l'état d'énergie du système.

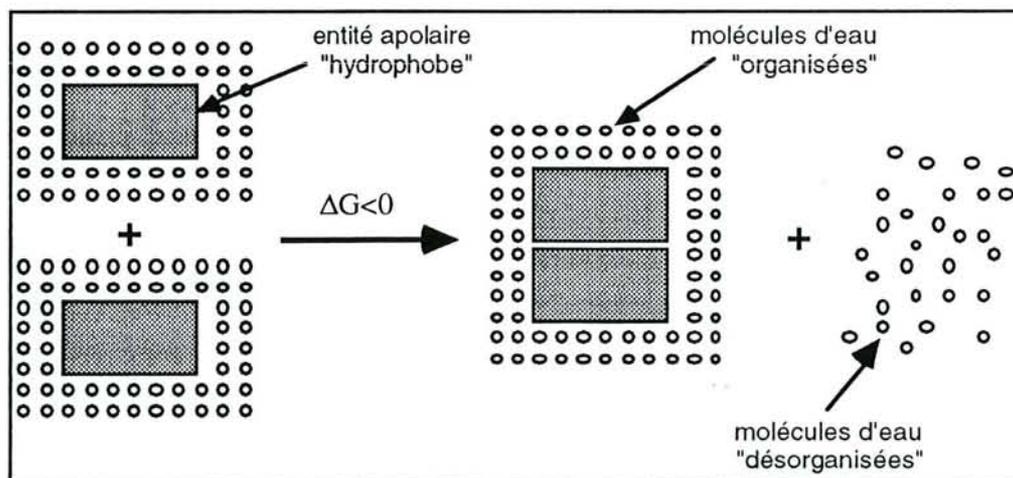


Figure I-17 : Représentation schématique de l'interaction entre deux entités hydrophobes montrant leur association et l'exclusion de l'eau (d'après Rosenberg et Kjelleberg, 1986).

Pour aller vers un état thermodynamiquement plus stable le système aura tendance à réduire la surface de contact entre l'eau et les molécules apolaires en favorisant leur contact avec des surfaces autres que l'eau (air, solide) ou en rapprochant deux entités apolaires entre elles comme le montre la Figure I-17. Pour ce faire, les molécules d'eau vont être "exclues" des surfaces hydrophobes pour retourner dans la phase eau dans un état relativement désordonné. C'est donc par répulsion de l'eau que deux entités hydrophobes sont maintenues en contact l'une avec l'autre et non par une interaction directe.

L'interaction hydrophobe ne peut donc pas être considérée *sensu stricto* comme une liaison chimique. Pour cette raison, l'utilisation du terme "effet hydrophobe" paraît mieux appropriée que le terme de "liaison hydrophobe".

I.3.2. Description de la surface cellulaire des micro-organismes

I.3.2.1. Notion de balance hydrophobe/hydrophile

Les composés présents à la surface d'une bactérie sont très divers comme en témoigne la Figure I-18. Les macromolécules en contact avec le milieu liquide sont principalement de nature glucidique et protéique et les groupements chimiques externes sont surtout polaires (fonctions carboxyles, phosphates, amines...). Par conséquent la surface de la cellule aurait un caractère plutôt hydrophile qu'hydrophobe. En effet, la plupart des micro-organismes sont "mouillables" par l'eau où ils se trouvent en suspension ce qui traduit des propriétés de surface hydrophiles (néanmoins, il existe des cas particuliers où des bactéries marines se développent à la surface de l'eau directement en contact avec l'atmosphère et expriment une hydrophobicité de surface élevée (Rosenberg et Doyle, 1990). Or, de nombreux micro-organismes sont capables d'adhérer à des surfaces hydrophobes (solvants apolaires, polystyrène...) (Rosenberg et Doyle, 1990). La balance entre les groupements hydrophiles et les groupements hydrophobes contraints dans un environnement hydrophile, gouvernerait la capacité des micro-organismes à adhérer à ces surfaces hydrophobes. Mozes et Rouxhet (1990) ont montré par spectroscopie aux rayons X que l'hydrophobicité de surface cellulaire est inversement proportionnelle au nombre d'atome d'oxygène présent à la surface des cellules bactériennes et est proportionnelle au nombre d'atome de carbone. La surface de tels micro-organismes est abusivement appelée hydrophobe, le terme amphiphile serait en fait plus approprié.

I.3.2.2. Répartition des zones hydrophobes à la surface des cellules

L'effet hydrophobe n'est pas seulement dû à une répartition plus ou moins au hasard, des différents constituants de la paroi à la surface des microorganismes. Marshall et Cruickshank (1973) montrent l'existence de zones hydrophobes aux pôles de cellules en batonnet.

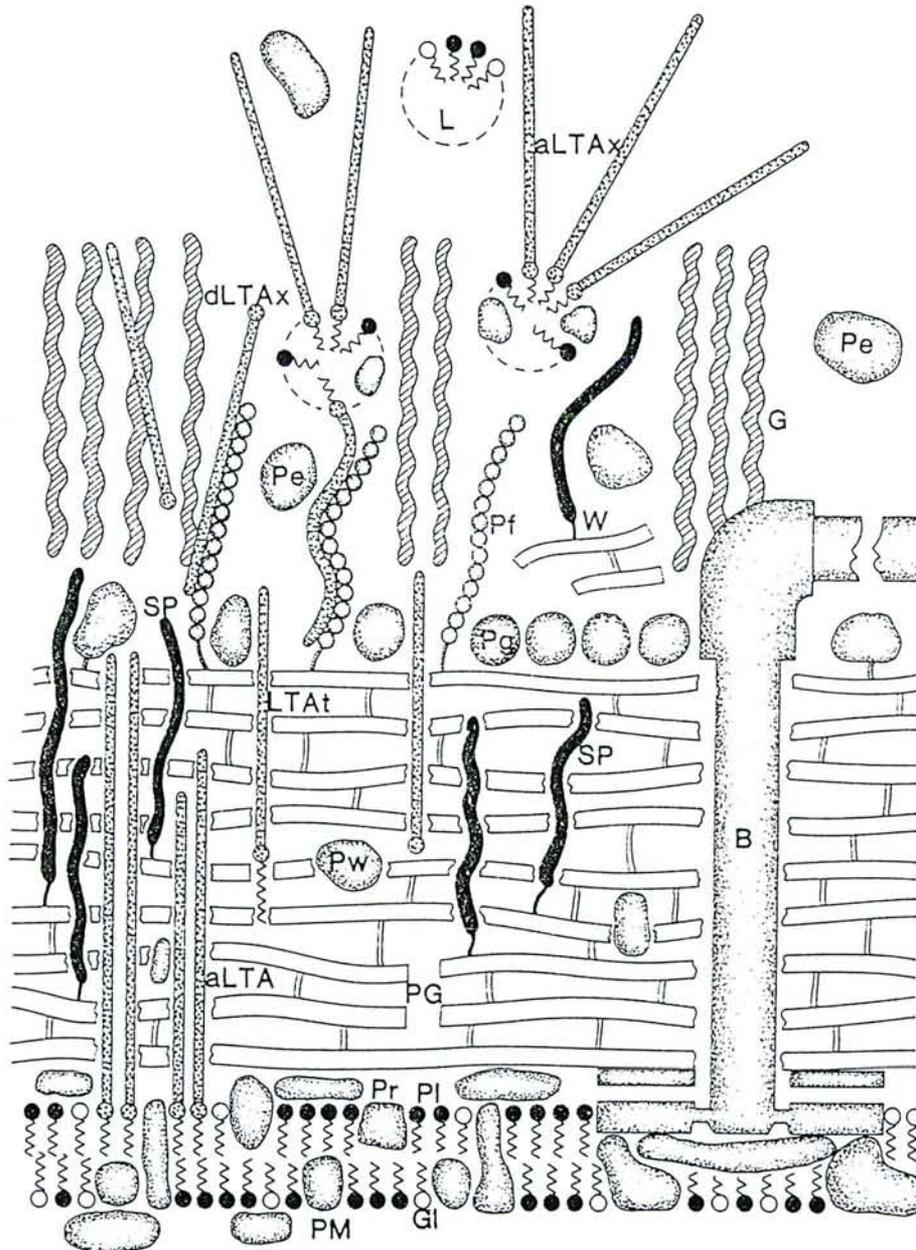


Figure I-18 : Représentation schématique de la paroi des bactéries gram positif. PG = peptidoglycane, PM = membrane plasmique, Pr, Pw et Pe = protéines, PI = phospholipides, GI = glycolipides, SP = polymères secondaires de la paroi (acides teichoïques, teichuroniques et polysaccharides), B = flagelle, aLTA = acides lipoteichoïques (forme acétylée), aLTax = acides lipoteichoïques excrétés, dLTax = acides lipoteichoïques excrétés (forme déacétylée), L = lipides, W = fragments membranaires relargués (d'après Wicken, 1985).

Ils constatent en effet que chez *Flexibacter aurantiacus* et *Hyphomicrobium vulgare* les cellules s'orientent perpendiculairement à une surface hydrophobe (liquide ou solide). Ils montrent ensuite par microscopie électronique que l'adhésion se fait par l'intermédiaire de polymères exo-cellulaires. Hazen (1990) constate un phénomène similaire chez une levure *Saccharomyces cerevisiae* lorsqu'elle est cultivée à 37°C. A 23°C les sites hydrophobes semblent cependant être distribués "au hasard" à la surface des cellules. Fattom et Shilo (1984) chez *Phormidium* sp. et Paul et Jeffrey (1985) chez *Vibrio proteolytica* constatent également une répartition régulière des zones hydrophobes.

I. 3.2.3. Les composés cellulaires hydrophobes de la surface bactérienne

L'hydrophobicité de surface et la capacité de floculation sont dans de nombreux cas des propriétés génétiquement acquises et les mutants les ayant perdues sont isolés sur la base de leur non-adhésion à un milieu hydrophobe ou de leur non floculation (Pines et Gutnick, 1984 ; Ferreiros et Criado, 1984 ; Tewari *et al.*, 1985 ; Onalapo et Klemperer, 1986 ; Ogden et Taylor, 1991 ; MacNab et Jenkinson, 1992). Intuitivement les composés hydrophobes de surface attendus sont de nature protéique (acides aminés hydrophobes) et/ou lipidique (longue chaîne carbonée), les polysaccharides étant au contraire souvent responsables des propriétés hydrophiles des surfaces cellulaires (Wrangstadh *et al.*, 1989). Néanmoins certains polysaccharides pourraient être impliqués dans l'effet hydrophobe des surfaces cellulaires (Neu *et al.*, 1992).

Rosenberg et Kjelleberg (1986) proposent le terme "hydrophobine" pour désigner les structures moléculaires responsables des propriétés hydrophobes de surface cellulaire. A ce terme est opposé celui de "hydrophiline".

Le Tableau I-17 qui donne une liste non exhaustive des différents hydrophobines identifiées chez les bactéries, montre la grande diversité des composés impliqués dans l'hydrophobicité de surface cellulaire. En outre, Pines et Gutnick (1984) montrent chez *Acinetobacter calcoaceticus* que l'hydrophobicité de surface peut être due à plusieurs structures dont les pili. Lorsque ceux-ci sont absents (souche mutante), l'hydrophobicité résiduelle est liée à la présence d'un site récepteur du phage Ø. Mais lorsque la mini-capsule (composée d'émulsan) est synthétisée, celle-ci recouvre les zones hydrophobes de la cellule et rend sa surface hydrophile (Rosenberg *et al.*, 1983 ; Pines et Gutnick, 1984). La représentation schématisée suggérée par Bar-Or (1990) sur l'agencement des structures hydrophobes/hydrophiles à la surface de *Phormidium* J-1 peut alors être généralisée à l'ensemble des microorganismes (Figure I-19).

Tableau I-17 : "Hydrophobines" et "hydrophilines" mis en évidence chez les bactéries (TAS = test d'agrégation saline, CIH = chromatographie d'interaction hydrophobe, TAMH = test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures, TPP = test de partage de phase, PEG = polyéthylène glycol).

Bactéries et composés de surface impliqués	Techniques utilisées	Références
<u>Hydrophobines :</u>		
<u>Structures fibrillaires</u> <i>fimbriae</i> (ou pili) et fibrilles		
<i>Escherichia coli</i>	TAS, CIH	Lindahl <i>et al.</i> (1981)
"	TAS, TAMH, CIH	Parker et Munn (1984)
"	TAS	Gonzalez <i>et al.</i> (1988)
"	TAS	Elliott <i>et al.</i> (1991)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	TAMH	Pines et Gutnick (1984)
<i>Streptococcus sanguis</i>	TAMH et or colloïdal	Handley <i>et al.</i> (1991)
<i>Streptococcus gordonii</i>		
<u>Protéines de surface</u> (couche cristalline "S")		
<i>Aeromonas salmonicida</i>	TAS, TAMH, CIH	Parker et Munn (1984)
<i>Bacillus stearotherophilus</i>	CIH	Gruber et Sleytr (1991)
<u>Site récepteur</u> (phage nØ)		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	TAMH	Pines et Gutnick (1984)
<u>Capsule</u>		
<i>Pseudomonas</i> sp. (boues activées)	TAMH	Singh et Vincent (1987)
<u>Acides lipoteichoïques</u>		
Sreptocoques du groupe A	TPP (PEG/Dextran)	Miörner <i>et al.</i> (1983) Courtney <i>et al.</i> (1990)
<u>Acides mycoliques</u>		
<i>Rhodococcus</i> sp.	Mesure de l'épaisseur de mousse	Mori <i>et al.</i> (1988)
<i>Microthrix parvicella</i>	TAMH	Kocianova <i>et al.</i> (1992)
<u>Lipoprotéine de surface</u>		
<i>Streptococcus gordonii</i>	TAMH	Jenkinson (1992)
<u>Hydrophilines :</u>		
<u>Capsule</u>		
<i>A. calcoaceticus</i> (émulsan)	TAMH	Rosenberg <i>et al.</i> (1983) Pines et Gutnick (1984)
Staphylococci	TAMH	Reifsteck et Wilkinson (1987)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	CIH, TAMH, TAS	Bonet <i>et al.</i> (1993)
<u>Exopolysaccharides</u>		
<i>Pseudomonas</i> sp.	CIH avec billes de verre siliconées Adhésion sur polystyrène	Wrangstadh <i>et al.</i> (1989)
<i>Deleya marina</i>	CIH, TAMH, TAS	Shea <i>et al.</i> (1991)
<i>Aeromonas salmonicida</i>		Bonet <i>et al.</i> (1993)

La nature protéique de nombreuses hydrophobines peut être révélée par digestion enzymatique par des protéases (Paul et Jeffrey, 1984 ; Bar-Or, 1990 ; Handley *et al.*, 1991 ; Hantula et Bamford, 1991 ; Greene *et al.*, 1992 ; Overmann et Pfennig, 1992) ou par des agents dénaturants comme l'urée (Overmann et Pfennig, 1992) ou encore par des inhibiteurs de la synthèse protéique (Paul et Jeffrey, 1984 ; Bar-Or, 1990). Parmi ces hydrophobines protéiques, les structures les plus fréquemment citées sont sans doute les *fimbriae* (ou pili) qui sont des extensions protéiques fines (2 à 12 nm de diamètre) pouvant atteindre 10 µm de longueur (Irvin, 1990). La présence de ces structures à la surface des bactéries est généralement associée à l'expression de tout ou une partie de l'hydrophobicité (Lindahl *et al.*, 1981 ; Firon *et al.*, 1982 ; Pines et Gutnick, 1984 ; Gonzalez *et al.*, 1988 ; Elliott *et al.*, 1991). Extraits de leur cellules, les *fimbriae* de *Pseudomonas aeruginosa* s'agrègent en s'associant longitudinalement révélant des propriétés adhésives réparties sur toute leur longueur (Irvin, 1990). D'autre part, ils faciliteraient le contact cellule-cellule en permettant de franchir plus aisément la barrière de répulsion électrostatique. Les protéines de la couche cristalline présente à la surface de nombreuses bactéries (Sleytr et Messner, 1983), procurent également aux cellules des propriétés hydrophobes (Parker et Munn, 1984 ; Gruber et Sleytr, 1991). Ces protéines contiennent une forte proportion (> 50%) d'acides aminés hydrophobes (Sleytr et Messner, 1983).

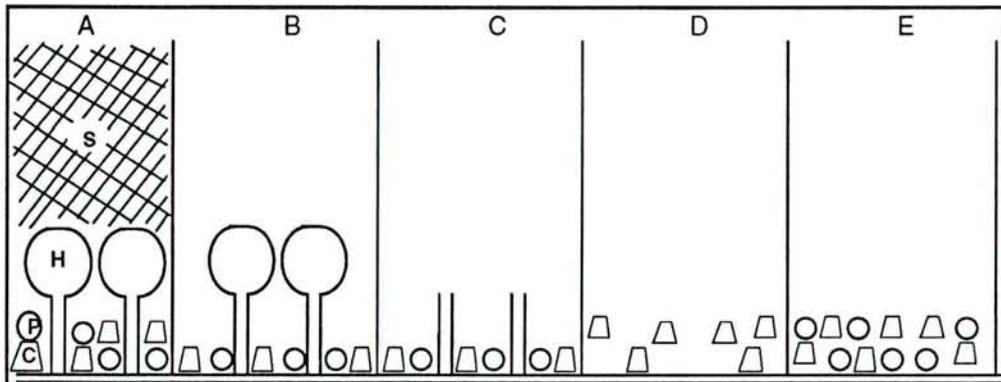


Figure I-19 : Représentation schématique de la structure et de la composition de la couche externe de *Phormidium J-1* après différents traitements entraînant une augmentation de l'hydrophobicité de surface. S= "slime", P= protéines non hydrophobes, H = protéines hydrophobes, C = glucides. (A) Cellule "mature" ayant sécrété une couche diffuse de polymères exo-cellulaires hydrophiles ("slime"). (B) Après traitement au dodécyl sulfate de sodium éliminant la plupart des glucides et des protéines non hydrophobes. (C) Après traitement successif à la pronase, qui digère les protéines, rendant la surface hydrophile. (D) Après traitement au chloramphénicol, qui interrompt la synthèse protéique. Les protéines de surface sont éliminées rendant la surface bactérienne plus hydrophile. (E) Après traitement au mixeur, qui lamine la surface de la cellule et élimine les protéines les plus faiblement fixées (d'après Bar-Or, 1990).

Les hydrophobines les plus connues des bactéries à gram positif sont les acides lipoteichoïques (Mörner *et al.*, 1983 ; Courtney *et al.*, 1990). Ces molécules sont amphiphiles et composées d'un polyglycérophosphate lié de manière covalente à un lipide. La partie lipidique serait associée à la partie hydrophobe de la membrane cytoplasmique et le reste (hydrophile) de la molécule traverserait le peptidoglycane et serait en contact avec le milieu externe. Dans ces conditions, la participation de ce composé aux interactions hydrophobes de surface semble impossible puisque la seule partie

hydrophobe de la molécule est noyée dans la membrane de la cellule. D'autres études ont mis en évidence une seconde molécule qui jouerait le rôle de médiateur dans l'hydrophobicité de surface. Le modèle de la Figure I-20 peut alors expliquer comment des composés amphiphiles peuvent intervenir dans l'hydrophobicité de surface cellulaire.

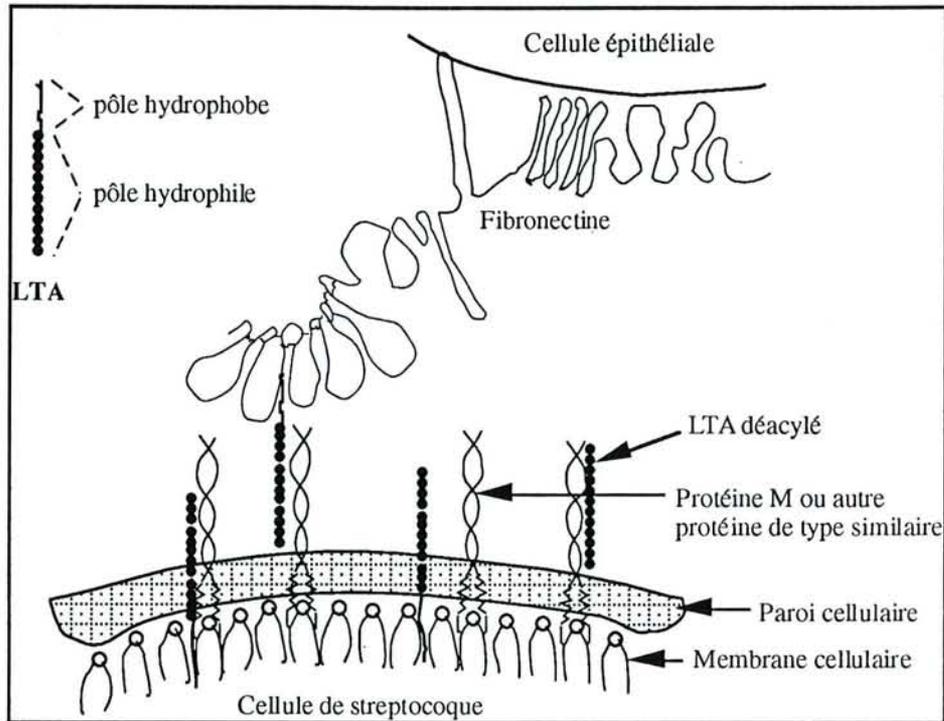


Figure I-20 : Modèle hypothétique de l'adhésion des streptocoques du groupe A aux cellules épithéliales par l'intermédiaire des acides lipoteichoïques (LTA) et des protéines M ou de protéines proches de la structure des protéines M. Des molécules de LTA sont liées aux cellules épithéliales par des interactions hydrophobes *via* des interactions ioniques entre les polyglycérophosphates des LTA, chargés négativement, et les charges positives des protéines M. Cet arrangement permet une orientation dans laquelle la moitié lipidique du LTA est exposée au milieu externe et peut alors se lier dans la poche hydrophobe de la région N-terminale de la fibronectine des cellules hôtes (d'après Courtney *et al.*, 1990).

Les propriétés hydrophobes de surface peuvent entraîner d'autres conséquences que l'adhésion bactérienne. Ainsi, dans les boues activées, les bactéries filamenteuses du genre actinomycète montrent des propriétés hydrophobes de surface (Blackall et Marshall, 1989 ; Kocianova *et al.*, 1992) qui ont comme conséquence la production parfois très importante de mousses stabilisées par les surfactants produits par ces souches (Blackall et Marshall, 1989). Ces surfactants présents à la fois à la surface des cellules et dans le milieu de culture sont des acides mycoliques. La stabilité des mousses produites dépend du nombre de carbone de ces molécules chez *Rhodococcus* sp. et *Nocardia amarae* (Mori *et al.*, 1988). D'autre part l'hydrophobicité de surface favorise les phénomènes de flottation des solides (Mozes et Rouxhet, 1990), cette propriété est utilisée dans différentes applications technologiques pour la séparation de solides (Degrémont, 1989 ; Mozes et Rouxhet, 1990).

I.3.3. Les tests de mesure des interactions hydrophobes

Il existe plusieurs techniques ayant pour but de quantifier l'hydrophobicité de surface cellulaire. La comparaison des tests entre eux amène à penser que chaque test est spécifique d'un phénomène lié de près ou de loin à l'hydrophobicité (Dillon *et al.*, 1986 ; Mozes et Rouxhet, 1987 ; van der Mei *et al.*, 1987). Dans l'analyse qui suit, nous nous intéresserons surtout au test d'adhésion aux hydrocarbures puisque c'est celui-ci qui a été utilisé dans l'étude expérimentale. Les autres tests ne seront que brièvement décrits.

1.3.3.1. Le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (TAMH)

Le TAMH (Rosenberg *et al.*, 1980) est sans doute la technique la plus répandue actuellement à cause de sa simplicité de mise en œuvre et du peu de matériel qu'elle exige. Le test consiste à estimer l'affinité des cellules pour une phase hydrophobe. Un volume (1 à 2 mL) de suspension cellulaire de concentration connue (d'absorbance de 0,3 à 1,0) est mélangé vigoureusement (agitateur de type "vortex") avec un volume (0,1 à 2 mL) de solvant (hexadécane, octane, toluène, xylène...). Lors de l'agitation le solvant est fragmenté en très fines gouttelettes auxquelles adhèrent les cellules hydrophobes. Après agitation les deux phases se séparent et l'adhésion des bactéries aux gouttelettes forme une émulsion à l'interface eau-solvant facilement observable au microscope optique (Figure I-21). La phase hydrophobe reste vierge de toutes cellules (Rosenberg *et al.*, 1980 ; Rosenberg, 1991). La quantité de cellules hydrophobes est obtenue par différence entre la concentration cellulaire de la phase aqueuse après et avant agitation.

Le solvant hydrophobe à utiliser ne doit pas entraîner de lyse cellulaire. Van Loosdrecht *et al.* (1987a) soupçonnent les solvants d'extraire les composés des surfaces cellulaires, mais aucune donnée expérimentale ne vient appuyer ces hypothèses. Néanmoins, Vanhaecke et Pijck (1988) montrent que le xylène entraîne une lyse cellulaire. De plus, avec le xylène et le toluène, l'absorbance des suspensions cellulaires augmente anormalement. Sweet *et al.* (1987) suggèrent pour expliquer ce phénomène que de fines gouttelettes de solvant resteraient accrochées à la surface des bactéries et augmenteraient ainsi leur indice de réfraction. De plus, la taille des gouttelettes serait insuffisante pour entraîner les cellules à l'interface. Il est donc préférable d'éviter l'utilisation des hydrocarbures aromatiques.

L'hexadécane est le solvant le plus utilisé, cependant il peut poser quelques problèmes principalement du fait que son point de solidification se situe à +18°C. L'octane est aussi utilisé. Il donne de bons résultats, bien corrélés avec ceux de l'hexadécane avec cependant des valeurs légèrement inférieures (Figure I-18).

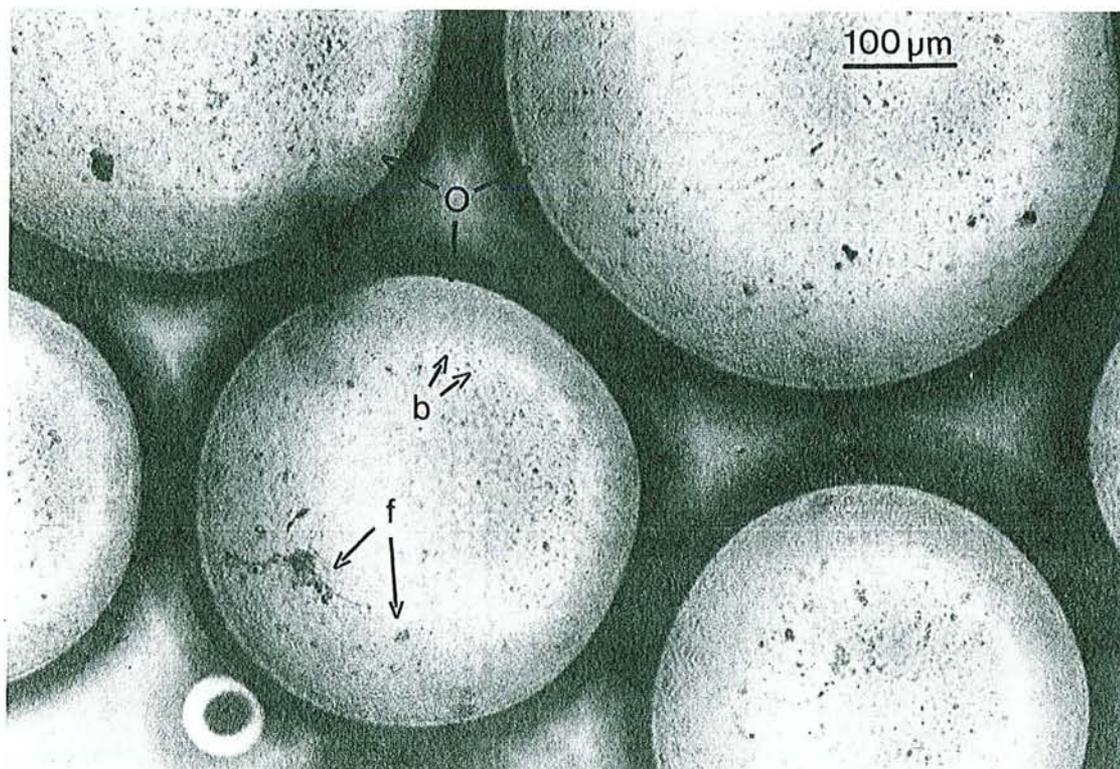


Figure I-21 : Bactéries (b) et floes ou/et micro-floes (f) de boues activées adhérant à des gouttelettes d'octane (O) observés en microscopie optique. L'émulsion d'octane a été obtenue lors du test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (Rosenberg *et al.*, 1980, modifié par Jorand *et al.*, 1994) réalisé à partir d'une suspension provenant d'une boue activée traitée par ultrasons. Les cellules et la phase aqueuse ont été colorées par une solution de safranine.

Le taux de cellules disparaissant de la phase aqueuse peut être dû à d'autres facteurs que l'hydrophobicité de surface. Ainsi, l'agitation de la suspension cellulaire en absence de solvant provoque une baisse de l'absorbance qui peut provenir d'une floculation ou/et d'une adhésion des bactéries aux parois en verre du tube à essais ou à l'interface eau-air. C'est pourquoi certains auteurs utilisent un témoin (suspension cellulaire agitée sans ajout de solvant) pour déterminer le taux d'adhésion à l'hydrocarbure. Cette procédure est inutile d'après Rosenberg et Doyle (1990) qui considèrent que seules les bactéries hydrophobes adhèrent aux parois en verre du tube à essai. Cependant, aucun résultat ne vient renforcer cette hypothèse.

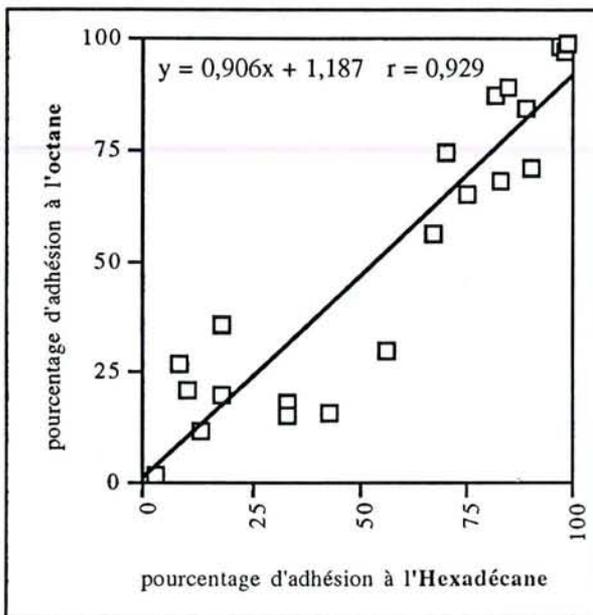


Figure I-22 : Comparaison des pourcentages d'adhésion à l'octane et à l'hexadécane de diverses souches bactériennes (n=21). Données provenant de Dillon *et al.* (1986) et Vanhaecke *et al.* (1990).

Le TAMH est très sensible à la quantité de surface à laquelle adhèrent les bactéries et qui dépend de la taille et du nombre de gouttelettes de solvant obtenues, influencées par les conditions d'agitations (vaisselle utilisée, durée et intensité d'agitation, volume respectif des phases liquides...). La force ionique, le pH et la nature des sels influencent le taux d'adhésion (Rosenberg, 1984a ; Mozes et Rouxhet, 1987). Des agents de "salting out", exacerbant l'effet hydrophobe, par exemple le sulfate d'ammonium (Lindahl *et al.*, 1981), peuvent être utilisés afin de faciliter la discrimination de certaines souches bactériennes dont l'hydrophobicité de surface apparaît identique dans un environnement peu ionique (Rosenberg, 1984a). Enfin, le test d'adhésion aux hydrocarbures étant une méthode non standardisée, les données obtenues dans les différents laboratoires sont difficiles à comparer.

1.3.3.2. Le test d'agrégation saline (TAS)

Le TAS (Lindahl *et al.*, 1981) consiste à provoquer la floculation des cellules avec des concentrations croissantes en sulfate d'ammonium, qui a la propriété d'exacerber les interactions hydrophobes (Lindahl *et al.*, 1981). Les cellules précipitant aux plus faibles concentrations en sulfate

d'ammonium sont considérées comme étant les plus hydrophobes. Les sels ont en outre pour effet de neutraliser les charges positives et négatives de la surface de la cellule et de diminuer les phénomènes de répulsion électrostatique. Aussi, l'importance relative des liaisons de van der Waals serait augmentée par rapport à l'effet hydrophobe (Mozes et Rouxhet, 1987 ; Duncan-Hewitt, 1990). Deux phénomènes seraient alors pris en compte par le TAS : i) l'effet hydrophobe et ii) les forces de van der Waals.

1.3.3.3. La mesure de l'angle de contact (MAC)

Le phénomène mesuré est la tension de surface qui est liée à la "mouillabilité" d'un film cellulaire. Une goutte d'eau est déposée sur le film et l'angle entre le plan horizontal du film et la tangente de la goutte au point de contact des trois phases eau-solide-air correspond à l'angle de contact (van Oss et Gillman, 1972 cités par Rosenberg et Doyle, 1990). Plus l'angle est élevé (plus la goutte est bombée) et plus l'échantillon est hydrophobe.

1.3.3.4. La chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)

Une suspension cellulaire traverse une colonne remplie d'un gel de sépharose lié à un ligand hydrophobe (résidu octyl ou phényl). Les cellules retenues par le gel correspondent aux cellules hydrophobes et sont généralement déterminées par mesure de densité optique (Smyth *et al.*, 1978, cités par Rosenberg et Doyle, 1990). Les cellules peuvent cependant être retenues stériquement dans la colonne. La réalisation du test en flacon (test "batch") plutôt qu'en colonne peut éviter cet inconvénient d'après Rosenberg et Doyle (1990).

1.3.3.5. Adhésion à un solide hydrophobe

Le solide le plus souvent utilisé est un disque de polystyrène (Rosenberg, 1981). La proportion de bactéries hydrophobes adhérant au polystyrène est estimée par observation au microscope optique ou par mesure de la densité optique de la suspension cellulaire après et avant contact. Hazen et Hazen (1987) ont utilisé des microbilles de 0,85 µm de diamètre avec des suspensions de levure. L'avantage est que l'emplacement des zones hydrophobes des surfaces cellulaires, correspondant au site de liaison des billes à la surface des cellules, est directement visualisé au microscope.

1.3.3.6. Technique de partage de deux phases liquides (TPP)

Les propriétés de surface des cellules sont estimées ici selon leur distribution entre deux gels non miscibles, l'un hydrophile (dextran) l'autre hydrophobe (polyéthylène glycol) (Stendhal *et al.*, 1973). Les cellules peuvent se placer également à l'interface. Leur recouvrement après mélange est délicat, la séparation des phases est longue et peut ne pas être complète (van Loosdrecht *et al.*, 1987a ; Rosenberg et Doyle, 1990).

1.3.3.7. Marquage par des sondes moléculaires hydrophobes

Plusieurs types de molécules hydrophobes peuvent être utilisées, par exemple le rose bengale (Lamberts et Neckers, 1983), l'acide palmitique radioactif (Malmqvist, 1983 cité par Rosenberg et Doyle, 1990), l'acide dodécanoïque radioactif (Kjelleberg *et al.*, 1980 cités par Rosenberg et Doyle, 1990), le violet de gentiane (Horskà *et al.*, 1993 ; Paula *et al.*, 1988 cités par Rosenberg et Doyle, 1990). Les principaux problèmes liés à cette approche sont la faible solubilité des sondes utilisées et leur intercalage probable dans les membranes cytoplasmiques.

1.3.3.8. Comparaison des techniques

Différents travaux (Dillon *et al.*, 1986 ; Mozes et Rouxhet, 1987 ; van der Mei *et al.*, 1987) ont comparé les techniques de mesures de l'hydrophobicité. Deux tests peuvent parfois être bien corrélés pour une même espèce ou une même souche bactérienne comme le montre la Figure I-23 avec les tests TAMH et CIH. Par contre si l'étude est étendue à plusieurs espèces bactériennes la relation est perdue (Dillon *et al.*, 1986 ; Darnell *et al.*, 1987, Van der Mei *et al.*, 1987 ; Sorongon *et al.*, 1991). En général, les corrélations obtenues entre les résultats de tous les tests sont bonnes lorsqu'il s'agit de micro-organismes soit très hydrophobes soit très hydrophiles. L'évaluation de l'hydrophobicité de certaines souches microbiennes, apparemment d'hydrophobicité "intermédiaire", donne des résultats très variables selon les tests utilisés. Dans certains cas cela peut s'expliquer par le fait qu'un récepteur hydrophobe peu abondant mais très accessible à la surface de la cellule est capable de la maintenir à un support par interaction avec un ligand hydrophobe (*e.g.* octyl sépharose du test CIH), *a contrario* il ne permettrait pas de rendre la surface de la cellule suffisamment hydrophobe pour modifier l'angle de contact d'une goutte d'eau avec un tapis cellulaire d'une culture de cette bactérie. La corrélation obtenue entre les tests MAC et TAMH conduit à la même réflexion. Les deux tests sont corrélés seulement à partir d'une certaine valeur de l'angle de contact (60° environ, Figure I-24). Cette corrélation a été obtenue par van Loosdrecht *et al.* (1987a), Vanhaecke *et al.* (1990) et Reid *et al.* (1992). Cette corrélation implique que les structures rendant les cellules faiblement hydrophobes par le test MAC (angle de contact inférieur à 60°) ne sont pas suffisantes pour leur permettre d'adhérer aux gouttelettes d'hydrocarbures du TAMH. Cependant Van der Mei *et al.* (1987) n'obtiennent aucune corrélation entre les deux tests pour 29 souches de streptocoques indiquant que le phénomène n'est pas généralisable.

Chaque test ne mesurerait alors qu'un aspect de l'hydrophobicité de surface. L'absence de corrélations systématiques entre les tests signifie que l'hydrophobicité n'est pas définissable ou mesurable selon un seul critère. Les méthodes actuelles sont en outre suffisamment efficaces pour distinguer les cellules à caractère très hydrophobe de celles à caractère très hydrophile. Cependant pour bien faire il faudrait utiliser une batterie de tests comme le suggèrent Dillon *et al.* (1986).

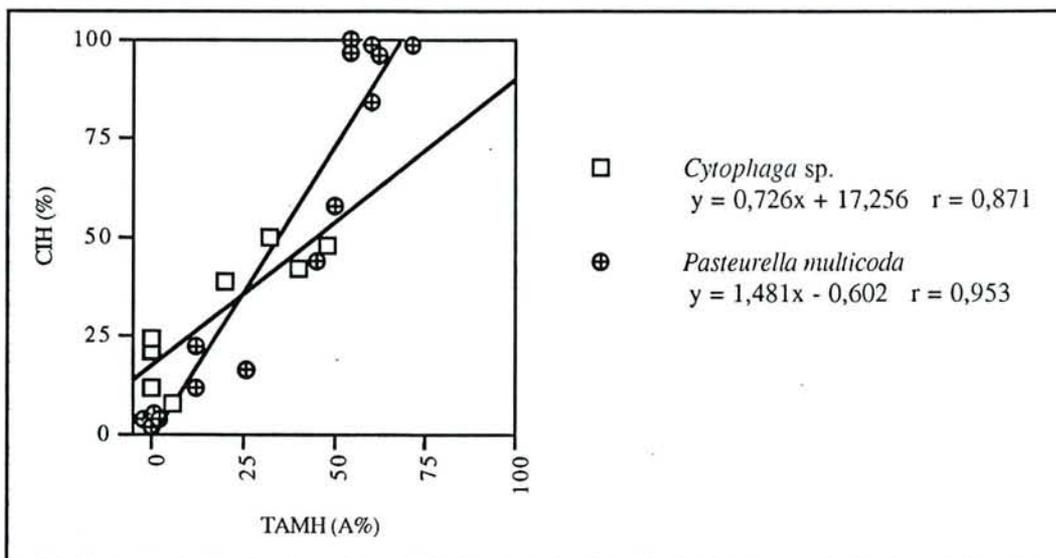


Figure I-23 : . Comparaison de deux méthodes d'hydrophobicité pour deux espèces bactériennes : 15 souches de *Pasteurella multocoda* (Darnell *et al.*, 1987) et 8 mutants de *Cytophaga* sp. souche U67 (Sorongon *et al.*, 1991). CIH : chromatographie d'interaction hydrophobe, % : pourcentage de cellules fixées par le ligand hydrophobe (octyl sépharose) (estimé par mesure de DO). TAMH : test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (hexadécane), A% = pourcentage de cellules adhérant à l'hydrocarbure (estimées par mesure de DO).

Certains auteurs se sont attachés à comparer la charge de surface des micro-organismes avec leur hydrophobicité. Et, contrairement à toute attente qui voudrais que plus une surface est hydrophobe moins sa charge est élevée, aucune corrélation claire n'apparaît entre ces deux paramètres (Rosenberg et Doyle, 1990). La présence d'appendices hydrophobes tels que les pili (Tableau I-17) et le fait que les mesures de la charge de surface ne rendent compte que de la charge globale et non pas des charges localisées à la surface des cellules, peuvent en être la cause.

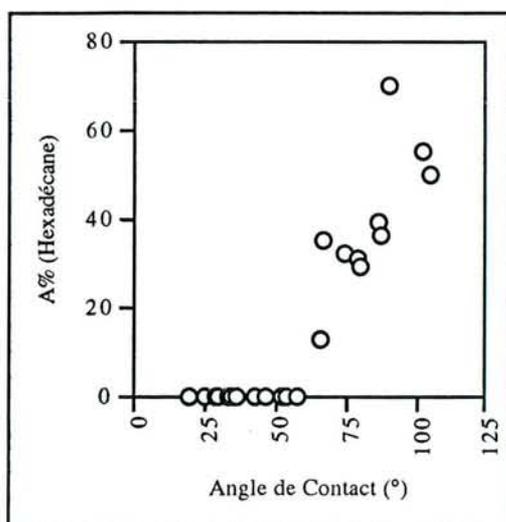


Figure I-24 : Comparaison des tests TAMH et MAC montrant une corrélation seulement pour des valeurs d'angle de contact > 60°. Données de Reid *et al.* (1992) pour diverses souches de *Lactobacillus*.

I.3.5. Hydrophobicité des agrégats bactériens

I.3.5.1. Apport de l'hydrophobicité dans le phénomène d'adhésion/floculation.

L'hydrophobicité de surface serait largement impliquée dans les propriétés d'adhésion des micro-organismes ainsi que dans leurs propriétés de floculation (Rosenberg et Doyle, 1990 ; Mozes et Rouxhet, 1990). La floculation équivaut à une adhésion entre plusieurs cellules et peut être étudiée au travers de l'adhésion des micro-organismes sur un support solide. Selon Huysman et Verstraete (1993) les caractéristiques les plus importantes de la surface cellulaire bactérienne qui déterminent l'adhésion sur des surfaces solides sont l'hydrophobicité, la charge de surface et la présence de structures extra-cellulaires (pili, exo-polysaccharides,...).

Van Loosdrecht *et al.* (1987b) se sont intéressés aux relations liant la charge de surface, l'hydrophobicité de surface et la capacité d'adhésion de cellules bactériennes. Ils trouvent une corrélation entre la charge de surface et la capacité d'adhésion sur du polystyrène négativement chargé, de 23 souches bactériennes issues de diverses espèces où la charge semble gouverner l'adhésion mais seulement pour les très faibles valeurs d'hydrophobicité (Figure I-25). L'hydrophobicité reste néanmoins le principal facteur gouvernant l'adhésion dans ce cas. Achouak *et al.* (1994) mettent en évidence une relation entre l'adhésion de 7 souches bactériennes à des racines de riz et leur capacité d'adhésion à du polystyrène. Enfin, Vanhaecke *et al.* (1990) montrent que l'hydrophobicité de surface est le facteur prédominant du phénomène d'adhésion mais plus précisément pendant les trente premières minutes du processus. Les polymères exo-cellulaires permettraient ensuite aux cellules de s'implanter plus fermement au support (Marshall, 1985).

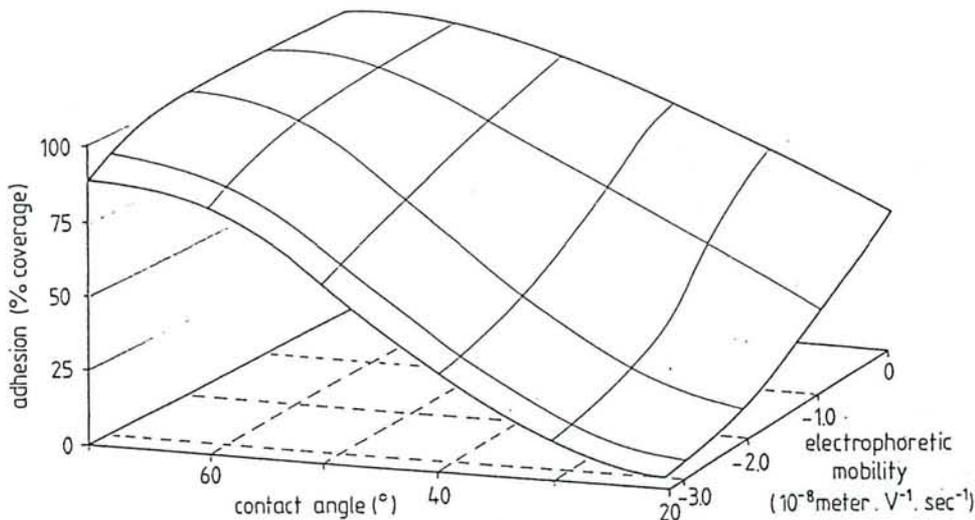


Figure I-25 : Relations entre l'adhésion bactérienne (23 souches) à un polycarbonate négativement chargé et les caractéristiques de surface déterminées par les mesures de mobilité électrophorétique et d'angle de contact (d'après van Loosdrecht *et al.*, 1987b).

Cependant, une hydrophobicité de surface cellulaire élevée ne permet pas aux cellules d'adhérer sur n'importe quel type de support. Ainsi Knox *et al.* (1985) puis van der Mei (1987) n'obtiennent aucune corrélation entre l'adhésion à l'hydroxyapatite et l'hydrophobicité de surface estimée par

divers tests. De même, la floculation et/ou l'adhésion n'est pas l'apanage des surfaces cellulaires hydrophobes. Shea *et al.* (1991) par exemple, montrent que la floculation de *Deleya marina* est liée à la présence d'un exopolysaccharide hydrophile.

I.3.5.2. Effet de l'hydrophobicité sur les propriétés des agrégats

Pavoni *et al.* (1972) montrent que la réduction de la charge de surface n'est pas une condition obligatoire pour augmenter la floculation des boues activées. Steiner *et al.* (1976) trouvent cependant que la charge de surface des floes influence la sédimentation des boues.

Si l'hydrophobicité est un des principaux facteurs gouvernant l'adhésion cellulaire, alors les bactéries composant les agrégats sont capables d'exprimer des propriétés hydrophobes de surface. Valin et Sutherland (1982) obtiennent une relation entre l'angle de contact de boue activées de laboratoire et leur performance de floculation (Figure I-26).

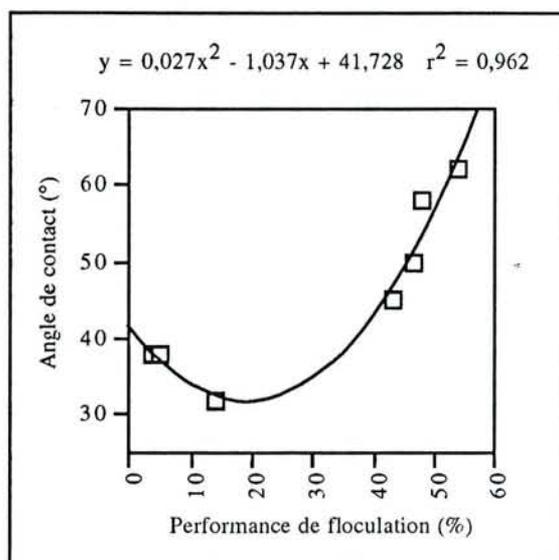


Figure I-26 : Relation entre l'angle de contact et la performance de floculation d'une boue de laboratoire (d'après les données obtenues par Valin et Sutherland, 1982). L'angle de contact est déterminé avec une goutte d'eau. La performance de floculation correspond au pourcentage de MES ayant décantées après 30 min dans une éprouvette de 1 L.

Singh et Vincent (1987) ont isolé, à partir d'une boue activée une souche de *Pseudomonas* qui présente une forte hydrophobicité de surface lorsque son aptitude à la floculation est bonne. Urbain *et al.* (1993) établissent à partir de 16 échantillons de boues activées, une relation entre les exopolymères, la décantabilité et l'hydrophobicité "intrafloc" estimée par le test d'agrégation saline. La relation montre un apport positif des interactions hydrophobes sur la capacité de décantation des boues.

Grotenhuis *et al.* (1992) étudient les propriétés de surface de souches bactériennes méthanogènes (anaérobies) isolées de boues granulaires. Toutes les souches isolées (n=10) possèdent une forte hydrophobicité par le test à l'angle de contact ($74 \pm 4^\circ$). Les auteurs suggèrent que le réacteur anaérobie est sélectif des souches hydrophobes et que la forte hydrophobicité est responsable en partie de la forte cohésion des boues granulaires méthanogènes.

L'apport de l'effet hydrophobe dans le phénomène de floculation est également rapporté par Mozes et Rouxhet (1990) chez les levures.

Un cas intéressant est celui mis en évidence par Overmann et Pfennig (1992) qui suggèrent que l'hydrophobicité de surface cellulaire semble dépendre d'un phénomène physico-chimique chez *Amoebobacter purpureus*, une bactérie pourpre sulfureuse (anaérobie phototrophe) isolée d'une eau de lac. Après épuisement des sulfures (S^{2-} , donneur d'électrons), les cellules forment des agrégats denses composés de cellules hydrophobes (79% par le TAMH) sédimentant très rapidement (0,8 à 2,5 $cm\ s^{-1}$). Des variations importantes de pH (4-10), de fortes concentrations en certains sucres (spécifiques de lectines) ou une augmentation de la température jusqu'à 60°C n'affecte pas la stabilité de ces agrégats. Mais, après ajout de 2 mM d'ions sulfures, ils sont immédiatement disloqués. Simultanément l'hydrophobicité de surface des cellules chute de 79% à 0%. Le phénomène est répétable en éliminant rapidement H_2S (par barbotage d'azote) puis en les rajoutant dans le milieu (Figure I-27). Des composés thiols (*e.g.* mercaptoéthanol) ont un effet similaire cependant leur efficacité est fortement dépendante de leur encombrement stérique et de leur charge. L'ion sulfure est sans effet sous de fortes concentrations en sels (3 M). Appuyés par d'autres expériences, les auteurs montrent que la forte cohésion des agrégats est exclusivement dépendante de l'hydrophobicité importante des cellules en absence de sulfures. Cette agrégation dépendrait d'un mécanisme réversible, unique à ce jour, impliquant une protéine de surface dont le caractère hydrophobe est gouverné par l'ouverture et la fermeture de ponts disulfures.

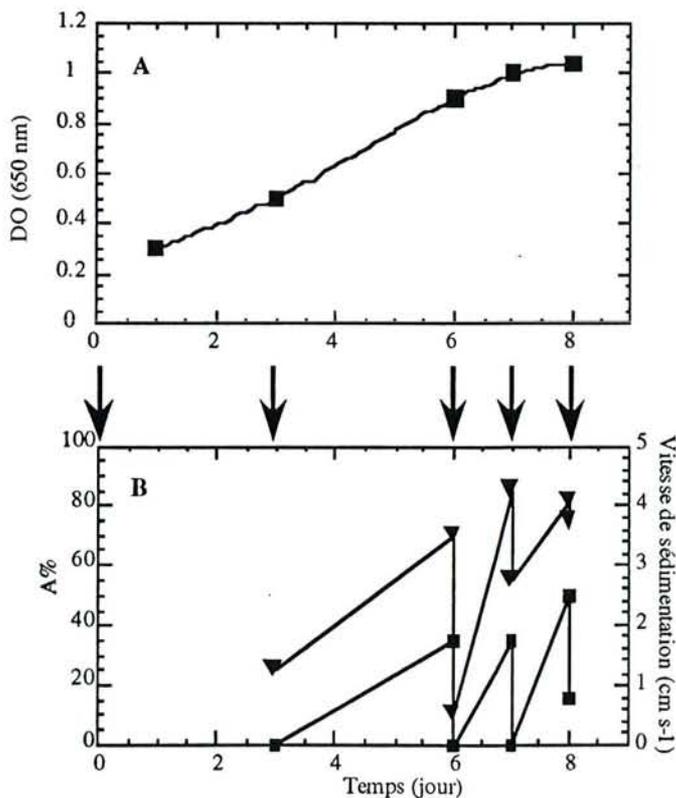


Figure I-27 : (A) Croissance en réacteur fermé d'une culture d'*Amoebobacter purpureus*, (B) Vitesse de sédimentation des floes de la culture (■) et indice d'hydrophobicité (A%) par le test d'adhésion à l'hexadécane (▼) au cours du temps. L'addition répétée de sulfures (concentration finale de 1,5 mM, symbolisée par les flèches) est immédiatement effectuée après épuisement du milieu en sulfures (d'après Overmann et Pfennig, 1992).

Le développement d'agrégats en forme de "rosette" où les bactéries sont en contact les unes avec les autres par leurs extrémités (Figure I-28) serait la conséquence de pôles hydrophobes à l'extrémité de cellules allongées (Marshall et Cruickshank, 1973). Eriksson et Härdin (1984) proposent un modèle similaire de la formation du floc "jeune" de boue activée. Ils se basent sur le fait que la plupart des cellules bactériennes sont de forme allongée. De ce fait les répulsions électrostatiques sont minimales à l'extrémité des cellules, ce qui favorise leur association bout à bout. Le floc aurait alors initialement une structure allongée le rendant fragile. La cohésion et la forme plus ou moins cylindrique du floc "veillissant" serait par la suite gouvernée par les polymères exocellulaires (Eriksson et Härdin, 1984).

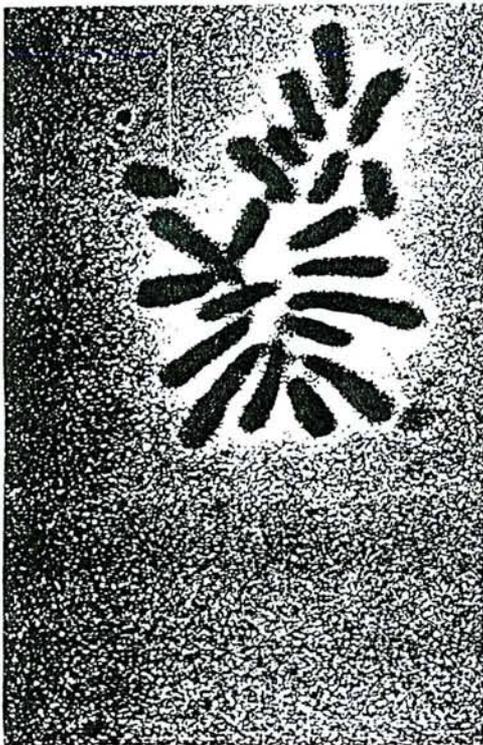


Figure I-28 : Formation en rosette chez *Flexibacter auriantacus* CW7 par ses pôles hydrophobes, microscopie en contraste de phase (X4900) (d'après Marshall et Cruickshank, 1973).

I.3.6. Effets de l'environnement sur l'hydrophobicité des cellules

I.3.6.1. Variation au cours de la croissance

L'hydrophobicité de surface change ou ne change pas au cours de la croissance selon les souches bactériennes. Tous les cas de figures possibles ont été observés et sont résumés ci-après.

Chez *Serratia marcescens*, l'hydrophobicité est faible en début de phase de croissance exponentielle (0 à 10% par le test à l'octane) et augmente en début de phase stationnaire (50%) (Rosenberg *et al.*, 1980). De même chez de nombreuses bactéries à gram positif, l'hydrophobicité devient maximale en phase stationnaire et reste stable (Beck *et al.*, 1988 ; Mörner *et al.*, 1983 ; Reifsteck et Wilkinson, 1987). Par contre, chez plusieurs cyanobactéries, l'hydrophobicité est élevée

pendant la croissance (95% d'adhésion pour une culture de 2 jours, par le TAMH) puis diminue (40% d'adhésion) après 15 jours de vieillissement de la culture (Bar-Or et Shilo, 1988). Jorand *et al.* (1994) constatent, par le TAMH et sur des souches isolées de boues activées, que l'hydrophobicité augmente en début de croissance puis diminue en fin de croissance exponentielle. Allison *et al.* (1990) observent chez *E. coli*, un phénomène inverse où l'hydrophobicité, estimée par le test CIH, diminue au début de la croissance puis reste stable pour augmenter en début de phase stationnaire (Figure I-29).

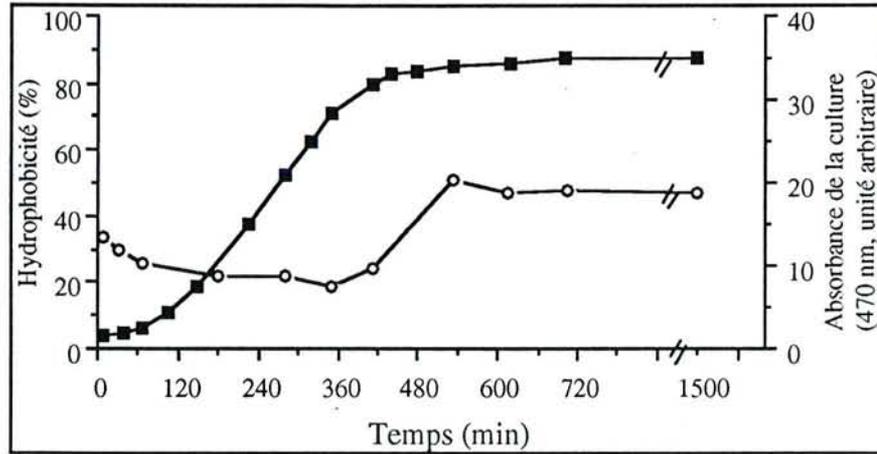


Figure I-29 : Variation de l'hydrophobicité de surface (o) d'*E. coli* au cours de sa croissance (■) en réacteur fermé. L'hydrophobicité de surface est mesurée par la CIH (octyl sépharose, NaCl 4 M) et est exprimée par le pourcentage de rétention du ligand hydrophobe. La croissance est estimée par mesure de la densité optique à 470 nm (d'après Allison *et al.*, 1990).

L'origine de la variation des propriétés de surface des bactéries est diverse. Par des études en réacteur continu, Allison *et al.* (1990) montrent chez *E. coli* que l'hydrophobicité de surface diminue avec l'augmentation du taux de croissance spécifique aussi bien pour les cellules fixées sous forme de biofilm que pour les cellules en suspension. Par contre, l'hydrophobicité de surface des cellules se détachant du biofilm (cellules jeunes nouvellement formées) augmente avec la vitesse de croissance spécifique (Figure I-30). Après incubation à 37°C ces cellules retrouvent un taux d'hydrophobicité proche des cellules en réacteur fermé. Les auteurs expliquent ces variations par l'altération de la surface des cellules au cours de leur vieillissement. Les surfaces responsables de l'hydrophobicité (et de l'adhésion) seraient minimales pendant et juste après la division cellulaire. En phase de croissance exponentielle d'une culture la proportion de cellules jeunes, donc hydrophiles est maximale. Cependant, Ascon-Cabrera *et al.* (1995) observent un phénomène inverse avec une culture mixte de *Pseudomonas* sp. L'hydrophobicité des cellules d'un biofilm (cellules sessiles) augmente avec leur taux de croissance, l'hydrophobicité des cellules planctoniques reste par contre stable.

Van Loosdrecht *et al.* (1987b) observent chez *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp. et *Pseudomonas* sp. que l'hydrophobicité (déterminée par le test MAC) augmente avec la vitesse de croissance. Chez plusieurs bactéries à gram positif (Staphylocoques, Streptocoques, *Corynebacterium glutamicum*) il semble que l'hydrophobicité soit liée au remplacement progressif des

acides teichoïques et teichuroniques par les acides lipoteichoïques, considérés comme hydrophobines (Tableau I-17).

Chez *A. calcoaceticus* la perte de la paroi en début de phase stationnaire est généralement liée à l'expression du caractère hydrophobe (Rosenberg *et al.*, 1983). Chez certaines cyanobactéries c'est la synthèse progressive de polymères exo-cellulaires au cours de la croissance qui va rendre leur surface hydrophobe (Bar-Or et Shilo, 1988).

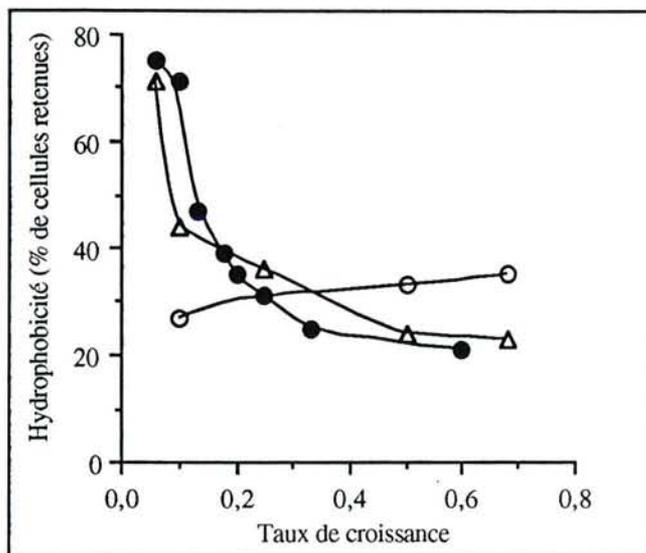


Figure I-30 : Hydrophobicité de surface de *E. coli* en fonction de la vitesse spécifique de croissance (μ) (limitation en carbone) pour trois populations différentes : (O), cellules fixées (biofilm); (●), cellules planctoniques (cellules libres); (Δ), biofilm élué (cellules du biofilm nouvellement formées). L'hydrophobicité est estimée avec la même technique que pour la Figure I-29 (d'après Allison *et al.*, 1990).

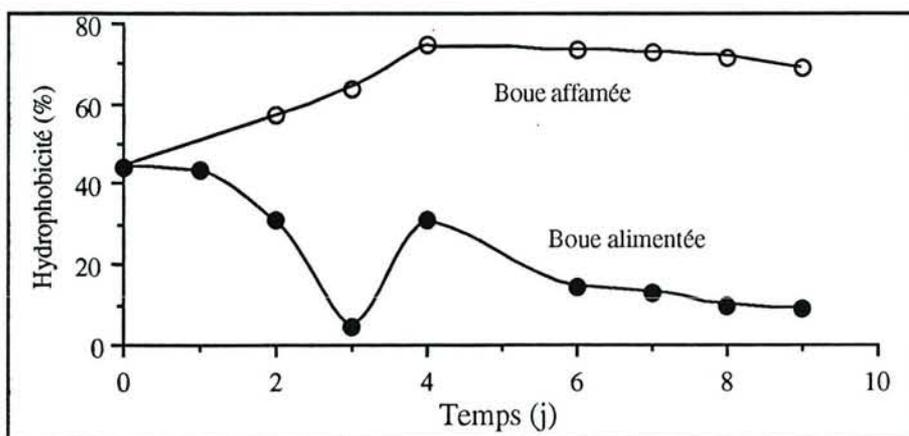


Figure I-31 : Variation de l'hydrophobicité d'une boue activée acclimatée en laboratoire et à population filamenteuse dominante en *Microthrix parvicella* par le TAMH en fonction du temps, en conditions affamée ou alimentée (effluent synthétique) en réacteur continu (d'après Kocianova *et al.*, 1992).

En conditions de famine, l'hydrophobicité des cellules a généralement tendance à augmenter (Rosenberg, 1984b ; Rosenberg et Kjelleberg, 1986). Singh et Vincent (1988) observent qu'une souche isolée de boues activées devient hydrophile en milieu "riche" et hydrophobe en milieu "dilué". Kocianova *et al.* (1992), observent sur une boue activée de laboratoire cultivée en réacteur continu, où une prolifération de l'espèce filamenteuse *Microthrix parvicella* est constatée, que l'hydrophobicité

de la boue est plus élevée lorsqu'elle est affamée que lorsqu'elle est alimentée (Figure I-31). Cette variation peut être due à une modification de dominance des espèces microbiennes de la boue et non pas à une variation des propriétés de surface cellulaire. Cependant, l'hydrophobicité d'une boue activée ($\approx 80\%$ par le TAMH) en réacteur batch ne varie pas en trois jours d'expérience que la boue soit affamée ou non (ajout de glucose) (Jorand *et al.*, 1994). D'autre part, chez une souche marine de *Pseudomonas*, l'hydrophobicité diminue avec le temps en conditions de famine, probablement à cause de la synthèse d'un exopolysaccharide hydrophile (Wrangstadh *et al.*, 1989).

I.3.6.2. Effet de la composition du milieu de culture

Chez *Rhodococcus erythropolis* S-1, la capacité de floculation est différente selon la nature de la source carbonée (glucose, fructose, saccharose..., Kurane *et al.*, 1991). En présence de glucose (et de bouillon d'extrait de levure/peptone) *Aeromonas salmonicida* ne synthétise pas de polysaccharides extra-cellulaires et est hydrophobe. Mais en absence de glucose (bouillon seul), la souche est hydrophile (Bonet *et al.*, 1993). Les auteurs montrent en outre que la variation d'hydrophobicité n'est pas liée au rapport C/N du milieu nutritif. Eisen et Reid (1989) avaient obtenu des résultats similaires avec deux souches de *Lactobacillus* qui étaient plus hydrophobes en milieu complexe (urine) et glucose qu'en milieu complexe seul. Van Loosdrecht *et al.* (1987b) ne constatent, par contre, aucun effet de la nature de la source de carbone (acétate, éthanol, mannitol, glucose, xylène) sur 4 souches bactériennes (*Arthrobater* spp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*).

Cultivé en présence d'une source de carbone peu soluble dans le milieu de culture (octadécane, hexadécane) l'hydrophobicité de surface de *Pseudomonas aeruginosa* augmente (de 20 à 80% par le TAMH) lorsqu'un biosurfactant (rhamnolipide) est ajouté au milieu (Zhang et Miller, 1994). Des tests au ^{14}C permettent de montrer que cette augmentation est bien due à une consommation de la molécule amphiphile et non pas à une simple incorporation au niveau de la membrane.

L'oxygénation du milieu de culture peut avoir un rôle. Ainsi Rouxhet *et al.* (1987) constatent chez *A. calcoaceticus*, que l'adhésion sur polycarbonate est augmentée en présence de fortes teneurs en oxygène.

La nature et la quantité des sels en solution semblent avoir un effet sur l'hydrophobicité de surface des bactéries. Ainsi l'hydrophobicité de souches de *Renibacterium salmoninarum* est légèrement augmentée si elles sont cultivées en présence de NaCl (0, 10 ou 20 g L⁻¹) puis lavées par de l'eau déminéralisée (Bandin *et al.*, 1989). Il semble aussi que les cations divalents et notamment Mg²⁺ et Mn²⁺ augmentent efficacement l'hydrophobicité des cellules (Fattom et Shilo, 1984 ; Beveridge et Graham, 1991).

Une concentration saturante en phosphate a pour effet d'augmenter l'hydrophobicité de *Corynebacterium glutamicum* par rapport à un milieu carencé en phosphates (Buchs *et al.*, 1988). Le remplacement des acides teichuroniques par les acides lipoteichoïques, riches en phosphates, en serait l'explication.

I.4. Les propriétés de biosorption des floccs

Lorsque les eaux usées entrent en contact avec les boues activées, une fraction de la matière organique est rapidement éliminée de la phase eau (10 à 60 min) (Rensink et Donker, 1991 ; Pujol et Canler, 1992 ; Torrijos *et al.*, 1994). Ainsi, en réacteur fermé, près de 40 % de la matière organique soluble d'une eau usée prédécantée disparaissent en 60 min après contact avec une boue activée (Figure I-32). Ce phénomène est généralement appelé "biosorption" et doit être distingué du phénomène de biodégradation de la matière organique qui nécessite *a priori* une durée plus importante selon Pujol et Canler (1992).

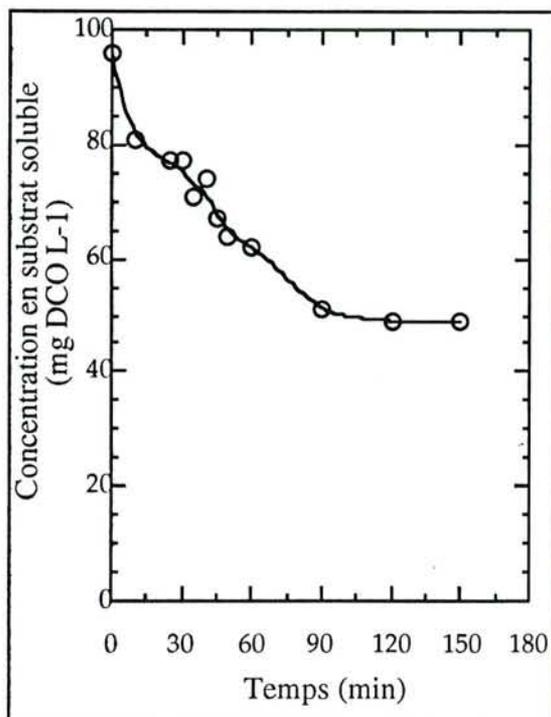


Figure I-32 : Evolution de la concentration en substrat soluble ($<0,1\mu\text{m}$) en fonction du temps, d'une eau usée prédécantée placée en contact avec une boue activée acclimatée au laboratoire (d'après Torrijos *et al.*, 1994).

La biosorption des boues activées désigne en fait un phénomène dont les mécanismes ne sont pas clairement définis. L'hypothèse proposée par plusieurs auteurs (*e.g.* Tsezos et Bell, 1989 ; Rensink et Donker, 1991 ; Pujol et Canler, 1992 ; Boller, 1993) est que les composés organiques sont "piégés" par les floccs biologiques. Dès lors, les mécanismes envisageables sont i) l'adsorption par les cellules bactériennes et/ou par la matrice d'exo-polymères et ii) l'absorption par les cellules microbiennes suivie ou non d'une biodégradation. Mais du fait de l'hétérogénéité aussi bien de l'adsorbant (surfaces hydrophiles et hydrophobes, surfaces minérales et organiques, affinité variable des groupes bactériens pour les différents substrats, porosité du flocc...) que de l'adsorbat (due à la composition chimique variable des eaux usées), il est difficile de déterminer dans quelle mesure l'un ou l'autre de ces mécanismes participe au phénomène de biosorption.

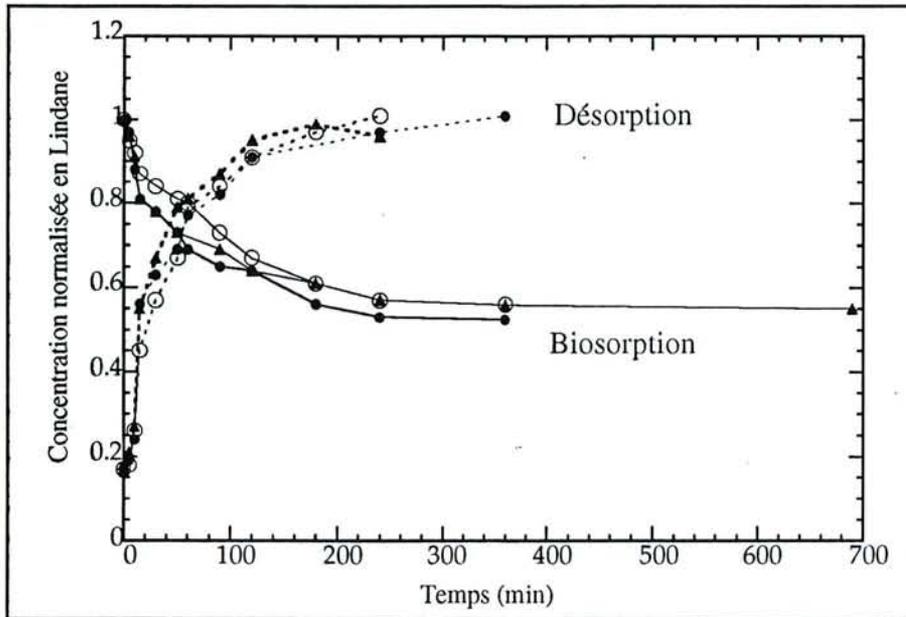


Figure I-33 : Effet de la température sur la biosorption et la désorption du Lindane par une boue activée stérilisée. (O) +5°C , (●) +33°C et (▼) +20°C. Concentration en Lindane = $997 \pm 6 \mu\text{g mL}^{-1}$, le lindane est dosé par chromatographie en phase gazeuse (d'après Tsezos et Wang, 1991).

Plusieurs travaux amènent à penser que la boue activée peut jouer le rôle d'un adsorbant par rapport aux composés des eaux usées. Tsezos et Bell (1989) obtiennent des constantes d'adsorption K (selon Freundlich) d'un xénobiotique (lindane), sur boue activée, très proches à 5°C et à 20°C (0,49 et 0,56 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivement) et montre ainsi que le phénomène n'est pas sensible à la température au moins dans l'intervalle où la plupart des mécanismes biologiques sont affectés. De plus, avec une boue "tuée" par autoclavage, Tsezos et Wang (1991) n'obtiennent pas de différence d'adsorption du lindane entre 5 et 33°C (Figure I-33). La fraction éliminée de la phase liquide peut être récupérée en renouvelant la phase eau par de l'eau "ultrapure" aussi bien avec une boue autoclavée (Tsezos et Wang, 1991 ; Figure I-33) qu'avec une boue vivante (Bell et Tsezos, 1989). Plusieurs auteurs montrent de plus une relation entre le taux d'adsorption de solutés sur une boue activée et leur hydrophobicité (estimée par le K_{ow}) (Mater-Müller *et al.* cités par Boller, 1993 ; Tsezos et Bell, 1989 ; Struijs *et al.*, 1991).

Tous ces résultats suggèrent que les composés organiques des eaux usées sont bien éliminés dans un premier temps par un phénomène d'adsorption sur les floes des boues activées. Toutefois, il semble qu'une métabolisation très rapide des composés de l'influent puisse se produire au contact de la boue. Ainsi Pujol et Canler (1992) obtiennent avec une boue activée, une disparition de la matière organique (DCO) d'une eau usée prédécantée, environ 3 fois plus élevée à +24°C qu'à +3°C. Torrijos *et al.* (1994) étudient les mécanismes de disparition des composés des eaux usées en fonction du temps de contact boue activée—influent, en réacteur semi-continu. Ils montrent que pendant les cinq premières minutes de contact entre l'influent et la boue activée, la fraction soluble ($<0,1 \mu\text{m}$) disparaît

plus vite que la consommation d'oxygène, ce qui suggère qu'un processus indépendant de l'oxydation biologique est responsable de la disparition d'une partie de la matière organique dissoute. Au delà des cinq premières minutes et jusque 120 min, les auteurs montrent que la disparition de la matière organique dissoute (50% biodégradable) devient proportionnelle à la vitesse de consommation d'oxygène signifiant que l'activité biologique est impliquée dans ce phénomène. Il semble alors que la biosorption tiennent compte des composés éliminés par adsorption et par absorption mais aussi de composés éliminés par oxydation biologique.

La biosorption est un paramètre qui évolue probablement avec la structure des boues activées. Rensink et Donker (1991) et Pujol et Canler (1992) obtiennent en effet une variation de la biosorption en fonction de la décantabilité. Cependant cette variation pourrait provenir de la présence de populations de micro-organismes ayant différentes affinités pour les substrats, notamment entre les bactéries filamenteuses et les bactéries du floc (Chudoba *et al.*, 1973).

Tableau I-18 : Répartition de la matière organique selon Henze (1992) à partir de 5 stations d'épuration d'origine différente (Danemark, Suisse, France et Afrique de Sud).

Fractions	% de la DCO (n=5 sauf * où n=2)
Soluble inerte	7±3%
Soluble facilement biodégradable	26±6%
Lentement biodégradable	46±8%
Particulaire inerte	9±3%
Micro-organismes hétérotrophes	10±9%*

Enfin, Pujol et Canler (1992) montrent qu'une même boue a un comportement différent selon qu'elle est en présence d'effluent de brasserie ou d'effluent de tannerie. Les différents composés de la matière organique n'ont en effet pas tous les mêmes propriétés et selon leur biodégradabilité, leur taille ou leurs propriétés physico-chimiques, leur capacité à être biosorbé pourrait être différente. La complexité des eaux usées peut-être décrite selon plusieurs approches : biodégradabilité de la matière organique (Tableau I-18) ; taille des particules (Tableau I-19) ou composition chimique de la fraction soluble (Tableau I-20).

Tableau I-19 : Contenu en carbone et en azote des composés des eaux usées selon la taille (d'après Richert et Hunter, cités par Boller, 1993).

Types de solides	Taille (µm)	Proportion de C (% de la masse sèche)	Proportion de N (% de la masse sèche)
Décantables	>100	25	4,0
Supra-colloïdales	1-100	18	6,7
Colloïdales	0,001-1	9	3,8
Organiques dissous	<0,001	48	0,7

Tableau I-20 : Composition d'eaux usées urbaines (% de la DCO totale) extrait de Nielsen *et al.* (1992).

Composition	Henze (1982)	Tanaka <i>et al.</i> (1991)	Narkis <i>et al.</i> (1980)*	
			**	***
DCO totale (mg/L)	530	259	394 (350-443)	813 (600-1180)
DCO soluble	40		57 (50-70)	36 (33-38)
Carbohydrates	12	6	9 (2-20)	6 (2-9)
Protéines	8	12	27 (18-36)	14 (7-22)
Lipides	10	19		
Surfactants	5	6	8 (7-10)	4 (3-5)
Acides gras	19	3	10 (6-12)	14 (8-18)
Acides humiques		2		
Autre subst. organiques	46	49		

* moyenne de 3 échantillons pour chaque type d'eau usée

** eau usée jeune (10-60 min), *** eau usée agée (6-12 hrs)

La composition chimique des particules est différente selon leur taille (Tableau I-19), la fraction soluble est très hétérogène et varie selon les types d'eaux usées (Tableau I-20). Torrijos *et al.* (1994) constatent que la moitié de la fraction soluble est rapidement métabolisée tandis que 80% de la fraction colloïdale (0,1 µm à 50 µm) est éliminée par adsorption sans être métabolisée. Les mécanismes de disparition de la matière organique semblent donc être très différents selon la taille et la nature des composés. Toutefois pour la fraction soluble il n'existerait pas de relation entre biodégradabilité et poids moléculaire (Torrijos *et al.*, 1994).

I.5. Références

- ACHOUAK W., THOMAS F. and HEULIN T. (1994) Physico-chemical surface properties of *rhizobacteria* and their adhesion to roots, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **3**, 131-137.
- AIKEN G.R. (1985) Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances, in *Humic substances in soil, sediment and water*, Aiken G. R., McKnight D. M., Waeshaw R. L. and McCarthy eds., J. Wiley and Sons, New York, pp. 363-385.
- AITKEN M.D., P.E. HECK, R.O. MINES and J.H. SHERRARD (1992) Activated sludge, *Wat. Environ. Res.*, **64**, 347-359.
- ALLISON D.G., EVAN D.J., BROWN M.R.W. and GILBERT P. (1990) Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms, *J. Bacteriol.*, **172**, 1667-1669.
- ANDREADAKIS A. D. (1993) Physical and chemical properties of activated sludge floc., *Wat. Res.*, **27**, 1707-1714.
- ASCON-CABRERA M.A., THOMAS D., LEBEAULT J.M. (1995) Activity of synchronized cells of a steady-state biofilm recirculated reactor during xenobiotic biodegradation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 920-925.
- BANDIN I., Y. SANTOS, J.L. BARJA and A.E. TORANZO (1989) Influence of the growth conditions on the hydrophobicity of *Renibacterium salmoninarium* evaluated by different methods., *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**, 71-78.
- BANKS C.J. and I. WALKER (1977) Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media., *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 363-368.
- BAR-OR Y. and M. SHILO (1988) The role of cell-bound flocculants in coflocculation of benthic cyanobacteria with clay particles, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 169-174.
- BAR-OR Y. (1990) Hydrophobicity in the aquatic environment, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 211-228.
- BECCARI M., P. MAPPELLI and V. TANDOI (1980) Relationship between bulking and physicochemical-biological properties of activated sludges, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 969-979.

- BECK G., E. PUCHELLE, C. PLOTKOWSKI and R.PESLIN. (1988) Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus*., *Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.*, **139**, 655-664.
- BECKETT R. (1990) The surface chemistry of humic substances in aquatic systems, in *Surface and Colloid Chemistry in Natural Waters and Water Treatment*", R. BECKETT Ed., Plenum Press, New York, pp. 3-20.
- BENGTSSON G. (1991) Bacterial exo-polymers and PHB production in fluctuating ground-water habitats, *Microbiol. Ecol.*, **86**, 15-24.
- BEVERIDGE T.J. and L.L. GRAHAM (1991) Surface layers of bacteria, *Microbiological Rev.*, **55**, 684-705.
- BLACKALL L.L. and MARSHALL K.C. (1989) The mechanism of stabilization of actinomycete foams and the prevention of foaming under laboratory conditions, *J. Indust. Microbiol.*, **4**, 181-188.
- BLACKALL L.L. (1994) Molecular identification of activated sludge foaming bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 35-42.
- BLEICH U. and NEHRKORN A. (1989) Elektronenmikroskopische Darstellung extrazellulärer polymere Substanzen in Belebtschlammflocken, *Zbl. Hyg.*, **188**, 66-83.
- BLUMENKRANTZ N. and G. ASBOE-HANSEN (1973) New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.
- BOLLER M., (1993) Removal of organic matter by physico-chemical mechanisms in wastewater treatment plants, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n° 11, 167-183.
- BONET R., M.D. SIMON-PUJOL and F. CONGREGADO. (1993) Effects of nutrients on exopolysaccharides production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2437-2441.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BROWN M.J. and J.N. LESTER (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 179-185.
- BRUUS J.H., P.H. NIELSEN and K. KEIDING (1992) On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering, *Wat. Res.*, **26**, 1597-1604.
- BRYERS J. D. and MASON C. A. (1987) Biopolymer particulate turnover in biological waste treatment systems: a review., *Bioprocess Eng.*, **2**, 95-109.
- BUCHS J., N. MOZES, C. WANDREY and G. ROUXHET. (1988) Cells adsorption control by culture conditions : influence of phosphate on surface properties, flocculation and adsorption behaviour of *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 119-128.
- BURTON K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid., *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
- CASELLAS-SALHA (1979) Contribution au contrôle et à la régulation de la floculation des eaux usées, Thèse Dr es-Sciences, Université de Montpellier I, 136 pages.
- CHAO A.C. and KEINATH T.M. (1979) Influence of process loading intensity on sludge clarification and thickening characteristics, *Wat. Res.*, **13**, 1213-1223.
- CHUDOBA J., GRAU P. and OTTOVA V. (1973) Control of activated sludge filamentous bulking. II-Selection of microorganisms by means of selector, *Wat. Res.*, **7**, 1389-1406.
- CLOETE T.E. and STEYN P.L. (1988) The role of *Acinetobacter* as a phosphorus removing agent in activated sludge, *Wat. Res.*, **22**, 971-976.
- COLLIN J.F., BLOCK J.C., IMBS M.A. and LABAN P. (1979) Contribution à l'étude des bactéries aérobies hétérotrophes d'une boue activée, *J. Français d'Hydrologie*, **10**, 47-58.
- COURTNEY H.S., HASTY D.L. and OFEK I. (1990) Hydrophobicity of group A streptococci to host cells, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, DOYLE R.J. and ROSENBERG M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 361-386.
- DAMMEL E.E. and E.D. SCHROEDER (1991) Density of activated sludge solids, *Wat. Res.*, **25**, 841-846.
- DARNELL K.R., M.E. HART and F.R. CHAMPLIN (1987) Variability of cell surface hydrophobicity among *Pasteurella multocida* somatic serotype and *Actinobacillus lignieresii* strains., *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 67-71.
- DAS D., KEINATH T.M., PARKER D.S. and WAHLBERG E.J. (1993) Floc breakup in activated sludge plants, *Wat. Environ. Res.*, **65**, 138-145.
- DAVIS E.M. (1988) Protein assays: a review of common techniques., *ABL*, **7**, 28-37.
- DEGREMONT (1989) Mémento technique de l'eau, 9° édition, vol. 1 et 2, Lavoisier, Technique et Documentation, Paris, 1500 p.
- DERIAZ R.E., M. STACEY, E.G. TEECE and L.F. WIGGINS (1949) Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses., *J. Chem. Soc.*, **14**, 1222-1232.
- DEWALLE F. B. and CHIAN S. K. (1974) Kinetics of formation of humic substances in activated sludge systems and their effect on flocculation., *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 739-755.
- DICK R.I. and P.A. VESILIND (1969) The sludge volume index- What is it ?, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **41**, 1285-1291.
- DILLON J.K., J. A. FUERST, A.C. HAYWARD and G.H.G. DAVIS. (1986) A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity, *J. Microbiol. Methods*, **6**, 13-19.

- DONKERSLOOT J.A., S.A. ROBRISH and M.I. KRICHEVSKY (1972) Fluorimetric determination of deoxyribonucleic acid in bacteria with ethidium bromide, *Appl. Microbiol.*, **24**, 179-183.
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- DUNCAN-HEWITT W.C. (1990) Nature of the hydrophobic effect, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 39-74.
- EISEN A. and G. REID (1989) Effect of culture media on *Lactobacillus* hydrophobicity and electrophoretic mobility, *Microb. Ecol.*, **17**, 17-25.
- ELLIOTT S.J., N. NANDAPALAN and B.J. CHANG (1991) Production of type 1 fimbriae by *E. coli* HB101., *Microbial Pathogenesis*, **10**, 481-486.
- ERIKSSON L. and AXBERG C. (1981) Direct influence of wastewater pollutants on flocculation and sedimentation behaviour in biological wastewater treatment-I Model system *E. Coli* B., *Wat. Res.*, **15**, 421-431.
- ERIKSSON L. and A.-M. HARDIN (1984) Settling properties of activated sludge related to floc structure, *Wat. Sci. Tech.*, **16**, 55-68.
- ERIKSSON L. and B. ALM (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 21-28.
- ERIKSSON L., I. STEEN and M. TENDAJ (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, n°6, 251-265.
- FASS S., GANAYE V., URBAIN V., MANEM J. and BLOCK J.C. (1994) Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification, *Environ. Technol.*, **15**, 459-467.
- FATTOM A. and M. SHILO (1984) Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria., *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 135-143.
- FERREIROS C.M. and M.T. CRIADO (1984) Expression of surface hydrophobicity encoded by R-plasmids in *Escherichia coli* laboratory strains, *Arch. Microbiol.*, **138**, 191-194.
- FINSTEIN and EUKELEKIAN (1967) Gross dimensions of activated sludge flocs with reference to bulking, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **39**, 33-40.
- FIRON N., I. OFEK and N. SHIRON (1982) Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the lectin of *Escherichia coli*., *Biochem. Biophys. R. Comm.*, **105**, 1426-1432.
- FITCH B. and P. KOS (1976) Toward a more meaningful index of sludge quality, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **48**, 1979-1987.
- FORSTER C.F. (1971) Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index, *Wat. Res.*, **2**, 767-776.
- FORSTER C.F. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process, *Water SA*, **2**, 119-125.
- FORSTER C.F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-I. Nutrients and surface polymers, *Wat. Res.*, **19**, 1259-1264.
- FRØLUND B. and KEIDING K. (1994) Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 708-716.
- FRØLUND B., GRIEBE T. and NIELSEN P. (1995a) Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, sous presse.
- FRØLUND B., PALMGREN R., KEIDING K. and NIELSEN P. (1995b) Strategies for extraction of activated sludge exopolymers by cation exchange. Soumis à publication in : *Wat. Res.*
- GALIL N., N. STAHL, J.T. NOVAK and M. REBHUN (1991) The influence of mixing on the physical characteristics of biological flocs, *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, **63**, 768-772.
- GAYFORD C.G. and J.P. RICHARDS (1970) Isolation and enumeration of aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge, *J. Appl. Bact.*, **33**, 342-350.
- GONZALEZ E.A., J. BLANCO, S.B. BALODA, and T. WADSTROM (1988) Relative cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains with various recognized fimbriae, *Zbl. Bakt. Hyg.*, **A 269**, 218-236.
- GOODWIN J.A.S. and C.F. FORSTER (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics, *Wat. Res.*, **19**, 527-533.
- GREENE R.T., C. LAMMLER and M. SCHMITT (1992) Surface hydrophobicity of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*, *Res. Vet. Sci.*, **52**, 90-96.
- GROTENHUIS J.T.C., C.M. PLUGGE, A.J.M. STAMS and J.B. ZEHNDER (1992) Hydrophobicities and electrophoretic mobilities of anaerobic bacterial isolates from methanogenic granular sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1054-1056.
- GRUBER K. and U.B. SLEYTR (1991) Influence of an S-layer on surface properties of *Bacillus stearothermophilus*, *Arch. Microbiol.*, **156**, 181-185.
- GURIJALA K.R. and M. ALEXANDER (1990) Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing., *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1631-1635.
- HANDLEY P., L.M. HESKETH and R. A. MOUMENA (1991) Charged and hydrophobic groups are localised in the short and long tuft fibrils on *Streptococcus sanguis* strains, *Biofouling*, **4**, 105-111.
- HANTULA J. and D.H. BAMFORD (1991) The efficiency of the protein-dependent flocculation of *Flavobacterium* sp. is sensitive to the composition of growth medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 100-104.

- HANTULA J., A. KURKI, P. VUORIRANTA and D.H. BAMFORD (1991) Rapid classification of bacterial strains by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : population dynamics of the dominant dispersed phase bacteria of activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 551-555.
- HAZEN K.C. and B.W. HAZEN (1987) A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations, *J. Microbiol. Methods*, **6**, 289-299.
- HAZEN K.C. (1990) Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, especially *Candida* species, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 249-296.
- HENZE M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes, *Wat. Sci. Technol.*, **25**, n°6, 1-15.
- HEUKELEKIAN H. and E. WEISBERG (1956) Bound water and activated sludge bulking, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **28**, 558-574.
- HORAN N.J. and C.R. ECCLES (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges, *Wat. Res.*, **20**, 1427-1432.
- HORSKÁ E., POKORNY J. and LABAJOVÁ M. (1993) Changes of surface charge and hydrophobicity of the outer bacterial membrane depending on the cultivation medium, *Biologia*, **48**, 343-347.
- HUGHES D.E. and D.A. STAFFORD (1976) The microbiology of the activated-sludge process, *Critical Rev. Environ. Control*, **9**, 233-257.
- HULTMAN B., M. LOWEN, U. KARLSSON, P.H. LI and L. MOLINA (1991) Prediction of activated sludge sedimentation based on sludge indices, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, n°7, 33-42.
- HUYSMAN F. and VERSTRAETE W. (1993) Effect of cell surface characteristics on the adhesion of bacteria to soil particles, *Biol. Fertil. Soils*, **16**, 21-26.
- INGRAHAM J.L., MAALØE O. and NEIDHARDT F. C. (1983) Composition, organization and structure of the bacterial cell, in *Growth of the bacterial cell*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, USA, pp. 1-48.
- IRVIN R.T. (1990) Hydrophobicity of proteins and bacterial fimbriae, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 137-178.
- JENKINS D., M.G. RICHARD and G.T. DAIGGER (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton, 193 pages.
- JENKINSON H.F. (1992) Adherence, coaggregation and hydrophobicity of *Streptococcus gordonii* associated with expression of cell surface lipoproteins, *Infect. Immun.*, **60**, 1225-1228.
- JORAND F., GUICHERD P., URBAIN V., MANEM J. and BLOCK J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 211-218.
- JORAND F., ZARTARIAN F., THOMAS F., BLOCK J.C., BOTTERO J.-Y., VILLEMIN G., URBAIN V. and MANEM J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **29**, 1639-1647.
- KAKII K., SHIRAKASHI T. and KURIYAMA M. (1984) Some properties of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge, *J. Ferment. Technol.*, **62**, 429-435.
- KIFF R.J. and THOMPSON R. (1979) Physical method for the extraction of bacterial exopolymers from activated sludge biomass, *Biotechnol. Lett.*, **1**, 183-186.
- KING R.O. and FORSTER C.F. (1990) Effects of sonication on activated sludge, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 109-115.
- KNOX K.W., L.N. HARDY, L.J. MARKEVICS, J.D. EVANS and A.J. WICKEN (1985) Comparative studies on the effect of growth conditions on adhesion, hydrophobicity, and extracellular protein profile of *Streptococcus sanguis* G9B, *Infect. Immun.*, **50**, 545-554.
- KOCIANOVA E., R.J. FOOT and C.F. FORSTER (1992) Physicochemical aspects of activated sludge in relation to stable foam formation., *J.IWEM*, **6**, 342-350.
- KURANE R., S. HATAKEYAMA and H. TSUGENO (1991) Correlation between flocculant production and morphological changes in *Rhodococcus erythropolis* S-1, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 498-500.
- LAMBERTS J.J.M. and NECKERS D.C. (1983) Rose bengal and non polar derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7465-7470.
- LI D.H. and J.J. GANCZARCZYK (1986) Physical characteristics of activated sludge flocs, *Crit. Rev. Environ. Control*, **17**, 53-87.
- LI D. H. and J. J. GANCZARCZYK (1987) Stroboscopic determination of settling velocity, size and porosity of activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **21**, 257-262.
- LI D. H. and J. J. GANCZARCZYK (1988) Research note : Flow through activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **22**, 789-792.
- LI D. H. and J. J. GANCZARCZYK (1989) Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes, *Environ. Sci. Tech.*, **23**, 1385-1389.
- LI D.H. and J.J. GANCZARCZYK (1990) Structure of activated sludge flocs, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 57-65.
- LI D.H. and J.J. GANCZARCZYK (1991) Size distribution of activated sludge flocs, *J. Water. Pollut. Control Fed.*, **63**, 806-814.

- LIEBESKIND M. and DOHMANN M. (1994) Improved method of activated sludge biomass determination, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 7-14.
- LINDAHL M., A.FARIS, T.WADSTRÖM and S.HJERTEN. (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells, *Biochimica Biophysica Acta*, **677**, 471-476.
- LOGAN B.E. and HUNT J.R. (1988) Bioflocculation as a microbial response to substrate limitations, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 91-101.
- LOGAN B.E. and D.B. WILKINSON (1991) Fractal dimensions and porosities of *Zooglea ramigera* and *Saccharomyces cerevisiae* aggregates, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 389-396.
- LOUISOT (1969) Cours de biochimie structurale n°4 : lipides et dérivés isopréniques, SIMEP éditions, Lyon, 93 pages.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MacNAB R. and H.F. JENKINSON (1992) Gene disruption identifies a 290 kDa cell-surface polypeptide conferring hydrophobicity and coaggregation properties in *Streptococcus gordonii*, *Molecular Microbiology*, **6**, 2939-2949.
- MADONI P., D. DAVOLI and E. CHIERICI, (1993) Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works, *Wat. Res.*, **27**, 1485-1491.
- MADONI P. (1994) A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis, *Wat. Res.*, **28**, 67-75.
- MAGARA Y., S. NAMBU and UTOSAWA K. (1976) Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics, *Wat. Res.*, **10**, 71-77.
- MAGNUSSON K.E. (1980) The hydrophobic effect and how it can be measured with relevance for cell-cell interactions, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, **24**, 131-134.
- MARSHALL K.C. and R.H. CRUICKSHANK (1973) Cell surface hydrophobicity and the orientation of a certain bacteria at interfaces, *Arch. Mikrobiol.*, **91**, 29-40.
- MIORNER H., G. JOHANSSON, and G. KRONVALL (1983) Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci., *Infect. Immun.*, **39**, 336-343.
- MORFAUX J.N. et ALBAGNAC G. (1979) Ecophysiologie des boues activées induites dans les stations d'épuration industrielles ou mixtes par les effluents à forte charge glucidique, *J. Français d'Hydrologie*, **10**, 37-46.
- MORGAN J. W., FORSTER C. F. and EVISON L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges, *Wat. Res.*, **24**, 743-750.
- MORGAN J.W. and C.F. FORSTER (1992) A comparative study of the sonication of anaerobic and activated sludges., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **55**, 53-58.
- MORI T., Y. SAKAI, K. HONDA, I. YANO and S. HASHIMOTO. (1988) Stable abnormal foam in activated sludge process produced by *Rhodococcus* sp. with strong hydrophobic property., *Environ. Technol. Lett.*, **9**, 1041-1048.
- MOZES N. and P.G. ROUXHET. (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms, *J. Microbiol. Methods*, **6**, 99-112.
- MOZES N. and P.G. ROUXHET. (1990) Microbial hydrophobicity and fermentation technology, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 75-106.
- NEU T.R., T. DENGLER, B. JANN and K. PORALLA (1992) Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive hydrophobic *Rhodococcus* strain, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2531-2537.
- NIELSEN P. H., RAUNKJÆR K., NORSKER N. H., JENSEN N. A. and HVITVED-JACOBSEN T. (1992) Transformation of wastewater in sewer systems – A review, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, n° 6, 17-31.
- NISHIKAWA S., M. KURIYAMA (1968) Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge, *Wat. Res.*, **2**, 811-812.
- NOVAK J.T. and HAUGAN B.-E. (1981) Polymer extraction from activated sludge, *J. Wat. Control Pollut. Fed.*, **53**, 1420-1424.
- OGDEN K.L. and A.L. TAYLOR (1991) Genetic control of flocculation in *Escherichia coli*., *J. Indus. Microbiol.*, **7**, 279-286.
- OGRAM A., SAYLER G. S. and BARKAY T. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments, *J. Microbiol. Methods*, **7**, 57-66.
- ONALOPO J.A. and M.M.R. KLEMPERER. (1986) Effect of R-plasmid RP1 on surface hydrophobicity of *Proteus mirabilis*., *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 3303-3307.
- OVERMANN J. and N. PFENNIG (1992) Buoyancy regulation and aggregate formation in *Amoebacter purpureus* from Mahoney lake, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **101**, 67-79.
- PARKER D.S., W.J. KAUFMANN and D. JENKINS (1972) Floc breakup in turbulent flocculation processes, *J. Sanitary Engineering Division*, **98**, n°SA1, 79-99.
- PARKER N.D. and C.B. MUNN (1984) Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*., *FEMS Microbiol. Lett.*, **21**, 233-237.
- PAUL J.H. and W.H. JEFFREY (1985) The effect of surfactants on the attachment of estuarine and marine bacteria to surfaces., *Can. J. Microbiol.*, **31**, 224-228.
- PAVONI J.L., TENNEY M.W. and ECHELBERGER W.F. Jr (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **44**, 414-431.

- PETERSON G. L. (1979) Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall., *Anal. Biochem.*, **100**, 201–220.
- PINES O. and D. GUTNICK (1984) Aternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1., *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 307-311.
- PIPES W.O. (1978) Microbiology of activated sludge bulking, *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 85-127.
- PLATT R., G.G. GEESEY, J.D. DAVIS and D.C. WHITE (1985) Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium, *Can. J. Microbiol.*, **31**, 675-680.
- PUJOL R. and J.P. CANLER (1992) Biosorption and dynamics of bacterial populations in activated sludge, *Wat. Res.*, **26**, 209-212.
- RASMUSSEN H., BRUUS J. H., KEIDING K. and NIELSEN P. H. (1994) Observations on dewaterability and physical, chemical and microbiological changes in anaerobically stored activated sludge from a nutrient removal plant., *Wat. Res.*, **28**, 417–425.
- RATSAK C.H., KOOL B.W. and VAN VERSEVELD H.W. (1994) Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 119-128.
- RAUNKJÆR K., HVITVED-JACOBSEN T. and NIELSEN P. H. (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrates and lipid in domestic wastewater, *Wat. Res.*, **28**, 251–562.
- REBHUN M. and M. LURIE, (1993) Control of organic matter by coagulation and floc separation, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n°11, 1-20.
- REID G., P.L. CUPERUS, A.W. BRUCE, H.C. Van Der MEI, L. TOMECZECK, A.H. KHOURY and H.J. BUSSCHER (1992) Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 15549-15553.
- REIFSTECK F., S. WEE and B.J. WILKINSON (1987) Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci, *J. Med. Microbiol.*, **24**, 65-73.
- RENSINK J.H. and H.J.G.W. DONKER (1991) The effect of contact tank operation on bulking sludge and biosorption processes, *Wat. Sci. Tech.*, **23**, 857-866.
- RIFFALDI R., SARTORI F. and LEVI-MINZI R. (1982) Humics substances in sewage sludges, *Environ. Pollut.*, **3**, 139-146.
- ROLS J.L., MAURET M., RAHMANI H., NGUYEN K.M., CAPDEVILLE B., CORNIER J.C. and DEGUIN A. (1994) Population dynamics and nitrite build-up in activated sludge and biofilm for nitrogen removal, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 43-52.
- ROSENBERG E., N. KAPLAN, O. PINES, M. ROSENBERG and D. GUTNICK. (1983) Capsular polysaccharides interfere with adherence of *acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbons, *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 157-160.
- ROSENBERG M., D. GUTNICK and E. ROSENBERG. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell surface hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 29-33.
- ROSENBERG M. and ROSENBERG E. (1981) Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane, *J. Bacteriol.*, **148**, 51-57.
- ROSENBERG M., H. JUDES and E. WEISS. (1983) Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ., *Infect. Immun.*, **42**, 831-834.
- ROSENBERG M. (1984a) Ammonium sulphate enhances adherence of *Escherichia coli* J-5 to hydrocarbon and polystyrene., *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 41-45.
- ROSENBERG M. (1984b) Bacterial adherence to hydrocarbons : a useful technique for studying cell surface hydrophobicity., *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 289-295.
- ROSENBERG M. and S. KJELLEBERG. (1986) Hydrophobic interactions : role in bacterial adhesion., *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 353-393.
- ROSENBERG M. and DOYLE R.J. (1990) Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance, in *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*, Doyle R.J. and Rosenberg M. eds, American Society for Microbiology, Washington, pp. 1-38.
- ROSENBERG M. (1991) Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: water interface, *Critical Rev. Microbiol.*, **18**, 159-173
- RUDD T., STERRITT M. and LESTER J.N. (1983) Extraction of extracellular polymers from activated sludge, *Biotechnol. Lett.*, **5**, 327-332.
- SATO T. and OSE Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxyde solutions, *Wat. Res.*, **14**, 333-338.
- SHEA C., J.W. NUNLEY, J.C. WILLIAMSON and H.E. SMITH-SOMERVILLE (1991) Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharides-defective mutant strain DMR, *Appl. Environ.*, **57**, 3107-3113.
- SHEINTUCH M., O. LEV, P. EINAV and E. RÜBIN. (1986) Role of exocellular polymer in the design of activated sludge, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1564-1576.
- SIGMA Diagnostics® (1989) Protein assay Kit, procedure n° P 5656, Sigma Chemical Company.
- SINCLAIR J. L. and ALEXANDER M. (1989) Effect of protozoan predation on relative abundance of fast- and slow-growing bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **35**, 578–582.

- SINGH K.K. and W.S. VINCENT. (1987) Clumping characteristics and hydrophobic behaviour of an isolated bacterial strain from sewage sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 396-398.
- SLEYTR U.B. and P. MESSNER (1983) Crystalline surface layers on bacteria, *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 311-339.
- SMITH P.G. and COACKLEY P. (1984) Diffusivity, tortuosity and pore structure of activated sludge, *Wat. Res.*, **18**, 117-122.
- SODDELL J.A. and R.J. SEVIOUR (1990) Microbiology of foaming in activated sludge plants, *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 145-176.
- SORONGON M., R.A. BLOODGOOD and R.P. BURCHARD (1991) Hydrophobicity, adhesion and surfaceexposed protéins of gliding bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3193-3199.
- STEINBERG C. and MUENSTER U. (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater, in *Humic substances in soil, sediment and water*, Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L. and McCarthy P. eds., John Wiley & sons, New York, p. 105-145.
- STEINER A.E., McLAREN D.A. and FORSTER C.F. (1976) The nature of activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **10**, 25-30.
- STENDAHL O., C. TAGESSON and M. EDEBO (1973) Partition of Salmonella typhimurium in a two polymer aqueous phase system in relation to liability to phagocytosis., *Infect. Immun.*, **8**, 36-41.
- STRIJJS J. STOLTENKAMP J. and Van De MEENT D. (1991) A spreadsheet-based model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant, *Wat. Res.*, **25**, 891-900.
- SUTHERLAND I.W. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides, *Biotech. Adv.*, **12**, 393-448.
- SWEET S.P., Mac FARLANE T.W. and SAMANARANAYAKE L.P. (1987) Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method., *FEMS Microbiol. Lett.*, **48**, 159-163.
- TAMBO N. and WANG X.C. (1993) The mechanism of pellet flocculation in a fluidized-bed operation, *J. Wat. SRT-Aqua.*, **42**, 67-76.
- TEWARI R., D.G. SMITH and R.J. ROWBURY (1985) Effect of Col V plasmids on the hydrophobicity of *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **29**, 245-249.
- THOMAZEAU R. (1983) Contribution à l'étude de l'écologie bactérienne des boues activées, thèse Dr es -Sciences, Université PARIS VII.
- TORRIJOS M., CERRO R-M., CAPDEVILLE B., ZEGHAL S., PAYRAUDEAU M. and LESOUEF A. (1994) Sequencing batch reactor a tool for wastewater characterization for the IAWPRC model, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 81-90.
- TSEZOS M. and BELL J.P. (1989) Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass, *Wat. Res.*, **23**, 561-568.
- TSEZOS M. and X. WANG (1991) Study on the kinetics of hazardous pollutants adsorption and desorption by biomass: mechanistic considerations, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 507-521.
- URBAIN V. (1992) Caractérisation physico-chimique des boues activées en relation avec leur propriété de décantation, Thèse Dr es-Sciences, Université NANCY I, 200 pages.
- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.
- VALIN S.D. and D.J. SUTHERLAND (1982) Predicting bioflocculation : new developments in the application of flocculation theory, *Environ. Technol. Lett.*, **3**, 363-374.
- VALLOM J.K. and A.J. McLOUGHLIN (1984) Lysis is a factor in sludge flocculation, *Wat. Res.*, **18**, 1523-1528.
- VAN LEUSSEN W. (1988) Aggregation of particles, settling velocity of mud flocs, in *Physical processes in estuaries*, J. Dronkers and W. van Leussen Eds, Berlin, pp. 347-403.
- Van der MEI H.C., A.H. WEERKAMP and H.J. BUSSCHER (1987) A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces, *J. Microbiol. Methods*, **6**, 277-287.
- Van LOOSDRECHT M.C.M., J. LYKLEMA, W. NORDE, G. SCHRAA and A.J.B. ZEHNDER (1987a) The role of bacteria cell wall hydrophobicity in adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1883-1897.
- Van LOOSDRECHT M.C.M., J. LYKLEMA, W. NORDE, G. SCHRAA and A.J.B. ZEHNDER (1987b) Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1898-1901.
- VANHAECKE E. and J. PIJCK (1988) Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1436-1439.
- VANHAECKE E., J.P. REMON, M. MOORS, F. RAES, D. de RUDDER and A. van PETEGHEM (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-l stainless steel : role of cell surface hydrophobicity, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 788-795.
- VEDRY B. (1987) L'analyse écologique des boues activées, SEGETEC, Lavoisier, Technique et Documentation, Paris, 120 pages.
- VERSTRAETE W. and E. van VAERENBERGH (1986) Aerobic activated sludge, in *Biotechnology*, vol. 8, Rehm H.J. and G. Reed Eds., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 43-112.

- WAGNER M., ERHART R., MANZ W., AMANN R., LEMMER H., WEDI D. and SCHLEIFER K. H. (1994) Development of an rRNA—targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 792—800.
- WAGNER M., R. AMANN, H. LEMMER and K.H. SCHLEIFER (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria : inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1520-1525.
- WANNER J. and GRAU P. (1989) Identification of filamentous microorganisms from activated sludge: a compromise between wishes, needs and possibilities, *Wat. Res.*, **23**, 883—891.
- WANNER J. (1994) Activated sludge bulking and foaming control, Technomic Publishing Company, Bâle, Suisse, 327 pages.
- WHITE M.D. and D. MARCUS (1988) Disintegration of microorganisms, *Adv. Biotechnol. Processes*, **8**, 51-96.
- WICKEN A.J. (1985) Bacterial cell walls and surfaces, in *Bacterial adhesion*, Savage and Fletcher eds., Plenum Publishing Corporation, New-York, pp. 45-70.
- WILLIAMS A.R., D.A. STAFFORD, A.G. CALLELY and D.E. HUGHES (1970) Ultrasonic dispersal of activated sludge flocs, *J. Appl. Bact.*, **33**, 656-663.
- WOESE C.R., WEISBURG W.G., HAHN C.M., PASTER B.J., ZABLEN L.B., LEWIS B.J., MACKE T.J., LUDWIG W. and STACKEBRANDT E. (1985) The phylogeny of purple bacteria : the gamma subdivision, *System. Appl. Microbiol.*, **6**, 25-33.
- WRANGSTADH M., P. L. CONWAY and S. KJELLEBERG (1989) The role of an extracellular polysaccharide produced by the marine *Pseudomonas* sp. S9 in cellular detachment during starvation, *Can. J. Microbiol.*, **35**, 309-312.
- ZARTARIAN F., VILLEMEN G., BOTTERO J.-Y., C. MUSTIN, THOMAS F., GRULOIS P. (1994) Spatial arrangement of the components of activated sludge flocs, *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 243-250.
- ZHANG Y. and MILLER R. M. (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2101—2106.

II : ORGANISATION DES AGREGATS DE BOUES ACTIVEES

II.1. Introduction générale.....	75
II.2. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs.....	76
II. 2.1. Introduction.....	76
II.2.2. Materials and methods	77
II.2.3. Results.....	79
II.2.4. Discussion	88
II.2.5. References.....	93
II.3. Effet de l'EDTA et des ultrasons sur l'extraction des polymères exo-cellulaires.....	95
II.3.1. Introduction.....	95
II.3.2. Matériel et méthodes	95
II.3.3. Résultats.....	97
II.3.4. Discussion	99
II.3.5. Conclusion.....	101
II.3.6. References.....	101
II.4. Conclusion générale.....	102

II.1. Introduction générale

Les floccs biologiques des systèmes d'épuration à boues activées sont constitués de cellules bactériennes, de particules minérales et de débris organiques noyés dans une matrice hydratée de polymères exo-cellulaires (Li et Ganczarczyk, 1986). C'est par sédimentation que ces agrégats sont séparés de la phase eau épurée. La qualité de cette séparation dépend des propriétés physiques du flocc elles-mêmes gouvernées par son organisation tridimensionnelle. Aussi la connaissance de la structure des floccs et de leur mécanismes de formation est essentielle à une bonne maîtrise du traitement des eaux usées.

L'étude de la structure et de la composition des floccs nécessite souvent une étape préalable de dispersion par les ultrasons qui facilite l'énumération des cellules bactériennes contenues dans ces agrégats (Banks and Walker, 1977 ; Hughes and Stafford, 1976 ; Williams *et al.*, 1970), permet l'extraction des polymères exo-cellulaires (Brown and Lester, 1980 ; Kiff and Thompson, 1979 ; King and Forster, 1990) ou autorise encore l'étude des propriétés de surface des micro-organismes des boues activées (Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1995). Cependant le choix des conditions optimales de dispersion des boues par ultrasons n'est pas résolu. En particulier, dans quelles conditions doit-on se placer pour obtenir à la fois une dispersion des agrégats et une extraction maximale des polymères sans lyse cellulaire et contamination du milieu par des polymères intracellulaires ? Comment évaluer correctement la lyse cellulaire sans utiliser les méthodes très critiquables de culture des bactéries viables (Parkinson et Coleman, 1991 ; Roszak et Colwell, 1987), ou le dosage de marqueurs intracellulaires (ADN, ARN...) déjà présents dans la matrice d'exopolymères du fait de la mort et de l'autolyse antérieure de quelques bactéries (Nishikawa and Kuryiama, 1968 ; Vallom and McLoughlin, 1984) ?

La première phase de cette étude a consisté à apporter des éléments de réponse à ces différentes questions et s'est orientée vers un triple objectif : (i) apprécier l'effet lytique des ultrasons et définir un protocole de dispersion des boues activées par sonication aussi peu dénaturant que possible, (ii) analyser les polymères relargués au cours de la phase de dispersion et (iii) étudier l'organisation spatiale des floccs. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans la revue *Water Research* (1995, vol. 29, p. 1639-1647).

La seconde phase de l'étude complète l'approche méthodologique concernant l'extraction des exopolymères en particulier en utilisant une combinaison des ultrasons et de l'EDTA. Elle a pour objet d'améliorer la récupération des exopolymères totaux et de différencier certaines classes chimiques des exopolymères.

II.2. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs

(F. JORAND¹, F. ZARTARIAN², F. THOMAS², J.C. BLOCK*¹, J.Y. BOTTERO², G. VILLEMIN³, V. URBAIN⁴ and J. MANEM⁴)

¹ Laboratoire Santé-Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, B.P. 403, 54001 Nancy Cedex, France. ² Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Ecole Nationale Supérieure de Géologie, C.N.R.S. U.A. 235, B.P.40, 54501 Vandoeuvre Cedex, France. ³ Centre de Pédologie Biologique, U.P.R. 6831, B.P. 5, 54501 Vandoeuvre Cedex, France. ⁴ C.I.R.S.E.E., Lyonnaise des Eaux-Dumez, 38, rue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France.

* Author to whom all correspondence should be addressed.

Abstract—This study describes the complexity of the activated sludge floc structure using four methods : (i) microscopic observation of flocs *in situ* and after specific staining, (ii) optimization of floc dispersion by sonication of pure bacterial strains, (iii) analysis of polymers released from sonicated sludges, and (iv) floc size distributions after different sonication times. The sonication of activated sludge at 37 W for 60 s was found to be best for dispersing flocs and minimizing bacterial cell lysis. The polymers released from flocs were mainly proteins, with polysaccharides and DNA. Electron microscopy showed that a polysaccharide gel connected the cells together. Raw activated sludges give a continuous distribution of particle sizes (1.2–600 µm). The floc size distribution in sonicated sludge samples was used to build a model of floc structure showing that the predominating macroflocs (125 µm) are formed from 13 µm microfloc aggregates, which are made up of smaller particles (2.5 µm).

Key words—activated sludge, granulometric analysis, transmission electronic microscope, exopolymers, sonication

II. 2.1. Introduction

Wastewater treatment by the activated sludge process is based on the growth of microbial populations, particularly bacteria, in flocculated form (known as biological floc). Activated sludge is a heterogeneous mixture of particles, microorganisms, colloids, organic polymers and cations (Forster, 1976; Li and Ganczarczyk, 1990), whose composition depends on the origin of the sample and the date of sampling (Eriksson and Härdin, 1984; Urbain *et al.*, 1993). The efficiency with which flocs are removed by settling out from the aqueous phase, depends directly on their size and density, and hence on their structure. The mineral floc size-density-structure relationship is important for optimizing phase separation in drinking water processing (Bottero *et al.*, 1990; Clark and Flora, 1991).

The settling capacity of the floc is of more recent interest in wastewater treatment (Li and Ganczarczyk, 1989, 1993) because of the greater complexity of the floc constituents and their chaotic structure. One of the most difficult problems is to analyze the chemical nature of the polymeric constituents in relation with their link with bacteria.

The floc structuring polymers can be analysed by dispersive methods, such as ultrasonic treatment, or by *in situ* observation using specific staining. Ultrasonic dispersion has been used for counting the number of bacterial cells in these aggregates (Banks and Walker, 1977; Hughes and Stafford, 1976; Williams *et al.*, 1970, 1971), to extract exocellular polymers (Brown and Lester,

1980; Kiff and Thompson, 1979; King and Forster, 1990) and to study the surface properties of activated sludge microorganisms (Urbain *et al.*, 1993; Jorand *et al.*, 1994). The major problem is contamination of the exocellular compartment by intracellular components (DNA, RNA, proteins, etc...) that are found their way into the polymer matrix following the death and autolysis of some bacteria (Nishikawa and Kuriyama, 1968; Vallom and McLoughlin, 1984).

This work examines the complexity of the activated sludge floc structure using four approaches : (i) microscopic observations of flocs *in situ* and after specific staining, (ii) optimization of dispersion by sonication using pure bacterial strains, (iii) analysis of polymer released from sonicated sludges, and (iv) floc size distributions after different sonication intensities.

II.2.2. Materials and methods

Sludge samples

The activated sludge samples were taken from the aeration tank at the Nancy metropolitan wastewater treatment plant (300,000 inhabitant equivalents ; organic loading 0.2–0.4 kg BOD₅ kg⁻¹ DSS, day; with primary settling), and transported to the laboratory in plastic containers. Experiments were conducted immediately after, or within a few days of sampling. Stored samples were kept in the dark at 5 ± 1°C. A 50 ml sludge sample was centrifuged for 5 min at 5700 g. Dry suspended solids (DSS) were measured by desiccating at 105°C and volatile suspended solids (VSS) were measured by calcinate at 550°C. The decantability of the sludge was assessed by measuring the Sludge Volume Index (SVI), without dilution, in a 1,000 ml graduated glass cylinder (APHA *et al.*, 1992).

Pure bacterial strains

Two bacterial strains (Hi and Ho) previously isolated from activated sludge (Jorand *et al.*, 1994) were tested for their sensitivity to ultrasound. Bacterial suspensions were obtained by growing the strains in stirred M-PCB medium (0751-01-0, Difco) for six days at 30°C in the dark. The cells were collected by centrifugation (20,000 g for 30 min), washed twice in deionized water and resuspended to give OD_{600nm} values of 2.7 for Hi and 1.7 for Ho *i.e.* around 10⁸ cells per ml. Each suspension was then sonicated.

Microscopic observation of flocs

A drop of sludge was placed between the slide and coverglass and observed at 100 X magnification under a light microscope (IM35, Zeiss). For transmission electron microscopy, 1 ml sludge (Nancy, urban wastewater treatment plant) was fixed in a blood collecting tube with 1 ml 2 % osmium tetroxide in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for one hour, thus creating connexions between the carbon-carbon double bonds. This preserved the sample in as near the original state as possible. Excess osmium tetroxide was removed with phosphate buffer. The flocs were then

dehydrated in an acetone series (5 min at 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 15 min at 80 %, 2 x 15 min at 95 %, and 3 x 20 min at 100 %). And embedded in Epon 812 (E006, Josédelville Technology) in three stages. First, 1/3 of the acetone was replaced by the same volume of resin; then, 2/3 of the resulting mixing liquor was replaced by resin. The sample was placed in a vacuum for four hours after each change. Finally, all the supernatant was replaced by resin. The flocs remained in pure resin for 12 hours under atmospheric pressure. The well impregnated flocs were sampled by pipette with a wide opening and transferred to a mould filled with resin. Polymerization was carried out for 12 hours at 60°C.

The resin-fixed flocs were cut into sections (0.1 µm) on an ultra-microtome (Reichert OM U2) and placed on copper grids (300 mesh size) for staining. Copper grid sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (Gerhardt *et al.*, 1981) and examined in a transmission electron microscope (Zeiss E.M.95, 60 kV).

Sonication of sludge and pure strains

50 ml sludge or suspensions of pure strains were dispersed with an ultrasound generator (Labsonic 2000U, standard 19 mm diameter probe) in 85 ml round-bottomed tubes (Nalgene®, Oak Ridge type) 38 mm diameter, using 37 W (power output) for 15–420 seconds. The tube containing the sample was kept in crushed ice for 15 minutes before and throughout treatment. The probe was immersed 15 mm into the liquid. The temperature recorded during treatment was 5°C after 30 s, and 39°C after 360 s.

Counting of pure strains by epifluorescence (DAPI method)

A 20 ml sample cell of sonicated suspension was mixed with 3.2 ml 37 % formaldehyde (W/V) (Prolabo, 20880.290), filtered through a 0.2 µm Millex filter (Millipore, SLGS025BS) and then kept for 48 h at 4°C. The bacteria were stained with DAPI solution (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate, Sigma, D9542) according to Lebaron *et al.* (1994) and counted .

Supernatant absorbance and settled volume of sonicated sludge

The turbidity of the supernatant and the sludge volume were measured after settling 10 ml of the sonicated sample for 90 minutes in graduated conical 10 ml tubes. The volume taken up by the sludge was read directly on the tube after 90 minutes settling and was expressed in ml g⁻¹ of DSS. 3 ml of the supernatant were also delicately sampled by automatic pipette; it was diluted with deionized water and its absorbance was measured at 600 nm in a 1 cm cell. Absorbance was expressed as OD_{600nm} per mg DSS.

Analysis of polymers

A 25 ml of sonicated sludge or 25 ml of pure bacterial strain suspension was centrifuged at 20,000 g for 30 minutes (Beckman J2 centrifuge, JA 14 rotor). The supernatant was kept in sterile

tubes at - 25°C until assayed. Polysaccharides were assayed by the method of Dubois *et al.* (1956). Deoxyribonucleic acid (DNA) in the mixture of exopolymers extracted from sludge was assayed by the method of Deriaz *et al.* (1949). Proteins were assayed by the method of Lowry *et al.* (1951) using the Sigma Diagnostics® procedure (no. P 5656).

The ultra-microtome floc slices were stained for exocellular polysaccharides. Samples on gold grid were stained with Thiery's silver proteinate staining method (Thiery, 1967) to reveal $\alpha(1-4)$ and $\beta(1-4)$ linkages in polysaccharide chains. The stained flocs were examined in a transmission electron microscope (Zeiss E.M.95, 60 kV).

Granulometric distribution

The granulometric distribution was measured with a Malvern Mastersizer laser beam diffraction granulometer, over a 1.2–600 μm size range. Any particles smaller than 1.2 μm were ignored. Each particle population was quantified by deconvoluting the granulometric distribution curves into log-normal distributions (Villiéras *et al.*, 1992), with a median (peak) and standard deviation (σ) (Figure 1). The area of each log-normal distribution represents the proportion of the total volume taken up by particles of this distribution.

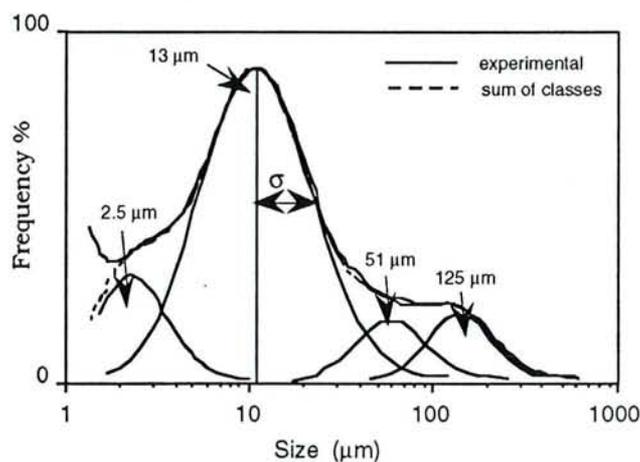


Fig. 1. Frequency (in percentage of total particle volume) as a function of apparent diameter after deconvolution of the granulometric distribution of sludge after sonication. In this example, the sludge was sonicated at 37 W for 60 seconds. The figure shows sigma (σ) and four classes of particles.

II.2.3. Results

Microscopy of activated sludge flocs

The activated sludge flocs were of different sizes with highly irregular boundaries and contained protozoa (*Epistylis* sp., *Vorticella* spp.) and filamentous bacteria (Figure 2). A transmission electron micrograph (Figure 3) showed the many components of the floc, by the different grey contrasts. There were many colourless voids, irregular boundaries with ill-defined. The size of the components ranged from single bacteria to undefined waste (10 μm diam). Such waste varied greatly and was

organic as well as inorganic particles coming from the influent (animal tissue, parietal residues, humic substances, clay).

Figure 3 also shows a small clump of microbial cells (6 μm in size). At a higher magnification (Figure 4), this aggregate had clear, rough boundaries, and appeared to be an encapsulated unit filled with microorganisms, with similar morphological characteristics and polymers. Some cells appeared to be dividing.

Dispersion and lysis of bacterial suspensions by sonication

The resistance to ultrasound of two bacterial strains (Hi and Ho), isolated from activated sludge, was tested to overcome the difficulty of differentiating between polymers produced by cell lysis and those extracted from the exocellular compartment. The Gram negative Hi strain had hydrophilic surface properties, while the Gram positive Ho strain had a strongly hydrophobic surface (Jorand *et al.*, 1994). The resistance to ultrasound of the two strains was estimated (Figure 5) by direct counting of suspended cells and by assaying the polymers extracted by sonication. The numbers of bacterial cells in the two strains were reduced with increased sonication time, showing cell lysis. The Hi cell population fell within the first few seconds of sonication, and 50 % were lysed within 120 seconds (Figure 5a). By contrast, the number of Ho bacteria rose during the first few seconds of sonication (Figure 5b), undoubtedly due to dispersion of aggregates. Ultrasound thus had to be used for longer than 60 seconds for cell lysis.

These observations were confirmed by assaying polymers released during sonication. Significant amounts of DNA were released by the Hi strain after 30 seconds of treatment (Figure 5a). The Ho strain released no detectable DNA into the liquid phase during the first 90 seconds of sonication (Figure 5b). All the DNA assayed after 360 seconds sonication was from cell lysis; both Hi and Ho bacteria contained around 15 fg DNA per cell.

By contrast, the other two types of polymers (polysaccharides and, particularly, proteins) were released within the first few seconds of treatment, showing the fragility of cell walls and the inadequacy of assaying these polymers as markers of cell lysis. The quantity of protein salted out by the hydrophobic Gram positive strain (55 mg g^{-1} DSS after 120 seconds sonication) was also lower than that from the hydrophilic Gram negative strain (230 mg g^{-1} DSS) (Figure 5).

The two bacterial cell populations tested thus reacted differently to ultrasound. Bacterial counts indicated that the Ho strain resisted lysis for up to 60 seconds of sonication, but rapidly released large amounts of salted out proteins. The Hi population was much more fragile, and significant lysis had occurred after 15 seconds of sonication. Thus, cell lysis can only be assessed by direct counting of cells or by DNA assays of unflocculated and sparsely flocculated bacterial suspensions. In addition, under our experimental conditions (37 W / 50 ml and 19 mm probe) 60 seconds sonication seemed to be the maximum time to minimize cell lysis.

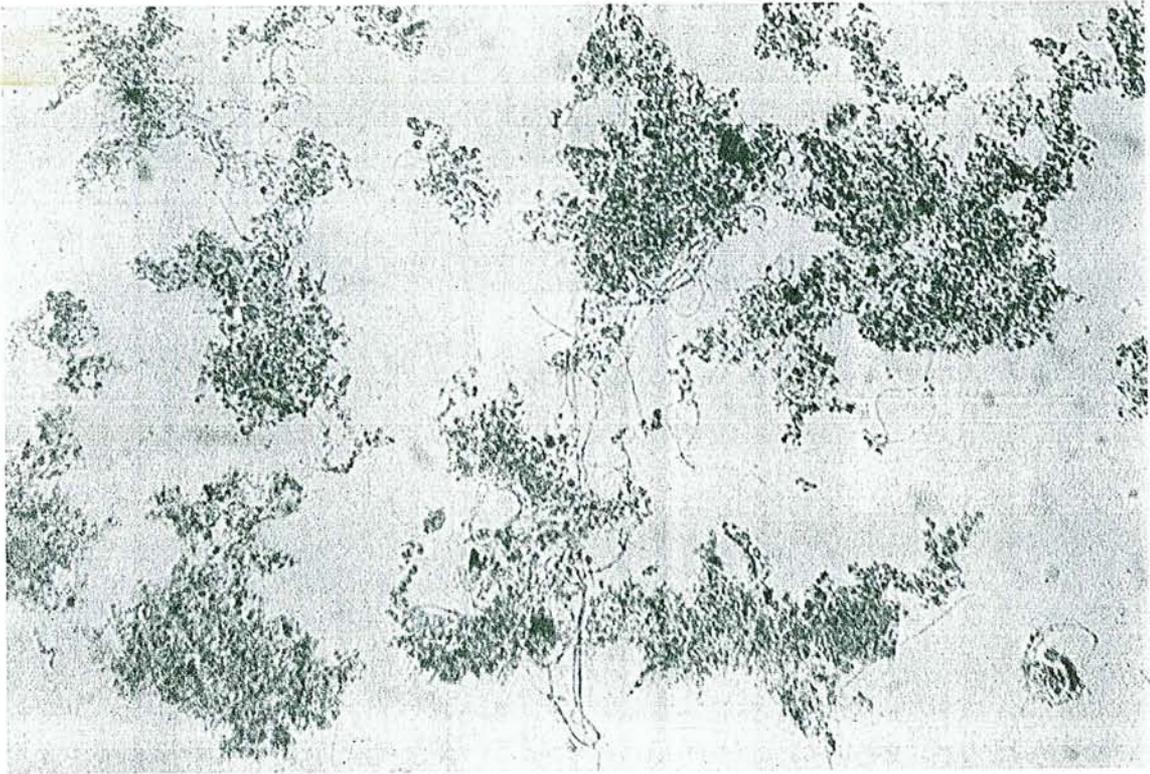


Fig. 2. Photograph (X100) of activated sludge no 6 showing macroaggregates.

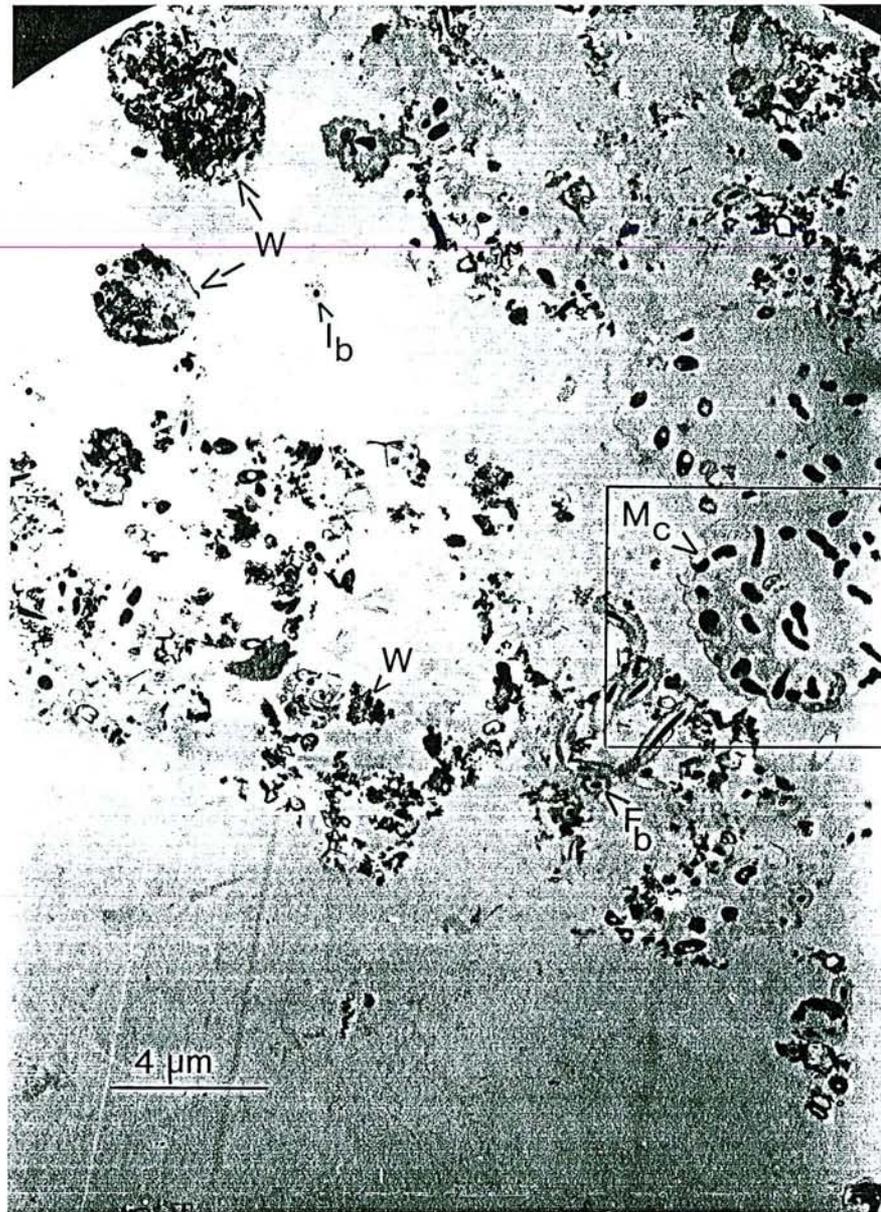


Fig. 3. Transmission electron micrograph of a section (0.1 μm) of an activated sludge floc (100 μm). Ib, isolated bacteria; Fb, filamentous bacteria; Mc, microcolony; W, waste.



Fig. 4. Transmission electron micrograph of a microcolony. B, bacteria; Bd, dividing bacteria; Fb, filamentous bacteria; Ps, polysaccharides.

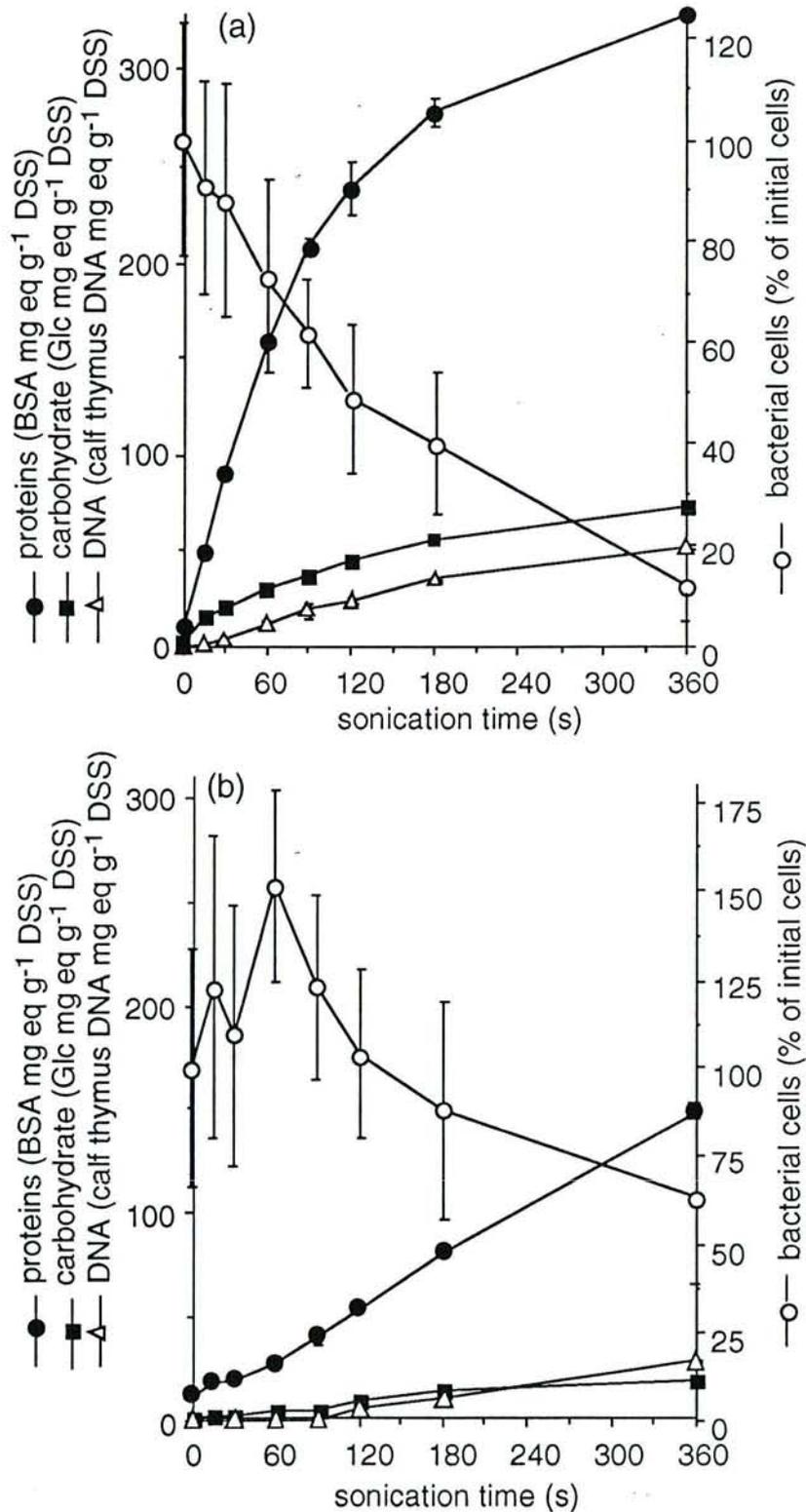


Fig. 5. Change in cell number and polymers released (protein, carbohydrates and DNA) as a function of sonication time for (a) Gram negative hydrophilic strain Hi (initial density is $3.9 \cdot 10^9 \pm 0.9 \cdot 10^9$ cells ml⁻¹) and for (b) Gram positive hydrophobic strain Ho (initial density is $1.6 \cdot 10^9 \pm 0.5 \cdot 10^9$ cells ml⁻¹). \bar{I} = standard deviation calculated from triplicates for the chemical analysis and from 30 microscopic fields for cell counts.

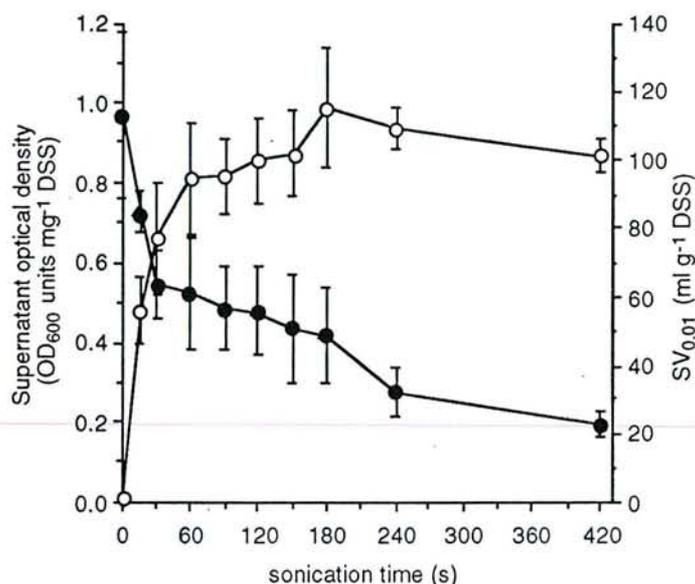


Fig. 6. Effect of sonication time on sludge volume ($SV_{0.01}$) and supernatant optical density (OD_{600}) after 90 min settling. ●, $SV_{0.01}$; ○, OD_{600} . I = standard deviation for six sludge samples (nos 1–6) for OD measurements and for four sludge samples for $SV_{0.01}$ measurements (nos 1 – 4).

Activated sludge dispersion by sonication and analysis of polymers released

The amount of dry suspended solids (DSS) in the six activated sludge samples used varied from 2.72 to 5.25 g DSS l⁻¹ (Table 1), but the proportion of volatile suspended substances (VSS, mainly organic matter) remained almost constant (mean $74.5 \pm 1.7\%$). The settleability of these sludges, estimated by the sludge volume index (SVI), ranged from 137 to 294 ml g⁻¹.

Table 1. Characteristics of the sludge samples (SVI : Sludge Volume Index, DSS : Dry Suspended Solids, VSS : Volatil Suspended Solids).

Sample	Wastewater origin	DSS (g l ⁻¹)	VSS (% of DSS)	SVI (ml g ⁻¹)
1	municipal	4.45±0.03	74.9±0.2	207
2	municipal	3.67±0.03	72.4±0.2	137
3	municipal	4.18±0.06	72.9±0.2	215
4	brewery	2.72±0.02	74.0±0.1	294
5	municipal	4.03±0.02	76.8±0.2	221
6	municipal	5.25±0.02	75.8±0.1	179

Sonication both reduced the sludge volume obtained after settling for 90 minutes in 10 ml tubes ($SV_{0.01}$ ml g⁻¹ DSS) and increased the absorbance (OD_{600nm} mg⁻¹ DSS) of the supernatant liquid (Figure 6). The reduction in the amount of volatile substances in the centrifuged sludge residues after sonication (Figure 7) supported the observation of floc dispersion and substance loss in the supernatant liquid. Similarly, the concentration of polysaccharides, proteins and DNA in the supernatant rose (Figure 7) with the sonication time.

The changes in OD_{600nm} and $SV_{0.01}$ during sonication were not constant, but showed several phases (Figure 6), with large changes from 0 to 30 seconds, a pseudo levelling-off from 60 to 150 seconds for OD_{600nm} and from 30 to 180 seconds for $SV_{0.01}$, a reduction in OD_{600nm} and $SV_{0.01}$ after 180 seconds. The OD_{600nm} peaked (approximately 1 unit g^{-1} DSS) at 180 seconds sonication. These phases suggest the sequential destructuring of floc, with a rapid initial phase and a much slower later one. Such dual-phase kinetics were also suggested in the salting out of polymers (Figure 7) with significant, almost systematic discontinuity at 150 seconds. The tests on pure strains and the minimal cell lysis in activated sludge after 60 seconds sonication, indicate that exopolymers are easily extracted from the aqueous phase by sonication of the flocs. They are a complex mixture of proteins, sugars and DNA that are excreted and/or salted out of the flocs during ageing of the sludge. Proteins were the most abundant exopolymers ($43 mg g^{-1}$) in our samples, while the amounts of carbohydrates ($13 mg g^{-1}$) and DNA were similar ($14 mg g^{-1}$). A polysaccharide gel linked cells together (Figure 8), as shown by the black spots indicating low density. As Thiery's stain only reveals polysaccharide chains with α (1-4) and β (1-4) linkages, the voids may be filled with other unstained polymers.

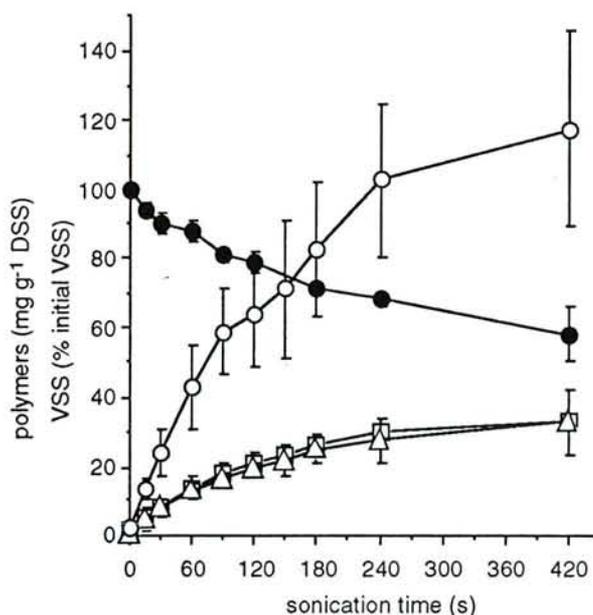


Fig. 7. Changes in polymers in the high speed centrifugation supernatant and of volatile suspended solids of sludge (VSS) as a function of sonication time. \square , DNA (mg calf thymus DNA equivalents g^{-1} DSS of sludge); \triangle , carbohydrates (Glc mg equivalents g^{-1} DSS of sludge); \circ , proteins (BSA mg equivalents g^{-1} DSS of sludge); \bullet , VSS (% of sludge VSS before sonication). I = standard deviation for six sludge samples (nos 1-6).



Fig. 8. Transmission electron micrograph. Polysaccharide gel stained with silver proteinate. B, bacteria; Ps, polysaccharides.

Granulometric analysis of activated sludge

The particle size distribution in sludge no. 5 was determined before and after each sonication phase (Figure 9). The untreated sample (raw sludge) had an asymmetric continuous binomial distribution (biased to the left) for particles whose apparent diameter was 1.2–600 μm (the widest window analyzed) (Figure 9). Approximately 44 % of the population in raw sludge was 68.3–183 μm . Four sizes, characterized by the mean representative diameter of half the population (d_{50}), were identified (Figure 9): 2.5 μm , 13 μm , 51 μm and 125 μm . 30 seconds sonication at 37 W immediately dispersed the 125 and 51 μm particles and produced a population dominated by 13 μm particles. 2.5 μm particles and those smaller than 1.2 μm were also seen after 30 seconds sonication (Figure 9).

The changes in each size category during sonication (Figure 10) were analysed by deconvoluting the granulometric distributions in Figure 9. There were very rapid decreases in the relative areas of the log-normal distributions of 125 and 51 μm particles from the onset of sonication, with a relatively significant increase in the 13 and 2.5 μm particles (Figure 10a). The system change little during 30 to 90-120 seconds sonication. By contrast, beyond 90-120 seconds, there was a reduction in the 13 μm population, accompanied by a further increase in the 2.5 and 125 μm populations (Figure 10a). The relative stability in the populations of the other particle sizes between 30 and 90 seconds paralleled the small changes in absorbance and $SV_{0.01}$ during the same sonication phases.

Thus ultrasound had a continuous effect on floc disintegration, shown by the sagging and widening of the part of the curve for particles above 13 μm diameter. This widening of the 13 μm size is well indicated by the changes in the sigma value (σ) for all four particle sizes (Figure 10b) as a function of the sonication time. The only significant change in sigma (from 0.16 to 0.35) occurred for 13 μm particles between 0 and 90 seconds (Figure 10b). The log normal distribution curve for the 13 μm particles widened, with increased sonication time (sigma value increased, and the symmetry axis for the log normal distribution curve showed little or no change). Hence, ultrasound broke down the 13 μm particles by erosion (although not sufficiently to grade them as 2.5 μm , the next size down). The 13 μm population increased by larger particles being formed by disintegration of even larger ones (*i.e.* 125–51 μm).

II.2.4. Discussion

Some physico-chemical properties of sludge flocs (size, area, density, shape, water content, porosity, hydrophobicity of cell surface, type and quantity of exopolymers) are directly or indirectly related to the decantation properties of activated sludge (Valin and Sutherland, 1982; Forster, 1985; Li and Ganczarczyk, 1986; Sheintuch *et al.*, 1986; Eriksson and Alm, 1991; Urbain *et al.*, 1993). As the separation of water from biomass is a decisive stage in the activated sludge process, these characteristics must be known in order to determine the relationships between the operation of wastewater treatment plant and the performance of secondary settling.

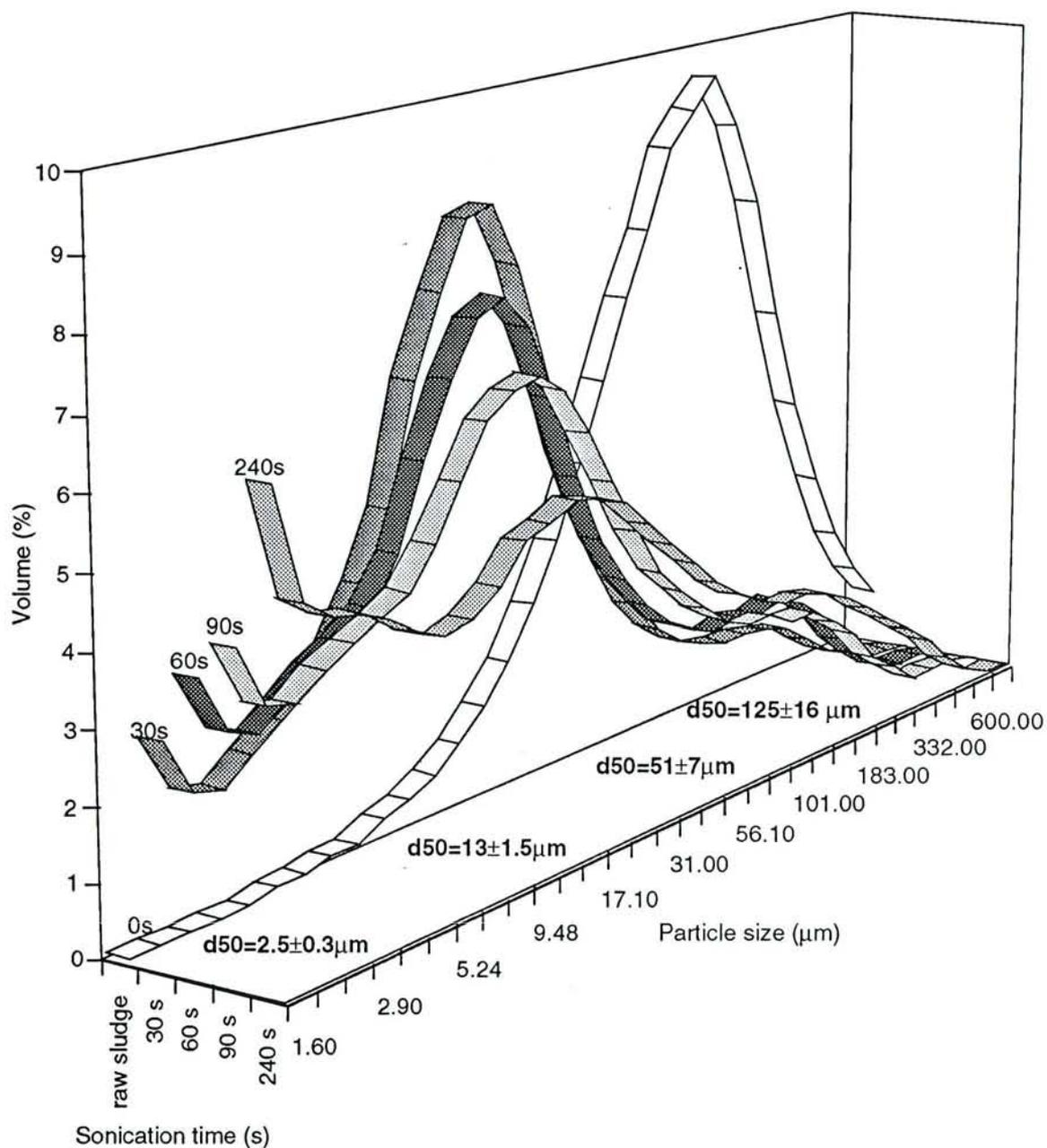


Fig. 9. Particle size distribution by volume of sludge no 5 after different sonication times. The apparent median diameter (d50 in µm) of the four dominant classes of particles are indicated in bold.

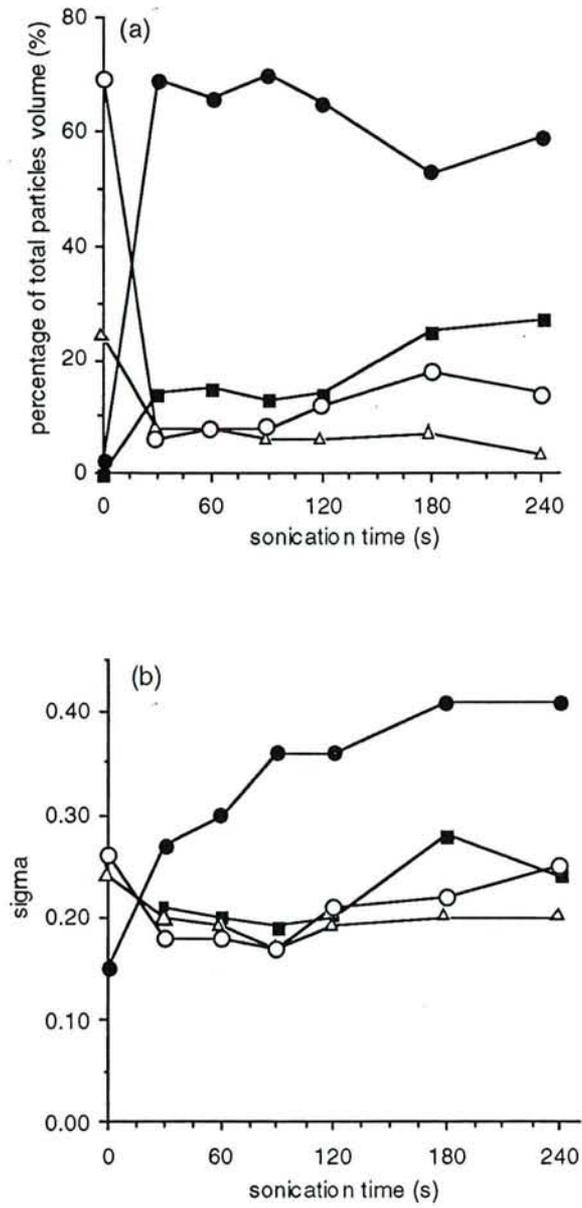


Fig. 10. (a) Relative surface areas of the particle classes and (b) Values of sigma of each particle class from sludge no 5 as a function of sonication time. ○, class 125 μm; △, class 51 μm; ●, class 13 μm and ■, class 2.5 μm.

Optimization of component separation by sonication

The composition and organization of aggregated biological systems (biofilms, activated sludges, sediments) are often more accessible if the sample has been dispersed. Physical methods, like sonication, do not contaminate the sample with chemical reagents, and are good ways of dispersing bacterial aggregates, provided excessive energy, which could lyse the cells and contaminate the sample with intracellular polymers, is not used (Doulah, 1977; Banks and Walker, 1977; White and Marcus, 1988; Williams *et al.*, 1970, 1971). The highly aggregated structure of activated sludge (limiting the efficiency of direct cell counting) and the large amounts of nucleic acid in the extracellular compartment (preventing the use of DNA assays as cell lysis markers) make it impossible to calibrate the ultrasound apparatus to define optimum sonication conditions. Only slightly or non flocculant bacterial strains can be used in laboratory culture.

However, care must be taken when extrapolating the sensitivity of laboratory cultured bacterial suspensions to ultrasound, to activated sludge, as the bacterial cells in activated sludge are probably less sensitive to ultrasound (Doulah, 1977) due to their small size (Urbain *et al.*, 1993) and the presence of aggregates which absorb ultrasound radiation. The conditions defined in our tests (60 s, 37 W, probe 19 mm in diameter, 50 ml sample volume) are thus probably acceptable in terms of cell lysis. However, it cannot be affirmed all cells remain fully intact.

Although, most of the particles in activated sludge mixtures are smaller than 5 μm (Parker *et al.*, 1971; King and Forster, 1990; Li and Ganczarzyk, 1991), we have observed, like Li and Ganczarzyk (1991), that the flocs of 68 to 183 μm take up the greatest volume. These flocs are relatively resistant, as stirring one litre of sludge in a beaker, fitted with baffles, with a flat blade stirrer at 800 rpm has virtually no immediate effect on size distribution (data not shown). The average arithmetic floc diameter dropped from 166 μm to 55 μm only after one hour, at the same stirring speed, and to 1 μm after three hours (Li and Ganczarzyk, 1986). By contrast, even short applications of ultrasound (30 seconds at 37 W) destroy more than 80 % of the 125 and 51 μm flocs, reduce apparent sludge volume, salt out polymers and form small flocs with a mean diameter of 13 μm . These can also be directly observed under the electron microscope in ultrafine macrofloc sections. Sonication for longer than 30 seconds produces a slow erosion of the particularly resistant 13 μm category, which could be microcolonies as suggested by Li and Ganczarzyk (1990), Eriksson and Alm (1991). Total ultrasound dispersion of microaggregates without risk of lysis is improbable as these particles still account for 60 % of the total volume of particles even after 240 seconds sonication at 37 W, which the studies with pure strains indicate may produced significant cell damage.

Structural relationship

Li and Ganczarzyk (1989, 1990) state that is unrealistic to assume that the floc structure is uniform. The heterogeneous nature of the components and their random dispersion is clearly shown by the electron microscope data shown in Figure 11. Li and Ganczarzyk (1989) used the concept of

fractal geometry to describe floc arrangements and used this mathematical tool to obtain one dimension for the whole of the floc. Different aggregation mechanisms could be distinguished at different scales: aggregation inside the floc, between microcolonies and the rest of the floc, and aggregation between flocs. This last mechanism can be related to the nature of different sludges produced in different conditions. It also involved exopolymers that bridge cells. They are easily shown by staining floc sections.

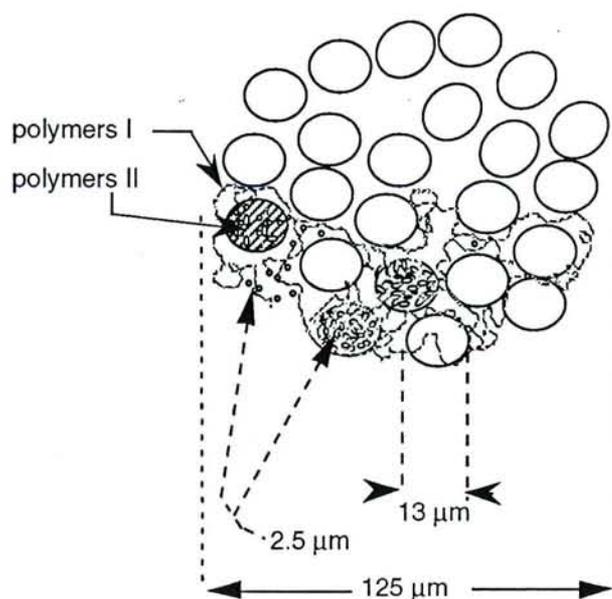


Fig. 11. Model (water gaps and filamentous bacteria are not shown on this model) of activated sludge floc (not to scale).

The polymers salted out from flocs during sonication are of several chemical groups: proteins, nucleic acids, carbohydrates (proteins predominated in our studies), lipids (Goodwin and Forster, 1985), humic acids (Eriksson and Alm, 1991) glycoproteins (Goodwin and Forster, 1985; Horan and Eccles, 1986; King and Forster, 1990). Some of these polymers are produced by the lysis of dead cells. Chemical analysis of such mixtures, where heteropolymers undoubtedly predominate, is difficult and insufficient. As several authors have clearly pointed out, the characteristics of this intercellular cement are sometimes better described by measuring molecular weight (Forster, 1985), the attachment force to the floc (Eriksson and Alm, 1991; King and Forster, 1990) and hydrophobic properties (Frølund *et al.*, 1994).

Only the polymers linking 13 μm subunits to each other were extracted by 30 seconds sonication (type I polymers) under our experimental conditions. They contain a mixture of approximately 100 mg per gram of dry matter, similar to values reported for a extraction method such as EDTA, heating and alkaline pH (Horan and Eccles, 1986; Sheintuch *et al.*, 1986; King and Forster, 1990; Eriksson and Alm, 1991).

We have suggested a model for floc structure (Figure 11) that is similar to the one proposed by Eriksson *et al.* (1992). The model has three structural levels microflocs, which are primary particles 2.5 μm in size, secondary particles (13 μm) linked together by exopolymers and forming tertiary structures having a mean diameter of 125 μm : these are sensitive to the shearing forces produced by ultrasound. The simultaneous appearance of 2.5 and 13 μm particles from the start of sonication suggests that some of the 2.5 μm particles lie between the 13 μm microflocs. Type I polymers may link 13 μm particles together and also link isolated 2.5 μm particles. The nature of the polymers, called type II, linking the microorganisms inside the 2.5 and 13 μm particles still has to be determined. However, electron microscopy indicates that the gel linking the cells together is a polysaccharide.

The heterogeneity demonstrated here suggests that the relationship between the size, density and settling velocity of activated sludge flocs is important. The aggregates cannot be considered as dense particles and Stoke's law cannot be used, *in extenso*, to describe the settling velocity.

Acknowledgements—This research was funded by the Société Lyonnaise des Eaux-Dumez and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

II.2.5. References

- APHA (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 18th edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, D.C.
- Banks C. J. and Walker I. (1977) Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 363–368.
- Bottero J. Y., Tchoubar D., Axelos M. A., Quienne P. and Fiessinger F. (1990) Flocculation of silica colloids with hydroxy aluminium polycations. Relation between floc structure and aggregation mechanisms. *Langmuir* **6**, 596–602.
- Brown M. J. and Lester J. N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 179–185.
- Clark M. M. and Flora J. R. V., (1991) Floc restructuring in varied turbulent mixing. *J. Colloids Surf.* **147**, 407–421.
- Deriaz R.E., Stacey M., Teece E.G. and Wiggins L.F. (1949) Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses. *J. Chem. Soc.* **14**, 1222–1232.
- Doulah M.S. (1977) Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 649–660.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* **5**, 271–278.
- Eriksson L. and Härden A.M. (1984) Settling properties of activated sludge related to floc structure. *Wat. Sci. Tech.* **16**, 55–68.
- Eriksson L. and Alm B. (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. *Wat. Sci. Tech.* **24**, 21–28.
- Eriksson L., Steen I. and Tendaj M. (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Wat. Sci. Tech.* **25**, 251–265.
- Forster C.F. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process. *Wat. S.A.* **2**, 119–125.
- Forster C.F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-I : nutrients and surface polymers. *Wat. Res.* **19**, 1259–1264.
- Frølund B. and Keiding K. (1994) Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 708–716.
- Gerhardt P., Murray R.G., Costilow R.N., Nester E.W., Kierg N.R., Philips G.B. (1981) *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology.

- Goodwin J.A.S. and Forster C.F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.* **19**, 527-533.
- Horan N.J. and Eccles C.R. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Wat. Res.* **20**, 1427-1432.
- Hughes D.E. and Stafford D.A. (1976) The microbiology of the activated-sludge process. *Critical Rev. Environ. Control.* **7**, 233-257.
- Jorand F., Guicherd P., Urbain V., Manem J. and Block J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria. *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 211-218.
- Kiff R.J. and Thompson R.T. (1979) Physical methods for the extraction of bacterial exopolymers from activated sludge biomass. *Biotechnol. Lett.* **1**, 183-186.
- King R.O. and Forster C.F. (1990) Effects of sonication on activated sludge. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 109-115.
- Lebaron P., Trousselier M. and Got P. (1994) Accuracy and precision of epifluorescence microscopy for direct estimates of bacterial numbers. *J. Microbiol. Methods.* **19**, 89-94.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. (1986) Physical characteristics of activated sludge flocs. *Critical Rev. Environ. Control* **17**, 53-87.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. (1989) Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 1385-1389.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. (1990) Structure of activated sludge flocs. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 57-65.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. (1991) Size distribution of activated sludge flocs. *J. Water. Pollut. Control Fed.* **63**, 806-814.
- Li D.H. and Ganczarczyk J.J. (1993) Factors affecting dispersion of activated sludge flocs. *Water Environ. Res.*, **65**, 258-263.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Nishikawa S. and Kuriyama M. (1968) Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge. *Wat. Res.* **2**, 811-812.
- Parker D.S., Kaufman W.J. and Jenkins D. (1971) Physical conditioning of activated sludge floc. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **43**, 1817-1833.
- Sheintuch M., Lev O., Einav P. and Rubin E. (1986) Role of exocellular polymer in the design of activated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1564-1576.
- Thiery J.P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupe fine en microscopie électronique. *J. Microscopie* **6**, 987-1018.
- Urbain V., Manem J. and Block J.C. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Wat. Res.* **27**, 829-838.
- Valin S.D. and Sutherland D.J. (1982) Predicting bioflocculation : new developments in the application of flocculation theory. *Environ. Technol. Lett.* **3**, 363-374.
- Vallom J.K. and McLoughlin A.J. (1984) Lysis as a factor in sludge flocculation. *Water Res.* **18**, 1523-1528.
- Villieras F., Cases J.M., François M., Michot L.J. and Thomas F. (1992) Texture and surface energetic heterogeneity of solids from modeling of low pressure gas adsorption isotherms. *Langmuir* **8**, 1789-1795.
- White M.D. and Marcus D. (1988) Disintegration of microorganisms in *Downstream Processes Equipment and Techniques*, Mizrahi A. (eds), pp. 51-96, Alan R. Liss Inc., New York.
- Williams A.R., Stafford D.A., Callely A.G. and Hughes D.E. (1970) Ultrasonic dispersal of activated sludge flocs. *J. Appl. Bact.* **33**, 656-663.
- Williams A.R., Forster C.F. and Hughes D.E. (1971) Using an ultrasonic technique in the enumeration of activated sludge bacteria. *Effluent Wat. Treat. J.* **11**, 83-86.

II.3. Effet de l'EDTA et des ultrasons sur l'extraction des polymères exo-cellulaires.

II.3.1. Introduction

L'étude de l'organisation des floccs de boues activées impose une dispersion préalable des agrégats afin d'en analyser les différents constituants et notamment les polymères exo-cellulaires (PEC) relargués. Cependant on peut reconnaître que les quantités de polymères ainsi dosées sont systématiquement sous estimées et cela pour deux raisons principales: d'une part les microflocs résistent relativement bien aux ultrasons, une partie de la matrice de polymères qui les compose échappe donc à l'analyse (Jorand *et al.*, 1995). D'autre part une fraction de la suspension plus ou moins dispersée floccule rapidement dès l'arrêt de la sonication (Hall, 1981 ; Zartarian *et al.*, 1994). L'EDTA, puissant chélatant des cations pourrait limiter ces problèmes. Hall (1981) montre en effet que la refloculation est négligeable en présence d'EDTA (2,5 mM). Ce chélatant est par ailleurs fréquemment utilisé dans des protocoles d'extraction des PEC (*e.g.* Nishikawa et Kuryiama, 1968 ; Eriksson et Alm, 1991) tout comme les résines Dowex échangeuses de cations (Rudd *et al.*, 1983 , Frølund *et al.*, 1994, 1995). Les cations divalents sont présents en relativement grande quantité dans les polymères exo-cellulaires des boues activées : 2 à 50 mg L⁻¹ (Urbain *et al.*, 1993) et participent à la cohésion des floccs en se liant aux charges négatives des PEC (Eriksson et Alm, 1991 ; Bruus *et al.*, 1992). Aussi, leur piégeage entraîne obligatoirement une déstructuration du flocc et un relargage de PEC anioniques dont on peut penser *a priori* que les exopolysaccharides uroniques, les protéines, les acides nucléiques en seront les principaux représentants. L'EDTA pourrait ainsi permettre l'extraction des polymères exo-cellulaires qui échappent aux ultrasons. En d'autres termes, l'extraction des PEC à l'aide de l'EDTA, combiné à l'action des ultrasons, devrait permettre de récupérer de plus grandes quantités de PEC. Afin de comparer l'efficacité de l'extraction des PEC par l'EDTA ou par les ultrasons, les quantités et la nature des polymères exo-cellulaires extraits des boues activées par application de différents temps de sonication (60 et 120 s) en présence ou en absence d'EDTA sont comparées.

II.3.2. Matériel et méthodes

II.3.2.1. Échantillons

Les boues activées sont prélevées à la station d'épuration de Maxéville. Elles sont stockées à $+4 \pm 1^\circ\text{C}$ dans des récipients en polycarbonate 30 min après leur prélèvements et sont utilisées 24 h au plus après leur stockage.

Trois types de boues sont prélevés : des boues de la filière urbaine, des boues de la filière industrielle (alimentées par un mélange de 75% d'effluents de brasserie et 25% d'effluents urbains) et des boues d'un réacteur de taille industrielle (9 m³) alimenté directement soit par les effluents de la

filière urbaine après décantation primaire soit par les eaux usées dégrillées (0,5 mm).

La capacité de décantation des boues est caractérisée par l'indice de Molhman (SVI, mL g⁻¹) et par les teneurs en matières sèches et en matières volatiles en suspension (MES et MVS) qui sont déterminées par dessiccation (105°C) et par calcination (550°C) de culots de boues centrifugées (5700 g, 5 min).

II.3.2.2. Extraction des polymères exo-cellulaires

Les boues sont centrifugées à faible accélération (5700 g, 5 min) et le surnageant est remplacé par un volume identique d'eau ultra-pure (qualité MilliQ/MilliRO, Millipore) ou d'une solution d'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique, Prolabo, 20 302.180) à 2,5 mM préparée dans une solution tampon TRIS/HCl (pH ajusté à 7,1) selon Kamoun (1974). Les exo-polymères sont alors extraits des boues selon trois méthodes différentes. Dans tous les cas la fin du traitement consiste à les séparer des matières en suspension par centrifugation haute vitesse (20 000 g pendant 40 min). Les surnageants contenant les exo-polymères sont conservés à - 18°C jusqu'à leur utilisation (une semaine à plusieurs mois).

Extraction par les ultrasons

Les exo-polymères sont extraits des boues par un traitement aux ultrasons selon la procédure décrite par Jorand *et al.* (1995). Lors de la sonication, le régulateur de puissance de l'appareil générateur d'ondes ultrasonores est réglé sur la position 100 correspondant à une puissance de 37 W après calibration de l'appareil selon la méthode de North (1976).

Extraction par l'EDTA

Après centrifugation à faible accélération (5700 g, 5 min) et élimination du surnageant, les boues sont repris dans 50 mL de solution d'EDTA et laissés en contact pendant 15 min après homogénéisation rapide de 5 s (agitateur vortex) puis l'échantillon est centrifugé à 20 000 g pendant 30 min, le surnageant, contenant les exo-polymères est récupéré.

Extraction par les ultrasons et l'EDTA

La procédure d'extraction par l'EDTA est d'abord réalisée ; ensuite la boue est traitée par les ultrasons avant d'être centrifugée.

II.3.2.3. Caractérisation chimique des exo-polymères

L'extrait d'exo-polymères (surnageant de centrifugation 20 000 g) est caractérisé par la demande chimique en oxygène (DCO), le contenu en protéines, en polysaccharides, en acides

uroniques et en ADN.

La demande chimique en oxygène est déterminée par oxydation au dichromate de potassium selon la procédure Merck (Spectroquant®, 14540).

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Sigma Diagnostics (procédure n°P5656). Cette méthode permet d'éviter les interférences de l'EDTA sur la réaction de complexation du cuivre. Les teneurs en protéines sont exprimées en mg équivalent sérum albumine bovine (Sigma, A-7906).

Les polysaccharides sont dosés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) et exprimé en mg équivalent glucose.

L'ADN est dosé par réaction à la diphénylamine selon la réaction de Dische (1930, cité par Deriaz *et al.*, 1949) et est exprimé en mg équivalent ADN de thymus de veau.

Les acides uroniques sont dosés selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) et sont exprimés en mg équivalent acide glucuronique (Sigma, G-5269).

Aucune interférence de l'EDTA sur les dosages des polysaccharides, de l'ADN ou des acides uroniques n'a été observée. Le milieu utilisé pour la préparation des solutions standards est le même que celui utilisé pour l'extraction des exo-polymères (*i.e.* eau ultra-pure ou solution TRIS et tampon phosphate).

II.3.3. Résultats

16 échantillons de boues activées ont été prélevés à différentes dates dans les bassins d'aération de la filière urbaine (6 prélèvements) ou industrielle (1 prélèvement) de la station d'épuration de Maxéville et à partir d'un pilote de taille industrielle (9 prélèvements).

Les teneurs en MES des échantillons sont comprises entre 2 et 5 g L⁻¹ de boue et les indices de décantation (SVI) entre 70 et 300 mL g⁻¹ (40% de variation) caractérisant une capacité de décantation excellente à médiocre. Aucun de ces échantillons ne présente de prolifération de bactéries filamenteuses. La proportion moyenne en matières volatiles en suspension (MVS), qui représentent les matières organiques, est de 72±5% des MES. C'est une valeur habituellement rencontrée sur la station. La demande chimique en oxygène (DCO) de ces boues représente environ 1200 mg g⁻¹ de MES (moyenne de 4 échantillons). L'ensemble des résultats est présenté en Annexe I.

Les exo-polymères ont été extraits par traitement des boues aux ultrasons, pendant 60 s ("traitement [ultrasons 60 s]"), et 120 s ("traitement [ultrasons 120 s]"). La quantité totale d'exo-polymères a été déterminée par dosage de la DCO du surnageant de centrifugation des boues traitées par les ultrasons. Les DCO ainsi obtenues respectivement pour les traitements [ultrasons 60 s] et [ultrasons 120 s] représentent 13 à 20 % de la DCO totale des boues activées (Tableau II-1). Les écarts-types, calculés sur la concentration moyenne des différents types chimiques dosés, témoignent de l'hétérogénéité relativement forte du lot de 16 échantillons de boues. Par ordre d'importance quantitative décroissante, les protéines, les polysaccharides, l'ADN puis les acides uroniques sont

dosés dans l'extrait de PEC (Tableau II-1).

Tableau II-1 : Concentrations moyennes obtenues en polymères à partir d'échantillons de boues provenant de la station de Maxéville et du réacteur pilote prélevés entre Décembre 91 et Octobre 94 par traitements aux ultrasons (37W) pendant 60 ou 120s. Les concentrations sont en mg g⁻¹ (MES). La DCO représente la demande chimique en oxygène de l'extrait d'exo-polymères (en mg d'O₂ g⁻¹ de MES de boue).

Paramètres mesurés	Traitement [ultrasons 60s] (n=16)	Traitement [ultrasons 120s] (n=16)	Rapport: $\frac{[\text{ultrasons 120s}]}{[\text{ultrasons 60s}]}$
DCO	160±50 (env.13% des boues)	240±60 (20% des boues)	1,47±0,10
Protéines	50±20	70±20	1,45±0,12
Polysaccharides	16±5	23±6	1,43±0,11
Ac. uroniques	1,8±0,5	2,3±0,6	1,31±0,16 (a)
ADN	15±4	22±5	1,52±0,12

(a) : moyenne significativement différente des autres moyennes au seuil de probabilité de 0,05.

Le doublement du temps de sonication (60 à 120s) permet d'obtenir environ 1,5 fois plus d'exo-polymères, le rapport [ultrasons 120 s / [ultrasons 60 s] étant de 1,47 pour la DCO (Tableau II-1). Tous les types chimiques dosés augmentent dans les mêmes proportions, excepté les acides uroniques dont la moyenne du rapport [ultrasons 120 s / [ultrasons 60 s] est légèrement mais significativement plus faible (1,31±0,16) (Tableau II-1).

Les exo-polymères de cinq des 16 échantillons de boues ont aussi été extraits par un traitement associant les ultrasons (60s) à l'effet complexant de l'EDTA ("traitement [ultrasons+EDTA]") et trois ont subi le traitement à l'EDTA seul ("traitement [EDTA]"). Les résultats de ces différentes méthodes sont également comparés (Tableaux II-2 et II-3).

Tableau II-2 : Concentrations moyennes en PEC obtenues à partir d'échantillons de boues provenant du réacteur pilote prélevés entre Mars 94 et Octobre 94 par traitements aux ultrasons (37W) pendant 60s avec ou sans traitement complémentaire à l'EDTA (2,5 mM). Les concentrations sont en mg g⁻¹ (MES).

Paramètres mesurés	Traitement [ultrasons 60s] (n=5)	Traitement [ultrasons+EDTA] (n=5)	Rapport: $\frac{[\text{ultrasons + EDTA}]}{[\text{ultrasons 60s}]}$
Protéines	59±9	53±14	0,89±0,15
Polysaccharides	19±3	27±2	1,32±0,20
Ac. uroniques	2,09±0,09	3,6±0,4	1,73±0,26
ADN	18±3	24±6	1,36±0,15

Le traitement [ultrasons+EDTA] permet par rapport au traitement [ultrasons 60s] d'augmenter les quantités de polysaccharides, d'ADN et surtout d'acides uroniques, les protéines étant extraites dans des proportions équivalentes (Tableau II-2). Cependant il ne permet pas d'extraire plus de PEC que le traitement [ultrasons 120 s] (Tableau II-2) et les composés récupérés ne sont sans doute pas exactement les mêmes, les différents types chimiques étant obtenus en proportions différentes lorsque les PEC sont extraits par les ultrasons en présence d'EDTA (rapport $\frac{[\text{ultrasons + EDTA}]}{[\text{ultrasons 60s}]}$ différent) (Tableau II-2).

Le 3^{ème} traitement consiste à extraire les PEC par l'EDTA sans les ultrasons ("traitement [EDTA

seul]). Seuls trois échantillons parmi le lot de 16 boues ont été ainsi étudiés. La proportion des PEC extraits par le traitement [EDTA seul] est très faible (Tableau II-3) excepté pour les acides uroniques où les mêmes quantités sont obtenues (Rapport: $\frac{[\text{EDTA seul}]}{[\text{ultrasons 60s}]} \approx 1$).

Tableau II-3. : Comparaison des quantités d'exo-polymères obtenues par traitement aux ultrasons (60s) et par traitement à l'EDTA (2,5mM) de trois boues activées provenant du réacteur pilote à différentes périodes.

Paramètres mesurés	Traitement [ultrasons 60s] (n=3)	Traitement [EDTA seul] (n=3)	Rapport: $\frac{[\text{EDTA seul}]}{[\text{ultrasons 60s}]}$
Protéines	51±4	15±7	0,3±0,1
Polysaccharides	18±5	6±1	0,4±0,2
Ac. uroniques	2,0±0,2	2,2±0,3	1,1±0,2
ADN	14±3	4±1	0,3±0,1

II.3.4. Discussion

Aucune méthode ne permet à ce jour une extraction fiable des PEC de boues activées. L'utilisation des ultrasons, qui dans un premier temps a été optimisée (Jorand *et al.*, 1995), est à nouveau utilisée mais cette fois en présence d'EDTA afin d'améliorer l'extraction. Les forces de cisaillement des ondes ultrasonores entraînent une déstructuration des floccs mise en évidence par l'augmentation du nombre de particules en suspension et par un relargage de polymères dans la phase aqueuse (Hall, 1981 ; King et Forster, 1990 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1995). Les liens des exo-polymères aux floccs sont donc tels qu'un traitement mécanique comme les ultrasons est capable de les casser. Des temps faibles de sonication (60 s) permettent de casser la macrostructure du flocc (Jorand *et al.*, 1995). Par conséquent, les polymères exo-cellulaires extraits seraient ceux impliqués dans la cohésion des macrofloccs (polymères de type I). Les temps de sonication plus élevés (120 s) sont capables d'augmenter la dispersion des floccs mais aussi sont susceptibles de produire une forte lyse cellulaire (Jorand *et al.*, 1995) augmentant ainsi les quantités de protéines, d'ADN et de polysaccharides. La lyse des cellules ne devrait pas apporter d'acides uroniques ceux-ci étant principalement d'origine exo-cellulaire (Sutherland, 1994). Cela peut expliquer pourquoi ils augmentent en proportion plus faible que les autres familles chimiques lorsque le temps de sonication est doublé. Avec une durée de sonication élevée, en se rattachant à l'étude de Jorand *et al.* (1995), les polymères de type II impliqués dans la cohésion des microfloccs, sont susceptibles d'être atteints.

Le doublement du temps de sonication (60 à 120 s) a le même effet sur tous les échantillons, *i.e.* que les proportions des groupes chimiques analysés restent constantes. Cela ne prouve pas qu'il n'y ait pas lyse des cellules ou extraction d'un autre type de PEC (type I *versus* type II) comme le spéculent Jorand *et al.* (1995). Par contre, l'utilisation de complexants (*e.g.* EDTA) semble apporter des types particuliers de PEC, différents au moins de ceux apportés par l'extraction aux ultrasons. En effet, bien que les analyses effectuées ici soient très grossières par le fait qu'elles ne permettent pas d'identifier des macromolécules ou de doser des hétéropolymères, les acides uroniques, obtenus en proportion plus élevée avec l'EDTA, apparaissent comme des indicateurs de la présence de PEC

particuliers (polymères acides). En traitant les boues par de l'EDTA en plus de la sonication, les quantités plus élevées d'ADN et de polysaccharides obtenus pourraient signifier que d'autres liaisons sont impliquées dans la cohésion de ces polymères aux floccs. Par contre, l'EDTA ne permet pas une meilleure extraction des protéines.

L'EDTA est un complexant puissant des cations et si certains polymères sont préférentiellement extraits par ce composé, cela signifie implicitement qu'ils sont fixés au flocc par des interactions faisant intervenir des cations. Ce serait alors le cas pour l'ADN et les polysaccharides et particulièrement pour les polysaccharides acides constitués d'acides uroniques. Les principaux cations rencontrés dans les boues et participant de manière importante à la cohésion du flocc sont les ions Calcium et dans une moindre mesure les ions Magnésium (Bruus *et al.*, 1992). Urbain *et al.* (1993) montrent en effet que les ions Calcium et Magnésium sont bien corrélés ($r=0,73$ à $0,93$, $n=16$) à la quantité d'exo-polymères de boues prélevées dans 6 stations différentes appuyant l'idée que les exo-polymères sont des sites importants de fixation des cations. L'ADN est connu pour être un site privilégié du Magnésium et, certains exo-polysaccharides bactériens présentent des sites de fixation des ions Calcium, principalement par leur fonctions acides (acides uroniques, pyruvate..., Sutherland, 1994).

L'extraction des acides uroniques, des polysaccharides et de l'ADN par les ultrasons est augmentée en présence d'EDTA. Il est probable qu'après avoir brisé la macrostructure du flocc par les ultrasons, une partie de ces composés reste dans la phase solide (*e.g.* dans les microflocs) et sont alors extraits par l'EDTA. L'accès de l'EDTA à ces microflocs pourrait avoir été facilité par destruction de la macrostructure du flocc. D'autre part, seule une forte proportion d'acides uroniques est obtenue par le traitement [EDTA] comparativement au traitement [ultrasons 60s], confirmant que ces composés sont principalement liés au flocc par des cations.

Les protéines ne sont pas mieux extraites par l'EDTA, ce qui ne signifie pas pour autant, que leur liaison aux floccs ne fait pas intervenir des cations. Eriksson et Alm (1991) observent une diminution de l'extraction des protéines à certaines concentrations en EDTA. Ils suggèrent que l'élimination des cations provoque un repliement des protéines limitant leur relargage du flocc. De plus, de faibles quantités de protéines sont extraites des boues par le traitement [EDTA seul], suggérant qu'une fraction des protéines est liée au flocc par des cations. Ces cations pourraient se situer au niveau des sites carboxyliques d'acides aminés ou de parties non protéiques d'hétéroprotéines. Les substances humiques par exemple sont connues pour être des chélatants puissants de cations (Steinberg et Muenster, 1985) et répondent de plus au dosage des protéines par la méthode de Lowry (Raunkjauer *et al.*, 1994).

L'extraction des PEC par combinaison des ultrasons et de l'EDTA s'avère donc intéressante. Mais cette technique pose le problème de l'apport d'un composé chimique dans l'extraction des PEC. Cela peut entraîner des interférences dans le dosage des PEC (dosage du COD, de la DCO). Pour éviter ce problème, le choix d'une résine échangeuse de cations (Dowex), facilement séparable des PEC après extraction, et dont l'action est similaire à celle de l'EDTA, peut être envisagé.

II.3.5. Conclusion

L'augmentation du temps de sonication permet d'extraire de plus grande quantités de polymères exo-cellulaires dans des proportions identiques d'une boue à l'autre et cela pour les 4 familles chimiques dosées (protéines, polysaccharides, ADN et acides uroniques). Cela suppose que les structures cassées par 60 et 120 s de sonication sont constituées d'une même proportion de polymères exo-cellulaires.

L'extraction d'une partie importante des polysaccharides, et en particulier des polysaccharides acides, et de l'ADN nécessite l'utilisation de chélatants (EDTA) montrant que la liaison de ces familles chimiques dépend dans une large mesure d'interaction faisant intervenir des cations. L'extraction des polymères exo-cellulaires par les ultrasons est donc incomplète, en particulier une fraction des polymères liés au floc par l'intermédiaire de cations n'est pas prise en compte.

II.3.6. Références

- BANKS C.J. and I. WALKER (1977) Sonication of activated sludge flocs and the recovery of their bacteria on solid media., *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 363-368.
- BLUMENKRANTZ N. and G. ASBOE-HANSEN (1973) New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.
- BROWN M.J. and J.N. LESTER (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 179-185.
- BRUUS J.H., P.H. NIELSEN and K. KEIDING (1992) On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering, *Wat. Res.*, **26**, 1597-1604.
- DERIAZ R.E., M. STACEY, E.G. TEECE and L.F. WIGGINS (1949) Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses., *J. Chem. Soc.*, **14**, 1222-1232.
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- ERIKSSON L. and B. ALM (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 21-28.
- FRØLUND B. and KEIDING K. (1994) Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 708-716.
- FRØLUND B., PALMGREN R., KEIDING K. and NIELSEN P. (1995) Strategies for extraction of activated sludge exopolymers by cation exchange. Soumis à publication in : *Wat. Res.*
- HALL T. (1981) Sonication for the study of floc strength and reflocculation of activated sludge, *Environ. Technol. Lett.*, **2**, 579-588.
- HUGHES D.E. and D.A. STAFFORD (1976) The microbiology of the activated-sludge process, *Critical Rev. Environ. Control*, **9**, 233-257.
- JORAND F., ZARTARIAN F., THOMAS F., BLOCK J.C., BOTTERO J.-Y., VILLEMIN G., URBAIN V. and MANEM J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **29**, 1639-1647.
- KAMOUN P. (1974) Appareils et méthodes en biochimie, Flammarion, Paris, p. 45-58.
- KIFF R.J. and THOMPSON R. (1979) Physical method for the extraction of bacterial exopolymers from activated sludge biomass, *Biotechnol. Lett.*, **1**, 183-186.
- KING R.O. and FORSTER C.F. (1990) Effects of sonication on activated sludge, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 109-115.
- LI D.H. and J.J. GANCZARCZYK (1986) Physical characteristics of activated sludge flocs, *Crit. Rev. Environ. Control*, **17**, 53-87.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- NISHIKAWA S., M. KURIYAMA (1968) Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge, *Wat. Res.*, **2**, 811-812.
- NORTH P. F. (1976) Towards an absolute measurement of soil structural stability using ultrasound, *J. Soil. Sci.*, **27**, 451-459.

- PARKINSON D. and D.C. COLEMAN (1991) Microbial communities, activity and biomass, *Agri. Ecosystems Env.*, **34**, 3-33.
- RAUNKJÆR K., HVITVED-JACOBSEN T. and NIELSEN P. H. (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrates and lipid in domestic wastewater, *Wat. Res.*, **28**, 251-562.
- ROSZAK D.B. and R.R. COLWELL (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microb. Rev.*, **51**, 365-379.
- RUDD T., STERRITT M. and LESTER J.N. (1983) Extraction of extracellular polymers from activated sludge, *Biotechnol. Let.*, **5**, 327-332.
- STEINBERG C. and MUENSTER U. (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater, in *Humic substances in soil, sediment and water*, Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L. and McCarthy P. eds., John Wiley & sons, New York, p. 105-145.
- SUTHERLAND I.W. (1994) Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides, *Biotech. Adv.*, **12**, 393-448.
- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.
- VALLOM J.K. and A.J. McLOUGHLIN (1984) Lysis is a factor in sludge flocculation, *Wat. Res.*, **18**, 1523-1528.
- WILLIAMS A.R., D.A. STAFFORD, A.G. CALLELY and D.E. HUGHES (1970) Ultrasonic dispersal of activated sludge flocs, *J. Appl. Bact.*, **33**, 656-663.
- ZARTARIAN F., THOMAS F., BOTTERO J.-Y., VILLEMEN G. (1994), Structure et hydratation des floes de boues activées, *Rapport annuel d'activité*, Lyonnaise des Eaux-Dumez — Ecole Nationale Supérieure de Géologie, Novembre 1994, 41 pages.

II.4. Conclusion générale

En combinant quatre types de méthodes (ultrasons, granulométrie laser, microscopie électronique et analyses chimiques), nous montrons qu'une boue activée a une population dominante de macroflocs dont la taille est centrée à 125 μm . Ces macroflocs proviennent d'un assemblage de microflocs de 13 μm eux-mêmes constitués par des particules plus petites de 2,5 μm de moyenne.

Les microagrégats se révèlent être beaucoup plus résistants aux forces de cisaillement engendrées par les ultrasons que les macroagrégats de 125 μm . La sonication des boues activées (60 s à 37 W), est alors efficace pour désagréger plus de 80 % des macroflocs. Dans ces conditions de sonication, des essais avec des souches pures permettent de s'assurer qu'un minimum de lyse cellulaire s'est produite, limitant ainsi la contamination du compartiment exo-cellulaire par des composants intracellulaires. Une déstructuration plus poussée du floc nécessite des temps de sonication plus longs qui provoquent alors une forte lyse cellulaire.

Les exo-polymères obtenus sont des polysaccharides (20 mg g^{-1}) avec environ 10% d'acides uroniques, des protéines (60 mg g^{-1}) et de l'ADN (18 mg g^{-1}) mais leur emplacement dans le floc n'est pas clair. La liaison des protéines au floc ne semble pas dépendre des cations. Les acides nucléiques proviendraient de lyse antérieure de cellules microbiennes. La microscopie électronique renforce cette hypothèse en montrant de nombreux débris cellulaires dans les floes. Une fraction de l'ADN et des polysaccharides ne sont extractibles par l'EDTA qu'après avoir cassé la macrostructure des floes par les ultrasons, suggérant que ceux-ci sont liés à la structure secondaire du floc par des interactions faisant intervenir des cations. Les acides uroniques sont particulièrement bien extraits par l'EDTA et sont alors directement impliqués dans la liaison des polysaccharides au floc.

III. CARACTÉRISATION HYDROPHOBE/HYDROPHILE DES POLYMÈRES EXO-CELLULAIRES DE BOUES ACTIVÉES

III.1. Introduction.....	104
III.2. Matériel et méthodes.....	106
III.2.1. Prélèvement et caractérisation des échantillons	106
III.2.2. Extraction des polymères exo-cellulaires	106
III.2.3. Caractérisation chimique des exo-polymères.....	107
III.2.4. Fractionnement des exo-polymères.....	107
III.2.4.1. Précipitation des exo-polymères.....	107
III.2.4.2. Adsorption par les résines XAD.....	108
III.3. Résultats	110
III.3.1. Caractérisation globale des échantillons de boues activées.....	110
III.3.2. Courbes de percée des résines XAD par les PEC solubles.....	110
III.3.3. Fractionnement des PEC.....	112
III.4. Discussion	115
III.5. Conclusion.....	117
III.6. Références.....	117

Caractérisation hydrophobe/hydrophile des polymères exo-cellulaires de boues activées

JORAND F¹, BOUE-BIGNE F¹, BLOCK JC*¹, URBAIN V² and MANEM J²

¹ Laboratoire Santé-Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, B.P. 403, 54001 Nancy Cedex, France. ² C.I.R.S.E.E., Lyonnaise des Eaux, 38, rue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France.

III.1. Introduction

La phase secondaire de l'épuration biologique des eaux usées consiste à séparer par décantation l'eau épurée de la biomasse en suspension. L'efficacité de cette étape dépend principalement de la structure physico-chimique des agrégats ou "flocs biologiques" formés au cours du procédé familièrement appelé "boues activées". Excepté le développement excessif des bactéries filamenteuses qui représente un cas particulier (Jenkins *et al.*, 1993), les facteurs qui affectent l'organisation de cette structure sont mal connus.

Les flocs sont constitués d'une matrice de polymères exo-cellulaires (PEC) qui proviennent à la fois des micro-organismes et des eaux usées, et qui semblent avoir un rôle essentiel sur les propriétés des boues. La microscopie électronique montre que ces polymères sont irrégulièrement distribués autour des cellules microbiennes (Bleich et Nehrkorn, 1989 ; Li et Ganczarczyk, 1990 ; Jorand *et al.*, 1995). Leur analyse révèle la présence de protéines et de polysaccharides (Carr et Ganczarczyk, 1974 ; Brown et Lester, 1980 ; Rudd *et al.*, 1983 ; Frølund *et al.*, 1995), d'acides nucléiques (Vallom et McLoughlin, 1984 ; Horan et Eccles, 1986 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Frølund *et al.*, 1995 ; Jorand *et al.*, 1995), de lipides (Goodwin et Forster, 1985) et de substances humiques (Steinberg et Muenster, 1985 ; Frølund *et al.*, 1995). Il est très probable que ces groupes chimiques soient associés formant ainsi des hétéropolymères telles que des glycoprotéines (Horan et Eccles, 1986).

Les quantités respectives de chaque type d'exo-polymères varient d'une boue à l'autre (*e.g.* 6 à 160 mg de protéines g⁻¹ de boues sèches pour 7 stations d'épuration, Urbain *et al.*, 1993) mais aussi selon les méthodes d'extraction (Carr et Ganczarczyk, 1974 ; Brown et Lester, 1980 ; Rudd *et al.*, 1983 ; Frølund *et al.*, 1995) et les méthodes de dosage utilisées (Raunjkauer *et al.*, 1994), si bien qu'il est quasiment impossible de comparer les différents résultats de la littérature sans tenir compte des méthodologies utilisées et de l'origine des boues testées.

Des études montrent une relation inversement proportionnelle entre la qualité de décantation des boues et leur contenu en PEC (Forster, 1971 ; Eriksson et Alm, 1991 ; Urbain *et al.*, 1993). L'altération de la capacité de décantation des boues a été liée à une augmentation de leur teneur en eau liée (Heukelekian et Weisberg, 1956 ; Forster et Lewin, 1972) ainsi qu'à une augmentation de leur charge de surface (Magara *et al.*, 1976 ; Steiner *et al.*, 1976 ; Goodwin et Forster, 1985). Eriksson et Alm (1991) et Bruus *et al.* (1992) montrent que les cations polyvalents participent à la

cohésion du floc en se liant probablement aux charges négatives des exopolymères qui d'après les travaux de Steiner *et al.* (1976) et Magara *et al.* (1976) seraient principalement portées par les polysaccharides. Les analyses élémentaires effectuées par Forster (1976) et par Sato et Ose (1980) montrent que les exo-polymères des boues activées ont une teneur élevée en oxygène (40 à 58 %) traduisant un caractère hydrophile. Ainsi, les exo-polymères altèreraient la structure des floccs par l'apport de fonctions hydrophiles, dont des charges électriques négatives, en augmentant le taux d'hydratation des boues et les phénomènes de répulsion électrostatique entre les particules du floc. Cependant, ils participent à la floculation des boues et sont nécessaires à la formation d'un floc de bonne qualité (Pavoni *et al.*, 1972 ; Urbain *et al.*, 1993).

Si le caractère hydrophile contribue à l'altération du floc de boue activée, l'hydrophobicité doit avoir un effet inverse. Valin et Sutherland (1982) relient en effet l'hydrophobicité des boues estimée par mesure de l'angle de contact à leur capacité de floculation. Urbain *et al.* (1993) établissent une relation entre l'hydrophobicité des boues, la quantité de PEC et la capacité de décantation. Leurs résultats suggèrent que la décantation des floccs dépend de la balance hydrophobe/hydrophile des boues. Dans cette balance le côté hydrophile serait représenté principalement par les PEC. Les micro-organismes des boues, ayant généralement une hydrophobicité de surface élevée (60 à 90 % par le test d'adhésion à l'octane, Jorand *et al.*, 1994), pourraient participer au caractère hydrophobe des floccs. Peu d'études se sont intéressées aux propriétés hydrophobes/hydrophiles des PEC des boues. Frølund *et al.* (1994) ont séparé par HPLC, les PEC de boues à la fois par exclusion de taille et par affinité pour un solide hydrophobe (polystyrène divinyl benzène). Leurs résultats montrent que des boues issues de différentes stations contiennent les mêmes groupes de polymères mais dans des proportions différentes.

Les résines Amberlite XAD-8 et XAD-4 permettent de caractériser la matière organique des eaux naturelles par rapport à leur propriétés hydrophobes/hydrophiles. Les échantillons sont filtrés au travers de colonnes contenant des résines XAD-8 et XAD-4 placées en série et la matière organique est fractionnée en compartiments de polarité différente (Aiken *et al.*, 1992 ; Croué *et al.*, 1993 par modification de la méthode de Thurman & Malcolm, 1981). Les caractéristiques des résines sont indiquées dans le Tableau III-1. L'avantage de la résine XAD-8 est lié au diamètre de pore élevé (25 nm) qui lui permet d'avoir une limite d'exclusion de taille relativement grande, au moins égale à 90 kD (Tableau III-1) et pouvant aller probablement jusqu'à 400 kD.

Les solutés organiques sont retenus sur ces résines par des processus d'adsorption physique de faible énergie (4 à 21 KJ/mole) telles que les forces de Van der Waals, les interactions dipolaires et les liaisons hydrogènes (Malcolm *et al.*, 1977). Du fait de ces liaisons de faible énergie, l'adsorption du soluté est principalement gouvernée par sa solubilité dans l'eau (Thurman *et al.*, 1978 ; Aiken *et al.*, 1992). Les solutés doivent être non ioniques pour s'adsorber efficacement sur les résines XAD à cause de la forte liaison ion-dipole qui se forme entre le soluté ionisé et la molécule d'eau et parce que la résine XAD-8 est légèrement chargée à pH neutre (Thurman *et al.*, 1978). Le maximum d'adsorption est donc obtenu à pH acide lorsque la matière organique et les résines sont protonées.

Néanmoins, à pH acide une grande partie des polymères exo-cellulaires des boues échappent à la caractérisation hydrophobe/hydrophile par les résines XAD car ceux-ci précipitent (Boué-Bigne, 1994 non publié).

L'ajout d'une résine échangeuse de cations (Dowex) après dispersion par les ultrasons réduit de manière importante (- 40 % environ) la quantité de PEC précipités à pH acide et permet de plus d'augmenter la quantité de PEC extraits par rapport au seul traitement aux ultrasons (Boué-Bigne, 1994 non publié). L'avantage d'une telle résine par rapport à un chélatant cationique comme l'EDTA, qui a probablement le même effet (voir § II.2.), est qu'elle n'entraîne quasiment aucun apport de carbone et peut être facilement éliminée après dispersion des floes et extraction des PEC.

Nous nous proposons alors d'extraire les PEC de boues activées par l'action combinée des ultrasons et de la résine Dowex puis de fractionner l'extrait d'exo-polymères obtenu par acidification/centrifugation et par filtration au travers des résines XAD-8 et XAD-4. Les différentes fractions obtenues seront ensuite caractérisées par leur contenu en COD, protéines et polysaccharides.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Prélèvement et caractérisation des échantillons

Les échantillons de boues activées sont prélevés à la station d'épuration de Maxéville et sont conditionnés dans des récipients en polycarbonate. Ils sont stockés à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 30 min après leur prélèvement et sont utilisés dans les 24 h qui suivent.

Trois types de boues sont prélevées : boues de la filière urbaine, boues de la filière industrielle (alimentées par un mélange de 75 % d'effluents de brasserie et 25 % d'effluents urbains) et boues d'un réacteur de taille industrielle (9 m^3) directement alimenté par les effluents de la filière urbaine après décantation primaire des eaux usées.

La capacité de décantation des boues est caractérisée par l'indice de qualité de boue (Fitch et Kos, 1976). Les teneurs en matières sèches en suspension (MES) et en matières volatiles en suspension (MVS) sont déterminées par pesée après dessiccation (105°C) et par calcination (550°C) de culots de boue centrifugés à faible vitesse ($3\,000 \text{ g}/5 \text{ min}$).

III.2.2. Extraction des polymères exo-cellulaires

Avant l'extraction des PEC le surnageant des boues est éliminé : les boues sont centrifugées à faible vitesse et le surnageant est prélevé et remplacé par un volume identique d'eau ultrapure (qualité MilliQ/MilliRO, Millipore). Les exo-polymères sont ensuite extraits par combinaison d'un traitement aux ultrasons et par une résine échangeuse de cations. La résine utilisée est la résine Dowex 50X8, Na^+ , 20-50 mesh (Aldrich-Fluka, 44445) qui est une résine échangeuse de cations ayant une forte affinité pour les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

Avant utilisation, la résine Dowex est lavée par agitation de 100 g de résine dans 100 mL de tampon phosphate pH=7,1 (Kamoun, 1974) pendant 1 h puis rincée abondamment à l'eau ultrapure par filtration au travers d'une toile à bluter de 250 μm de maille (UGB, 12270S). Le relargage de carbone par la résine ne dépasse alors pas 0,5 mg de COD L⁻¹. 50 mL de boues traitées aux ultrasons (37W) pendant 60 s sont placés en contact avec la résine Dowex à raison de 60 g g⁻¹ de MES de boue (méthode adaptée de Frølund *et al.*, 1995) et sont agités à 180 rpm pendant 1 h à $+4 \pm 1^\circ\text{C}$ dans des flacons de 250 mL (agitation orbitale, Certomat R, Braun Sciencetech.). La résine est ensuite éliminée par filtration sur toile à bluter puis les polymères sont séparés de la matière en suspension par centrifugation (20 000 g / 30 min)

III.2.3. Caractérisation chimique des exo-polymères

L'extrait d'exo-polymères est caractérisé selon sa teneur en carbone organique dissous (COD), en protéines et en polysaccharides.

Le COD est dosé par un analyseur de carbone (Dohrmann, DC 80). Le carbone organique est oxydé en dioxyde de carbone (CO₂) par du persulfate de sodium (100 g L⁻¹) et par des rayons ultraviolet. L'appareil est étalonné avec une solution d'hydrogénéphthalate de potassium (Merck, 4874) à 10 mg L⁻¹. Le carbone minéral (CO₂ dissous) est éliminé par acidification des échantillons à pH=2 par HCl concentrée et par barbotage d'oxygène ultrapure pendant 5 min. Toute la verrerie utilisée est débarrassée des traces de carbone organique par calcination à 550°C pendant 3 heures.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Sigma Diagnostics (procédure n°P5656). Les teneurs en protéines sont exprimées en mg équivalent d'albumine bovine sérique (Sigma, A-7906).

Les polysaccharides sont dosés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) et sont exprimés en mg équivalent glucose.

III.2.4. Fractionnement des exo-polymères

Un échantillon de chacun des trois types de boues (urbaines, industrielles et de réacteur pilote) prélevées le même jour (Mai 1994) est utilisé dans cette étude. Les exo-polymères extraits des boues par action combinée des ultrasons et de la résine Dowex sont fractionnés dans un premier temps en deux compartiments : i) polymères précipités en milieu acide (pH 2) et ii) polymères solubles en milieu acide (pH 2). Les polymères du compartiment soluble sont ensuite fractionnés en trois compartiments de polarité différente par filtration au travers des résines XAD-8 et XAD-4 placées en série.

III.2.4.1. Précipitation des exo-polymères

Après extraction par les ultrasons et la résine Dowex, les solutions d'exopolymères sont diluées

avec de l'eau ultrapure et leur concentration est ajustée à 30 mg de COD L⁻¹. 2,2 L de solution d'exopolymères à cette concentration ont été obtenus. Ces solutions sont acidifiées à pH 2,0 par HCl 35 % (20 248.320, Prolabo) puis sont conservées à + 1°C (glace fondante) pendant 12 h. Après ce temps de stockage le précipité formé est récupéré par centrifugation à 20.000 g pendant 40 min à + 4°C. Les surnageants, contenant les polymères solubles, sont conservés à + 1°C (glace fondante). Les culots sont rassemblés et sont repris par 500 mL d'eau ultrapure, le pH de la solution est neutralisé par NaOH en vue des dosages des protéines et des polysaccharides.

III.2.4.2. Adsorption par les résines XAD

Les solutions d'exopolymères non précipitées à pH acide sont fractionnées sur les résines Amberlites® XAD-8 et XAD-4 (Rhom et Haas) selon la méthode de Thurman et Malcolm (1981) modifiée par Croué *et al.* (1993). Le Tableau III-1 donne les principales caractéristiques des deux résines utilisées.

Tableau III-1 : Caractéristiques physico-chimiques des résines XAD d'après Aiken *et al.* (1979).

Résine	Nature chimique	Capacité d'échange d'ion (m éq g ⁻¹)	Diamètre de pore moyen (nm)	Surface spécifique (m ² g ⁻¹)	k'	
					de deux solutés de poids moléculaires différents 90 kD*	126 D**
XAD-8	Ester acrylique (légèrement polaire)	10 ⁻²	25	140	350	159
XAD-4	Styrène divinyl benzène (non polaire)	0	5	750	0	907

* = acide polyacrylique

** = acide valérique

k' = coefficient d'adsorption.

Avant leur utilisation les résines XAD sont lavées selon la procédure décrite par Croué *et al.* (1993) comprenant notamment un lavage avec divers solvants (méthanol, éther diéthylique, dichlorométhane) par extraction au Soxhlet et sont rincées avec une solution d'HCl 0,1 M puis 0,01 M jusqu'à ce que la concentration en COD en sortie de colonne soit inférieure à 0,5 mg L⁻¹. Chaque colonne (diamètre intérieur de 18 mm) contient environ 50 cm³ de résine. Une pompe péristaltique (M 312, Gilson) permet d'obtenir une vitesse de filtration constante à 250 mL h⁻¹. Tous les tubes utilisés sont en verre à l'exception des tuyaux de pompe et des raccords qui sont en polycarbonate "acido-résistant" (Viton, 7606-42, Cole Parmer Instrument).

2,2 L d'échantillon sont utilisés pour la filtration au travers des résines placées en série. Des prélèvements de 20 mL environ sont effectués en sortie de la résine XAD-8 et en sortie de la résine XAD-4 après filtration de 0, 500, 1 000, 1 500 et 2 000 mL. Les prélèvements sont conservés à l'obscurité à + 4 ± 1°C pendant au plus une semaine avant les dosages du COD, des protéines et des polysaccharides. Le protocole de fractionnement est résumé dans la Figure III-1.

Lorsque les concentrations en COD en sortie de colonne sont stables la quantité de matière organique retenue par les résines est déterminée à chaque prélèvement par calcul de la différence entre

la concentration en entrée et la concentration en sortie de colonne. La moyenne des valeurs obtenues donne une estimation de la concentration retenue par les résines.

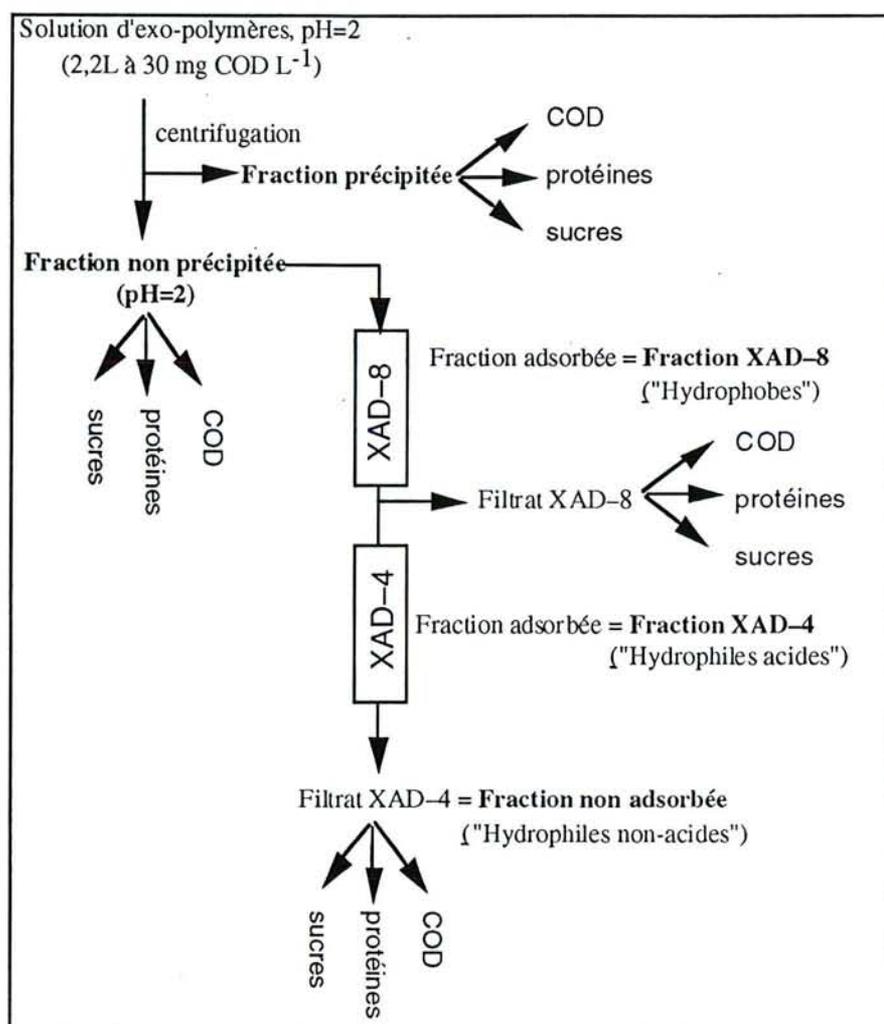


Figure III-1 : Schéma du protocole de fractionnement des exo-polymères à pH = 2 (HCl).

Thurman et Malcolm (1981) et Croué *et al.* (1993) donnent la dénomination suivante aux fractions obtenues :

Fraction XAD-8 = "fraction hydrophobe"

Fraction XAD-4 = "fraction hydrophile acide"

Fraction non adsorbée = "fraction hydrophile non acide" (Figure III-1).

La "fraction XAD-4" ne représente en fait qu'une partie des acides hydrophiles et la "fraction non adsorbée" ne contient pas seulement des solutés hydrophiles "non acides" (Aiken *et al.*, 1992).

La capacité d'adsorption d'une résine pour un soluté donné est défini par le coefficient d'adsorption k' :

$$k' = \frac{\text{quantité de soluté adsorbé sur la résine}}{\text{quantité de soluté dissous dans le volume mort}}$$

Le volume mort (V_0) des deux résines représente environ 67 % du volume de résine (Malcolm et McCarthy, 1992). Thurman et Malcolm (1978) ont relié de manière empirique le k' au volume de

résine (V_R) et au volume d'échantillon filtré (V_E):

$$V_E = (1/6) V_R k' \quad (1)$$

D'après l'équation (1), et selon nos conditions expérimentales ($V_E = 2000$ mL et $V_R = 50$ mL), le k' des solutés retenues par la colonne XAD-8 après filtration de 2 L est au moins égal à 240.

III.3. Résultats

III.3.1. Caractérisation globale des échantillons de boues activées

Les caractéristiques des boues utilisées sont données dans le Tableau III-2. Les indices de décantation des boues urbaines et de pilote sont de qualité très moyenne. La décantabilité de la boue industrielle a été impossible à mesurer du fait d'une importante flottation. Les taux de matières volatiles en suspension (MVS) des trois boues correspondent aux valeurs habituellement obtenues sur la station (*i.e.* environ 75 % des MES). Les exopolymères extraits représentent 39 à 57 mg de COD g^{-1} de MES. Des trois boues, celle qui provient du réacteur pilote contient le plus d'exopolymères.

Tableau III-2 : Caractéristiques des échantillons utilisés pour le fractionnement des exo-polymères en compartiments hydrophobes/hydrophiles. SQI = sludge quality index (indice de qualité de boue), MES = matières sèches en suspension, MVS = matières volatiles en suspension, COD = carbone organique dissous. n.m. = non mesurable.

	Boue urbaine	Boue de pilote	Boue de brasserie
MES ($g L^{-1}$)	2,8	2,9	4,0
MVS (% des MES)	73 %	73 %	75 %
SQI ($mL g^{-1}$)	134	130	(n.m.)
Exo-polymères			
mg COD (g^{-1} MES)	39±1*	57±3	41±2
mg protéines (g^{-1} MES)	46,0±0,2	54±3	46,0±0,1
mg polysaccharides (g^{-1} MES)	14,0±0,1	22±2	13,6±0,2

* Ecart-type sur la moyenne de trois dosages indépendants.

III.3.2. Courbes de percée des résines XAD par les PEC solubles

Les fractions d'exo-polymères solubles à pH 2 sont filtrées au travers des résines XAD-8 et XAD-4 placées en série. La Figure III-2 représente les courbes de percée obtenues avec les 3 types d'échantillons. La concentration en matière organique a été suivie au cours de la filtration par dosage du COD et par mesure de l'absorbance UV_{270nm} des filtrats recueillis en sortie des résines. L'absorbance aux UV et les teneurs en COD évoluent de la même manière au cours de la filtration (Figure III-2) : un pseudo-plateau est obtenu pour les trois échantillons entre 500 (ou 1000 mL pour XAD-4) et 2000 mL de volume filtré. Les valeurs de COD atteintes par ce plateau varient de 10 à 15 $mg L^{-1}$ pour le filtrat XAD-8 et de 6 à 10 $mg L^{-1}$ pour le filtrat XAD-4 (Figure III-2A). Les absorbances aux UV_{270nm} varient de 0,11 à 0,17 et 0,07 à 0,13 respectivement pour les filtrats XAD-8 et XAD-4 (Figure III-2B).

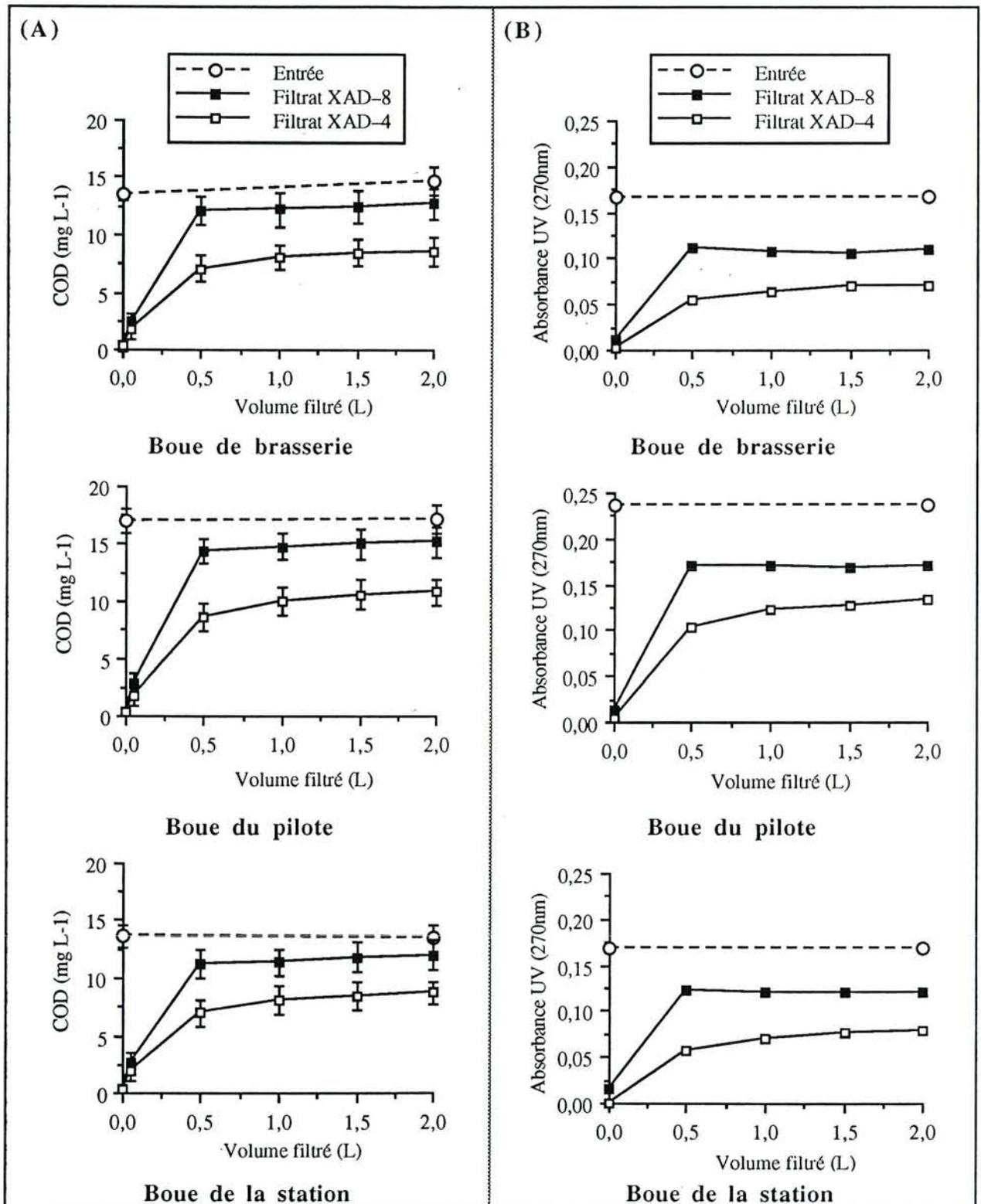


Figure III-2 : Suivi du COD (A) et de l'absorbance UV_{270nm} (B) des filtrats XAD-8 et XAD-4 des fractions d'exopolymères solubles à pH 2 de 3 types de boues activées : alimentées par des effluents de brasserie ("boue de brasserie") ou par des effluents urbains ("boue de la station" ou "boue du pilote"). Les barres verticales représentent l'incertitude calculée sur trois dosages indépendants.

La filtration des PEC au travers d'une résine XAD permet donc de les séparer en 2 groupes : i) le premier qui comprend les solutés qui s'adsorbent fortement sur la résine et ii) le second ceux qui ne s'adsorbent quasiment pas. Le calcul des coefficients d'adsorption (k') selon l'équation (1) et nos conditions expérimentales donne un $k' > 240$ pour les composés du premier groupe et un $k' < 15$ pour les composés du second groupe.

III.3.3. Fractionnement des PEC

La concentration en COD des fractions adsorbées (fraction XAD-8 et XAD-4) est calculée lorsque la concentration en COD ou l'absorbance UV des filtrats sont stables, *i.e.* dans notre étude à partir de 500 mL pour la fraction XAD-8 et 1000 mL pour la fraction XAD-4. La répartition du COD au sein des quatre fractions obtenues au terme du protocole de séparation est similaire pour les trois boues étudiées (Figure III-3). La fraction précipitée représente la moitié du COD des exo-polymères des trois échantillons. La fraction non-adsorbée est largement supérieure aux fractions XAD-8 et XAD-4 (30 % contre respectivement 13 % et 7 % du COD).

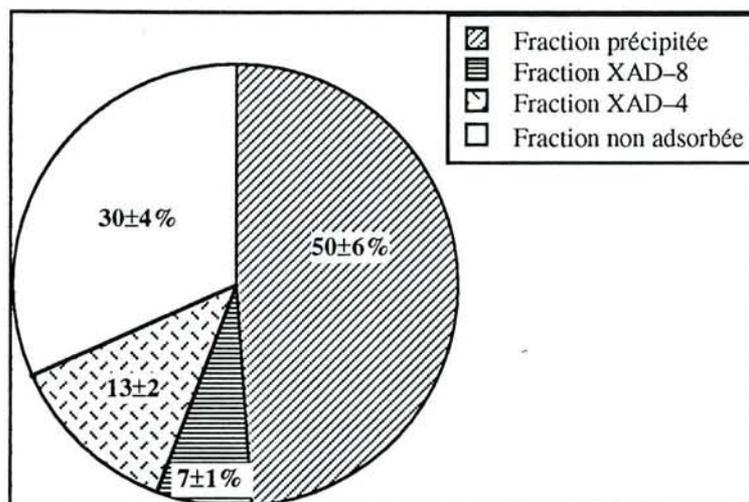


Figure III-3 : Répartition du COD des exopolymères des trois types d'échantillons de boues au sein des 4 fractions obtenues par précipitation en milieu acide et par fractionnement par les résines XAD.

Le Tableau III-3 permet de comparer les différences relatives qui existent entre les valeurs en COD et de l'absorbance UV. La fraction XAD-8 qui absorbe plus intensément les UV_{270nm} que la fraction XAD-4 (31 % contre 24 %) représente seulement 14 % du COD soluble à $pH=2$ (Tableau III-3). Par contre la fraction XAD-4 a une même proportion de COD que d'absorbance aux UV_{270nm} . La fraction non adsorbée qui en COD représente 61 % des exo-polymères solubles à $pH = 2$, ne représente plus que 47 % de l'absorbance aux UV_{270nm} (Tableau III-3). Si pour les composés absorbant intensément dans l'UV, un degré d'aromaticité élevée est attribué, alors le classement par ordre d'aromaticité décroissante des fractions est le suivant : fraction XAD-8 > fraction XAD-4 > fraction non-adsorbée.

Tableau III-3 : Répartition de l'absorbance aux UV ($\lambda=270\text{nm}$) et des teneurs en COD de la solution d'exo-polymères solubles à pH 2 au sein des fractions obtenues par fractionnement par les résines XAD. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne obtenue à partir des trois échantillons de boues d'origine industrielle (brasserie) ou urbaine (réacteur pilote et station d'épuration).

	Fraction XAD-8	Fraction XAD-4	Fraction non adsorbée
C.O.D. (% de la fraction soluble à pH 2).	14 %	25 %	61 %
Absorbance UV (% de la fraction soluble à pH 2).	31 %	24 %	47 %
Abs UV relative (% abs UV/% COD)	2,2	1,0	0,8

Les protéines et les polysaccharides ont été dosés dans la fraction de PEC précipitée à pH 2 ainsi que dans les filtrats recueillis au cours de la filtration des PEC solubles à pH 2. La majorité des protéines et des polysaccharides est contenue dans la fraction précipitée soit 77 % des protéines et 66 % des polysaccharides (Tableau III-4).

Tableau III-4 : Répartition moyenne du COD, des protéines et des polysaccharides des exo-polymères entre la fraction précipitée et la fraction soluble à pH 2 pour les trois échantillons de boue.

	Fraction précipitée	Fraction soluble
COD	$50 \pm 6 \%$	$50 \pm 6 \%$
Protéines	$77 \pm 2 \%$	$23 \pm 2 \%$
Polysaccharides	$66 \pm 3 \%$	$34 \pm 2 \%$

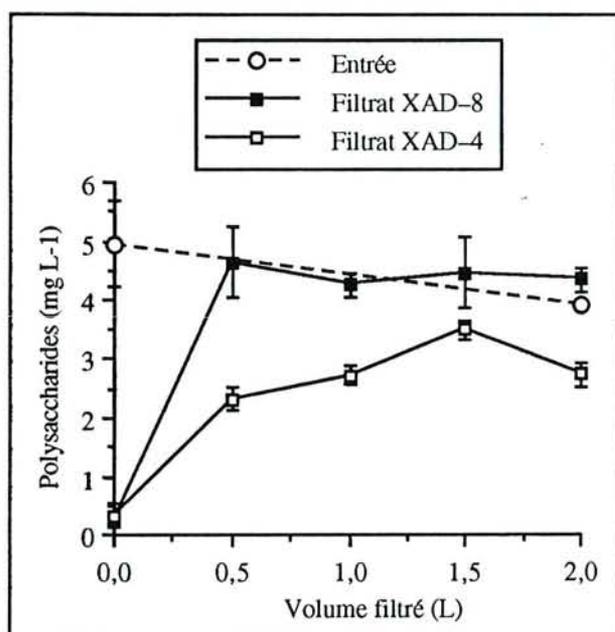


Figure III-4 : Suivi des polysaccharides au cours de la filtration de la solution d'exopolymères solubles de la boue de brasserie. Les barres verticales représentent l'incertitude calculée sur trois dosages indépendants.

Les concentrations en protéines et en polysaccharides de la fraction soluble sont relativement faibles (3 à 5 mg L^{-1} et 11 à 15 mg L^{-1} respectivement pour les polysaccharides et les protéines, résultats non montrés) et après filtration au travers des résines XAD, les concentrations en sortie des colonnes sont à la limite du seuil de sensibilité du dosage des protéines et des polysaccharides

(environ 2 mg L^{-1}). Seuls les résultats obtenus avec la boue de brasserie, qui montrent les meilleurs taux de recouvrement (e.g. polysaccharides : 90 % contre environ 75 % pour les autres échantillons, résultats non montrés) sont analysés dans le paragraphe suivant.

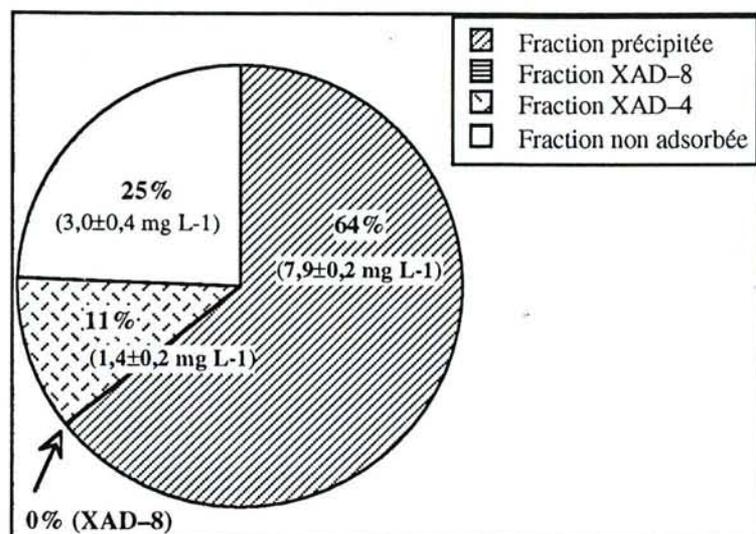


Figure III-5 : Répartition des polysaccharides des PEC de la boue de brasserie dans les différentes fractions . Somme des fractions = $12,3 \pm 0,8 \text{ mg équivalent Glc L}^{-1}$.

Le suivi des concentrations en polysaccharides des PEC de la boue de brasserie au cours de la filtration sur résines, représenté par la Figure III-4, montre l'obtention d'un pseudo-plateau comme pour le suivi du COD et de l'absorbance UV (Figure III-2) mais avec moins de précision. Les concentrations en polysaccharides en sortie de colonne XAD-8 sont identiques aux concentrations d'entrée signifiant que les polysaccharides ne sont pas adsorbés par la résine XAD-8. La répartition des polysaccharides des PEC de la boue de brasserie indiquée dans la Figure III-5 est alors la suivante : 64 % des polysaccharides sont contenus dans la fraction précipitée, 11 % dans la fraction XAD-4 et 25 % ne sont pas adsorbés par les résines. La proportion de polysaccharides retenus par la résine XAD-8 est négligeable.

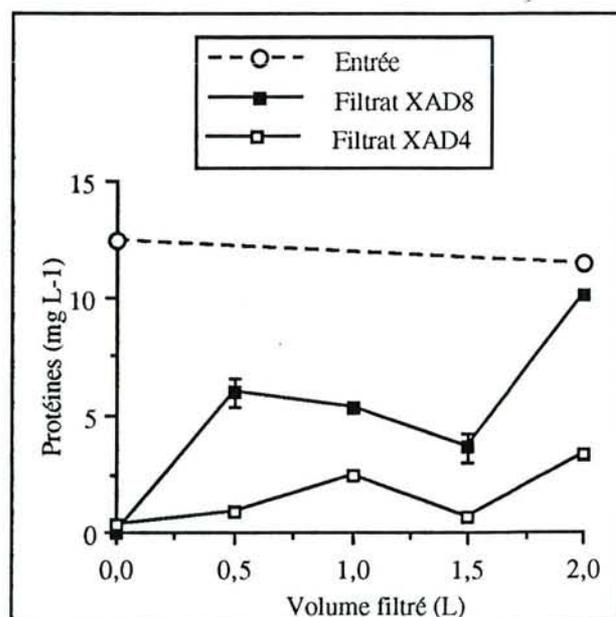


Figure III-6 : Suivi des protéines au cours de la filtration de la solution d'exopolymères solubles de la boue de brasserie. Les barres verticales représentent l'incertitude calculée sur trois dosages indépendants.

Les protéines s'adsorbent principalement sur les résines XAD puisque à l'inverse des polysaccharides, les concentrations en sortie de colonne XAD-8 sont nettement plus faibles (Figure III-6) et deviennent négligeables en sortie de colonne XAD-4. La répartition des protéines entre les 4 compartiments considérés est représentée par la Figure III-7 et montre que 76 % des protéines sont contenues dans la fraction précipitée et 12 % pour les fractions XAD-8 et XAD-4. Les résultats des autres échantillons de boues présentaient pour les protéines des résultats similaires.

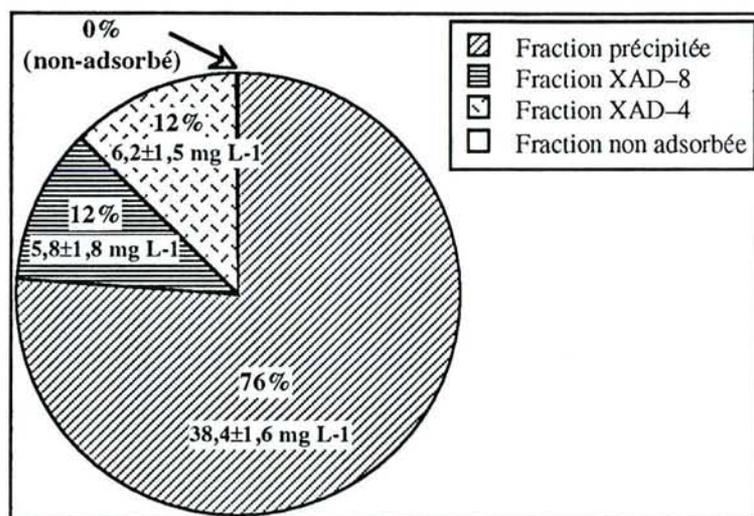


Figure III-7 : Répartition des protéines des PEC de la boue de brasserie dans les différentes fractions. Somme des fractions = 50,4 ± 5 mg équivalent SAB L⁻¹.

III.4. Discussion

La balance entre les surfaces hydrophobes et hydrophiles des boues activées a été décrite comme facteur de la structure du floc (Valin et Sutherland, 1982 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Jorand *et al.*, 1994). Il est connu que les boues activées contiennent des bactéries présentant une surface fortement hydrophobe (Jorand *et al.*, 1994) par contre le caractère hydrophobe des PEC des boues a été très peu étudié. L'utilisation de résines hydrophobes permet de fractionner une partie des exo-polymères selon leur polarité. Cependant la méthode n'est pas parfaitement adaptée au problème puisqu'une importante fraction (50 % équivalent COD) précipite en milieu acide et échappe à la caractérisation. Cette fraction contient une proportion importante des protéines des exo-polymères (environ les trois quarts). Leur présence dans cette fraction n'est pas surprenante, il est en effet connu que les protéines ont la propriété de précipiter au pH correspondant à leur point isoélectrique. Par conséquent, près des trois quarts des protéines exo-cellulaires des boues, de cet exemple, auraient leur point isoélectrique situé autour de pH 2. La présence de plus de 60 % des polysaccharides dans la fraction précipitée est par contre plus difficile à expliquer. Cela peut signifier, en accord avec Horan et Eccles (1986), qu'une

fraction importante des polysaccharides est associée aux protéines (glycoprotéine) ou à un autre type chimique non identifié (*e.g.* substances humiques) capable de précipiter à pH acide. Les protéines ont également pu entraîner dans leur précipitation certains polysaccharides.

La matière organique soluble à pH 2 contient 25 % des protéines et 40 % des polysaccharides et probablement de nombreux autres groupes chimiques tels que les acides gras et les substances humiques. La fraction soluble est répartie en trois fractions après filtration au travers des résines XAD. La comparaison des absorbances relatives aux UV de ces trois fractions permet d'appuyer le caractère plutôt hydrophobe des fractions XAD-8. En effet une forte absorbance dans l'UV indique un contenu élevé en doubles liaisons conjuguées et en composés aromatiques ; structures chimiques généralement couplées avec une hydrophobicité élevée (Aiken *et al.*, 1992). Les solutés de la fraction XAD-4 ont une absorption dans l'UV intermédiaire suggérant qu'ils ont tendance à être légèrement hydrophobes par rapport aux solutés de la fraction non adsorbée.

Le tiers des polymères ne s'adsorbe sur aucune des deux résines XAD et est alors considéré comme très hydrophile d'après la classification proposée par Aiken *et al.* (1992). La fraction XAD-4 moins hydrophile représente 10-15 % du COD total des exo-polymères. Une faible fraction de PEC peut être considérée comme hydrophobe puisque seulement 6 à 8 % du COD est présent dans la fraction XAD-8. L'absence de polysaccharides dans cette fraction renforce l'hypothèse qu'ils sont impliqués dans les propriétés hydrophiles du floc (Steiner *et al.*, 1976 ; Magara *et al.*, 1990). A l'inverse, seules les protéines se retrouvent dans la fraction hydrophobe montrant qu'elles participent aux propriétés hydrophobes du floc. Cependant, les substances humiques interfèrent dans le dosage des protéines par la technique de Lowry (Frølund *et al.*, 1995) et sont connues pour avoir une forte adsorption sur les résines XAD (Aiken *et al.*, 1992), il est probable que tout ou une partie des protéines obtenues dans la fraction XAD-8 correspondent en fait à des substances humiques.

Le fractionnement des solutés par les résines XAD peut se faire non seulement par interactions hydrophobes mais aussi par exclusion de taille. Le diamètre de pore élevé de la résine XAD-8 (25 nm) doit permettre de prendre en compte les macromolécules de poids moléculaire d'environ 100 kD à 400 kD (Aiken *et al.*, 1979). Cependant, si l'on considère l'analyse des poids moléculaires des PEC de boues activées rapportés dans la littérature qui varient de 20 kD à 2 000 kD (Forster, 1976 ; Kiff et Thompson, 1979 ; Sato et Ose, 1980 ; Novak et Haughan, 1981 ; Horan et Eccles, 1986), il est probable qu'une partie des PEC se retrouvent dans les filtrats XAD-8 et XAD-4 par des phénomènes d'exclusion de taille. Les limites d'exclusion de taille des résines XAD, et la distribution des poids moléculaires des PEC de la fraction soluble doivent donc être clairement décrites afin de conclure sur la répartition des différentes fractions des PEC au sein des résines XAD.

Le protocole de fractionnement sur résine XAD nécessite de placer l'échantillon en milieu acide, ce qui peut modifier les structures et les propriétés des exo-polymères et limite l'analyse à la moitié de l'échantillon, l'autre fraction ayant précipité. D'autres techniques, comme la chromatographie d'interaction hydrophobe, permettent de caractériser les propriétés hydrophiles/hydrophobes de solutés sans nécessairement modifier l'environnement ionique de l'échantillon et avec les mêmes

tailles de pores (Fuchs et Heidt, 1994). Appliquées aux PEC de boues activées ces techniques permettraient d'étudier la totalité des PEC sans avoir à acidifier le milieu.

III.5. Conclusion

Le mélange complexe d'hétéropolymères que représentent les PEC des boues activées a été divisé en 4 groupes dont les proportions se sont révélées extrêmement proches pour trois échantillons de boues activées d'origine différente. L'acidification à pH 2 de l'extrait de PEC provoque la précipitation de la moitié des polymères en terme de COD. La majorité des protéines (76 %) et des polysaccharides (60 %) se retrouvent dans cette fraction suggérant des associations entre les deux groupes chimiques comme c'est le cas des glycoprotéines. La filtration de la fraction soluble au travers de résine Amberlite montre que parmi les PEC certains possèdent des propriétés hydrophobes (6 à 8 % du COD). Les polysaccharides de la fraction soluble se révèlent surtout hydrophiles et les protéines sont partagées entre le compartiment hydrophile et le compartiment hydrophobe. Parmi les PEC existe donc une fraction qui présente des propriétés hydrophobes et qui est alors susceptible de participer au caractère hydrophobe des floccs de boues activées.

III.6. Références

- AIKEN G.R., D.M. McKNIGHT, K.A. THORN and E.M. THURMAN (1992) Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins, *Org. Geochem.*, **18**, 567-573.
- AIKEN G.R., E.M. THURMAN, R.L. MALCOLM and H.F. WALTON (1979) Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution, *Anal. Chem.*, **51**, 1799-1803.
- BOUE-BIGNE F. (1994) Caractérisation hydrophobe/hydrophile des polymères exo-cellulaires de boues activées, rapport de stage de DEA, Université Henri-Poincaré, Nancy 1, France.
- BLEICH U. and NEHRKORN A. (1989) Elektronenmikroskopische Darstellung extrazellulärer polymere Substanzen in Belebtschlammflocken, *Zbl. Hyg.*, **188**, 66-83.
- BROWN M.J. and J.N. LESTER (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 179-185.
- BRUUS J.H., P.H. NIELSEN and K. KEIDING (1992) On the stability of activated sludge floccs with implications to dewatering, *Wat. Res.*, **26**, 1597-1604.
- CARR D.F. and J.J. GANCZARCZYK (1974) Activated sludge exocellular material extraction methods and problems, *Proc. of : 9th Can. Symp. Wat. Pollut. Res.*, pp. 250-261.
- CROUE J.P., E. LEFEBVRE, B. MARTIN and B. LEGUBE. (1993) Removal of dissolved hydrophobic and hydrophilic organic substances during coagulation/flocculation of surface waters, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n°11, 143-152.
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- ERIKSSON L. and B. ALM (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 21-28.
- FITCH B. and P. KOS (1976) Toward a more meaningful index of sludge quality, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **48**, 1979-1987.
- FORSTER C.F. (1971) Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index, *Wat. Res.*, **2**, 767-776.
- FORSTER C.F. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process, *Water SA*, **2**, 119-125.
- FRØLUND B. and KEIDING K. (1994) Implementation of an HPLC polystyrene divinylbenzene column for separation of activated sludge exopolymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 708-716.
- FRØLUND B., PALMGREN R., KEIDING K. and NIELSEN P. (1995) Strategies for extraction of activated sludge

- exopolymers by cation exchange. Soumis à publication in :*Wat. Res.*
- GOODWIN J.A.S. and C.F. FORSTER (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics, *Wat. Res.*, **19**, 527-533.
- HEUKELEKIAN H. and E. WEISBERG (1956) Bound water and activated sludge bulking, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **28**, 558-574.
- HORAN N.J. and C.R. ECCLES (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges, *Wat. Res.*, **20**, 1427-1432.
- JENKINS D., M.G. RICHARD and G.T. DAIGGER (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton, 193 pages.
- JORAND F., ZARTARIAN F., THOMAS F., BLOCK J.C., BOTTERO J.-Y., VILLEMIN G., URBAIN V. and MANEM J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **29**, 1639-1647.
- KAMOUN P. (1974) Appareils et méthodes en biochimie, Flammarion, Paris, p. 45-58.
- LI D.H. and J.J. GANCZARCZYK (1990) Structure of activated sludge flocs, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 57-65.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAGARA Y., S. NAMBU and UTOSAWA K. (1976) Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics, *Wat. Res.*, **10**, 71-77.
- MALCOLM R.L., E.M. THURMAN and G.R. AIKEN. (1977) The concentration and fractionation of trace organic solutes from natural and polluted waters using XAD-8, a methylmethacrylate resin, *Proc. of: Trace Substances In Environmental Health-XI*, D.D. HEMPHILL, ed., University of Missouri, Columbia, pp. 307-314.
- MALCOM R.L. and McCARTHY P. (1992) Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water, *Environ. Int.*, **18**, 597-607.
- PAVONI J.L., TENNEY M.W. and ECHELBERGER W.F. Jr (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **44**, 414-431.
- RAUNKJÆR K., HVITVED-JACOBSEN T. and NIELSEN P. H. (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrates and lipid in domestic wastewater, *Wat. Res.*, **28**, 251-562.
- RUDD T., STERRITT M. and LESTER J.N. (1983) Extraction of extracellular polymers from activated sludge, *Biotechnol. Lett.*, **5**, 327-332.
- SATO T. and OSE Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxyde solutions, *Wat. Res.*, **14**, 333-338.
- STEINBERG C. and MUENSTER U. (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater, in *Humic substances in soil, sediment and water*, Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L. and McCarthy P. eds., John Wiley & sons, New York, p. 105-145.
- STEINER A.E., McLAREN D.A. and FORSTER C.F. (1976) The nature of activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **10**, 25-30.
- THURMAN E.M. and G.R. MALCOLM (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Tech.*, **15**, 463-466.
- THURMAN E.M., R.L. MALCOLM and G.R. AIKEN. (1978) Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrylic resin, *Anal. Chem.*, **50**, 775-779.
- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.
- VALIN S.D. and D.J. SUTHERLAND (1982) Predicting bioflocculation : new developments in the application of flocculation theory, *Environ. Technol. Lett.*, **3**, 363-374.
- VALLOM J.K. and A.J. McLOUGHLIN (1984) Lysis is a factor in sludge flocculation, *Wat. Res.*, **18**, 1523-1528.

IV. ADSORPTION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DES EAUX USEES PAR LES FLOCS BACTÉRIENS

IV.1. Introduction.....	120
IV.2. Caractérisation hydrophobe/hydrophile de la matière organique soluble des eaux usées.	121
IV.2.1. Introduction.....	121
IV.2.2. Matériel et méthodes.....	122
IV.2.2.1. Prélèvements	122
IV.2.2.2. Conditionnement des résines Amberlites	122
IV.2.2.3. Dosage du carbone organique dissous	123
IV.2.2.4. Mesure de l'absorbance aux UV	123
IV.2.2.5. Fractionnement de la matière organique dissoute	123
IV.2.3. Résultats	124
IV.2.3.1. Mise en évidence de l'absence de fraction précipitée à pH acide.....	124
IV.2.3.2. Analyse d'une courbe de percée.....	125
IV.2.3.3. Fractions hydrophobes et hydrophiles	126
IV.2.4. Discussion.....	129
IV.3. Propriétés de biosorption des floes de boues activées.....	131
IV.3.1. Introduction.....	131
IV.3.2. Matériel et méthodes.....	131
IV.3.2.1. Prélèvement des échantillons.....	131
IV.3.2.2. Caractérisation des échantillons	131
IV.3.2.3. Concentration des boues.....	132
IV.3.2.4. Dosage des matières en suspension des influents.....	132
IV.3.2.5. Mesure de la biosorption	132
IV.3.2.6. Estimation des paramètres cinétiques de la biosorption	134
IV.3.3. Résultats	135
IV.3.3.1. Caractéristiques des échantillons de boues activées.....	135
IV.3.3.2. Effet de la charge sur la biosorption.....	136
IV.3.3.3. Effet de la température et du stockage des échantillons sur la biosorption.....	137
IV.3.3.4. Biosorption et caractéristiques physico-chimiques des boues	138
IV.3.4. Discussion.....	139
IV.4. Conclusions et perspectives	141
IV.5. Références.....	141

IV.1. Introduction

Parmi les mécanismes qui intéressent l'épuration des eaux usées par le procédé "boues activées", l'adsorption des composés de la matière organique sur les flocs peut occuper une place importante. Elle permet d'éliminer la pollution de la phase eau et peut être considérée comme une forme de stockage des nutriments pour la biomasse. L'adsorption par les flocs concerne aussi bien les particules colloïdales que les substances dissoutes (Torrijos *et al.*, 1994). C'est un phénomène rapide qui selon certains auteurs se réalise durant les 10 à 30 premières minutes du contact entre l'influent (eaux usées prédécantées) et les boues (Rensink et Donker, 1991 ; Pujol et Canler, 1992) ou même dure quelques heures (Tsezos et Bell, 1989).

Les facteurs qui gouvernent les propriétés d'adsorption des flocs sont probablement multiples et vont dépendre des propriétés des flocs et des eaux usées. La quantité d'adsorption d'un soluté par une boue activée (Matter-Müller *et al.*, 1980 cités par Boller, 1993 ; Tsezos et Bell, 1989 ; Struijs *et al.*, 1991) est proportionnelle à l'hydrophobicité (k_{ow}) du composé. Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, d'études décrivant la composition des eaux usées par rapport aux propriétés hydrophobes/hydrophiles des différents composés. Avant d'étudier les propriétés de biosorption des boues activées, nous nous proposons de caractériser les eaux usées selon les propriétés hydrophobes/hydrophiles de la matière organique qu'elles contiennent. La technique choisie est le fractionnement par filtration au travers de résines Amberlites hydrophobes déjà utilisée par Croué *et al.* (1993) pour des eaux naturelles. La connaissance de la composition en substances hydrophobes/hydrophiles des eaux usées permettra d'une part de mieux caractériser les eaux usées et d'autre part de déterminer si, du fait des propriétés des boues, la fraction hydrophobe est préférentiellement éliminée par le traitement.

La deuxième partie de ce chapitre traite des propriétés de biosorption des boues activées. Nous avons cherché à optimiser un test permettant de quantifier le phénomène de biosorption. Puis après application de ce test à 10 échantillons de boues issues d'une station d'épuration et d'un réacteur pilote, les propriétés de biosorption ont été comparées avec d'autres caractéristiques physico-chimiques des boues activées telles que leur hydrophobicité intrafloc, leur décantabilité ou leur contenu en polymères exo-cellulaires (PEC).

IV.2. Caractérisation hydrophobe/hydrophile de la matière organique soluble des eaux usées

IV.2.1. Introduction

De nombreux travaux décrivent les eaux usées urbaines selon la taille, la nature chimique ou encore la biodégradabilité des composés de la matière organique (*e.g.* Levine *et al.*, 1991 ; Henze, 1992 ; Nielsen *et al.*, 1992 ; Boller, 1993). Cependant leur caractérisation selon leurs propriétés hydrophiles/hydrophobes n'est pas connue contrairement aux eaux naturelles (Mantoura et Riley, 1975 ; Malcolm *et al.* 1977 ; Leenheer, 1981 ; Malcolm et McCarthy, 1992 ; Croué *et al.*, 1993 ; Fuchs et Heidt, 1994). L'application des techniques utilisées pour la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de la matière organique des eaux naturelles permettrait de compléter nos connaissances quant à la composition et les propriétés de la matière organique des eaux usées. Ces techniques font appel aux propriétés hydrophobes des résines macroporeuses non ioniques de type XAD qui à l'origine ont surtout été utilisées pour extraire les polluants organiques hydrophobes des sols ou des eaux (Grieser et Pietrzyk, 1973 ; Infante *et al.*, 1993). La méthode s'est rapidement révélée efficace pour concentrer les substances humiques aquatiques (Mantoura et Riley, 1975) considérées comme les principaux composés hydrophobes des eaux naturelles (Aiken, 1985). Aiken *et al.* (1979) comparant plusieurs résines, conclurent que la résine XAD-8, ayant le plus fort diamètre de pore (> 25 nm), est la plus efficace pour extraire les macromolécules hydrophobes de type humique. Thurman et Malcolm (1981) établirent alors un protocole qui permet de séparer, en milieu acide (pH 2), la matière organique dissoute en deux fractions l'une comprenant les solutés adsorbés sur la résine XAD-8 ("acides hydrophobes" ou "neutres") et l'autre les solutés non adsorbés ("substances hydrophiles").

Les bases hydrophobes ne sont pas prises en compte. En effet, celles-ci portant théoriquement des charges positives en milieu acide, elles ne sont pas retenues par les résines. Leenheer (1981) montre que leur proportion est négligeable dans les eaux naturelles.

Afin de compléter la caractérisation de la fraction hydrophile, Malcolm et McCarthy (1992) placèrent une résine XAD-4 à la suite de la résine XAD-8. Ils définirent la fraction adsorbée sur la résine XAD-4 "fraction hydrophile acide" et la fraction non adsorbée "fraction hydrophile non acide". La résine XAD-4 est de nature encore plus hydrophobe (divinyl benzène) que la résine XAD-8 (ester acrylique) (voir les caractéristiques des résines données par le Tableau III—1, p. 108), l'appellation "hydrophile" des solutés adsorbés sur cette résine paraît donc discutable. Cependant, l'étude des différentes fractions adsorbées sur les deux résines (après élution par la soude 0,1 M) révèle bien, par spectrométrie UV, IR ou RMN du ^{13}C et par analyse élémentaire (contenu en C, H, O et N), que la fraction XAD-4 est nettement plus hydrophile que la fraction XAD-8 (Leenheer, 1981 ; Aiken *et al.*, 1992 ; Croué *et al.*, 1993). La fraction XAD-4 correspondrait aux petites molécules présentant une

ou plusieurs fonctions carboxyles (neutres à pH acide) avec un pôle hydrophobe comme une courte chaîne aliphatique (moins de 5 atomes de carbone tel l'acide butyrique) ou comme un cycle aromatique (*e.g.* acide benzoïque) (Aiken *et al.*, 1992). La surface spécifique élevée de la résine XAD-4 la rendrait alors capable d'adsorber ce type de molécules, non retenues par la résine XAD-8 car trop solubles dans l'eau du fait de leur petite taille et de la présence de fonction(s) hydrophile(s) (Aiken *et al.*, 1992).

Les substances humiques semblent être en concentrations plus faibles dans les eaux usées (Croué *et al.*, 1993) que dans les eaux naturelles (Nielsen *et al.*, 1992) mais de nombreux autres composés telles que des lipides, des protéines, des surfactants ou des acides gras présents en quantités relativement importantes sont susceptibles de présenter des propriétés hydrophobes et d'être adsorbés par les résines XAD. La technique de filtration par les résines XAD apparaît alors comme un outil intéressant pour caractériser la matière organique dissoute des eaux usées. L'objectif de cette étude est d'évaluer le compartiment hydrophobe de la matière organique des eaux usées en utilisant les résines XAD. La technique nécessitant de placer l'échantillon en milieu acide, l'absence de fraction précipitée a tout d'abord été mise en évidence. Puis la matière organique dissoute de 8 échantillons d'influent (eaux usées prédécantées) et 6 échantillons d'effluent (eaux usées épurées) a été fractionnée au travers des résines XAD-8 et XAD-4 en trois groupes de polarité différente. Les échantillons ont été prélevés à différentes dates à partir de la station d'épuration de Maxéville. Afin de déterminer si un des trois groupes de polarité est préférentiellement éliminé par le traitement d'épuration, la composition des eaux usées en entrée et en sortie de la station est comparée.

IV.2.2. Matériel et méthodes

IV.2.2.1. Prélèvements

Les influents ont été prélevés à la station de Maxéville à partir du canal d'alimentation des bassins d'aération de boues activées (*i.e.* en sortie de décantation primaire des eaux usées) du pilote (cf. Chap. V) ou de la station ; les effluents ont été prélevés à partir des déversoirs des clarificateurs secondaires de la station ou du pilote. Les échantillons ont été stockés dans des récipients en polycarbonate à $+ 4 \pm 1^\circ\text{C}$ 30 min après leur prélèvement et ont été utilisés 1 à 12 h après leur réception.

IV.2.2.2. Conditionnement des résines Amberlites

Les résines Amberlites XAD-8 et XAD-4 (Rhom et Haas) sont purifiées afin d'éliminer les monomères de synthèse, les fines et les agents conservateurs. La procédure de lavage qui a été suivie est celle décrite par Croué *et al.* (1993) adaptée de Malcolm (1991) (voir chap. III). Après conditionnement, la concentration en COD (carbone organique dissous) en sortie des colonnes était toujours inférieure à $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

IV.2.2.3. Dosage du carbone organique dissous

Le carbone organique dissous (COD) est déterminé selon la méthode décrite au chapitre III sur des échantillons filtrés au travers de filtres de 0,45 µm de porosité préalablement rincés par 250 mL d'eau ultrapure. Afin de limiter la quantité de matière organique à oxyder, les échantillons ont été préalablement dilués par de l'eau ultrapure jusqu'à ce que la concentration en COD à doser soit comprise entre 5 et 10 mg L⁻¹.

IV.2.2.4. Mesure de l'absorbance aux UV

L'absorbance aux UV est réalisée à une longueur d'onde de 270 nm dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique (spectrophotomètre U 2000, Hitachi).

IV.2.2.5. Fractionnement de la matière organique dissoute

Préparation des échantillons

Après préfiltration au travers de membrane en fibre de verre de 1,1 µm de porosité (GFC, Whatman), 2 à 2,5 L d'échantillon sont filtrés au travers de membranes de 0,45 µm de porosité (Durapore HVLP04700, Millipore) par série de 250 mL. Les échantillons sont ensuite acidifiés à pH 2 avec une solution d'HCl 35 % (20 248.320, Prolabo) et sont conservés une nuit à $+4 \pm 1^\circ\text{C}$ à l'obscurité avant d'être filtrés au travers des résines XAD-8 et XAD-4. La concentration en COD est ajustée si nécessaire à 25 mg L⁻¹ par dilution avec une solution d'HCl 0,01 M.

Protocole de filtration au travers des résines

2 L d'échantillon sont filtrés par les résines placées en série selon la méthode de Aiken *et al.* (1992) modifiée par Croué *et al.* (1993). Les caractéristiques des résines et la procédure de filtration sont décrites au chapitre III. Le schéma du protocole suivi est rappelé par la Figure III-1. Au moins cinq prélèvements de 20 mL environ sont effectués en sortie de chaque colonne.

Détermination des fractions

Lorsque la concentration en COD (ou l'absorbance UV) en sortie de colonne est stable (pseudo-plateau), la concentration moyenne en COD (ou l'absorbance UV moyenne) des fractions adsorbées est calculée par différence entre les valeurs obtenues en entrée avec les valeurs obtenues en sortie (Figure IV-1).

Selon la nomenclature de Aiken *et al.* (1992) et Croué *et al.* (1993) la fraction XAD-8 correspond aux solutés ayant un caractère "hydrophobes", la fraction XAD-4 représente les solutés "hydrophiles acides" et la fraction non adsorbée représente les solutés "hydrophiles non acides" (Figure IV-1).

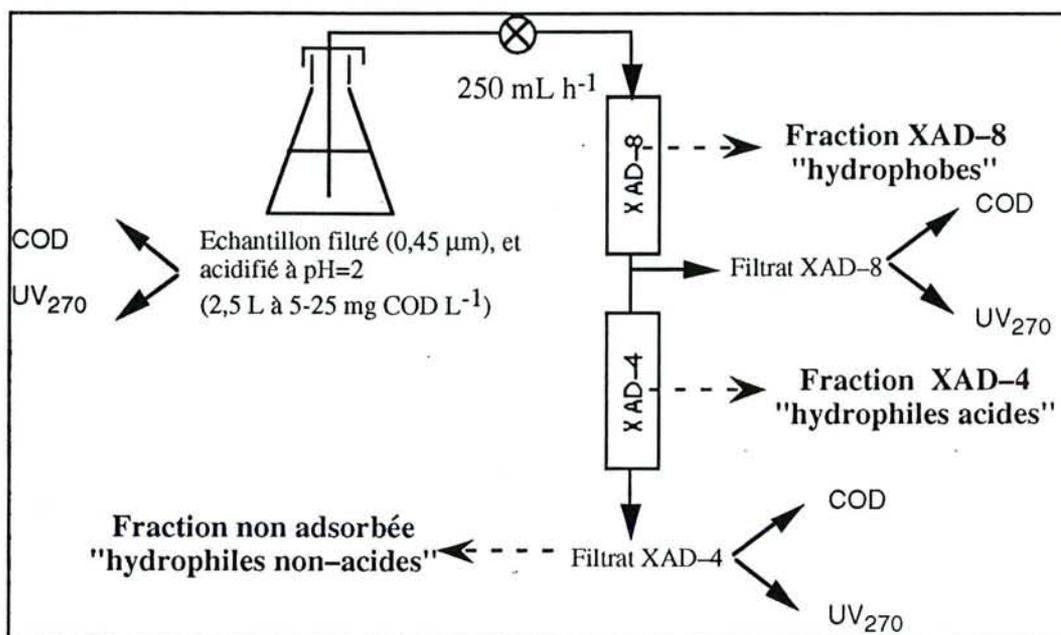


Figure IV-1 : Schéma du protocole de fractionnement des influents ou effluents par filtration au travers des résines XAD-8 et XAD-4 placées en série. COD = carbone organique dissous.

Mise en évidence de l'absence de fraction précipitée à pH acide

La présence d'une fraction de la matière organique ayant précipité sous l'effet de l'acidification a été recherchée. Un influent prélevé à la station d'épuration a été utilisé. 100 mL de l'influent (préfiltré et filtré, § IV.2.2.5) sont acidifiés (HCl, pH=2) et sont placés sous agitation orbitale (180 rpm) à + 4°C. Parallèlement, un témoin non acidifié est réalisé. Après 12 h, les échantillons sont centrifugés 40 min à 20 000g, 15 mL du surnageant sont prélevés et le COD est dosé. La différence entre l'essai et le témoin donne la fraction de COD ayant précipité.

IV.2.3. Résultats

IV.2.3.1. Mise en évidence de l'absence de fraction précipitée à pH acide

La concentration en COD des filtrats XAD et de l'échantillon dans le flacon d'alimentation a été suivie au cours de la filtration d'un influent acidifié 1 h avant filtration sur résine (Figure IV-2). Au cours des premières heures de filtration la concentration en COD de l'influent (alimentation) passe de 30 mg L⁻¹ à 20 mg L⁻¹ environ et se stabilise après 4 h de filtration soit environ 5 h après acidification de l'échantillon (Figure IV-2). Il est probable que l'acidification entraîne la précipitation d'une fraction du COD ce qui expliquerait la diminution du COD observée dans la Figure IV-2. Pour vérifier cette hypothèse des essais ont été réalisés à partir de deux influents où la fraction précipitable à pH 2 est recherchée. Plusieurs heures après avoir été acidifiés, les échantillons d'influent sont centrifugés afin d'éliminer tout précipité éventuel.

La concentration en COD obtenue dans les surnageants n'est cependant pas différente de celle

de témoins non acidifiés (Tableau IV-1). L'origine de la baisse de concentration en COD n'est donc pas expliquée par une précipitation de la matière organique causée par un environnement acide. Par sécurité, les influents acidifiés ont par la suite été stockés pendant 12 h à + 4°C afin de stabiliser leur concentration en COD avant l'étape de filtration sur les résines.

Tableau IV-1 : Teneurs en COD de surnageants d'échantillons acidifiés ou non et centrifugés 12 h après agitation (180 rpm) à + 4°C.

Echantillon	Essai 1 (n=3)	Essai 2 (n=3)
acidifié	18,9±0,1 mg L ⁻¹	19,6±0,2 mg L ⁻¹
non acidifié (témoin)	18±2 mg L ⁻¹	20±0,2 mg L ⁻¹

IV.2.3.2. Analyse d'une courbe de percée

Entre 0 et 400 mL de volume filtré la concentration en COD des filtrats XAD augmente rapidement signalant la sortie des solutés non adsorbés par les résines et s'équilibre entre 500 et 1000 mL de volume filtré. Une très légère augmentation du COD est constaté après filtration de 500 mL filtrés (Figure IV-2).

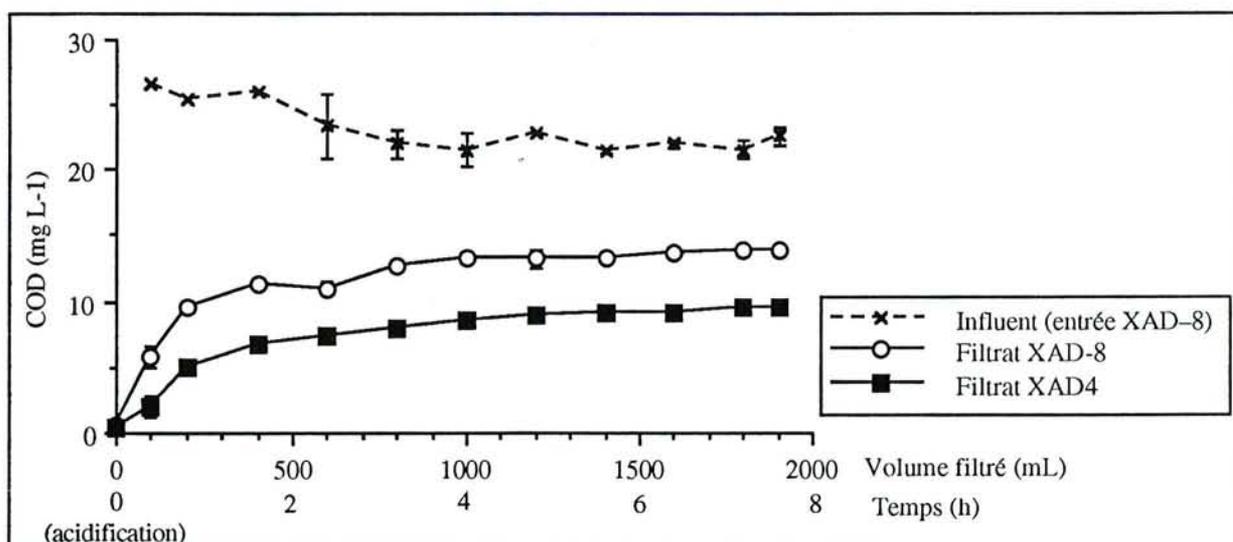


Figure IV-2 : Suivi de la concentration en COD d'un échantillon dans le flacon d'alimentation (entrée XAD-8) et des filtrats XAD-8 et XAD-4 d'un influent prélevé à partir de la station d'épuration (prélèvement de Juin 93, Tableau IV-2). Le fractionnement de l'influent au travers des résines a exceptionnellement commencé immédiatement après l'étape d'acidification (voir matériel et méthodes). Les barres verticales correspondent à l'écart-type calculé sur la moyenne de deux essais réalisés en parallèle.

La relative stabilité des concentrations en COD des filtrats XAD permet de classer les solutés en 3 groupes : i) solutés adsorbés par la résine XAD-8 = fraction XAD-8 ("hydrophobes neutres et hydrophobes acides"), ii) solutés adsorbés par la résine XAD-4 = fraction XAD-4 ("acides hydrophiles") et , iii) solutés non adsorbés = fraction non adsorbée ("hydrophiles non acides"). A partir de 1000 mL de volume filtré chacune de ces fractions est déterminée. Les faibles écart-types obtenus (Figure IV-2) indiquent la bonne répétabilité de la méthode.

IV.2.3.3. Fractions hydrophobes et hydrophiles

Huit influents et six effluents prélevés à la station de Maxéville ont été filtrés au travers des résines XAD-8 et XAD-4 montées en séries. Les prélèvements ont eu lieu entre Juin 1993 et Mai 1994 à différentes heures de la journée (Tableau IV-2). Les teneurs en COD des influents varient de 9,05 à 46,5 mg L⁻¹ selon l'heure de prélèvement (Tableau IV-2a) mais la répartition de la matière organique entre les différentes fractions "XAD-8", "XAD-4" et "non adsorbée" est *grosso modo* la même pour tous les échantillons au vu des écart-types relativement faibles (Figure IV-3). Les fractions non adsorbées et les fractions XAD-8 sont équivalentes en proportion et représentent chacune 40-45 % du COD de l'influent. La fraction XAD-4 est minoritaire et ne représente que 14 % environ du COD de l'influent (Figure IV-3).

Les effluents ont été prélevés pour la plupart en sortie de décanteur secondaire d'un réacteur pilote installé sur le site sauf pour l'échantillon du 9/05/1994 qui a été prélevé à partir du décanteur secondaire de la station. Leurs teneurs en COD varient de 5,8 à 8,5 mg L⁻¹ (Tableau IV-2b). Comme les influents la répartition de la matière organique dissoute au sein des fractions XAD est relativement constante d'un prélèvement à l'autre mais est légèrement différente de celle de l'influent (Figure IV-3). Ainsi la fraction XAD-4 est significativement plus élevée au seuil de probabilité 0,05 que dans le cas de l'influent (20 ± 3 % contre 14 ± 4 %). Les deux autres fractions (XAD-8 et non adsorbée) ont par contre les mêmes proportions que celles de l'influent.

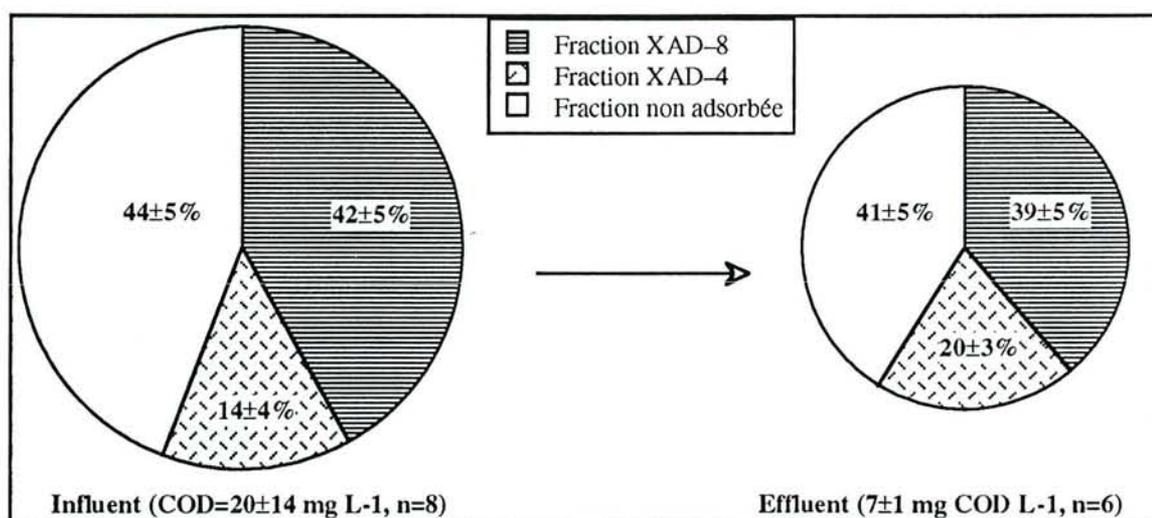


Figure IV-3 : Répartition moyenne de la matière organique dissoute au sein des différentes fractions hydrophobes / hydrophiles des influents et des effluents prélevés à partir du pilote et de la station de Maxéville. La fraction précipitée est indétectable.

Tableau IV-2 : Concentration et répartition du carbone organique dissous (COD) des influents et des effluents au sein des différentes fractions hydrophobes/hydrophiles obtenues par filtration au travers des résines XAD-8 et XAD-4. Les effluents sont filtrés au travers de filtres de 0,45 µm de porosité après préfiltration au travers de filtres en fibre de verre de 1,1 µm de porosité (GFC, Whatman). a) Caractéristiques des effluents primaires ou influents (eaux usées dégrillées, dégraissées en sortie de décanteur primaire) prélevés à la station d'épuration de Maxéville, alimentant directement les bassins aérés de boues activées de la station et du pilote, b) caractéristiques des effluents secondaires (en sortie de décanteur secondaire) du pilote excepté pour le prélèvement du 9/05/1994 qui provient de la station.

a) INFLUENTS

<i>date et heure de prélèvement</i>	<i>Jun-93 9h</i>	<i>8-Jul-93 9h</i>	<i>19-Jul-93 9h</i>	<i>23-Jul-93 10h</i>	<i>8-Mar-94 9h</i>	<i>10-Mar-94 9h</i>	<i>29-Mar-94 12h</i>	<i>9-Mai-94 14h</i>
COD (mg L⁻¹)	22±2	17,8±0,7(a)	10,0±0,2	13,2±0,1	9,05±0,56	10,3±0,1	34,1±0,7	46,5±1,3
Fraction XAD8								
mg COD L ⁻¹	8,6±0,7	8,8±0,4	4,4±0,3	6,2±0,1	3,9±0,3	4,2±0,2	11,6±0,6	18,5±1
% du COD total	39%	49%	44%	47%	43%	41%	34%	40%
Fraction XAD4								
mg COD L ⁻¹	4,5±0,2	1,6±0,2	1,5±0,2	1,8±0,2	0,7±0,2	1,9±0,2	4,4±0,6	6,6±0,8
% du COD total	20%	9%	15%	14%	8%	18%	13%	14%
Fraction non adsorbée								
mg COD L ⁻¹	9,1±0,5	7,3±0,6	4,1±0,3	5,3±0,1	4,4±0,5	4,2±0,2	18,1±1,0	21,5±0,6
% du COD total	41%	41%	41%	40%	49%	41%	53%	46%

b) EFFLUENTS

<i>date et heure de prélèvement</i>	<i>Jun-93 9h</i>	<i>8-Jul-93 9h</i>	<i>19-Jul-93 9h</i>	<i>23-Jul-93 10h</i>	<i>8-Mar-94 9h</i>	<i>10-Mar-94 9h</i>	<i>29-Mar-94 16h30</i>	<i>9-Mai-94 14h</i>
COD (mg L⁻¹)	—	8,1±0,2	6,4±0,1	5,8±0,2	6,6±0,5	7,3±0,5	8,5±0,2	7,8±0,2
Fraction XAD8								
mg COD L ⁻¹	—	2,5±0,1	3,0±0,2	—	2,4±0,5	3,1±0,3	3,3±0,2	3,1±0,2
% du COD total	—	31%	47%	—	36%	42%	39%	40%
Fraction XAD4								
mg COD L ⁻¹	—	1,4±0,6	1,1±0,0	—	1,6±0,5	1,3±0,4	1,8±0,2	1,8±0,2
% du COD total	—	17%	18%	—	25%	18%	21%	23%
Fraction non adsorbée								
mg COD L ⁻¹	—	4,1±0,6	2,4±0,3	—	2,5±0,3	2,9±0,6	3,4±0,3	2,9±0,2
% du COD total	—	51%	37%	—	39%	40%	40%	37%

(a) = moyenne et écarts types de 4 à 5 dosages indépendants

Absorbance aux UV

En plus du dosage du COD, l'absorbance aux UV₂₇₀ des filtrats XAD et de l'échantillon non filtré ont été réalisés pour l'influent et l'effluent du 9 Mai 1994. L'absorbance théorique des fractions XAD est exprimée en unité d'absorbance L g⁻¹ de COD (Tableau IV-3). Les fractions qui absorbent le plus intensément dans l'UV sont en ordre décroissant les fractions XAD-8, les fractions XAD-4 et

les fractions non adsorbées. Les solutés de l'effluent absorbent plus que ceux de l'influent (10,4 unités contre 7,4), surtout en ce qui concerne les fractions adsorbées où les solutés de l'effluent absorbent presque deux fois plus dans l'UV que ceux de l'influent (Tableau IV-3). Les fractions XAD-8 de l'influent et de l'effluent se différencient de plus par leur couleur. En effet, les résines XAD-8 prennent une couleur saumon après filtration de l'influent tandis que les résines ayant filtré l'effluent prennent une couleur brunâtre. Ces résultats suggèrent que les fractions XAD de l'effluent sont qualitativement différentes de celles de l'influent.

Tableau IV-3 : Absorbances aux UV rapportées au g de COD des différentes fractions obtenues par filtration de l'influent au travers des résines XAD. Les valeurs correspondent aux moyennes et écarts types sur les essais A et B.

	Influent (unité DO ₂₇₀ g ⁻¹ COD L)	Effluent (unité DO ₂₇₀ g ⁻¹ COD L)
Entrée	7,3	10,4
Fraction XAD-8	10,6	20,6
Fraction XAD-4	6,1	12,8
Fraction non adsorbée	5,1	7,0

Rendement d'épuration

Le prélèvement du 29/03/1994 a été réalisé de manière à ce que le temps qui sépare le prélèvement de l'influent de celui de l'effluent corresponde au temps de séjour hydraulique soit environ 4 h 30. Ainsi il est possible d'estimer la proportion de COD éliminé par le réacteur pilote (rendement d'épuration) peut être estimée (Tableau IV-4).

Tableau IV-4 : Pourcentage d'élimination des fractions XAD par le réacteur pilote pour le prélèvement du 29/03/1994. L'effluent a été prélevé environ 4 h 30 min après l'influent ce qui est proche du temps de séjour hydraulique du bassin aérée et du décanteur (environ 4 h). Les concentrations en COD des différentes fractions sont également indiquées.

	Fraction XAD-8	Fraction XAD-4	Fraction non adsorbée	COD total
Influent (mg COD L ⁻¹)	11,6	4,4	18,1	34
Effluent (mg COD L ⁻¹)	3,3	1,8	3,4	8,5
% COD éliminé : $\frac{(Influent - Effluent)}{Influent} \times 100$	71 %	59 %	81 %	72 %

Le rendement d'épuration du COD est alors de 72 %. En considérant chaque fraction on peut noter que ces 72 % proviennent de 71 % de la fraction XAD-8, de 59 % de la fraction XAD-4 et de 81 % de la fraction non adsorbée (Tableau IV-4). La fraction XAD-4 apparaît donc comme la fraction la moins bien éliminée par le traitement d'épuration. Le même calcul appliqué aux cinq autres échantillons, sans tenir compte des heures de prélèvement, montre que la fraction XAD-4 est systématiquement la fraction la moins bien éliminée et que les deux autres fractions (XAD-8 et non

adsorbées) sont les mieux éliminées. Cependant, le calcul ne tient pas compte de la matière organique éventuellement produite par le traitement d'épuration (arrachage du floc, synthèses microbiennes...).

IV.2.4. Discussion

Le fractionnement de la matière organique soluble des eaux usées (station de Maxéville) par les résines XAD montrent une proportion plus importante en substances hydrophiles (40 % pour la fraction non adsorbée et 15–20 % du COD pour la fraction XAD-4) par rapport aux eaux de surfaces (15–20 % du COD pour chacune des fractions non adsorbée et XAD-4 (Malcolm, 1991 ; Croué *et al.*, 1993). La forte proportion de substances hydrophiles dans les eaux usées peut provenir des polysaccharides ou des protéines qui représentent à eux seuls 20 à 70 % du COD soluble (Nielsen *et al.*, 1992 ; Boller, 1993). Dans les eaux de surface, les composés hydrophobes (40 à 55 % du COD) sont représentés à 90 % par les substances humiques (Malcolm, 1991). Dans les eaux usées, la fraction XAD-8 est également susceptible de contenir des substances humiques, leur présence ayant déjà été rapportée (Nielsen *et al.*, 1992 ; Boller, 1993), mais aussi des acide gras, des surfactants, des hydrocarbures et peut-être des protéines (cf. chapitre III). Du fait de leur faible concentration et de la faible sensibilité des méthodes de dosage, il nous a été impossible de déterminer la part en protéines, polysaccharides ou acides nucléiques présent dans chacune des fractions comme cela avait pu être partiellement réalisé avec les polymères exo-cellulaires des boues activées (cf. chapitre III).

En accord avec les résultats de Croué *et al.* (1993) et Fuchs et Heidt (1994) les rapports UV/COD des fractions augmentent avec leur polarité. Ce qui d'une certaine manière permet de renforcer, mais non pas de confirmer, le classement par ordre d'hydrophilicité décroissante des fractions XAD-8, XAD-4 et non-adsorbée. En effet, les double liaisons conjuguées sont responsables de la forte absorbance aux UV de la plupart des molécules et leur présence est généralement associée à un caractère hydrophobe. Les macromolécules capables d'avoir une absorbance élevée dans l'UV sont les acides nucléiques, les protéines, les acides humiques et certains acide gras. Toutes ces molécules sont susceptibles de se retrouver dans les fractions adsorbées par les résines et en particulier par les résines XAD-8. Celles-ci présentent une taille de pore élevée ce qui rend possible l'adsorption des macromolécules (Aiken *et al.*, 1979). La faible absorbance dans l'UV de la fraction non-adsorbée peut s'expliquer par leur contenu en solutés de type polysaccharides qui ont habituellement un caractère hydrophile et qui absorbent peu dans l'UV. La fraction XAD-4 contient les petites molécules telles que les acides gras volatiles ou certains acides aromatiques (Aiken *et al.*, 1992).

Pour les mêmes raisons que pour les polymères exo-cellulaires, il est probable que la séparation entre les différentes macromolécules soit dans certains cas gouvernée par l'exclusion de taille et non par leur caractère hydrophobe. Cependant, la majorité de la matière organique "dissoute" (<0,1 μm) aurait selon Levine *et al.* (1985) cités par Nielsen (1992) un poids moléculaire inférieure à 20 kD ce qui est loin de la limite d'exclusion de taille des résines XAD-8 (25 nm au moins soit près de 400 kD)

(Aiken *et al.*, 1979). Mais en ce qui concerne les effluents (eau clarifiée), la taille des substances dissoutes serait plus élevée du fait de la présence de nombreux "produits microbiens" selon Boller (1993) et Jeong et Capdeville (1994) et dans ce cas les risques de séparation par exclusion de taille semblent plus importants que pour l'influent.

Les calculs de rendement apparent d'élimination des fractions montrent que la fraction XAD-4 est la moins bien éliminée, alors que les fractions hydrophobes XAD-8 et non-adsorbée sont éliminées aussi bien l'une que l'autre. Le caractère hydrophobe n'apparaît pas, alors comme le seul facteur favorisant l'élimination de la pollution dissoute par les boues activées. Cependant les fractions XAD de l'influent et de l'effluent se sont révélées qualitativement différentes par leur coloration et par leur absorbance relative aux UV. Cela suggère en accord avec Jeong et Capdeville (1994) que la matière organique de l'influent s'est transformée au cours du traitement et qu'elle provient au moins en partie de la biomasse. Par conséquent il ne nous est pas possible de discerner la matière organique éliminée par le traitement de celle produite par la biomasse.

L'application de la technique de fractionnement de la matière organique par les résines XAD à la caractérisation des eaux usées a permis de mettre en évidence la présence dans les eaux usées d'une fraction importante de matière organique dissoute présentant un caractère hydrophobe sous un pH acide. Ainsi près de 60 % de la matière organique soluble des eaux usées est capable à pH acide d'être adsorbée par un support hydrophobe. Néanmoins les conditions opératoires (pH 2) sont loin des conditions réelles (pH de 7 à 8,5 des boues activées) et il serait intéressant de connaître la proportion de la matière organique des eaux usées présentant un caractère hydrophobe au pH des boues. Pour cela, l'utilisation de la chromatographie d'interaction hydrophobe qui ne nécessite pas de travailler à pH acide pourrait s'avérer utile (Fuchs et Heidt, 1994).

IV.3. Propriétés de biosorption des flocs de boues activées

IV.3.1. Introduction

Lors du contact entre la boue biologique avec l'eau usée, une fraction de la matière organique (dissoute, particulaire et colloïdale) transportée par l'influent est rapidement éliminée de la phase eau (moins d'une heure). Parce que le matériel impliqué est de nature biologique, le phénomène est appelé "biosorption", mais les mécanismes mis en jeu sont inconnus. Selon Pujol et Canler (1992) la biosorption serait la somme de l'adsorption et de l'absorption de la matière organique, *de facto* le phénomène serait gouverné par des mécanismes biologiques et physiques. Cependant d'autres auteurs ont montré que l'élimination rapide de xénobiotiques (lindane, pentachlorophénol...) de la phase eau des boues activées était liée à un mécanisme physique plutôt que biologique (Tsezos et Wang, 1991). Torrijos *et al.* (1994) montrent qu'une fraction soluble ($<0,1 \mu\text{m}$) et une fraction colloïdale ($0,1 \mu\text{m} < <50 \mu\text{m}$) sont également éliminées selon un processus physique probablement d'adsorption.

Pujol et Canler (1992) observent que la biosorption augmente avec la présence de bactéries filamenteuses et avec l'altération de la décantabilité des boues. La structure des flocs est liée à leur décantabilité (Li et Ganczarzyk, 1986) et pourrait dans certains cas être en effet à l'origine des variations des propriétés de biosorption des boues par modification de la porosité par exemple. Dans un premier temps, notre étude s'est limitée à évaluer le phénomène de biosorption des boues activées au travers de paramètres cinétiques (constante de vitesse et vitesses initiales d'adsorption) de 10 échantillons de boues et d'influent prélevés à différentes dates à partir d'un réacteur pilote et d'une station d'épuration. L'effet de la température et de la charge organique sur ces paramètres a été étudié. Dans un deuxième temps les propriétés de biosorption ainsi que la décantabilité, la teneur en PEC et l'hydrophobicité intrafloc de cinq de ces boues sont comparées.

IV.3.2. Matériel et méthodes

IV.3.2.1. Prélèvements des échantillons

Les échantillons sont prélevés à la station d'épuration de Maxéville à partir d'un réacteur pilote ou des ouvrages de la station. Ils sont stockés à $+4^{\circ}\text{C}$ dès leur réception et sont utilisés 5 h au plus après leur prélèvement. L'origine des échantillons, la date et l'heure de prélèvement sont indiquées dans le Tableau IV-5.

IV.3.2.2. Caractérisation des échantillons

Les boues activées sont caractérisées par leur teneur en matières en suspension (MES), leur teneur en polymères exo-cellulaires (PEC), leur hydrophobicité intrafloc (A%) et leur décantabilité

(SQI).

Les MES sont mesurées par pesée d'un culot de 50 mL de boue centrifugée 5 min à 5800 g et séché à 105°C pendant 24 h. Les polymères exo-cellulaires sont extraits par 60 s d'ultrasons à 37 W et centrifugation à 20, 000 g pendant 30 min selon la méthode décrite par Jorand *et al.* (1995) et leur teneur en DCO est dosée selon la procédure Merck (Spectroquant, 14540). L'hydrophobicité intrafloc est déterminée par le test d'adhésion aux hydrocarbures (octane) selon la méthode de Rosenberg *et al.* (1980) modifiée par Jorand *et al.* (1994). La décantabilité est appréciée par l'indice SQI (indice similaire à l'indice de Molhman) selon Fitch et Kos (1976). SQI représente le volume de boue occupé par 1 g de MES après 30 min de décantation de 1 L de boue en éprouvette graduée.

IV.3.2.3. Concentration des boues

Afin d'uniformiser les concentrations en MES des boues à 4 g L⁻¹ (les méthodes de dosage classiques des MES ne permettant pas de disposer immédiatement des valeurs du fait d'une attente de 24 h au moins), la méthode d'estimation rapide des MES définie par Urbain (1992) est utilisée. La DO_{600nm} de la boue traitées aux ultrasons (120 secondes à 37W/50 mL) diluée au 1/10^o est mesurée. La teneur en MES est obtenue en reportant la valeur sur une courbe d'étalonnage. L'écart moyen entre la valeur obtenue et la valeur mesurée après concentration de la boue est de 0,19±0,2 g L⁻¹ (n=11). La teneur en MES de la boue est alors ajustée à 4 g L⁻¹ par concentration en éliminant le volume nécessaire de surnageant de la boue décantée à + 4°C en éprouvette de 2 L.

IV.3.2.4. Dosage des matières en suspension des influents

Les matières en suspension des influents (MES) sont récupérées par filtration de 250 mL d'influent au travers d'un filtre en fibre de verre (GFC, Wathmann, porosité = 1,1 µm environ). Les MES sont ensuite pesées après séchage pendant 8 h à 105°C et sont exprimées en mg L⁻¹ de boue.

IV.3.2.5. Mesure de la biosorption

50 mL de boue à 4,0 ± 0,2 g L⁻¹ sont mélangés à 200 mL d'influent dans un flacon en verre traité à 550°C. Parallèlement, 1 flacon contenant 250 mL de boue à 4,0 ± 0,2 g de MES L⁻¹ et 1 flacon témoin contenant 250 mL d'effluent sont réalisés. Les flacons sont placés sous agitation orbitale (180 RPM) à + 4°C. Au moins 5 prélèvements de 12 mL sont réalisés au cours du temps de contact (à partir de 3 min et jusqu'à 900 min) entre l'influent et la boue. Les prélèvements sont immédiatement centrifugés 5 min à 5000 g puis filtrés au travers de filtre Millex de 0,45 µm (Durapore, SLHV025NB, Millipore) préalablement lavés par 20 mL d'eau "ultrapure". Après filtration, les échantillons sont acidifiés à pH=2 avec 50 µL d'une solution d'HCl à 35 % (w/v).

Le contenu en COD des filtrats est alors dosé par analyseur de carbone (Dohrmann, DC80).

La biosorption est calculée selon l'équation (2) :

$$b = \frac{\text{COD}_{t0} - \text{COD}_t}{\text{MEST}} \quad (2)$$

$$\text{COD}_{t0} = \frac{\text{COD}_i \times V_i + \text{COD}_b \times V_b}{V_i + V_b}$$

$$\text{MEST} = \frac{V_i \times \text{MES}_i + V_b \times \text{MES}_b}{V_i + V_b}$$

b = biosorption (mg COD g⁻¹ MES)

COD_{t0} = COD de la phase eau du mélange boue + influent au temps zéro (mg L⁻¹).

COD_t = COD de la phase eau du mélange boue + influent au temps t (mg L⁻¹).

MEST = matières sèches en suspension du mélange boue + influent (g L⁻¹)

COD_i = COD de la phase eau de l'influent (mg L⁻¹).

COD_b = COD de la phase eau de la boue (mg L⁻¹).

V_i = volume d'influent introduit (mL).

V_b = volume de boue introduite (mL).

MES_b = matières sèches en suspension de la boue (g L⁻¹)

MES_i = matières sèches en suspension de l'influent (mg L⁻¹)

$$c = \frac{V_i \times \text{COD}_i}{V_b \times \text{MES}_b} \quad (3)$$

c = charge organique du floc.

Les valeurs des différentes charges organiques et des MES des échantillons lors des tests sont indiquées dans le Tableau IV-5.

Tableau IV-5 : Origine des échantillons, date et heure de prélèvements et conditions expérimentales.

Date et heure de prélèvement	Origine	MES des boues de la prise d'essai g L ⁻¹	MES des influents mg L ⁻¹	MES du mélange boue+influent g L ⁻¹	Charge organique mg COD g ⁻¹ MES
20-Déc-93 10h30	Station (a)	3,82	68±2	0,82	15
5-Jan-94 11 h	Station	3,99	10±1	0,81	12
10-Jan-94 14 h	Station	4,00	70±14	0,86	26
" "	" (a)	3,91	nm	0,84	19
" "	" (a) (b)	3,91	nm	0,84	18
8-Mar-94 9 h	Pilote	3,73	43±4	0,78	9
10-Mar-94 9 h	Pilote	4,10	32±1	0,85	12
29-Mar-94 11 h30	Pilote (c)	4,48	91±6	0,97	14
9-Mai-94 14 h30	Station	4,13	45±2	0,86	44
10-Oct-94 14 h	Pilote	4,52	43±2	0,94	40

(a) : échantillons stockés à +4°C pendant 24h

(b) : tests de biosorption effectués à +19°C

nm = non mesuré

(c) : présence importante de bactéries filamenteuses

IV.3.2.6. Estimation des paramètres cinétiques de la biosorption

$$L'equation \text{COD}_t = \text{COD}_{t\infty} + (\text{COD}_{t0} - \text{COD}_{t\infty}) \times e^{-kt} \quad (4)$$

(où t = temps en min et $\text{COD}_{t\infty}$ = concentration en COD résiduel pour $t = \infty$) s'ajuste correctement aux points expérimentaux (coefficient de corrélation = $0,96 \pm 0,03$, $n=10$, déterminée par le logiciel informatique Kaleidagraph™, Abelbeck Software) et donne les paramètres cinétiques k (constante de vitesse) et V_iS (vitesse initiale spécifique). La Figure IV-4 montre un exemple de détermination de ces paramètres.

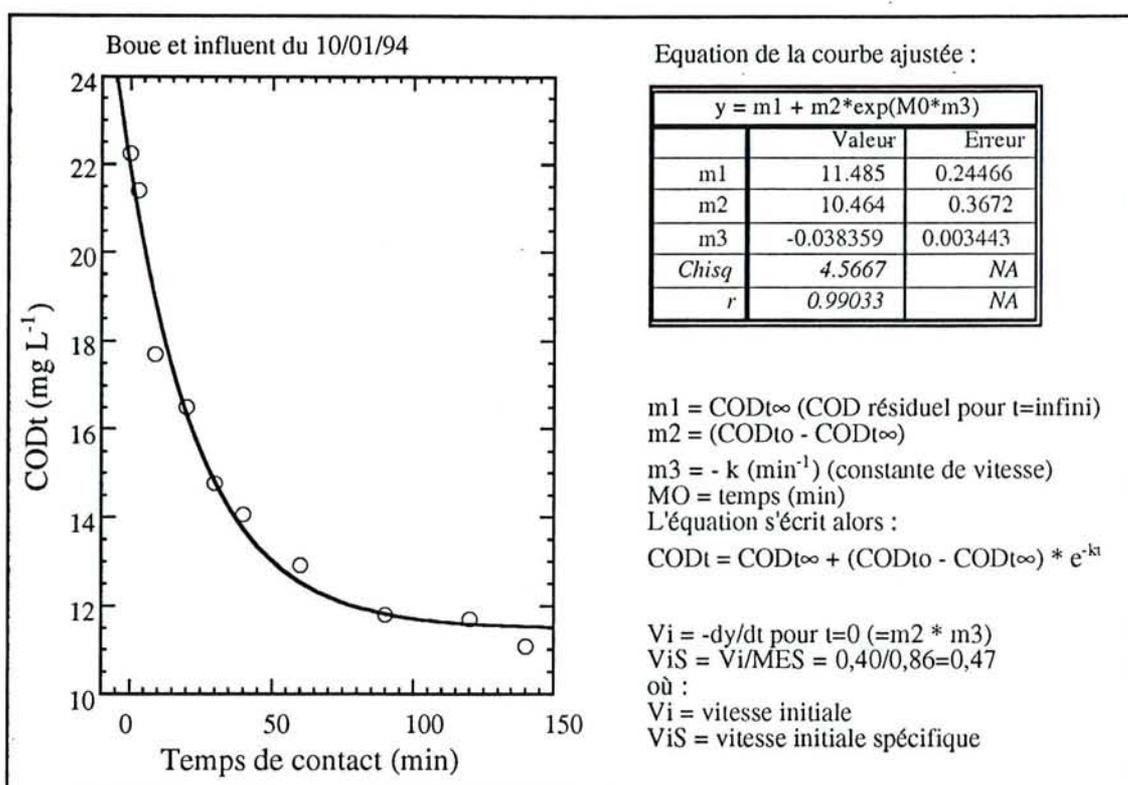


Figure IV-4 : Disparition du COD de la phase eau d'un mélange boue + influent (eau usée prédécantée) au cours du temps. Calcul des paramètres cinétiques.

L'équation (4) est une solution de l'équation différentielle décrivant la vitesse de disparition du COD de la phase eau du mélange boue + influent selon une cinétique d'ordre 1 :

$$V = k [\text{COD}] = -\delta\text{COD}/\delta t \quad (5)$$

où V = vitesse de disparition du COD ; k = constante cinétique et t = temps

$\text{COD}_t = \text{COD}_{t0} \times e^{-kt}$ est la solution générale de l'équation différentielle et $\text{COD}_t = \text{COD}_{t\infty}(1 - e^{-kt})$ est une solution particulière.

COD_t = concentration en COD au temps t

COD_{t0} = concentration en COD au temps t₀

COD_{t∞} = concentration en COD à l'infini, correspond à la constante m l

La vitesse initiale (V_i) est obtenue en calculant la dérivée par rapport à t de l'équation (4) pour t=0, soit :

$$\frac{\partial \text{COD}_t}{\partial t} = -k \times (\text{COD}_{t0} - \text{COD}_{t\infty}) \times e^{-kt} \text{ pour } t=0, V_i = -k \times (\text{COD}_{t0} - \text{COD}_{t\infty}) \text{ soit } m^2 \times m^3$$

(Figure IV-4). La vitesse initiale de disparition du COD est ramenée au g de MES en divisant V_i par la teneur en MES du mélange boue + influent (Tableau IV-5).

IV.3.3. Résultats

IV.3.3.1. Caractéristiques des échantillons de boues activées

Les caractéristiques des échantillons de boues sont présentées dans le Tableau IV-6. Leurs teneurs en MES sont typiques d'ouvrages fonctionnant à moyenne charge. Elles varient de 2,5 à 4 mg L⁻¹. La capacité de décantation, en terme d'indice de décantation SQI, se situe entre 55 et 128 mL g⁻¹ selon les échantillons, ce qui caractérise une décantabilité "excellente" à "médiocre". La quantité de polymères exo-cellulaires (PEC) est "moyenne" à "élevée" (140 à 260 mg g⁻¹) et l'hydrophobicité intrafloc (A%) varie de 65 à 85 % (Tableau IV-6) ce qui correspond aux valeurs habituellement obtenues avec les boues de la station. L'observation par microscopie optique révèle une présence significativement plus élevée de bactéries filamenteuses dans l'échantillon du 29/03/1994 que dans les autres échantillons.

Tableau IV-6 : Caractéristiques des boues activées utilisées pour les tests de biosorption. SQI représente l'indice de décantation des boues. Les polymères exo-cellulaires (PEC) sont obtenus après centrifugation des boues traitées aux ultrasons pendant 60 s (37 W). L'hydrophobicité intrafloc (A%) est mesurée par le test d'adhésion des micro-organismes à l'octane. b, ViS et k sont les paramètres décrivant la biosorption (voir matériel et méthodes).

Echantillons	MES g L ⁻¹	SQI mL g ⁻¹	PEC mg DCO g ⁻¹ MES	A % %	Biosorption			% COD éliminé en 1h % COD initial	
					b mg COD g ⁻¹ 15min 60min	ViS mg COD g ⁻¹ min ⁻¹	k min ⁻¹		
20-Déc-93 (a)	2,86	nm	nm	nm	3,6	4,6	0,48±0,03	0,12±0,05	30
5-Jan-94	2,79	nm	nm	nm	3,9	4,8	0,55±0,03	0,11±0,04	41
10-Jan-94	2,84	nm	nm	nm	5,7	10,9	0,47±0,00	0,038±0,003	41
" (a)	2,77	nm	nm	nm	5,2	6,9	0,60±0,03	0,10±0,04	36
" (a) (b)	2,77	nm	nm	nm	4,9	7,5	0,46±0,04	0,07±0,02	42
8-Mar-94	3,73	69±1	143±5	80±2	0,9	1,2	0,02±1,51	0,004±0,050	15
10-Mar-94	3,22	73±2	145±2	85±1	1,4	3,6	0,08±0,04	0,01±0,01	31
29-Mar-94 (c)	2,86	117±6	167±5	79±2	4±0,5	6±0,2	1,70±0,01	0,05±0,02	44
9-Mai-94	2,45	128±3	260±3	67±1	16±1	23±0,5	1,80±0,09	0,10±0,04	52
10-Oct-94	3,98	90±4	172±4	65±3	2,9	6,5	0,12±0,01	0,012±0,004	16

(a) : échantillons stockés à +4°C pendant 24h

(b) : tests de biosorption effectués à +19°C

nm = non mesuré

(c) : présence importante de bactéries filamenteuses

Les paramètres caractérisant la biosorption à + 4°C sont la quantité de COD "piégé" par 1 g de boue (b) en un temps donné, la vitesse initiale spécifique de disparition du COD (ViS), la constante cinétique k et le pourcentage de COD éliminé. D'un échantillon à l'autre b varie de 0,9 à 16 mg g⁻¹ pour 15 min de contact et de 1,2 à 23 pour 60 min de contact. Le phénomène de biosorption se poursuit donc au delà de 15 min et même au delà d'une heure, car les prélèvements ayant été effectués pour des temps supérieurs montrent des valeurs encore plus élevées (non montré).

ViS varie de 0,02 à 1,7 mg g⁻¹ min⁻¹ et k varie de 0,004 à 0,120 min⁻¹ (Tableau IV-6). Cette variabilité inter échantillons peut provenir des différentes caractéristiques physico-chimiques des échantillons (teneur en PEC, SQI, hydrophobicité intrafloc, nature et concentration des solutés de l'influent...) ou de certains paramètres expérimentaux mal contrôlés (e.g. charge organique, Tableau IV-5). Le Tableau IV-6 donne la proportion de COD éliminé de la phase eau en 1 h et montre que plus de la moitié du COD peut être éliminé de la phase eau en 1 h par contact entre la boue et l'influent.

IV.3.3.2. Effet de la charge sur la biosorption

Afin de mettre en évidence l'effet de la charge organique sur la biosorption, des tests ont été réalisés avec trois charges différentes : 10, 20 et 40 mg g⁻¹ avec les mêmes échantillons de boue et d'influent. La Figure IV-5 représente la disparition du COD de la phase eau en fonction du temps de contact boue + influent (0 à 15 h). Les points sont ajustés par l'équation (6) et les paramètres caractérisant la biosorption sont calculés (Tableau IV-7). D'après la Figure IV-5 la quantité de COD biosorbé par les boues (à concentration en MES égale) est différente selon la charge. Après un temps de contact très long (900 min) la quantité de COD résiduel reste différente. Ce qui suggère un équilibre entre la matière organique dissoute biosorbée et celle présente en solution. L'effet de la charge sur la quantité relative de COD biosorbé en 15 et 60 min ("b") est élevé dans l'intervalle 10–20 mg g⁻¹ où "b" varie quasiment d'un rapport de 1 à 2. Par contre, pour les charges de 20 et 40 mg g⁻¹, "b" est peu différent (Tableau IV-7). Il semble alors que pour une charge de 20 mg g⁻¹ la capacité de biosorption maximale des flocs soit atteinte.

Les vitesses spécifiques initiales (ViS) de l'élimination de la matière organique dissoute dans la phase eau varient avec la charge (Tableau IV-7) mais le coefficient de corrélation obtenu (r = 0,993) n'est pas significatif et ne vérifie pas la linéarité entre la vitesse et la concentration en COD décrite par l'équation $V=k[\text{COD}]$.

Tableau IV-7 : Paramètres décrivant la biosorption de la boue prélevée le 10/10/1994 en fonction de trois charges organiques. Même légende que pour le Tableau IV-5.

Charge organique (mg COD g ⁻¹ MES)	b		ViS mg COD g ⁻¹ min ⁻¹	k min ⁻¹
	mg COD g ⁻¹ MES 15 min	mg COD g ⁻¹ MES 60 min		
10	1,8	2,5	0,043 ± 0,001	0,008 ± 0,002
20	3	5,3	0,063 ± 0,001	0,007 ± 0,002
40	2,9	6,5	0,13 ± 0,01	0,011 ± 0,004

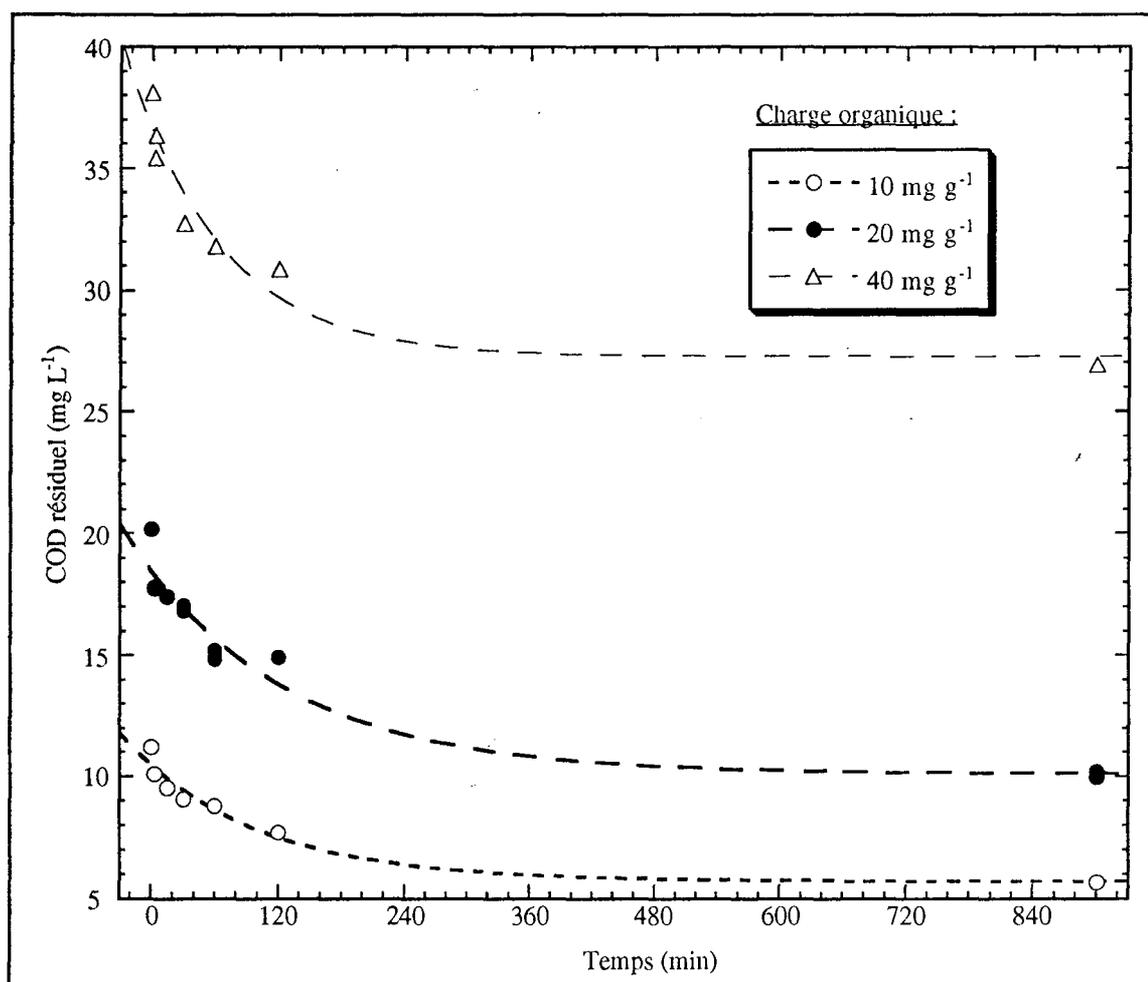


Figure IV-5 : Disparition à 4°C du COD de la phase eau en fonction du temps d'un mélange boue + influent pour trois charges organiques (quantité de COD par g de MES) différentes. La concentration en MES est identique dans les trois essais (0,9 g L⁻¹). L'équation $COD_r = COD_f + (COD_i - COD_f) e^{-kt}$ où COD_r = concentration résiduelle en COD, COD_f = concentration finale en COD, COD_i = concentration initiale en COD, t = temps et k = constante de vitesse s'ajuste aux points expérimentaux (voir matériel et méthodes).

Les valeurs de k obtenues à partir des équations des courbes ajustées de la Figure IV-5 (voir matériel et méthodes) ne sont pas différentes au vu des écarts-types (Tableau IV-7). Il semble donc, et en accord avec la théorie d'une cinétique d'ordre 1 (Schwarzenbach *et al.*, 1993), que la constante k n'est pas influencée par la charge. Si tel est le cas, la constante k permettrait de décrire la biosorption des boues quelle que soit la concentration en COD de l'influent. Un nombre plus important de mesures est nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

IV.3.3.3. Effet de la température et du stockage des échantillons sur la biosorption

Afin de mettre en évidence l'importance de l'activité biologique sur le processus de biosorption, un test a été réalisé à + 4°C et à + 19°C avec des boues préalablement stockées 24 h à + 4°C. Les résultats montrent qu'une telle variation de température n'a pas d'effet sur les quantités relatives de

COD biosorbés dans les trente premières minutes de contact boue–influent (Figure IV–6). Au-delà de trente minutes, une différence est observée entre les deux essais. Cette différence provient peut être d'une activité biologique plus forte dans l'essai réalisé à + 19°C que dans l'essai réalisé à + 4°C. Cependant, les échantillons utilisés ont auparavant été réalisés stockés 24 h à + 4°C. Les micro-organismes ont pu être "affaiblis" au cours de ce stockage ce qui pourrait expliquer le faible effet de la température sur la biosorption. Toutefois le test réalisé sur les mêmes échantillons fraîchement récoltés, montre que la biosorption n'est que légèrement plus élevée avec les échantillons frais ($b=5,7$ contre 5,2 et 4,9 mg g⁻¹ de MES, Tableau IV–6). Les vitesses initiales spécifiques sont similaires et les constantes de vitesse k sont légèrement plus faibles avec les échantillons frais (Tableau IV–6). La différence de biosorption entre la boue jeune et la boue âgée devrait en grande partie être imputable à la différence de charge entre les essais. En effet la teneur en COD de l'influent varie de 26 à 19 mg L⁻¹ durant le stockage expliquant la différence de charge entre les deux échantillons (Tableau IV–5).

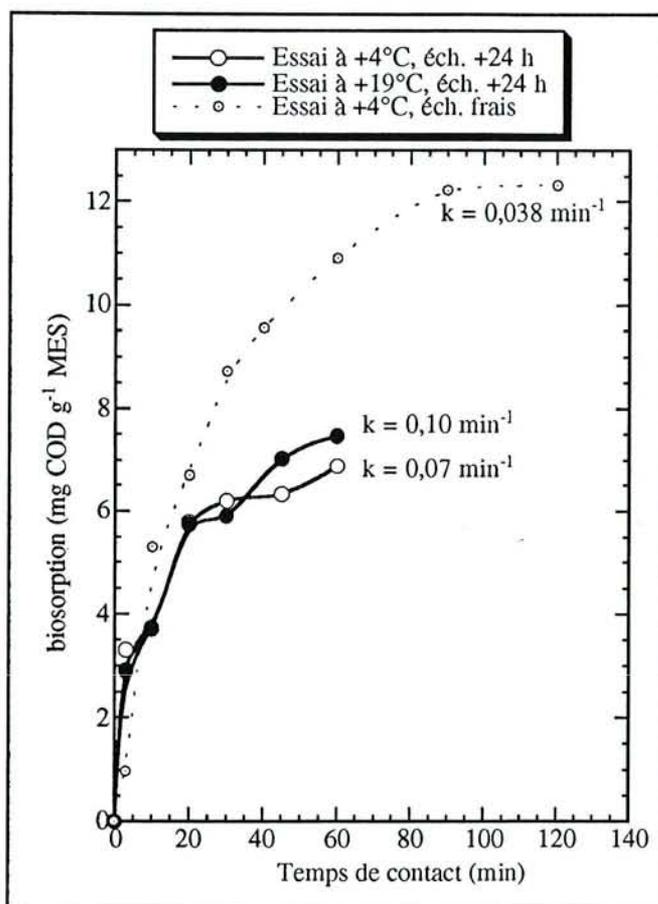


Figure IV–6 : Variation de la biosorption d'une boue activée en fonction du temps pour deux températures différentes. L'essai a été réalisé sur la boue et l'influent stocké 24 h à + 4°C. La variation de la biosorption des mêmes échantillons fraîchement récoltés est indiquée en traits pointillés sur le graphe.

IV.3.3.4. Biosorption et caractéristiques physico-chimiques des boues

Parmi les 9 échantillons de boue dont la biosorption a été évaluée (Tableau IV–6), cinq ont été caractérisés par certaines de leurs propriétés physico-chimiques : contenu en polymères exocellulaires (PEC), hydrophobicité intrafloc (A%) et décantabilité (SQI). Une éventuelle corrélation

entre ces propriétés et la biosorption des boues a été recherchée. Parmi les trois paramètres décrivant la biosorption seule la constante de vitesse k semble indépendante de la charge en COD (qui varie de 9 à 44 mg g⁻¹, Tableau IV-5) et doit donc être utilisée pour comparer les caractéristiques des boues entre elles.

Les paramètres SQI et PEC apparaissent linéairement corrélés avec la constante k (r est respectivement égal à 0,974 et 0,924) respectivement au risque de 1 % et 5 %. Toutefois eu égard au faible nombre de valeurs et à l'erreur élevée sur l'estimation de k , ces corrélations doivent être considérées avec prudence (Figure IV-7).

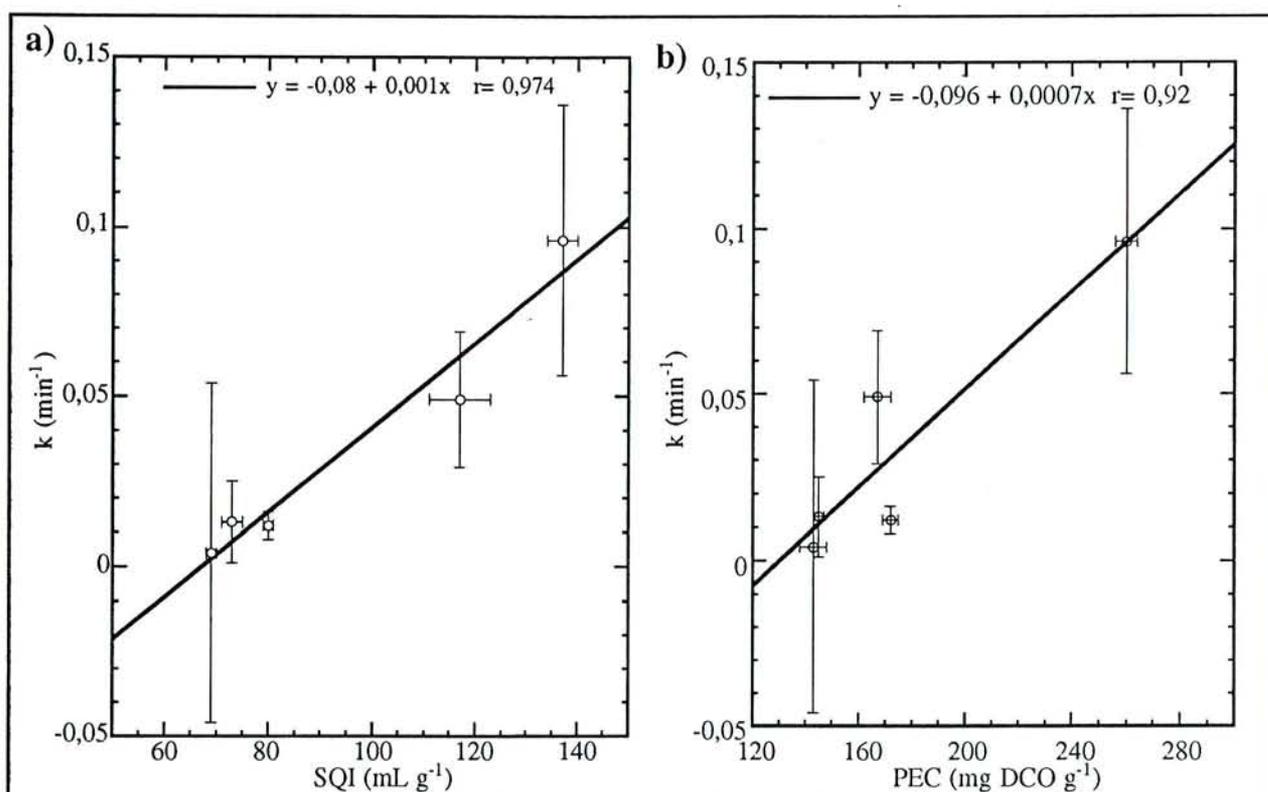


Figure IV-7 : Variation de la constante de vitesse de biosorption k en fonction de l'indice SQI (a) et de la concentration en PEC (b) des 5 échantillons de boues et d'influent prélevés entre le 8 mars 1994 et le 10 octobre 1994 (Tableau IV-5). Les barres horizontales correspondent à l'écart-type calculé sur la moyenne de trois mesures indépendantes de SQI et des PEC et les barres verticales correspondent à l'erreur type d'estimation de k donnée par le logiciel (Kaleidagraph©).

IV.3.4. Discussion

En mettant en contact une boue avec une eau usée, plus de 50 % du COD est susceptible d'être éliminé de la phase eau à une température où l'activité biologique est considérablement ralentie (+ 4°C). Cela implique qu'une fraction importante de la pollution dissoute est éliminée par des mécanismes indépendants de l'activité biologique. Tsezos et Wang (1991) ont montré que l'adsorption de solutés xénobiotiques (très peu biodégradables) par les boues activées est

indépendante de la température. Pujol et Canler (1992) qui effectuent les mesures de biosorption à température ambiante, ont montré par contre à l'aide d'un seul essai que la biosorption était considérablement plus faible lorsque l'échantillon était placé à basse température (+ 3°C). Il conviendrait alors de réaliser une étude à partir de nombreux échantillons afin d'avoir une réponse claire à propos de l'effet de la température sur la biosorption.

En accord avec Rensink et Donker (1991) et Pujol et Canler (1992), la charge organique apparaît comme un facteur de variation de la biosorption. Pujol et Canler préconisent de la mesurer pour une charge organique standard (*e.g.* 100 mg DCO g⁻¹ MES), ce qui impose de connaître à l'avance la concentration en COD et en MES des échantillons. L'ajustement de la cinétique de disparition du COD de la phase eau à une réaction d'ordre 1 permet d'obtenir la valeur de la constante de vitesse k qui théoriquement est indépendante de la concentration initiale en COD selon l'équation (6). Le nombre trop restreint de nos essais et le nombre trop faible de mesures du COD au cours du temps ne nous permettent cependant pas de valider cette démarche. Néanmoins nos résultats vont dans ce sens et pour trois charges différentes avec un même couple boue + influent les constantes k obtenues sont sensiblement les mêmes. La constante k pourrait alors être utilisée pour décrire les cinétiques de biosorption de mélange boue + influent à différentes charges organiques.

Il est reconnu que la dégradation de l'aptitude des boues à décanter est liée à l'altération de la structure du floc biologique (Li et Ganczarczyk, 1986). Les bactéries filamenteuses sont responsables selon de nombreux auteurs (*e.g.* Pujol et Canler, 1992 ; Jenkins *et al.*, 1993) de la mauvaise qualité des boues. Elles sont de plus considérées comme étant des micro-organismes ayant une forte affinité pour la matière organique des eaux usées (Chudoba *et al.*, 1973) ce qui expliquerait les niveaux élevés de biosorption constatés avec des boues filamenteuses (Pujol et Canler, 1992). Un seul de nos échantillons présentait une quantité relativement importante de bactéries filamenteuses (niveau d'abondance de "++" par rapport à l'échelle proposée par Urbain *et al.*, 1993), sans que toutefois, la biosorption soit particulièrement élevée par rapport aux autres échantillons. Aussi la biosorption ne dépend pas uniquement des bactéries filamenteuses.

La corrélation linéaire obtenue entre la constante k et la décantabilité va dans le sens des travaux de Pujol et Canler (1992) qui ont mesuré la biosorption de 60 boues provenant de 11 stations d'épuration et qui obtiennent une corrélation positive entre SVI et la biosorption. Rensink et Donker (1991) obtiennent toutefois une relation inverse mais avec des boues acclimatées au laboratoire. Il est probable que, l'altération de la structure des flocs, traduit par l'augmentation des indices de décantation, entraîne une augmentation de la surface d'adsorption, permettant une biosorption plus importante. La constante de vitesse de biosorption k n'est, par contre, pas corrélée avec l'hydrophobicité intrafloc. Dans l'intervalle étudié (65 à 85 %) l'hydrophobicité n'apparaît donc pas comme un facteur majeur de variation de la biosorption. Le nombre et la diversité trop restreints d'échantillons utilisés dans cette étude ne permettent pas de conclure à propos des relations entre la biosorption et les caractéristiques physico-chimiques des boues.

IV.4. Conclusions et perspectives

Le fractionnement de la matière organique des eaux usées par filtration au travers de résines hydrophobes montrent que 60 % du COD est représenté par des solutés exprimant un caractère hydrophobe. Ces solutés sont relativement bien éliminés par le traitement d'épuration (environ à 70 %) mais il ne le sont pas mieux que les solutés hydrophiles (éliminés à 80 %). Les mesures de biosorption des boues montrent qu'une fraction très importante de la matière organique dissoute est susceptible d'être éliminée de la phase eau (jusqu'à 50 % en 1 h) probablement par un mécanisme d'adsorption. L'étude des relations entre la biosorption et les caractéristiques physico-chimiques des boues n'ont pas été réalisées sur un nombre suffisamment important d'échantillons pour permettre d'en tirer des conclusions claires. Toutefois l'existence de relations linéaires significatives au seuil de probabilité de 1 % entre la constante de vitesse de biosorption et l'indice SQI conduisent à penser à l'existence d'un lien entre la biosorption et la structure du floc.

Sur les cinq échantillons étudiés, l'hydrophobicité intrafloc n'est pas corrélée avec la biosorption. L'utilisation de modèles bactériens hydrophobes ou hydrophiles permettraient de vérifier (i) si les surfaces bactériennes hydrophobes interviennent dans le phénomène de biosorption et (ii) si les solutés présentant un caractère hydrophobe, tel que nous l'avons décrit dans ce chapitre, sont préférentiellement adsorbés par les surfaces bactériennes. La caractérisation hydrophobe/hydrophile des solutés restant dans la phase aqueuse après biosorption, aussi bien par des boues activées que par des cultures de souches pures de bactéries hydrophobes/hydrophiles semble être un moyen d'apporter une réponse à ces questions.

IV.5. Références

- AIKEN G.R., D.M. McKNIGHT, K.A. THORN and E.M. THURMAN (1992) Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins, *Org. Geochem.*, **18**, 567-573.
- AIKEN G.R., E.M. THURMAN, R.L. MALCOLM and H.F. WALTON. (1979) Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution, *Anal. Chem.*, **51**, 1799-1803.
- BOLLER M., (1993) Removal of organic matter by physico-chemical mechanisms in wastewater treatment plants, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n° 11, 167-183.
- CHUDOBA J., GRAU P. and OTTOVA V. (1973) Control of activated sludge filamentous bulking. II-Selection of microorganisms by means of selector, *Wat. Res.*, **7**, 1389-1406.
- CROUE J.P., E. LEFEBVRE, B. MARTIN and B. LEGUBE. (1993) Removal of dissolved hydrophobic and hydrophilic organic substances during coagulation/flocculation of surface waters, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n°11, 143-152.
- FUCHS F. and HEIDT A. (1994) Application of hydrophobic interaction chromatography (HIC) in water analysis, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **22**, 121-129.
- GRIESER M. D. and PIETRZYK D.J. (1973) Liquid chromatography on a porous polystyrène-divinylbenzene support, *Anal. Chem.*, **45**, 1348-1353.
- HENZE M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes, *Wat. Sci. Technol.*, **25**, n°6, 1-15.
- INFANTE A.P., GUAJARDO N.C., ALONSO J.S., NAVASCUES M.C.M., MELERO M.P.O., MUTUBERRIA CORTABITARTE M.S. and OVELLEIRO NARVION J.L. (1993) GC/MS analysis of organic water pollutants isolated by XAD-2 resins and activated carbon in the Gallego river, Spain, *Wat. Res.*, **27**, 1167-1176.
- JENKINS D., M.G. RICHARD and G.T. DAIGGER (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton, 193 pages.

- JEONG Y.D. and CAPDEVILLE B. (1994) Caractérisation de la distribution des poids moléculaires des produits microbiens solubles (PMS) dans les procédés de traitement des eaux résiduaires urbaines par boues activées, *proc. of: "Les sous-produits de traitement et d'épuration des eaux (Water treatment by-products)"*, Tome 2, colloque organisé par le GRUTTEE et le LCEN (URA CNRS 1468), 29-30 sept. 1994, Futuroscope-Poitiers, France.
- JORAND F., GUICHERD P., URBAIN V., MANEM J. and BLOCK J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 211-218.
- JORAND F., ZARTARIAN F., THOMAS F., BLOCK J.C., BOTTERO J.-Y., VILLEMIN G., URBAIN V. and MANEM J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Wat. Res.*, **29**, 1639-1647.
- LEENHEER J.A. (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters, *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 578-587.
- LEVINE A.D., G. TCHOBANOGLOUS and T. ASANO (1991) Size distributions of particulate contaminants in wastewater and their impact on treatability, *Wat. Res.*, **25**, 911-922.
- LI D.H. and J.J GANCZARCZYK (1986) Physical characteristics of activated sludge flocs, *Crit. Rev. Environ. Control*, **17**, 53-87.
- MALCOLM R.L., E.M. THURMAN and G.R. AIKEN. (1977) The concentration and fractionation of trace organic solutes from natural and polluted waters using XAD-8, a methylmethacrylate resin, *Proc. of: Trace Substances In Environmental Health-XI*, D.D. HEMPHILL, ed., University of Missouri, Columbia, pp. 307-314.
- MALCOM R.L. (1991) Factors to be considered in the isolation and characterization of aquatic humic substances, in *"Humic substances in the aquatic and terrestrial environment"*, John Wiley, London, pp. 369-391.
- MALCOM R.L. and McCARTHY P. (1992) Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water, *Environ. Int.*, **18**, 597-607.
- MANTOURA R.F.C. and RILEY J. P. (1975) The analytical concentration of humic substances from natural waters, *Analytica Chimica Acta*, **76**, 97-106.
- NIELSEN P. H., RAUNKJÆR K., NORSKER N. H., JENSEN N. A. and HVITVED-JACOBSEN T. (1992) Transformation of wastewater in sewer systems - A review, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, n° 6, 17-31.
- PUJOL R. and J.P. CANLER (1992) Biosorption and dynamics of bacterial populations in activated sludge, *Wat. Res.*, **26**, 209-212.
- RENSINK J.H. and H.J.G.W. DONKER (1991) The effect of contact tank operation on bulking sludge and biosorption processes, *Wat. Sci. Tech.*, **23**, 857-866.
- ROSENBERG M., D. GUTNICK and E. ROSENBERG. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell surface hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 29-33.
- SCHWARZENBACH R.P., GSCHWEND Ph.M. and IMBODEN D.M. (1993) *Environmental Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 681.
- STRUJIS J. STOLTENKAMP J. and Van De MEENT D. (1991) A spreadsheet-based model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant, *Wat. Res.*, **25**, 891-900.
- THURMAN E.M. and G.R. MALCOLM (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Tech.*, **15**, 463-466.
- TORRIJOS M., CERRO R-M., CAPDEVILLE B., ZEGHAL S., PAYRAUDEAU M. and LESOUEF A. (1994) Sequencing batch reactor a tool for wastewater characterization for the IAWPRC model, *Wat. Sci. Tech.*, **29**, n° 7, 81-90.
- TSEZOS M. and BELL J.P. (1989) Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass, *Wat. Res.*, **23**, 561-568.
- TSEZOS M. and X. WANG (1991) Study on the kinetics of hazardous pollutants adsorption and desorption by biomass: mechanistic considerations, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 507-521.
- URBAIN V. (1992) Caractérisation physico-chimique des boues activées en relation avec leur propriété de décantation, Thèse Dr es-Sciences, Université NANCY I, 200 pages.
- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.

V. DYNAMIQUE DU FLOC

V.1. Introduction.....	144
V.2. Variation des caractéristiques du floc en réacteur fermé (“Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria”)	145
ABSTRACT.....	146
KEYWORDS	146
INTRODUCTION	146
Materials and methods	147
Activated sludge sampling and characterization	147
Exopolymer extraction and measurement.....	147
Octane adhesion test.....	147
Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains.....	148
Effect of glucose on the settlement of activated sludge	148
Hydrophobicity variation in pure strains during growth.....	149
Results and discussion	149
Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains of activated sludge	149
Effect of glucose on sludge settleability	151
Hydrophobicity variation of pure strains during growth.....	152
References.....	154
V.3. Variation des caractéristiques du floc en réacteur continu.....	156
V.3.1. Introduction	156
V.3.2. Matériel et méthodes.....	157
V.3.2.1. Prélèvement des échantillons.....	157
V.3.2.2. Description du réacteur pilote	157
V.3.2.4. Mesures des paramètres	158
V.3.2.5. Observation microscopique des boues.....	158
V.3.2.6. Analyse statistique	158
V.3.3. Résultats.....	158
V.3.3.1. Caractéristiques générales des boues du pilote	158
V.3.3.2. Variation des propriétés de décantation.....	163
V.3.3.3. Les polymères exo-cellulaires (PEC).....	164
V.3.3.4. Variation de l’hydrophobicité intrafloc.....	164
V.3.4. Discussion.....	166
V.4. Conclusion.....	168
V.5. Références.....	169

V.1. Introduction

La capacité de décantation des floes de boues activées est contrôlée par la balance entre les polymères hydrophiles “emprisonnant” les bactéries, et les interactions hydrophobes (Urbain *et al.*, 1993). Il apparaît alors d'un intérêt considérable de comprendre s'il est possible de déplacer cet équilibre hydrophile/hydrophobe afin de renforcer la densité du floc biologique et sa décantabilité. Parmi toutes les variables qui peuvent *de facto* gouverner ces différents phénomènes, la charge organique biodégradable joue apparemment un rôle important et selon la nature ou/et la concentration des nutriments du milieu, l'hydrophobicité des bactéries, la floculation ou la décantabilité des floes évoluent sensiblement (Eisen et Reid, 1989 ; Forster, 1985 ; Hantula et Bamford, 1991 ; Krul, 1977).

Aussi, au cours des essais réalisés dans ce travail, nous avons dans un premier temps voulu mettre en évidence :

- l'existence au sein de boues activées de souches bactériennes hydrophobes
- l'influence d'une source nutritive facilement assimilable (glucose) sur l'hydrophobicité interne (test d'adhésion aux hydrocarbures) et la décantabilité de boues activées.
- la variation du caractère hydrophobe de bactéries isolées de boues activées (test d'adhésion aux hydrocarbures) au cours de leur croissance en milieu nutritif.

Les résultats de ces travaux ont donné lieu à un article publié dans la revue *Water Science and Technology*.

Sur les 14 souches bactériennes isolées des boues, 4 ont par la suite été identifiées par le service de l'institut Pasteur. Les résultats de ces analyses sont données en Annexe III.

Dans un second temps, notre objectif a été d'étudier les variations des caractéristiques des floes de boues activées maintenues au mieux dans un état d'équilibre en réacteur continu. Pour cela un réacteur pilote de taille industrielle a été utilisé. La première phase de cette étude a consistée à étudier les boues placées dans un état d'équilibre dit “classique” au cours duquel les gestionnaires du pilote se sont efforcés de produire des boues de bonne qualité. La seconde phase de cette étude devait permettre d'évaluer avec quelle vitesse et de quelle amplitude les descripteurs classiques du floc (décantabilité, hydrophobicité, polymères exo-cellulaires) évoluaient lorsque le fonctionnement du pilote était hostile à la production d'une boue de bonne qualité (*e.g.* anoxie,...). Cependant, du fait de fortes discontinuités, les boues n'ont jamais pu être placées dans des conditions d'équilibre durable. La seconde phase n'a alors jamais pu être mise en place. Les variations des paramètres mesurés ont toutefois été analysés afin de rechercher des relations entre eux et l'altération de la qualité de la boue.

V.2. Variation des caractéristiques du floc en réacteur fermé :

“Hydrophobicité des floes de boue activée et de souches bactérienne de laboratoire”

(Titre original : “Hydrophobicity of activated sludge floes and laboratory-grown bacteria) 1994, *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 211-218.

Résumé :

Les floes de boues activées des stations d'épuration des eaux usées représentent une structure très complexe dans laquelle les microorganismes sont piégés par une matrice de polymères exocellulaires. Comme cela est montré dans cet article des bactéries fortement hydrophobes coexistent avec des bactéries fortement hydrophiles qui semblent relarguer de larges quantités de polymères exocellulaires (polysaccharides, ADN, protéines...). L'ajout aux boues activées de nutriments facilement assimilables tel que le glucose ne montrent aucun changement de l'hydrophobicité des bactéries mais augmente à la fois la production d'exopolymères et l'indice de volume de boue. Les conditions environnementales et la biodisponibilité des nutriments pourraient considérablement modifier la balance hydrophobe/hydrophile. De plus, des expériences réalisées avec 4 différentes souches bactériennes sur les 14 isolées à partir d'une boue ont montré chez certaines souches des possibilités considérables de variation de leur propriétés hydrophobes de surface au cours de leur croissance.

HYDROPHOBICITY OF ACTIVATED SLUDGE FLOCS AND LABORATORY-GROWN BACTERIA

F. Jorand*, P. Guicherd*, V. Urbain**, J. Manem** and J.C. Block*

*Laboratoire Santé Environnement – Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques– 5, rue Albert Lebrun – 54000 NANCY – FRANCE

** CIRSEE – Lyonnaise des Eaux–Dumez– 38, avenue du Président Wilson – 78230 LE PECQ – FRANCE

ABSTRACT

The cohesion of activated sludge biological flocs is controlled by the ratio between hydrophilic exopolymers in which bacteria are embedded and hydrophobic interactions. As shown in this study highly hydrophobic bacteria coexist in the flocs with highly hydrophilic bacteria which seem to release large quantities of exopolymers (polysaccharides, DNA, proteins...). Addition to the activated sludge of easily assimilable nutrient as glucose does not change hydrophobicity of bacteria but increases both exopolymer production and the sludge volume index. The environmental conditions and the bioavailability of nutrients may considerably shifts the hydrophilic/hydrophobic balance. Moreover experiments carried out with four different strains to fourteen isolated from activated sludges have shown that few strains (variable types) have quite considerable possibilities of hydrophobic property variations in the course of growth.

KEYWORDS

Activated sludge flocs; cell surface hydrophobicity; exopolymers; settleability.

INTRODUCTION

The last stage in the activated sludge treatment process consists of sedimentation to separate the flocs (Verstraete and van Vaerenbergh, 1986) wich consist of microorganisms embedded in a complex heteropolymer matrix (Eriksson and Alm, 1991 ; Eriksson and Härdin, 1984 ; Forster, 1971 ; Li and Ganczarczyk, 1986 ; Urbain *et al.*, 1993).

To date, relatively little is known about the structure of the biological flocs and the processes leading to their formation and the control of their apparent density (electrostatic bounding, hydrophobic interaction, coupling by exopolymers and cations, etc.). Valin and Sutherland (1982) and Singh and Vincent (1987) observed a positive correlation between the hydrophobicity of activated sludge flocs or bacteria isolated from activated sludges and their flocculation performance. Overmann and Pfennig (1992) noted that flocculation of *Amoebobacter purpureus* is linked to an increased hydrophobicity of cell surface probably including a mechanism mediated by a surface protein. More recently, Urbain *et al.* (1993) established a negative correlation between hydrophilic exopolysaccharide content and sludge settling capacity whereas intrafloc hydrophobic interactions were on the contrary, positively correlated with settling.

It therefore appears to be of considerable interest to understand whether it is possible to shift

this hydrophilic/hydrophobic balance to increase the density of the biological floc and its settling capacity. Among all the variables which may *de facto* govern these various phenomena, the biodegradable organic load apparently plays an important role and, depending on the nature and/or concentration of the nutrients in the medium, the hydrophobicity of the bacteria and the flocculation or settleability of the flocs may change appreciably (Eisen and Reid, 1989 ; Forster, 1985 ; Hantula and Bamford, 1991 ; Krul, 1977).

In the course of tests carried out in this research, we therefore wished to demonstrate the following :

- existence of hydrophobic or/and hydrophilic bacterial strains in activated sludge,
- influence of an easily assimilated nutrient source (glucose) on internal hydrophobicity and settleability of activated sludge,
- variation of the hydrophobic quality of isolated bacteria from activated sludge in the course of their growth in a nutritive medium.

MATERIALS AND METHODS

Activated sludge sampling and characterization

Samples of activated sludge were taken from the aeration tank at the Maxéville waste water treatment plant no more than 1 hour before use. Floc settleability was measured on a 100 mL sludge sample after a 30-minute sedimentation period in a graduated cylinder. The sludge volume index (SVI) is expressed as the apparent volume of sludge divided by its dry matter content (mL g^{-1}). Dry matter was measured out by desiccation at 105°C and gravimetric analysis of a pellet obtained by centrifugation was (3,000 g) of a 50 mL sludge sample for 5 min.

Exopolymer extraction and measurement

Exopolymers were obtained using the method described by Urbain *et al.* (1993) by sonication of a 50 mL sludge sample (power output 37 W, Soniprobe 19 mm in diameter, 120 seconds) held in an ice bath. After sonication, the samples were centrifuged for 30 min at 20,000 g. The various types of polymers were measured directly on the supernatant. The sugars (glucose equivalent) were determined by the Dubois *et al.* phenolsulphuric method (1956) and uronic acids (glucuronic acid equivalent) by the tetraborate and hydroxybiphenyl method (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973). The proteins (bovine serum albumin equivalent) were measured by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) and DNA by the diphenylamine method (Deriaz *et al.*, 1949).

Octane adhesion test

The hydrocarbon adhesion test (Rosenberg *et al.*, 1980) was applied to suspensions of microorganisms obtained either from activated sludge dispersed by ultrasounds and removal of the

largest particles by sedimentation at 4°C for 90 minutes, or from dispersed cultures of pure bacterial strains. The suspension was then washed by suspension in deionised water and centrifugation (5,700 g for 15 min). In all cases, 2.5 mL of the bacterial suspension set to an absorbance at 600 nm (Abs_i) of 0.3 unit was vigorously mixed (Heidolph DSG 302 vibratory agitator) for 120 s with 1 mL of n-octane (Aldrich, 0-325-7) in glass test tube of 10 mm diameter. Then, after 5 minutes rest, a sample of the aqueous phase was taken with a Pasteur pipette and absorbance at 600 nm (Abs_e) measured. A similar test was conducted in the same conditions of agitation and rest but without octane and the density of the sample was measured at 600 nm (Abs_t). Two parameters were then calculated from the three absorbance values :

$$\text{Octane adhesion index (A \%)} = [1 - Abs_e / Abs_t] \times 100$$

$$\text{Flocculation index (F \%)} = [1 - Abs_t / Abs_i] \times 100$$

Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains

Hydrophobic or hydrophilic bacteria were isolated from a suspension of microorganisms obtained by sonication of activated sludge which was subjected to an octane adhesion test. After agitation with the octane and separation of the phase by a 5-min. rest, the water phase and the emulsion accumulated under the octane phase were recovered separately. Each phase was washed by repeating the test 3 times, either with octane (for the water phase) or with sterilised deionised water (for the octane-water emulsion). The bacteria obtained by this method were isolated by plating on nutritive agar (Difco, 0479-02-0) 0.1 mL of the water phase or 0.1 mL of the emulsion phase broken by the prior addition of 5 % (V/V) isopropyl alcohol. After a 48-hour incubation period at 20°C, the morphologically different colonies were selected on the agar and cultured in nutrient broth (Difco, 0751-01-0). The strains were then subjected to an octane adhesion test to characterise them in stationary phase by A % and F %.

In addition, the strains were subjected to Gram staining and an attempt at identification on apparatus API 20 NE and API 20 E (Biomérieux).

Effect of glucose on the settlement of activated sludge

The activated sludge samples homogenised by gentle agitation were distributed into 2 L graduated cylinders. After 90 min of sedimentation at room temperature, 800 mL of supernatant were eliminated from each cylinder and replaced by 800 mL deionised water or 800 mL glucose solution (1.88 g L⁻¹) in deionised water. After mixing, each sample (containing on average 2.4 g of dry matter) was divided into three 1-L flasks at a rate of 650 mL per flask. The flasks were shaken at 150 rpm on an orbital agitator for 74 h at room temperature. Aliquot parts of 150 mL were taken after 0, 4, 22, 46 and 74 hours. Dry matters, residual glucose in the water, SVI, exopolysaccharides, A % and F % were then measured on each aliquot part.

Hydrophobicity variation in pure strains during growth

Four previously isolated strains from activated sludges considered to be hydrophobic (Ho6), hydrophilic (Hi11) and variable (Ho4 and Hi13) were tested.

A 24-hour preliminary culture of each strain was conducted in 10 mL of nutrient broth (Difco, 0751-01-0) diluted five times with ultrapure water. Into 500 mL flasks, 250 mL nutrient broth diluted as previously was inoculated by approximately $2 \cdot 10^{10}$ cells (*i.e.* Abs600 = 0.4) from the preliminary cultures. The flasks were shaken at 150 rpm (orbital agitator) at ambient temperature and aerated with a Pasteur pipette and an air compressor. Growth was followed by Abs600 measurement. Hydrophobicity (A %) and flocculation (F %) were followed using 20 mL aliquot parts taken at various phases of growth. Three identical flasks were inoculated by bacterial strains.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of hydrophobic or hydrophilic bacterial strains of activated sludge

By using the octane adhesion test to bacterial suspensions obtained from activated sludge, fourteen strains were isolated on agar, either from octane-water emulsion, or from water phase.

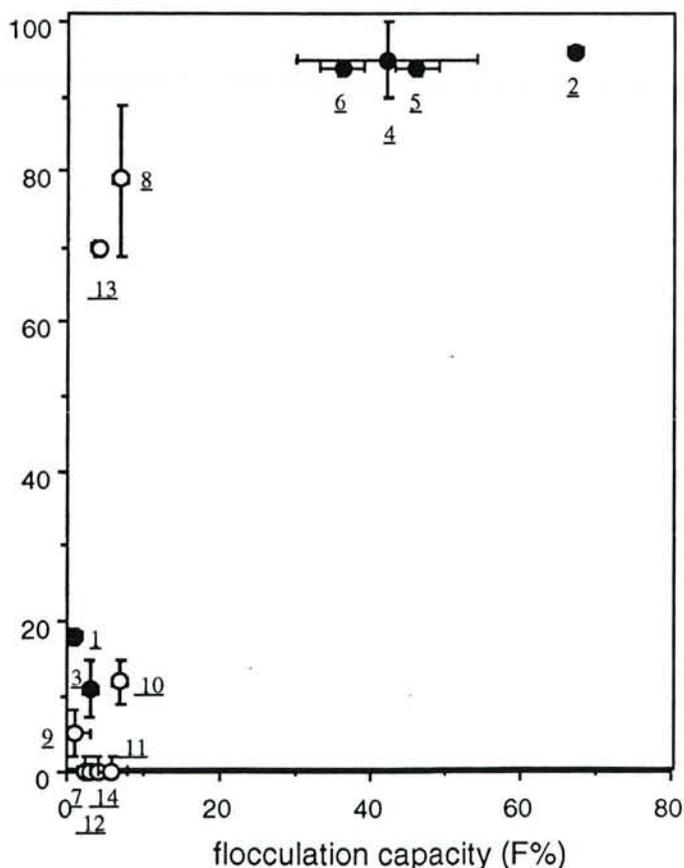


Fig. 1. Hydrophobicity and flocculation capacity of some bacterial strains isolated from activated sludge. Strains were isolated either from emulsion with octane (closed circle, numbers 1 to 6) or from aqueous phase (open circle, numbers 7 to 14), $n=3$.

After culture of these strains in stationary phase and assessment of their octane adhesion capacity (Figure 1) four of these (Ho2, Ho4, Ho5 and Ho6) confirmed their hydrophobic quality,

six others their hydrophilic quality (Hi7, Hi9, Hi10, Hi11, Hi12 and Hi14) and two strains previously isolated with octane emulsion (Ho1 and Ho3) appeared to be hydrophilic during the confirmation test. Finally two strains (Hi8 and Hi13) revealed intermediate characteristics. All the strains (except Hi8) were Gram negative bacilli which confirms the idea that the general organisation of the cell wall does not allow to make an *a priori* decision as to the hydrophobic quality of bacterial surfaces.

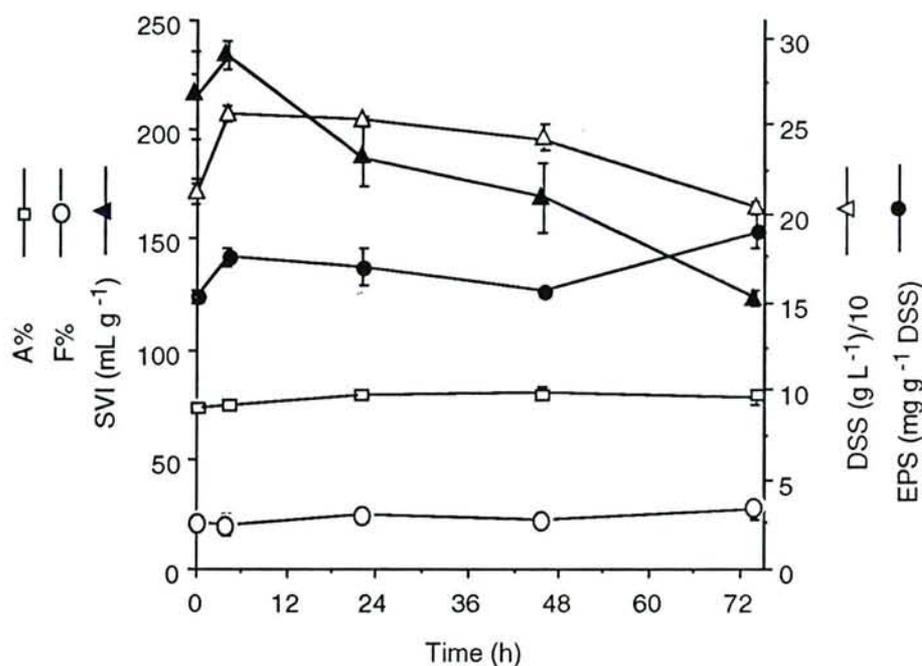


Fig. 2. Variations of sludge characteristics stored for 74 h at 20°C without nutrients. (DSS : dry suspended solids, SVI : sludge volume index, EPS : exopolysaccharides, A% : percentage of adhesion to octane, F% : percentage of reflocculation, n=3).

In activated sludge highly hydrophobic bacteria (high A % and F %) therefore coexist with highly hydrophilic bacteria (low A % and F %). These do not appear to have simply been trapped in the flocs but also to have participated in its organisation as already suggested by Allison and Sutherland (1987) with the biofilms. Indeed, the quantity of exopolymers released by sonication of a hydrophilic strain (Hi11) cultured in the laboratory is greater than that of the hydrophobic strain (Ho4) (Table 1).

Table 1 Concentrations of polymers extracted from two activated sludge bacterial strains submitted to sonication.

Exopolymers (mg g ⁻¹)	Hydrophilic strain (Hi11)	Hydrophobic strain (Ho4)
Proteins	239 (±14)	123 (±1)
Polysaccharides	45 (±2)	15 (±1)
DNA	25 (±1)	5 (±0.2)
Uronic acids	10 (±0.4)	0.0

The presence of strains of a variable hydrophobic quality is in keeping with the observations of a number of authors from whom hydrophobicity is influenced by the culture conditions (Bandin *et*

al., 1989 ; Büschs *et al.*, 1988 ; Fattom and Shilo, 1984 ; Hazen *et al.*, 1986 ; Rosenberg and Kjelleberg, 1986).

Effect of glucose on sludge settleability

The samples of activated sludge agitated for 74 h at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ without the addition of nutrients see their initial mass fall by an average of 16 % without significant variation in the exopolymer quantity, nor A % and F % (Figure 2). However, a marked reorganisation occurs in the floc as is shown by the considerable fall in SVI (demonstrating better settleability) from 220 to 120 mL g^{-1} .

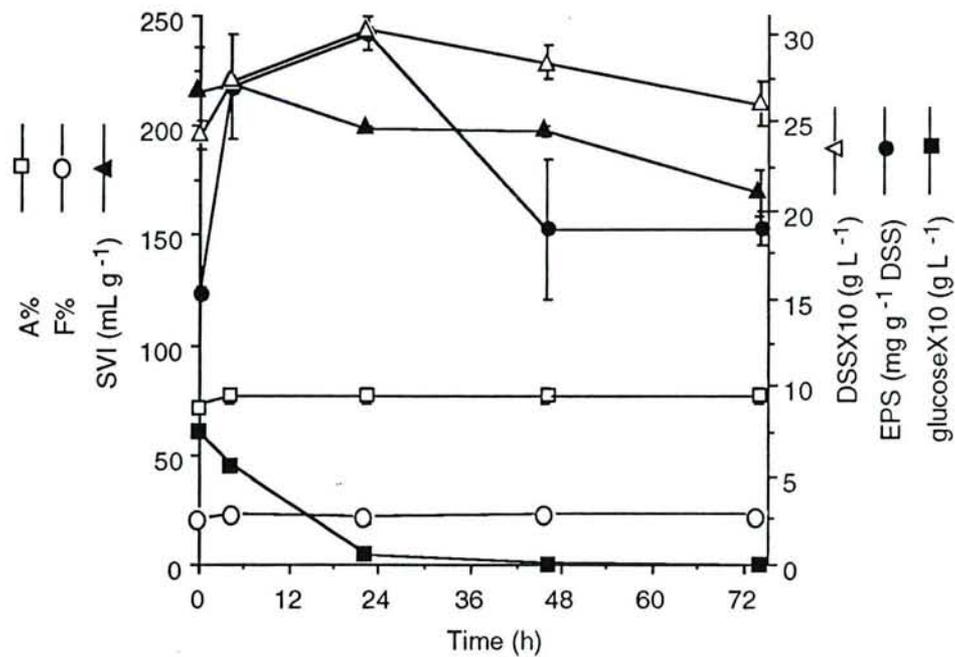


Fig. 3. Variations of sludge characteristics stored for 74 h at 20°C with initial addition of 750 mg L^{-1} of glucose. (DSS, SVI, EPS, A% and F% : same as in Fig. 2).

The addition of a strong load of glucose (750 mg L^{-1}) considerably modifies this development (Figure 3). The glucose is very rapidly consumed (residual close to 0 in 22 h) and the exopolysaccharides content increase of 55 mg L^{-1} (*i.e.*, 15 mg g^{-1} in 22 h) as already demonstrated by Jarman and Pace (1984). After 22 h, biomass and exopolymers fall constantly. Throughout this test, A % and F % remained unchanged but sludge settleability altered and especially SVI decreased but at a lower rate than in the glucose-free test. The exopolymer increase therefore affects the settling properties of sludge as already shown by Forster (1971), Eriksson and Härdin (1984), Kiff (1988), Magara *et al.* (1976) without modifying A % or F % (initially high in our tests). In other words, modifying one of the variables of the hydrophilic/hydrophobic balance is sufficient to shift this balance considerably.

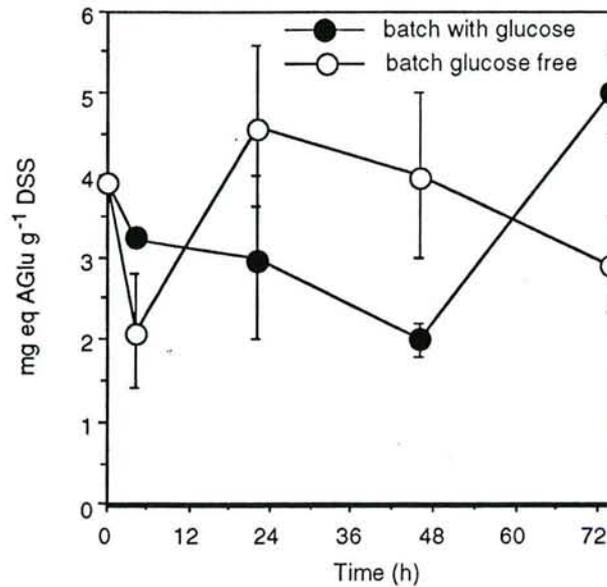


Fig. 4. Variation of uronic acid content in supernatant after dispersion of sludge by sonication ($n = 3$; eq AGlu = glucuronic acid equivalent).

In this study, the very low uronic acid content (2 to 4 mg g⁻¹ of DSS) (Figure 4) shows that these sugars are not a major component of the exopolymers of the sludge studied, contrary to the observations of Forster (1971), Bengtsson (1991), Horan and Eccles (1986), Neu *et al.* (1992), Ulhinger and White (1983). The values vary when storing sludge with or without glucose for 74 h. In the presence of glucose, uronic acid content falls constantly then after 48 h of culture, this quantity increase. For starved sludge, uronic acid content increases after 4 h of culture but then falls constantly in time. These variations may be explained by a response of the bacteria when faced with a particular environment, as is shown by Bengtsson (1991) on a bacterial strain from soil. This strain reduced its uronic acid synthesis by 50 % when placed in a poor medium (pure groundwater) compared with a medium rich in glucose.

Hydrophobicity variation of pure strains during growth

Hydrophobicity and reflocculation of 4 strains (Hi11, Hi13, Ho4 and Ho6) showing different surface properties in stationary phase, was followed in the course of their growth in a nutrient medium in an attempt to assess a relationship between physiological state and hydrophobicity. Strains Hi11 and Ho6 (Figures 5a and 5b), characterised as respectively highly hydrophilic or highly hydrophobic by preliminary tests conducted after culture in stationary phase, preserve the same surface properties (A % and F %) whatever their growth phase.

On the other hand, for so-called variable strains (Ho4 and Hi13), A % and F % vary in the course of growth. The relatively high A % value of strain Ho4 (Figure 5c) at the start of culture (> 0.3 unit) falls by -0.1 unit during the exponential phase, then rises in stationary phase (+0.4 unit). The variation in A % for strain Hi13 is the total opposite since A % is maximum in growth phase and

minimum in stationary phase (Figure 5d). On the other hand, the flocculation capacity, represented through the F % index hardly varies at all for the two strains considered.

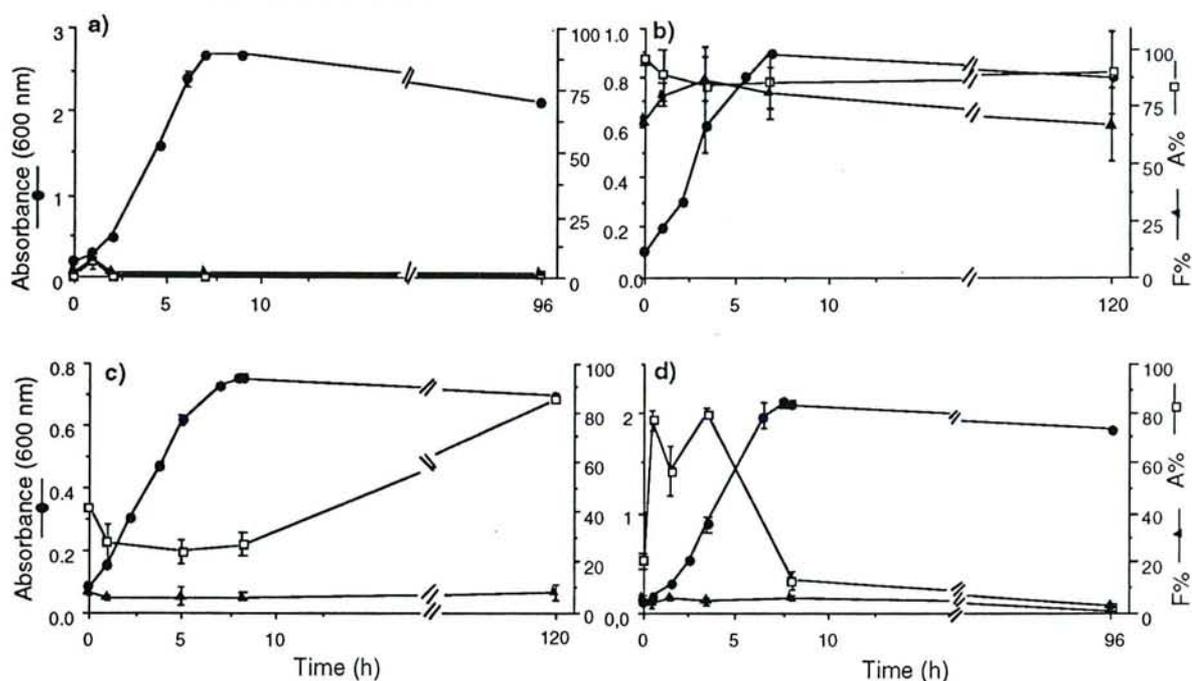


Figure 5. Variation of absorbance, A % and F % as a function of time for the strain Hi11 (a), Ho6 (b), Ho4 (c) and Hi13 (d) grown in agitated and aerated nutrient broth (n=3).

These results suggest that some strains in activated sludge flocs keep their surface properties (hydrophobicity/hydrophilicity) constant whatever the growth phase and that others on the contrary show variations in the course of growth.

This behavior is in keeping with data from several authors which demonstrates that hydrophobicity is different regarding the type of microorganism and the nutrient conditions (Bandin *et al.*, 1989 ; Büchs *et al.*, 1988 ; Fattom and Shilo, 1984 ; Hantula *et al.*, 1991 ; Hazen *et al.*, 1986 ; Rosenberg and Kjelleberg, 1986).

This reactivity of a microbial population to environmental conditions as well as the considerable diversity of microorganisms in the flocs of activated sludge suggest a strong influence of sludge growth conditions on floc settleability (aside from any filamentous bulking problems). Although, as we have already shown, the presence of hydrophobic bacteria provides conditions for good floc sedimentation, the way in which to increase, either the number of these species, or their hydrophobic quality by reorganizing sewage plant management remains to be studied.

REFERENCES

- Allison, D.G. and Sutherland, I.W. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. J. Gen. Microbiol., **133**, 1319–1327.
- Bandin, I., Santos, Y., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. (1989). Influence of the growth conditions on the hydrophobicity of *Renibacterium salmoninarium* evaluated by different methods. FEMS Microbiol. Lett., **60**, 71–78
- Bengtsston, G. (1991). Bacterial exopolymer and PHB production in fluctuating ground-water habitats, FEMS Microbiol. Ecol., **86**, 15–24.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids., Anal. Biochem., **54**, 484–489.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265–275.
- Büchs J., Mozes, N., Wandrey, C., and Rouxhet, G. (1988). Cell adsorption control by culture conditions : influence of phosphate on surface properties, flocculation and adsorption behaviour of *Corynebacterium glutamicum*., Appl. Microbiol. Biotechnol., **29**, 119–128.
- Deriaz, R.E., Stacey, M., Teece, E.G., and Wiggins, L.F. (1949). The Dische reaction for 2-deoxyribose, J. Chem. Soc., **14**, 1222–1232.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances., Anal. Chem., **28**, 350–356.
- Eisen, A., and Reid, G. (1989). Effect of culture media on *Lactobacillus* hydrophobicity and electrophoretic mobility., Microb. Ecol., **17**, 17–25.
- Eriksson, L., and Alm, B. (1991). Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties., Wat. Sci. Tech., **24**, 21–28.
- Eriksson, L., and Härdin, A.M. (1984). Settling properties of activated sludge related to floc structure., Wat. Sci. Tech., **16**, 55–68.
- Fattom, A., and Shilo, M. (1984). Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria., Appl. Environ. Microbiol., **47**, 135–143.
- Forster, C.F. (1985). Factors involved in the settlement of activated sludge-I : nutrients and surface polymers, Wat. Res., **19**, 1259–1264.
- Forster, C.F. (1971). Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index, Wat. Res., **5**, 861–870.
- Goodwin, J.A.S., and Forster, C.F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics, Wat. Res., **19**, 527–533.
- Hantula, J., and Bamford, D.H. (1991). The efficiency of the protein-dependent flocculation of *Flavobacterium* sp. is sensitive to the composition of growth medium., Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 100–104.
- Hantula, J., Kurki, A., Vuoriranta, P., and Bamford, D.H. (1991). Rapid classification of bacterial strains by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : population dynamics of the dominant dispersed phase bacteria of activated sludge, Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 551–555.
- Hazen, K.C., Plotkin, B.J., and Klimas, D.M. (1986). Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*., Infect. Immun., **54**, 269–271.
- Horan, N.J., and Eccles, C.R. (1986). Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges., Wat. Res., **20**, 1427–1432.
- Jarman, T.R., and Pace, G.W. (1984). Energy requirements for microbial exopolysaccharides synthesis, Arch. Microbiol., **137**, 231–235.
- Kiff, R.J. (1978). A study of the factors affecting bioflocculation in the activated-sludge process., Wat. Pollut. Control, **77**, 464–470.
- Krul, J.M., (1977). Some factors affecting floc formation by *Zooglea ramigera*, strain I-16-M, Wat. Res., **11**, 51–56.
- Li, D.H., and Ganczarczyk, J.J. (1986). Physical characteristics of activated sludge flocs., Crit. Rev. Environ. Control, **17**, 53–87.
- Magara, Y., Nambu, S., and Uotosawa, K. (1976). Biochemical and physical properties of an activated sludge on settling characteristics, Wat. res., **10**, 71–77.,
- Neu, T.R., Dengler, T., Jann, B., and Poralla, K. (1992). Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain, J. Gen. Microbiol., **138**, 2531–2537.
- Overmann, J., and Pfennig, N. (1992). Buoyancy regulation and aggregate formation in *Amoebobacter purpureus* from Mahoney lake, FEMS Microbiol. Ecol., **101**, 67–79.
- Rosenberg, M., and Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic interactions : role in bacterial adhesion., Advances in Microbial Ecology, Marshall K.C. ed., (9), 353–393, Plenum publishing corporation, New York.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell surface hydrophobicity., FEMS Microbiol. Lett., **9**, 29–33.

- Singh, K.K., and Vincent, W.S. (1987). Clumping characteristics and hydrophobic behaviour of an isolated bacterial strain from sewage sludge., Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 396-398.
- Uhlinger, D.J., and White, D.C. (1983). Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*, Appl. Environ. Microbiol., 45, 64-70.
- Urbain, V., Block, J.C., and Manem, J. (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach., Wat. Res., 27, 829-838.
- Valin, S.D., and Sutherland, D.J. (1982) Predicting bioflocculation : new developments in the application of flocculation theory., Environ. Technol. Lett., 3, 363-374.
- Verstraete, W., and van Vaerenbergh, E. (1986) Aerobic activated sludge. In : Biotechnology, Vol. 8, pp. 43-112, H.J. Rehm and G. Reed Eds, VCH Publishers.

V.3. Variation des caractéristiques du floc en réacteur continu

V.3.1. Introduction

Les caractéristiques physico-chimiques des floccs de boues activées et la variabilité d'échantillons de boues d'origine différente ont été décrites par Urbain *et al.* (1993). Une analyse statistique des valeurs des paramètres mesurés a permis d'établir une relation liant les polymères exocellulaires (PEC) et l'hydrophobicité intrafloc, à la décantabilité. Est-il possible d'en déduire que la qualité des floccs en terme de décantation est gouvernée par une balance hydrophobe/hydrophile de la matrice du floc ? La variation de cette balance en réacteur fermé (réacteur "batch"), pour des boues alimentées ou non en glucose, a montré qu'en trois jours de culture, seuls les PEC (représentés par les exo-polysaccharides) avaient varié avec la décantabilité, l'hydrophobicité intrafloc restant très stable (Jorand *et al.*, 1994). Cependant la présence dans les boues activées de bactéries dont les propriétés hydrophobes de surface cellulaire changent au cours de leur croissance en réacteur fermé (Jorand *et al.*, 1994) ou sous l'effet d'une faible oxygénation en chemostat (Palmgren R., communication personnelle) suggère que les populations microbiennes des boues activées peuvent influencer la balance hydrophobe/hydrophile du floc. Pour compléter ces travaux, une étude de la variabilité des caractéristiques des floccs se devait d'être réalisée.

En situation réelle, la variabilité des caractéristiques des boues activées est sous la dépendance (i) de la variation des caractéristiques des effluents à traiter et de la température, (ii) des discontinuités liées à la gestion du procédé (âge des boues, oxygénation...) et, (iii) par voie de conséquence des changements de la population bactérienne. Les caractéristiques du système sont sans doute suffisamment variables pour entraîner des modifications fondamentales des floccs. Ainsi Eriksson *et al.* (1992) montrent qu'en une semaine les valeurs extrêmes des charges organiques d'une station (0,05 à 0,6 g DBO totale g⁻¹ MES j⁻¹) peuvent être obtenues. La réponse des boues suite à de telles variations de fonctionnement peut être très rapide. Ainsi, l'installation par exemple, d'un sélecteur anoxique en amont du bassin d'aération, permet d'obtenir une diminution en 1 mois du SVI des boues de 500 à <100 mL g⁻¹ (Jenkins *et al.*, 1993). Palm *et al.* (1980, cités par Jenkins *et al.*, 1993) montrent que des boues de laboratoire placées dans des conditions critiques d'oxygénation (0,1-0,5 ppm) par rapport aux mêmes boues placées sous 0,5-1 ppm d'oxygène, voient leurs caractéristiques de décantation se dégrader très rapidement (SVI passe de 150 à 600 mL g⁻¹ en 4 j). Par contre le retour à une décantabilité normale de la boue placée sous 0,5 à 1 ppm d'oxygène est très lente (30 j).

Afin de suivre la variation des caractéristiques physico-chimiques des floccs (contenu en PEC, hydrophobicité intrafloc, indice de décantation) dans un système réel en phase pseudo-stationnaire, des prélèvements de boues ont été réalisés à partir d'un réacteur pilote de taille industrielle directement installé sur le site de la station de Maxéville. De nombreuses discontinuités de la qualité des boues sont observées et les corrélations entre les différents paramètres mesurés sont analysées.

V.3.2. Matériel et méthodes

V.3.2.1. Prélèvement des échantillons

Les boues activées ont été prélevées entre le 19 juillet 1993 et le 10 octobre 1994 (Figure V-1) à partir d'un réacteur pilote installé sur le site de Maxéville. Tous les prélèvements ont systématiquement été effectués à partir du 2^{ème} bassin d'aération du pilote (voir schéma du pilote Annexe V-1), à l'aide d'une perche munie d'un récipient en verre de 500 mL. Deux prélèvements ont été effectués directement à partir du 2^{ème} bassin d'aération de la station d'épuration les 22 juillet 1993 et 10 mai 1994. La chronologie des prélèvements est décrite dans la Figure V-1. Les échantillons sont prélevés dans un récipient en matière plastique (5 L) et conservés dès réception (environ 1/2h après le prélèvement) à + 4°C à l'obscurité.

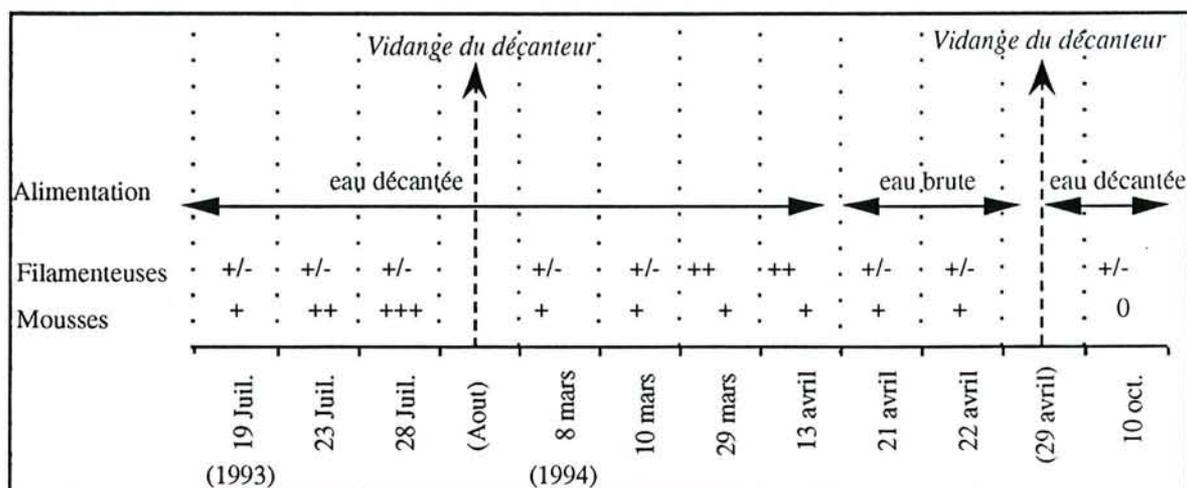


Figure V-1 : Chronologie des prélèvements et des vidanges du décanteur du pilote et de quelques caractéristiques du pilote. Eau décantée = eaux usées en sortie de décantation primaire, eau brute = eau usée dégrillée (0,5 mm) en entrée de décantation primaire. L'indice d'abondance des bactéries filamenteuses est appréciée par microscopie optique selon une échelle subjective +/- = présence, ++ = abondance, +++ = prolifération. L'épaisseur de mousse à la surface des bassins d'aération est appréciée selon une échelle subjective de 0 à +++.

V.3.2.2. Description du réacteur pilote

Le réacteur est placé sur le site de la station d'épuration de Maxéville dans un local couvert dont la température n'est pas contrôlée. Sa gestion est assurée par l'IRH. Il est composé de 3 bassins d'aération de 2,6 m³ placés en série, d'un dégazeur et d'un clarificateur de 6 m³ (Annexe V-1). Le corps du pilote est en acier. Les bassins de boue sont alimentés par l'effluent de décantation primaire, ou directement par les eaux usées, mais dans les deux cas l'influent est dégrillé au travers d'un tamis métallique de 0,5 mm de maille. Le débit de l'influent est de 2 m³ h⁻¹. Le temps de résidence hydraulique dans les trois bassins est de 3 h 30 min et de 6 h environ pour l'ensemble de l'ouvrage. La production de boue journalière est de 2 à 7 kg de MES. Le réacteur pilote fonctionne selon le

procédé dit à moyenne charge.

V.3.2.4. Mesures des paramètres

Toutes les mesures sont réalisées le jour même, en triplicat, dans le même ordre, excepté les dosages des PEC.

Les matières sèches en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVS) sont dosées selon les méthodes déjà utilisées auparavant (Jorand *et al.*, 1994) par la méthode de centrifugation et dessiccation/calcination. Les indices SVI et SQI sont dosés selon les méthodes décrites par Fitch et Kos (1976). L'hydrophobicité intrafloc (A%) est estimée par le test d'adhésion aux hydrocarbures (Rosenberg *et al.*, 1980 modifiée par Jorand *et al.*, 1994) à partir de la suspension cellulaire obtenue par dispersion des boues aux ultrasons et sédimentation à + 4°C pendant 90 min. Les PEC sont extraits par 60 s d'ultrasons et 30 min de centrifugation à 20.000 g selon la méthode décrite par Jorand *et al.* (1995). Les extraits sont conservés à - 18°C dans des flacons stériles de 40 mL en matière plastique en attente des dosages. Les PEC de chaque série de prélèvements (*i.e.* séries du 19 au 28 juillet 93, du 8 mars au 10 mai 94 et échantillon du 10 octobre 94) sont dosés simultanément après décongélation à + 4°C.

La DCO est mesurée selon le procédé développé par Merck (Spectroquant®, 14540). Les boues sont diluées au 1/10° par de l'eau "ultrapure" et les extraits d'exopolymères au 1/5°. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry (Sigma Diagnostic, procédure P5656). Les polysaccharides sont dosés par la méthode au phénol sulfurique de Dubois *et al.* (1956). L'ADN est dosé par la méthode à la diphénylamine selon la réaction de Dische modifiée par Deriaz *et al.* (1949). Les acides uroniques sont dosés par la méthode au phénylphénol (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1976).

V.3.2.5. Observation microscopique des boues

Une gouttelette de boue est déposée entre lame et lamelle et observée au microscope optique en lumière visible avec contraste de phase.

V.3.2.6. Analyse statistique

La matrice de corrélation est calculée à l'aide du logiciel Staview II™.

V.3.3. Résultats

V.3.3.1. Caractéristiques générales des boues du pilote

Les 10 échantillons prélevés entre juillet 1993 et octobre 1994 ont été caractérisés selon plusieurs paramètres : descripteurs de la biomasse (MES, MVS, DCO, polymères exo-cellulaires) ou des propriétés physico-chimiques (indices de décantation, hydrophobicité). Les valeurs moyennes de

ces paramètres mesurés sur les 10 échantillons ont été rassemblées dans le Tableau V-1.

Matières sèches en suspension (MES) et matières volatiles en suspension (MVS)

La teneur moyenne en MES des échantillons ($4 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$) est caractéristique des ouvrages fonctionnant à moyenne charge. Le coefficient de variation des MES de 17 % montre que cette fraction est relativement variable (Tableau V-1). La fraction organique (matières volatiles à 550°C), dont la proportion est de 72 % des MES –ce qui est une valeur classique des boues activées– est par contre relativement constante puisque le coefficient de variation calculé sur la moyenne n'est que de 6 % (Tableau V-1). Cela indique que la variation des MES provient d'une variation homogène des matières minérales et de la matière organique.

Tableau V-1 : Caractéristiques des boues prélevées à partir du pilote de juillet 1993 à octobre 1994 (n=10 sauf pour la DCOT des boues où n=4). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux coefficients de variation de la moyenne.

	Moyenne	cv%
MES (mg L^{-1})	$3,9 \pm 0,7$	(17%)
MVS (%MES)	72 ± 4	(6%)
DCOT (mg g^{-1})	1180 ± 20	(2%)
SVI (mL g^{-1})	132 ± 52	(39%)
SQI (mL g^{-1})	96 ± 23	(24%)
A%	78 ± 7	(8%)
Polymères exo-cellulaires (mg g^{-1} MES)		
DCO (mg d'O_2)	146 ± 37	(25%)
	(13% de la DCOT)	
Exo-pol (mg éq. Glc)	17 ± 4	(26%)
Exo-ADN ($\text{mg éq. ADN thymus de veau}$)	15 ± 4	(29%)
Exo-pro (mg éq. SAB)	50 ± 14	(29%)
Ac. Uroniques ($\text{mg éq. Ac. Glucuronique}$)	$1,9 \pm 0,3$	(16%)

DCOT = DCO totale des boues

Observation microscopique des boues

La présence de bactéries filamenteuses a systématiquement été constatée dans les échantillons. Leur fréquence était appréciée visuellement selon l'échelle qualitative utilisée par Urbain *et al.* (1993) qui, bien que subjective, permet de différencier trois niveaux de fréquence : présence, abondance et prolifération. Dans nos essais seul le niveau de filamenteuses des échantillons du 29 et du 13 avril a été considéré comme "abondant" (Figure V-3a), tandis que dans les autres échantillons le niveau de filamenteuses était faible (Figure V-3b). Les échantillons révélaient aussi une faune relativement abondante et variée de protozoaires (Vorticelles, Euplotes...) traduisant une oxygénation correcte du système.

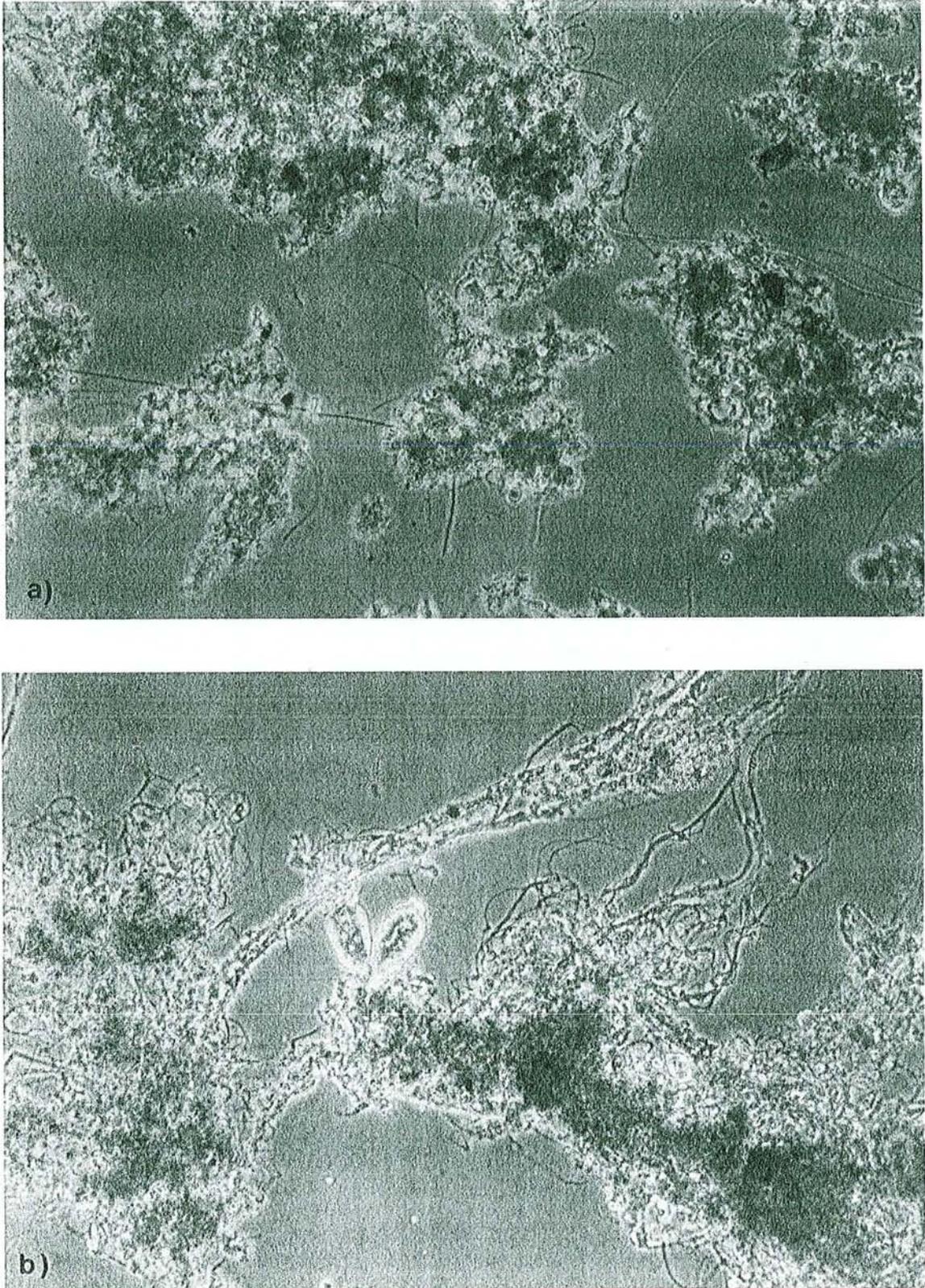


Figure V-3 : Aspect des flocs de boues activées du pilote (X100) des prélèvements du 8 mars 94 (a) et du 29 mars 94 (b). Les flocs des boues du 29/03/94 montrent un niveau de bactéries filamenteuses sensiblement plus élevé que la boue du 8/03/94. Les photographies ont été aimablement fournies par Florence Zartarian (Laboratoire Environnement et Minéralurgie, 54500, Vandoeuvre-les-Nancy).

L'apparition de très nombreuses particules libres dans l'espace inter-floc, dont de très nombreux micro-organismes spirallés (probablement du genre *Spirillum*), semble être consécutive au changement d'alimentation (effluent de décantation primaire remplacé par les eaux usées brutes dégrillées, Figure V-1) ce qui est caractéristique de boues alimentées par un influent riche en acides organiques d'origine septique (Jenkins *et al.*, 1993).

L'examen microscopique des boues n'a pas permis de mettre en évidence des différences frappantes de la structure des floes entre les différents échantillons.

Décantabilité

La décantabilité des boues a été systématiquement appréciée selon deux indices : SVI et SQI qui représentent le volume de boue occupé par 1 g de MES après 30 minutes de décantation en éprouvette de 1 L. Les indices sont bien corrélés entre eux comme le montre la Figure V-4 suggérant qu'ils rendent compte du même phénomène.

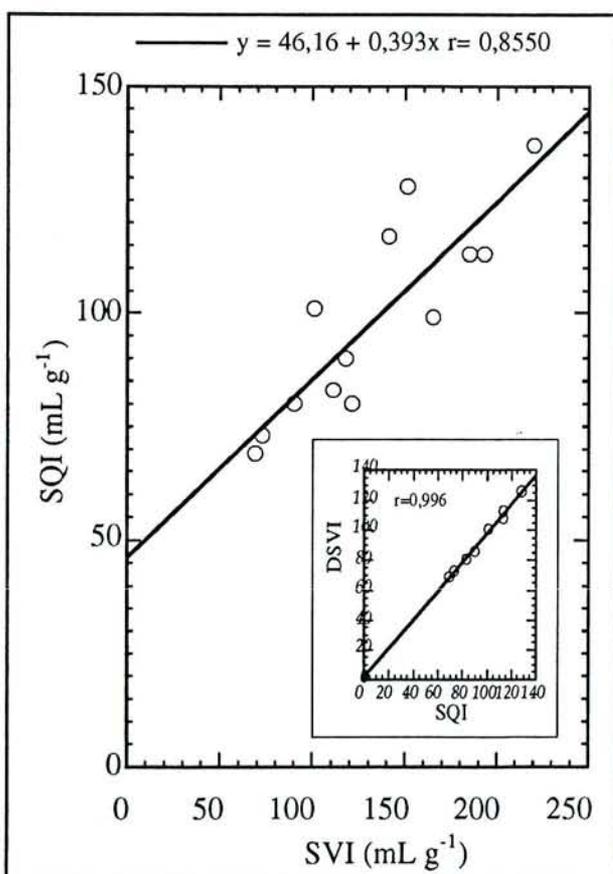


Figure V-4 : Relations linéaires entre l'indice SQI et l'indice SVI de 13 échantillons de boues (pilote et station d'épuration) et entre SQI et DSVI (en médaillon) de 8 échantillons de boues (pilote et station).

Cependant nous pensons qu'il est préférable d'utiliser l'indice SQI car celui-ci semble être moins influencé que l'indice SVI par la variation des teneurs en MES comme le montre le Tableau V-2. La boue A présente une concentration en MES relativement élevée (environ 4 g L⁻¹) et, après dilution, l'indice obtenu (DSVI pour "diluted sludge volume index") est plus faible que l'indice SVI

mais est identique à l'indice SQI (Tableau V-2). Par conséquent, la décantabilité d'une boue ayant une faible teneur en MES apparaît meilleure si l'indice SVI est seul pris en compte. En effet, la boue B qui a une teneur en MES presque deux fois plus faible que la précédente (2,22 g L⁻¹, Tableau V-2), présente au travers de l'indice SVI une meilleure décantabilité que la boue A (101 contre 118 mL g⁻¹). A teneur en MES presque identique, en considérant l'indice SQI ou l'indice DSVI, la décantabilité de la boue A devient meilleure (Tableau V-2). Aussi, afin de comparer avec le plus d'exactitude les résultats, nous avons choisi d'utiliser l'indice SQI. L'indice DSVI est comparable à l'indice SQI (Figure V-4 en médaillon) mais il nécessite plus de manipulations et c'est pour cette raison que nous l'avons peu utilisé. A titre d'information, les valeurs des indices SVI et DSVI sont données en annexe (Annexe I).

Tableau V-2 : Comparaison des indices de décantation de deux boues activées (provenant du pilote, boue A et de la station, boue B) ayant différentes concentrations en MES. SV30 = volume de boue après 30 min de décantation, SVI = indice de volume de boue sans dilution ("sludge volume index"), DSVI = indice de volume de boue avec dilution si SV30 > 300 mL ("diluted sludge volume index"), SQI = indice de qualité de boue ("sludge quality index") (Fitch et Kos, 1976) correspond à l'indice SVI corrigé quand SV30 est compris entre 300 et 800 mL (cf. § 1.2.5.2.4.).

	Boue A (23/07/93)	Boue B (22/07/93)
MES (mg L ⁻¹)	3,94 ± 0,03	2,22 ± 0,04
SV30 (mL L ⁻¹)	463	224
SVI (mL g ⁻¹)	118 ± 8	101 ± 2
DSVI (mL g ⁻¹)	86 ± 2*	idem
SQI (mL g ⁻¹)	90 ± 3	idem

*boue diluée au 1/2 soit MES = 1,97 g L⁻¹ et SV30 = 160 mL L⁻¹.

Pour un système où l'objectif est d'obtenir une décantabilité stable, la variabilité des indices de décantation peuvent être considérés comme très variables (cv% > 20 %, Tableau V-1). L'indice SQI a varié de 69 à 137 mL g⁻¹ (Annexe V-2) qualifiant la décantation des boues d'excellente (indices inférieurs à 80 mL g⁻¹) à moyenne ou médiocre (indices supérieurs à 110 mL) (Tableau V-1). C'est probablement grâce aux vidanges du décanteur que les situations critiques de bulking filamenteux n'ont pas été atteintes.

Hydrophobicité intrafloc

L'hydrophobicité intrafloc (A%) est relativement élevée (78±8%) comme le sont habituellement les boues de Maxéville. Le coefficient de variation associé à la moyenne est relativement faible (8%).

Polymères exo-cellulaires

Les polymères exo-cellulaires (PEC) représentent en DCO 146 mg d'O₂ g⁻¹ de MES soit environ 13 % de la DCO totale des boues (1200 mg g⁻¹). Les polysaccharides, ADN, protéines et acides uroniques correspondent aux valeurs moyennes habituellement rencontrées dans les boues de la station. Les teneurs en polymères exo-cellulaires sont relativement variables au vu des coefficients

de variation élevés (16 à 29 %).

Comparaison réacteur pilote et station

Les boues produites par le pilote semblent donc avoir des caractéristiques comparables à celles habituellement enregistrées sur des boues activées de station d'épuration. Néanmoins, en comparant les caractéristiques des deux boues (pilote et station), prélevées pendant la même période (1 jour d'intervalle), des différences significatives sont observées (Tableau V-3). En particulier le contenu en polymères exo-cellulaires est 66 % plus élevé dans la boue de station que dans la boue du pilote (Tableau V-3). L'analyse des PEC par famille chimique montre que cette différence concerne tous les groupes de polymères et particulièrement les protéines et les acides uroniques qui augmentent d'environ 70 %, les polysaccharides et l'ADN qui augmentent de 50 % environ (Tableau V-3). Le pilote ne permet pas d'obtenir des boues ayant les mêmes caractéristiques que celles de la station, au moins pour ce prélèvement.

Tableau V-3 : Comparaison des caractéristiques de la boue du pilote et de la boue de la station. Les boues ont été prélevées à 1 jour d'intervalle (22 et 23 juillet 93).

	Boue du pilote	Boue de la station	
MES (mg L ⁻¹)	4,33 ± 0,08	2,22 ± 0,04	
MVS (%MES)	70,8 ± 0,1	68,0 ± 0,5	
SVI (mL g ⁻¹)	111 ± 15	101 ± 2	
SQI (mL g ⁻¹)	83 ± 5	101 ± 2	
A%	84 ± 2	74 ± 2	
Polymères exo-cellulaires (mg g ⁻¹ MES)			(a)
DCO (mg d'O ₂)	98 ± 2	163 ± 3	+66%
Exo-pol (mg éq. Glc)	12,3 ± 0,4	18,3 ± 0,5	+49%
Exo-ADN (mg éq. ADN thymus veau)	9,7 ± 0,3	14,4 ± 0,5	+48%
Exo-pro (mg éq. SAB)	27 ± 0,5	46 ± 0,5	+70%
Acides Uroniques (mg équivalent acide glucuronique)	1,51 ± 0,06	2,6 ± 0,1	+72%

(a) = pourcentage exprimant la variation entre la boue de la station et la boue du pilote.

V.3.3.2. Variation des propriétés de décantation

Au cours de la première série de prélèvements (19 au 28 juillet 93), les boues sont d'assez bonne qualité en terme de décantabilité. L'indice SQI est relativement stable bien qu'une légère diminution soit observée (l'indice passe de 90 à 80 mL g⁻¹ en 9 jours) (Figure V-5). La forte production de mousse qui s'est produite pendant cette période (Figure V-1) n'est apparemment pas liée à l'altération de la décantation des boues.

Dans la deuxième série de prélèvements, des variations nettement plus fortes de l'indice SQI sont enregistrées. Ainsi le 29 mars 94 la décantabilité qui auparavant était excellente (SQI égal à environ 70 mL g⁻¹) devient moyenne à médiocre (SQI > 110) les jours suivants (Figure V-5). Simultanément une proportion plus importante de bactéries filamenteuses apparaît (Figure V-1) et se stabilise jusqu'au moment où le bassin est alimenté en eau brute, les filamenteuses reprenant alors un

niveau "normal". A partir du 21 avril 94, l'indice SQI a diminué mais les très bonnes valeurs de début mars ($SQI < 80 \text{ mL g}^{-1}$) n'ont pas été atteintes (Figure V-5). L'excès de bactéries filamenteuses ne serait alors pas le seul facteur responsable de l'altération de la décantabilité. Plusieurs mois après la 2^{ème} vidange du décanteur, les boues présentent un indice SQI correct ($= 80 \text{ mL g}^{-1}$, prélèvement du 10 octobre 94) mais qui de nouveau a glissé vers des valeurs médiocres quelques jours après ce prélèvement (d'après les observations de l'IRH).

V.3.3.3. Les polymères exo-cellulaires (PEC)

La concentration totale en polymères exo-cellulaires (PECT) a été déterminée par dosage de la DCO de l'extrait obtenu par sonication des boues pendant 60 s. Les différents groupes de macromolécules (protéines, polysaccharides et ADN) ont également été dosés dans cet extrait.

Tout comme l'indice SQI, les quantités de PEC des trois prélèvements de juillet 1993 sont relativement stables (99 à 94 mg g^{-1}) mais montrent aussi une très légère diminution (Figure V-5). La variabilité est plus importante pour les prélèvements de mars-avril 1994. Les PECT augmentent avec l'apparition des bactéries filamenteuses et l'augmentation de l'indice SQI. Le niveau de PECT reste ensuite élevé ($> 170 \text{ mg g}^{-1}$).

Parmi les PEC la fraction protéique est de loin la fraction majoritaire. Elle est deux à trois fois plus élevée que les polysaccharides et l'ADN qui sont en concentrations presque identiques l'un et l'autre (excepté dans le cas de la boue du 10 octobre où les polysaccharides sont presque deux fois plus élevée que l'ADN) (Figure V-6).

Les acides uroniques varient peu au cours des prélèvements, néanmoins il semble que ce soit pour les indices SQI les plus élevés que les plus fortes concentrations en acides uroniques sont obtenues (Figure V-7).

V.3.3.4. Variation de l'hydrophobicité intrafloc

L'hydrophobicité intrafloc des boues, exprimée à travers le pourcentage d'adhésion des cellules du floc à un solvant hydrophobe (octane), est la plus forte pour les échantillons de juillet 93 et pour ceux de début mars 94 (80 à 85 % d'adhésion) (Figure V-7). A partir du 29 mars, l'hydrophobicité des boues a tendance à diminuer (72 % le 21 avril) et c'est pour l'échantillon du 10 octobre 94 que la plus faible valeur est enregistrée (65 %).

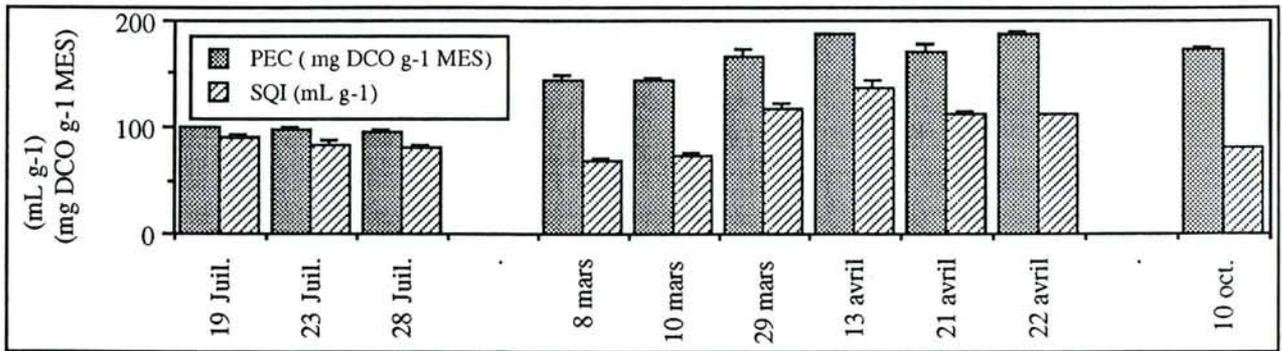


Figure V-5 : Variation de l'indice SQI et des polymères exo-cellulaires (PEC) des boues du pilote en fonction des dates de prélèvement. Les PEC sont extraits des boues par 60 s d'ultrasons et sont quantifiés par dosage de la DCO.

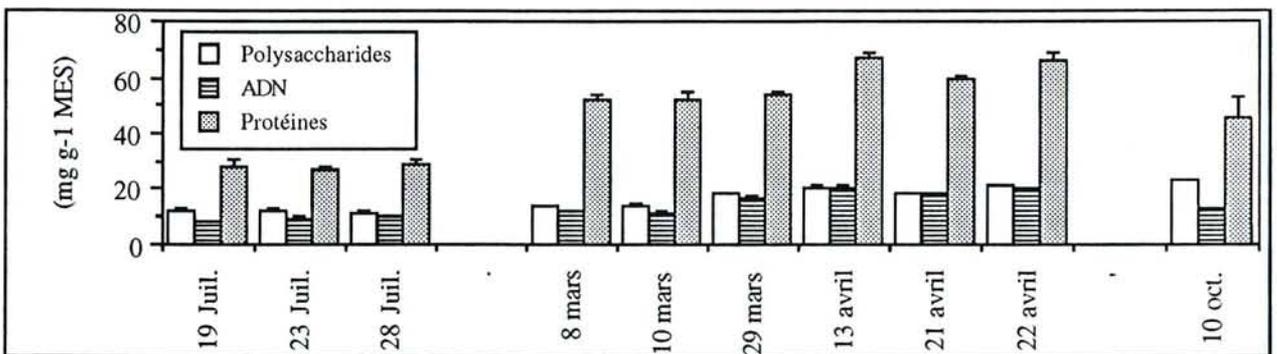


Figure V-6 : Variation des contenus en polysaccharides, ADN et protéines des PEC du pilote en fonction des dates de prélèvements.

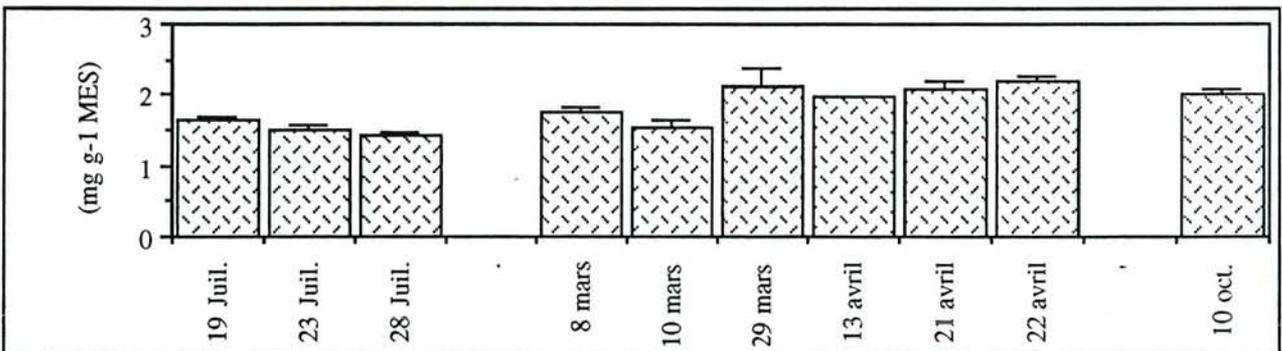


Figure V-7 : Variation du contenu en acides uroniques des PEC du pilote en fonction des dates de prélèvements.

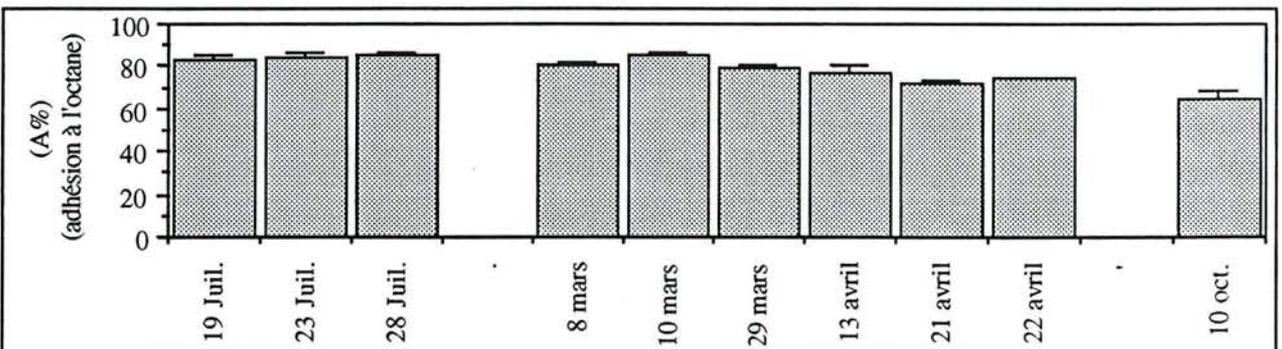


Figure V-8 : Variation de l'hydrophobicité intrafloc (A%) des boues activées du pilote en fonction des dates de prélèvements.

V.3.4. Discussion

Les valeurs de tous les paramètres mesurés à partir des boues du pilote et des boues de la station sont analysées afin de rechercher d'éventuelles relations entre les variables et en particulier entre A%, SQI et les différents PEC. Les coefficients de régression linéaires sont rassemblés dans le Tableau V-4. Aucune corrélation multiple significative n'a été obtenue entre les variables.

Tableau V-4 : Matrice de corrélation linéaire entre les variables des boues activées du pilote. Au risque α de 5%, seuls les coefficients de corrélation supérieurs à 0,576 sont pris en compte (en caractères gras) (n=12).

	MES	MESExp	MVS	SVI	SQI	A%	PECT	Polys.	ADN	Prot.	Ac. Uro.
MES	1,000										
MESExp	0,854	1,000									
MVS	0,947	0,841	1,000								
SVI	-0,030	0,040	0,082	1,000							
SQI	-0,479	-0,283	-0,334	0,872	1,000						
A%	0,362	0,317	0,157	-0,276	-0,447	1,000					
PECT	-0,640	-0,481	-0,512	0,434	0,689	-0,787	1,000				
Polys.	-0,513	-0,376	-0,314	0,455	0,671	-0,907	0,934	1,000			
ADN	-0,485	-0,318	-0,383	0,734	0,860	-0,654	0,904	0,840	1,000		
Prot.	-0,574	-0,423	-0,500	0,490	0,688	-0,631	0,962	0,820	0,915	1,000	
Ac. Uro.	-0,695	-0,600	-0,576	0,332	0,614	-0,765	0,751	0,769	0,715	0,617	1,000

Biomasse

Les MES et les MVS ne sont pas, excepté entre elles, liées de manière forte aux autres paramètres. Une corrélation inverse des MES avec les PECT ($r = 0,640$), ou avec les acides uroniques ($r = 0,695$) est constatée. Cette corrélation pourrait signifier que le rendement d'extraction des PEC est diminué aux fortes concentrations en MES. Cependant, les MES des boues ont été ajustées à $3,8 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$ avant l'extraction des polymères. Les valeurs de ces MES ajustées ("MESExp.", Tableau V-4) ne sont pas corrélées avec les PEC ou très faiblement avec les acides uroniques suggérant alors qu'il n'y a pas d'effet significatif des MES sur les rendements d'extraction des PEC.

Les coefficients de régression entre les différents groupes de PEC sont significatifs ($r = 0,612$ à $0,915$). L'ADN est particulièrement bien corrélé aux protéines ($r = 0,915$) et aux polysaccharides ($r = 0,840$). Par contre, l'acide uronique est faiblement corrélé avec les autres groupes de polymères exo-cellulaires ($r = 0,617$ à $0,769$), mais du fait de sa nature glucidique c'est logiquement qu'il est le mieux corrélé avec les polysaccharides ($r = 0,769$) (Tableau V-4).

Exo-polymères et hydrophobicité intrafloc

Les PECT et tous les groupes chimiques sont inversement corrélés à l'hydrophobicité intrafloc des boues ($r = -0,787$). Les deux corrélations les plus fortes sont obtenues pour les polysaccharides et les acides uroniques (respectivement $-0,907$ et $-0,765$ avec A%, Tableau V-4). La corrélation de A% avec les polysaccharides est représentée par la Figure V-9. Ainsi plus la

quantité d'exopolymères, et particulièrement des exopolysaccharides, est élevée plus l'hydrophobicité de surface cellulaire des micro-organismes des boues est faible. Cette relation pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de polymères extraits des floes est proportionnelle à la quantité de polymères restant à la surface des cellules. Ces derniers réduiraient l'hydrophobicité de surface cellulaire par leur caractère hydrophile et en masqueraient les éventuelles zones hydrophobes. Cette hypothèse va dans le sens des résultats obtenus au paragraphe V-2 (Jorand *et al.*, 1994) : de deux souches isolées de boues activées, la plus une souche pure hydrophile produisait des quantités importantes de polysaccharides contrairement à une souche hydrophobe. Cela renforce l'hypothèse de la balance hydrophile/hydrophobe qui veut que l'hydrophobicité intrafloc est opposée aux polymères exocellulaires du floc (Urbain *et al.*, 1993).

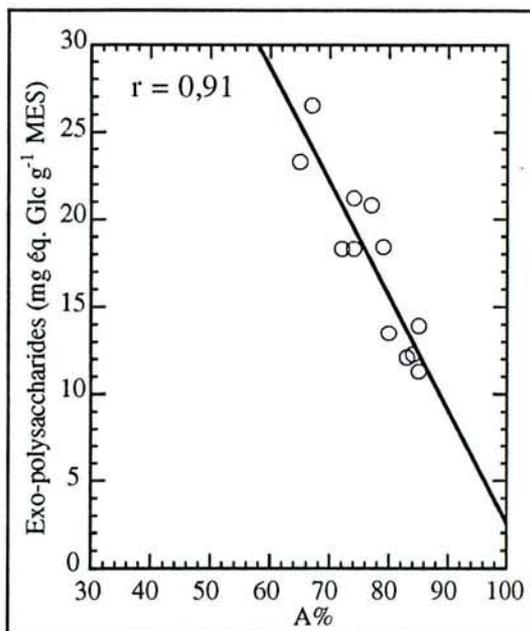


Figure V-9 : Relation linéaire entre les polysaccharides et A% des boues du pilote (n=10) et des boues de la station (n=2).

Il est probable que parmi les polysaccharides, ceux portant des résidus acides types acides uroniques soient particulièrement impliqués dans les propriétés hydrophiles des boues activées comme le suggèrent Steiner *et al.* (1976), Forster (1976) et Horan et Eccles (1986). La corrélation négative obtenue entre A% et la quantité d'acides uroniques renforce cette hypothèse (Tableau V-4).

Exo-polymères et décantabilité

Les PECT et SQI sont significativement liés ($r = 0,689$). La décantabilité est donc d'autant plus médiocre que la quantité de PEC extraits des boues est élevée. La plus forte corrélation est obtenue avec l'ADN ($r=0,860$) qui est en outre le seul des PEC à être lié avec l'indice SVI ($r = 0,734$). Cette corrélation linéaire est représentée par la Figure V-10.

Plusieurs travaux font état de relations entre la quantité de PEC des boues et leur décantabilité, impliquant qu'ils ont un effet négatif sur l'aptitude du floc à décanter (Forster, 1971 cité par Urbain *et al.*, 1993 ; Goodwin et Forster, 1985 ; Eriksson et Alm, 1991 ; Urbain *et al.*, 1993). Nos résultats

vont dans le sens de ces travaux. Urbain *et al.* (1993) proposent que c'est par augmentation de l'hydratation des boues que les PEC hydrophiles jouent un rôle négatif sur la décantabilité des boues. Toutefois ils considèrent que leur présence est nécessaire pour assurer la cohésion du floc.

L'ADN est parmi les PEC celui qui présente la meilleure corrélation avec SQI ($r = 0,86$, Tableau V-4 et Figure V-10) ce qui va à l'encontre des résultats obtenus par Genetelli (1967) et Vallom et McLoughlin (1984) qui trouvaient une relation positive de la concentration en ADN des boues avec leur décantabilité.

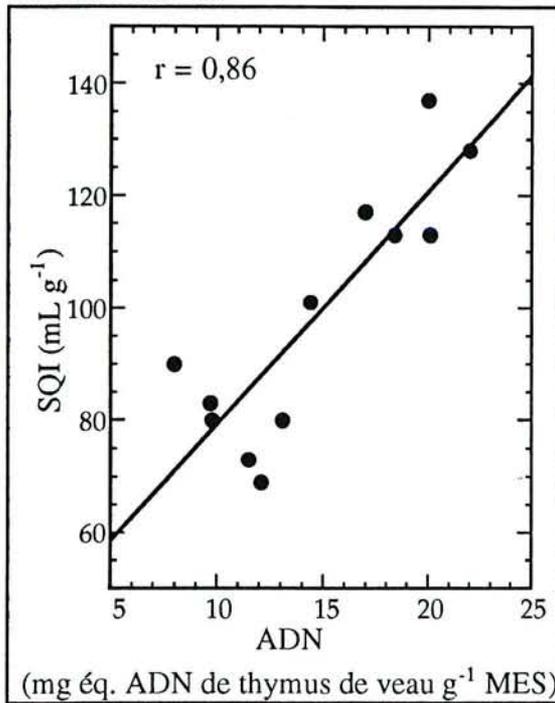


Figure V-10 : Corrélation linéaire entre SQI et l'ADN des boues du pilote et de la station (n=12).

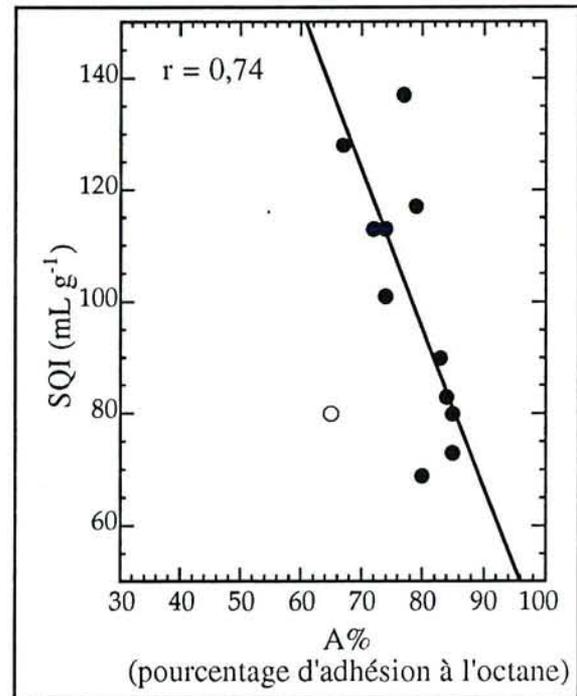


Figure V-11 : Corrélation linéaire entre SQI et A% des boues du pilote de la station (n=11). Seul le point blanc, correspondant à la boue prélevée le 10/10/94 n'est pas pris en compte dans le calcul du coefficient de régression.

Hydrophobicité et décantabilité

Aucune corrélation significative n'est obtenue entre SQI (ou SVI) et A%. Cependant si le prélèvement du 10 octobre 94, qui est le seul qui représente les boues obtenues après la vidange du 29 avril 1994 (Figure V-1), est ignoré, une corrélation linéaire inverse significative ($r = -0,738$) est obtenue (Figure V-11).

V.4. Conclusion

L'hydrophobicité intrafloc des boues est la conséquence d'une population microbienne ayant des propriétés hydrophobes très différentes (A% varie de 0 à 100%). Ces propriétés sont en outre capables de changer fondamentalement au cours de la croissance de certaines souches bactériennes ce qui suggère une forte influence des conditions de croissance microbienne sur les propriétés des flocs.

La culture en réacteur fermé de boues activées montrent que la balance hydrophobe/hydrophile est sensible à des variations d'alimentation en éléments nutritifs ce qui entraîne une modification des propriétés de décantation des boues. Le suivi des caractéristiques des boues d'un réacteur industriel permet de confirmer l'existence d'une relation entre les exo-polymères, l'hydrophobicité et la décantabilité des floccs. Par contre l'hydrophobicité n'apparaît pas être directement liée à la décantabilité des boues mais est reliée au contenu en PEC : ceux-ci affecteraient ainsi à la fois la décantabilité des boues et leur hydrophobicité.

Les perspectives d'une telle recherche sont d'identifier les facteurs qui favorisent la croissance des populations bactériennes vers un stade où leur hydrophobicité de surface est optimale et où la synthèse de polymères exo-cellulaires est réduite.

V.5. Références

Note : les références du paragraphe V-2 sont données en pages 155 et 156.

- URBAIN V., J.C. BLOCK and J. MANEM (1993) Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach, *Wat. Res.*, **27**, 829-838.
- EISEN A. and G. REID (1989) Effect of culture media on *Lactobacillus* hydrophobicity and electrophoretic mobility, *Microb. Ecol.*, **17**, 17-25.
- FORSTER C.F. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge-I. Nutrients and surface polymers, *Wat. Res.*, **19**, 1259-1264.
- HANTULA J. and D.H. BAMFORD (1991) The efficiency of the protein-dependent flocculation of *Flavobacterium* sp. is sensitive to the composition of growth medium, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 100-104.
- JORAND F., GUICHERD P., URBAIN V., MANEM J. and BLOCK J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge floccs and laboratory-grown bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **30**, n°11, 211-218.
- ERIKSSON L., I. STEEN and M. TENDAJ (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, n°6, 251-265.
- JENKINS D., M.G. RICHARD and G.T. DAIGGER (1993) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton, 193 pages.
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- DERIAZ R.E., M. STACEY, E.G. TEECE and L.F. WIGGINS (1949) Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses., *J. Chem. Soc.*, **14**, 1222-1232.
- BLUMENKRANTZ N. and G. ASBOE-HANSEN (1973) New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.
- FITCH B. and P. KOS (1976) Toward a more meaningful index of sludge quality, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **48**, 1979-1987.
- STEINER A.E., McLAREN D.A. and FORSTER C.F. (1976) The nature of activated sludge floccs, *Wat. Res.*, **10**, 25-30.
- HORAN N.J. and C.R. ECCLES (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges, *Wat. Res.*, **20**, 1427-1432.
- GOODWIN J.A.S. and C.F. FORSTER (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics, *Wat. Res.*, **19**, 527-533.
- ERIKSSON L. and B. ALM (1991) Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties, *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 21-28.
- GENETELLI E.J. and H. HEUKELEKIAN (1964) The influence of loading and chemical composition of substrate on the performance of activated sludge, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **36**, 643-649.
- VALLOM J.K. and A.J. McLOUGHLIN (1984) Lysis is a factor in sludge flocculation, *Wat. Res.*, **18**, 1523-1528.

CONCLUSION GENERALE

La présence de micro-organismes, de polymères exo-cellulaires hydrophiles, de cations divalents et de polymères exo-cellulaires hydrophobes dans les agrégats microbiens ("flocs") issus du traitement des eaux usées par "boues activées" explique largement le phénomène de floculation microbienne et la cohésion des agrégats bactériens. Parmi les polymères exo-cellulaires, les groupes chimiques obtenus sont par ordre d'importance quantitative : i) les protéines (30–100 mg g⁻¹ MES), ii) les glucides (11–30 mg g⁻¹ MES) et iii) l'ADN (8–22 mg g⁻¹ MES). D'autres groupes chimiques tels que les substances humiques, les lipides ou les ARN sont présents dans les boues activées, d'après l'analyse bibliographique, mais n'ont pas été recherchés dans notre étude. La prédominance dans les polymères exo-cellulaires extraits, des protéines par rapport aux glucides, modifie la traditionnelle vision des agrégats microbiens où les cellules sont retenues par un réseau de polysaccharides.

Une meilleure connaissance de la structure des "flocs biologiques" et des paramètres liés à la formation d'agrégats denses est nécessaire pour mieux contrôler l'épuration des eaux usées par les boues activées particulièrement au niveau de la séparation eau-biomasse. Nous avons pu montrer que les boues activées étudiées sont formées d'agrégats microbiens de taille très variable avec une population dominante de macroflocs. La distribution de la taille est centrée autour de 125 µm de diamètre. Ces macroflocs proviennent d'un assemblage de microflocs d'une dizaine de micromètres eux-mêmes constitués par des particules dont la taille est de l'ordre du micromètre et qui correspondent probablement aux micro-organismes. La force de cohésion des microflocs se révèle particulièrement importante.

L'extraction des polymères exo-cellulaires par l'EDTA et par les ultrasons permet d'obtenir, par rapport au traitement par les ultrasons seuls, des quantités plus importantes de polymères et particulièrement en polysaccharides acides et en ADN suggérant que ceux-ci sont liés aux flocs par des pontages faisant intervenir des cations. En outre, le "piégeage" des cations par une résine ou un chélatant (type EDTA) n'est pas efficace si celui-ci n'est pas complété par un traitement mécanique (agitation à grande vitesse ou sonication). L'action du chélatant au sein de la matrice d'exo-polymères serait ainsi limité probablement par diffusion. La question de l'extraction totale des polymères exo-cellulaires reste cependant imparfaitement résolue principalement du fait de la forte résistance des microflocs à la sonication et au risque de contamination par les composés intracellulaires dus à la lyse des cellules provoquée par les ultrasons.

La caractérisation hydrophobe/hydrophile des polymères exo-cellulaires des boues activées par fractionnement avec des résines non ioniques montre que certains présentent un caractère hydrophobe : 6 à 8 % de l'ensemble (dosage du carbone organique dissous) si seule l'adsorption sur résine XAD-8 est considérée et, jusqu'à 50 % en prenant en compte la fraction précipitée par acidification des échantillons à pH 2. En outre, la nature à la fois protéique et glucidique de cette fraction précipitée suggère la présence d'une large quantité de glycoprotéines. Au contraire, la fraction non précipitable et non adsorbable sur résine ne contient pas de protéines mais contient des glucides tandis que la fraction adsorbée sur la résine XAD-8 contient des protéines mais pas de glucides. Ces observations

renforcent l'idée que des hétéropolymères amphiphiles participent à la matrice du floc.

Afin de vérifier la capacité des floes à adsorber ("biosorber") une fraction de la pollution colloïdale/dissoute, nous avons tout d'abord analysé le caractère hydrophobe/hydrophile des composés non particuliers des eaux usées brutes et épurées. Ainsi, 40 % des molécules (mesurées par dosage du carbone organique dissous) des eaux usées présentent un caractère hydrophobe et 2/3 environ de ces molécules sont éliminés par le traitement d'épuration. Un test de "biosorption" en laboratoire appliqué sur une dizaine d'échantillons montre que 60% du carbone organique dissous peuvent être éliminés de la phase eau en 1 h à + 4°C. Toutefois, la comparaison conduite pour un faible nombre d'échantillons (5 boues) ne met pas en évidence de relation entre l'hydrophobicité interne des boues et leur propriétés d'adsorption mais montre une relation entre les propriétés de biosorption des boues avec d'une part leur capacité à décanter et d'autre part avec leur contenu en polymères exo-cellulaires.

L'analyse microbiologique montre qu'au sein des agrégats de boues activées, pourtant largement hydratés, coexistent des bactéries présentant des surfaces hydrophobes (exemple : *Enterococcus hirae*) et d'autres présentant des surfaces hydrophiles (exemple : *Klebsiella oxytoca*). L'hydrophobicité de certaines des souches est variable au cours de la croissance (exemple *Acinetobacter johnsonii* et *Leclercia adecarboxylata*). Les plus fortes variations s'observent généralement durant la phase exponentielle de croissance et sont probablement liées à la disponibilité en substrat ou/et en oxygène. Le suivi des caractéristiques de boues activées cultivées en laboratoire (réacteur fermé supplémenté en glucose) ou provenant d'un réacteur continu de taille industrielle, montre que l'hydrophobicité des boues, mesurée sur le mélange hétérogène des micro-organismes obtenus par dispersion des floes, ne varie pas de manière importante (coefficient de variation égal à 8%) contrairement aux polymères exo-cellulaires (coefficient de variation égal à 25%). En outre, la qualité de la décantation des boues s'altère avec leur contenu en polymères exo-cellulaires. Par conséquent, l'activité des cellules microbiennes impliquées dans la synthèse des polymères exo-cellulaires hydrophiles peut, plus que la proportion de cellules hydrophobes/hydrophiles, avoir un impact sur la qualité du floc.

Les perspectives d'une telle recherche sont tout à fait intéressantes. Elles doivent viser, au-delà du besoin d'outils analytiques améliorés (analyse et extraction des exo-polymères, caractérisation de l'hydrophobicité...), à identifier les facteurs qui favorisent directement la croissance des populations bactériennes hydrophobes ou/et la production de polymères exo-cellulaires hydrophobes assurant ainsi une forte cohésion des agrégats.

ANNEXES

ANNEXE I: Caractérisations physico-chimiques des boues utilisées dans le paragraphe II.3. et les chap. IV et V.

paramètres mesurés	Pilote						
	19-Jul-93 (9h)	23-Jul-93 (10h)	28-Jul-93 (11h15)	8-Mar-94 (9h)	10-Mar-94 (9h)	29-Mar-94 (11h30)	13-Avr-94 (9h)
MES (g L-1)	3,94±0,03	4,33±0,08	5,05±0,03	3,73±0,04	3,22±0,04	2,86±0,03	3,13±0,04
MVS (g L-1)	2,99±0,04	3,07±0,06	3,32±0,06	2,33±0,02	2,11±0,03	2,11±0,03	2,28
MVS (% des MES)	75,8±0,4	70,8±0,1	66,2±0,4	62,4±0,3	65,4±0,1	74,3±0,3	73%
DCOT (mg O2 L-1)	\	\	\	\	\	3350±170	3725
SV30 (mL L-1)	463	487	610	258±3	237±6	403±57	690±56
SVI sans dilution (mL g-1)	118±8	111±15	121±7	69±1	73±2	141±19	220±19
SVI avec dilution (mL g-1)	86 (d1/2)	81±2 d(2/3)	\	\	\	\	\
SQI (mL g-1, Fitch & Kos, 1976)	90±3	83±5	80±2	69±1	73±2	117±6	137±7
Hydrophobicité (A%)	83±2	84±2	85±1	80±2	85±1	79±2	77±3
Refloculation (F%)	17±3	22±2	20±3	32±3	23±4	28±4	34±0,5
PEC (mg g-1 MES)							
DCO (mg O2)							
% DCOT de la boue (a)	8,30%	8,20%	7,80%	11,90%	12,10%	13,90%	15,60%
sonication 60 s	99±2	98±3	94±3	143±5	145±2	167±5	187±2
sonication 120 s	\	158±0	146±0	192±4	199	267±3	272±5
rapport 60s/120s	\	0,62	0,64	0,74	0,73	0,63	0,69
Polysacch. (mg éq. Glc)							
sonication 60 s	12,1±0,8	12,3±0,4	11,3±0,6	13,5±0,2	13,9±0,6	18,4±0,6	20,8±0,9
sonication 120 s	\	20,3±0,7	17,8±0,4	18,4±0,1	18,8±0,8	28,0±0,6	29,7±0,5
rapport 60s/120s	\	0,61	0,63	0,73	0,74	0,66	0,70
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	25,0±0,5	27±1
EDTA 2,5mM	\	\	\	7,9±0,8	\	5,6±0,1	\
ADN (mg éq. ADN thymus)							
sonication 60 s	8,0±0,2	9,7±0,3	9,8±0,4	12,1±0,4	11,5±0,5	17±1	20±1
sonication 120 s	\	16,6±0,2	16,3±0,1	16±1	17,3±0,1	27,7±0,2	28,4±0,3
rapport 60s/120s	\	0,58	0,60	0,77	0,67	0,60	0,71
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	23,4±0,2	26±2
EDTA 2,5mM	\	\	\	4,2±0,3	\	5±1	\
Protéines / Bradford (b)							
sonication 60 s	12,6±0,7	12,7±0,9	13,0±0,3	30±1	31,4±0,9	30±0,5	33±2
sonication 120 s	\	20,3±0,5	20,1±0,4	40±1	42,2±0,2	47±0,1	47±3
rapport 60s/120s	\	0,63	0,65	0,75	0,74	0,64	0,70
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	27±3	32±1
EDTA 2,5mM	\	\	\	7,1±0,4	\	3,7±0,2	\
Protéines / Lowry (b) (c)							
sonication 60 s	28±3	27±0,5	29±2	52±2	52±3	54±1	67±2
sonication 120 s	\	42±3	43±1	70±0,1	65,2±0,8	83±0,5	95±5
rapport 60s/120s	\	0,64	0,67	0,74	0,79	0,65	0,71
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	50±4	61±2
EDTA 2,5mM	\	\	\	22±1	\	14±0,1	\
Ac.Uroniques (mg éq. Ac.gluc.)							
sonication 60 s	1,63±0,04	1,51±0,06	1,43±0,02	1,77±0,06	1,53±0,12	2,11±0,25	1,96±0,01
sonication 120 s	\	2,4±0,3	1,9±0,1	2,06±0,01	1,89±0,15	3,06±0,13	3,13±0,1
rapport 60s/120s	\	0,63	0,75	0,86	0,81	0,69	0,63
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	3,77±0,06	4,00±0,23
EDTA 2,5mM	\	\	\	2,36±0,16	\	2,23±0,02	\
Remarques générales							
<u>Alimentation</u>							
Mousses	+	++	+++	+	+	+	+
Filamenteuses	++	++	++	++	++	+++	+++

(a) pour les PEC extraits par 60 s d'ultrasons et sur la base de 1 g de boue = 1200 mg de DCO.

1

(b) mg éq. SAB

(c) sur la fraction précipitée par le TCA

ANNEXE I (suite)

paramètres mesurés	Pilote			Station	
	21-Avr-94 (9h)	22-Avr-94 (15h)	10-Oct-94 (9h)	22-Jul-93 (9h15)	10-Mai-94 (14h)
MES (g L-1)	3,91±0,04	4,18±0,04	3,98±0,03	2,22±0,04	2,55±0,001
MVS (g L-1)	2,84±0,03	3,00±0,03	3,14±0,03	1,51±0,02	2,02±0,01
MVS (% des MES)	72,7±0,1	71,9±0,2	78,9	68,0±0,5	78,9±0,2
DCOT (mg O2 L-1)	4694±105	4826	\	\	\
SV30 (mL L-1)	723±25	800	360±17	224	385±21
SVI sans dilution (mL g-1)	185±6	193	90±4	101±2	151±8
SVI avec dilution (mL g-1)	113±7	108±12	\	\	\
SQI (mL g-1, Fitch & Kos, 1976)	113±2	113	80±1	101±2	128±3
Hydrophobicité (A%)	72±1	73,7±0,1	65±3	74±2	66,9±0,3
Refloculation (F%)	34±1	28±2	38±5	11±3	33±2
PEC (mg g-1 MES)					
DCO (mg O2)					
% DCOT de la boue (a)	14,20%	15,70%	14,30%	13,40%	21,70%
sonication 60 s	170±9	188±2	172±4	163±3	260±3
sonication 120 s	239±1	267±0	277±8	235±1	360±2
rapport 60s/120s	0,71	0,7	0,62	0,69	0,72
Polysacch. (mg éq. Glc)					
sonication 60 s	18,3±0,7	21,2±0,0	23,3±0,2	18,3±0,5	26,5±0,5
sonication 120 s	25,3±0,3	27±3	31,9±0,5	26,5±0,4	34,5±0,2
rapport 60s/120s	0,72	0,79	0,73	0,69	0,77
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	29,7±0,8	27,3±0,6	24,5±1,8	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	5,4±0,2	\	\
ADN (mg éq. ADN (hymus))					
sonication 60 s	18,4±0,3	20,1±0,0	13,1±0,1	14,4±0,5	22,0±0,5
sonication 120 s	26,4±0,4	28±1	20,7±0,2	21,4±0,4	32
rapport 60s/120s	0,70	0,71	0,63	0,67	0,69
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	29,1±0,1	28±1	15,2±1,6	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	2,7±0,4	\	\
Protéines / Bradford (b)					
sonication 60 s	33±1	37±2	23±4	28,3±0,9	61±3
sonication 120 s	49±1	54±2	35±1	40,1±0,8	85±3
rapport 60s/120s	0,67	0,69	0,66	0,71	0,72
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	36±3	36±1	16,2±0,6	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	1,4±0,4	\	\
Protéines / Lowry (b) (c)					
sonication 60 s	60±0,5	66±3	46±7	46±0,5	93±5
sonication 120 s	84±4	88±1	78±4	66±3	121±1
rapport 60s/120s	0,71	0,75	0,58	0,70	0,77
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	66±2	57±0,5	31±2	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	8±1	\	\
Ac.Uroniques (mg éq. Ac.gluc.)					
sonication 60 s	2,09±0,10	2,20±0,07	2,03±0,04	2,6±0,1	2,33±0,02
sonication 120 s	2,64±0,03	2,36±0,04	2,73±0,05	2,8±0,2	2,80±0,11
rapport 60s/120s	0,79	0,94	0,74	0,93	0,83
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	3,71±0,20	2,92±0,14	3,51±0,28	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	1,93±0,13	\	\
Remarques générales					
Alimentation					
eau brute					
eau décantée primaire					
Mousses	+	+	0	+	±
Filamenteuses	++	++	++	++	++

(a) pour les PEC extraits par 60 s d'ultrasons et sur la base de 1 g de boue = 1200 mg de DCO.

2

(b) mg éq. SAB

(c) sur la fraction précipitée par le TCA

ANNEXE I (suite et fin)

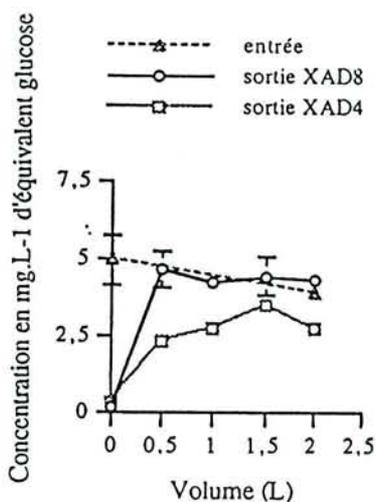
paramètres mesurés	Station					
	17-Déc-91 (n°1)	18-Fév-92 (n°2)	25-Fév-92 (n°3)	27-Fév-92 (n°4)	10-Mar-92 (n°5)	22-Fév-93 (n°6)
MES (g L-1)	4,45±0,03	3,67±0,03	4,18±0,06	2,72±0,02	4,03±0,02	5,25±0,02
MVS (g L-1)	3,33	2,66	3,05	2,01	3,09	3,98
MVS (% des MES)	74,9±0,2	72,4±0,2	72,9±0,2	74,0±0,1	76,8±0,2	75,8±0,1
DCOT (mg O2 L-1)	\	\	\	\	\	\
SV30 (mL L-1)	921	503	899	800	891	940
SVI sans dilution (mL g-1)	207	137	215	294	221	179
SVI avec dilution (mL g-1)	\	\	125	132	136	\
SQI (mL g-1, Fitch & Kos, 1976)	114	100	120	172	123	\
Hydrophobicité (A%)	\	\	\	\	\	\
Refloculation (F%)	\	\	\	\	\	\
PEC (mg g-1 MES)						
DCO (mg O2)						
% DCOT de la boue (a)	\	\	\	\	\	\
sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
sonication 120 s	\	\	\	\	\	\
rapport 60s/120s	\	\	\	\	\	\
Polysacch. (mg éq. Glc)						
sonication 60 s	15,5	12,9	10,9	10,6	14,6	14,5
sonication 120 s	20	18,3	16,4	16,8	19,9	21,9
rapport 60s/120s	1,29	1,42	1,5	1,59	1,36	1,51
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	\	\	\	\
ADN (mg éq. ADN thymus)						
sonication 60 s	11,9	12,5	12,3	19,1	\	13,1
sonication 120 s	19,8	19,4	20,4	25,4	\	20,2
rapport 60s/120s	1,66	1,54	1,67	1,33	\	1,54
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	\	\	\	\
Protéines / Bradford (b)						
sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
sonication 120 s	\	\	\	\	\	\
rapport 60s/120s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	\	\	\	\
Protéines / Lowry (b) (c)						
sonication 60 s	49,4	35,8	33,7	34,1	\	61
sonication 120 s	68,8	48,4	53,4	55,4	\	89
rapport 60s/120s	1,39	1,35	1,58	1,63	\	1,46
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	\	\	\	\
Ac.Uron. (mg éq. Ac.gluc.)						
sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
sonication 120 s	\	\	\	\	\	\
rapport 60s/120s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM + sonication 60 s	\	\	\	\	\	\
EDTA 2,5mM	\	\	\	\	\	\
Remarques générales						
Alimentation	eau décantée primaire			brasserie	eau décantée primaire	
Mousses	±	±	±	+	±	±
Filamenteuses	+ à ++	+ à ++	+ à ++	+ à ++	+ à ++	+ à ++

(a) pour les PEC extraits par 60 s d'ultrasons et sur la base de 1 g de boue = 1200 mg de DCO.

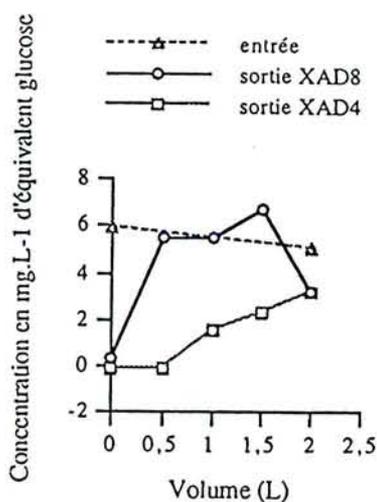
3

(b) mg éq. SAB

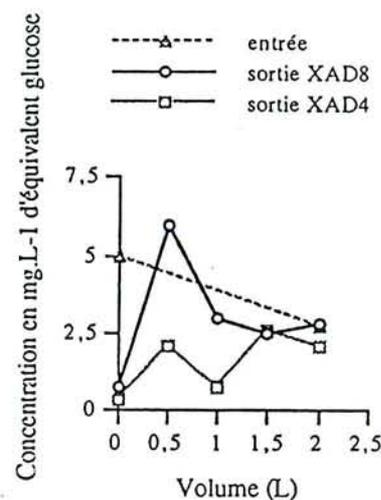
ANNEXE II : Courbes de percée des résines XAD par les solutions de polymères exo-cellulaires extraits d'une boue du pilote, de brasserie et de la station d'épuration de Maxéville. La concentration en polymères au cours de la filtration a été évaluée par dosage des protéines et des polysaccharides.



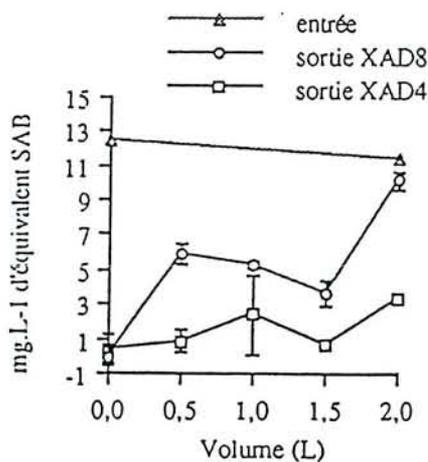
Suivi des polysaccharides des filtrats XAD-8 et XAD-4 de la boue de brasserie



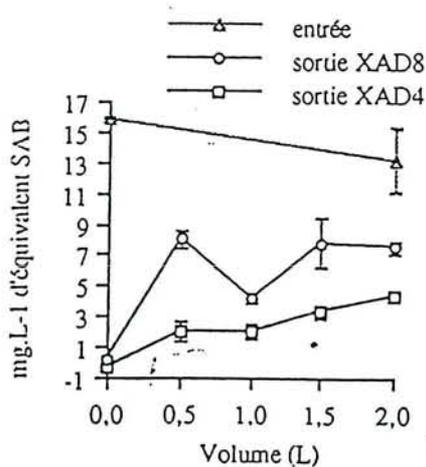
Suivi des polysaccharides des filtrats XAD-8 et XAD-4 de la boue du pilote



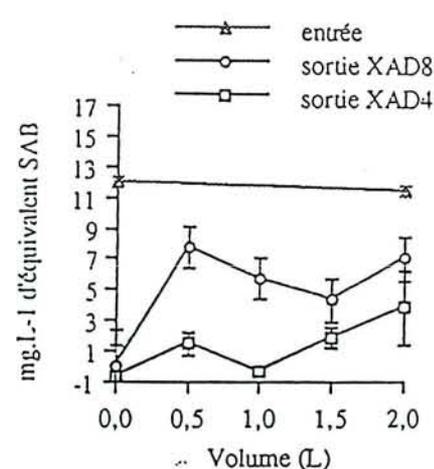
Suivi des polysaccharides des filtrats XAD-8 et XAD-4 de la boue de station



Suivi des protéines des filtrats XAD8 et XAD4 de la boue de brasserie



Suivi des protéines des filtrats XAD8 et XAD4 de la boue du pilote

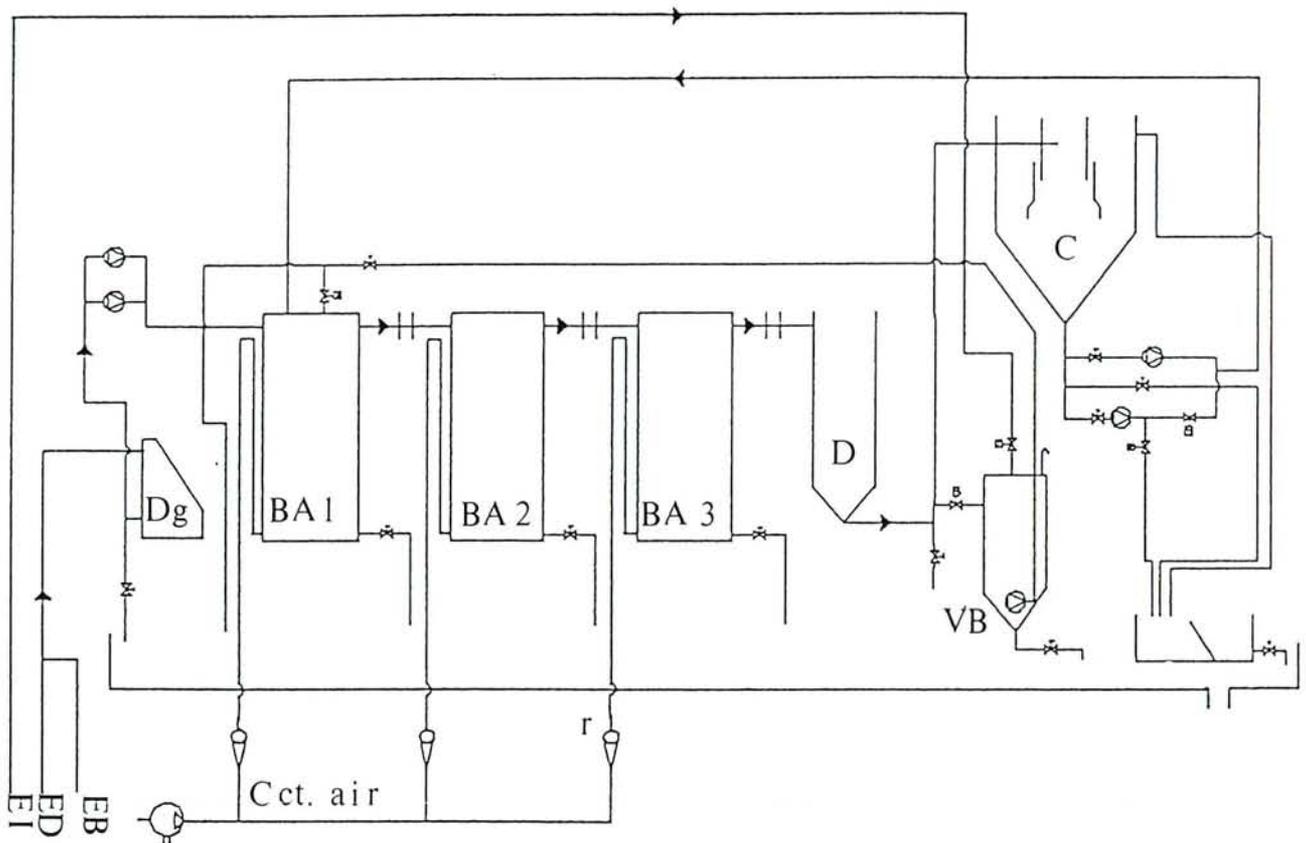


Suivi des protéines des filtrats XAD8 et XAD4 de la boue de station

ANNEXE III : Résultats des identifications de 4 souches hydrophobes/hydrophiles isolées des boues (les analyses ont été effectuées par le "Laboratoire des Identifications" de l'Institut Pasteur, 28, rue du Dr ROUX, 75724 PARIS CEDEX 15, tél. (1) 45 68 80 00).

Dénomination de la souche	Diagnostic
Hi12	<i>Klebsiella oxytoca</i> (gram négatif)
Hi10	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (gram négatif)
Hi13	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (gram négatif)
Hi8	<i>Enterococcus hirae</i> (gram positif)

ANNEXE IV : Caractéristiques hydrauliques et schéma du réacteur pilote installé sur le site de Maxéville (aimablement fournis par l'Institut de Recherche Hydraulique, 54500, Vandoeuvre-les-Nancy).



Légende :

EB = eaux usées urbaines brutes

ED = eaux usées urbaines prédécantées

EI = eaux usées industrielles (brasserie)

Cct. air = circuit d'air

VB = colonne de mesure de la décantabilité des boues

BA = bassin aéré de boues activées (3 X 2,7 m³)

D = dégazeur (1 m³)

C = clarificateur (6 m³)

Dg = dégrilleur (0,2 mm)

Le pilote fonctionne selon le procédé dit à "moyenne charge" (Degrémont, 1989).

Alimentation : par les eaux usées alimentant la station, urbaines (brutes ou prédécantées), ou industrielles et après dégrillage. Débit = 2 m³ h⁻¹. DBO₅ (valeurs moyennes journalières des eaux usées urbaines prédécantées) = 55 mg L⁻¹ (valeurs minimales) et 80 mg L⁻¹ (valeurs maximales)

Bassins d'aération : 3 bassins de boues activées (numérotés de 1 à 3) montés en série. Temps de rétention hydraulique pour les trois bassins = env. 3,5 h

Boues : env. 3 g L⁻¹

production journalière env. 3 kg j⁻¹

âge de boue moyen = 8 j.

ANNEXE V : Résultats des essais de biosorption. Teneurs en COD dans la phase eau de la boue et de l'influent (eaux usées) en mg L-1 et valeurs de biosorption. c = charge organique. ec = écarts-types, m = moyenne.

Prélèvement du 20/12/93 — Boue de la Station —

MESboue = 3,82 g L-1

MESinfluent = 68±2 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,764 g/L

MEST = 0,818 g L-1

CODto = 12,79 mg COD.L-1

c = 15,3 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD.L-1)	Boue (mg COD.L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD.g-1)
(mg COD.L-1) 3	14,55	\	10,98	2,22
10	14,39	7,32	10,58	2,71
15	\	\	9,84	3,60
30	14,43	6,20	9,62	3,87
45	14,91	5,86	9,43	4,12
60	14,12	6,06	9,01	4,62
120	14,10	6,05	7,01	7,07
<i>moy. et éc.type</i>	14,42 0,30	6,30 0,59		

Prélèvement du 5/01/94 — Boue de la Station —

MESboue = 3,99 g L-1

MESinfluent = 10,2 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,799 g/L

MEST = 0,806 g L-1

CODto = 10,06 mg COD.L-1

c = 11,6 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD L-1)	Boue (mg COD L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD g-1)
(mg COD.L-1) 3	13,17	3,83	8,95	1,38
10	11,13	3,79	7,34	3,37
15	\	\	6,87	3,94
45	11,66	3,69	6,81	4,03
60	11,04	3,96	6,22	4,76
120	11,00	4,18	5,56	5,59
<i>moy. et éc.type</i>	11,60 0,92	3,89 0,11		

Prélèvement du 10/01/94 — Boue de la Station —

MESboue = 4,00 g.L-1

MESinfluent = 70±14 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,799 g/L

MEST = 0,856 g L-1

CODto = 22,24 mg COD.L-1

c = 26,3 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD.L-1)	Boue (mg COD.L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD.g-1)
(mg COD.L-1) 3	27,23	6,44	21,42	0,97
10	—	6,18	17,71	5,30
15	—	—	17,37	5,66
20	25,72	6,26	16,50	6,71
30	—	6,10	14,77	8,73
40	25,70	6,20	14,06	9,56
60	26,09	6,21	12,91	10,91
90	26,61	6,17	11,79	12,22
120	26,08	6,10	11,70	12,32
140	26,41	5,97	11,08	13,05
<i>moy. et éc.type</i>	26,26 0,54	6,18 0,11		

Prélèvement du 8/03/94 — Boue du Pilote —

MESboue = 3,73±0,04 g L-1

MESinfluent = 43±4 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,746 g/L

MEST = 0,780 g L-1

CODto = 7,45 mg COD.L-1

c = 8,5 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD L-1)	Boue (mg COD L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD g-1)
(mg COD L-1) 3	8,103 0,065	5,186 0,087	7,016 0,086	0,56
15	8,019 0,061	5,320 0,084	6,784 0,085	0,85
30	7,665 0,069	5,908 0,167	6,730 0,058	0,92
60	8,012 0,034	5,375 0,161	6,481 0,050	1,24
<i>moy. et éc.type</i>	7,95 0,19	5,447 0,32		

Prélèvement du 10/03/94 — Boue du Pilote —

MESboue = 4,096 g L-1

MESinfluent = 32±1 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,819 g/L

MEST = 0,846 g L-1

CODto = 11,09 mg COD L-1

c = 11,5 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD L-1)	Boue (mg COD L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD g-1)
3	11,68	8,020	10,49	0,71
15	—	8,665	9,924	1,38
30	11,63	9,315	9,332	2,08
60	11,87	8,173	8,076	3,56
<i>moy. et éc.type</i>	11,73 0,13	8,54 0,58		

Prélèvement du 29/03/94 — Boue du Pilote —

MESboue = 4,48 g.L-1

MESinfluent = 91±6 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,896 g/L

MEST = 0,969 g L-1

CODto = 13,61 mg COD.L-1

c = 13,6 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent dilué 1/2		Boue concentrée		Mélange boue+Influent			
	essai a	essai b	essai a'	essai b'	essai 1	essai 2	m	ec
(mg COD L-1) 3	15,73	14,45	7,066	7,249	12,41	11,08	11,745	0,9
15	16,12	14,69	8,236	6,668	10,36	9,85	10,105	0,4
30	14,89	14,61	7,287	7,096	9,46	9,024	9,243	0,3
60	16,19	14,73	7,670	7,462	7,71	7,956	7,831	0,2
<i>moy. et éc.type</i>	15,18	0,716	7,342	0,467				

Temps de contact	Biosorption (mg COD g-1)			
	essai 1	essai 2	m	ec
3	1,24	2,61	1,92	0,97
15	3,35	3,88	3,62	0,37
30	4,28	4,73	4,51	0,32
60	6,09	5,83	5,96	0,18

Prélèvement du 9/05/94 — Boue de la Station —

MESboue = 4,13±0,03 g.L-1

MESinfluent = 89±2 mg L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,826 g/L

MEST = 0,897 g L-1

CODto = 38,03 mg COD.L-1

c = 43,6 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent dilué 1/2		Boue concentrée		Mélange boue+Influent			
	essai a	essai b	essai a'	essai b'	essai 1	essai 2	m	ec
(mg COD L-1) 3	45,75	44,83	10,05	9,684	27,29	29,33	28,31	1,4
15	44,55	44,29	9,139	9,392	23,53	24,38	23,955	0,6
30	43,23	-	10,43	9,353	20,09	20,36	20,225	0,2
60	44,89	48,02	9,814	10,66	17,48	18,07	17,775	0,4
<i>moy. et éc.type</i>	45,08	1,50	9,82	0,54				

Temps de contact	Biosorption (mg COD g-1)			
	essai 1	essai 2	m	ec
3	11,97	9,70	10,83	1,61
15	16,16	15,21	15,69	0,67
30	20,00	19,70	19,85	0,21
60	22,91	22,25	22,58	0,47

Variation de la charge

Prélèvement du 10/10/94 — Boue du Pilote —

MESboue = 4,52±0,04 g.L-1

MESinfluent = 85±3 mg L-1

Mélange boue + influent :*influent brut* (MEST = 0,94 g L-1)

MESboue = 0,904 g/L

CODto = 38,12 mg COD.L-1

c = 40 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent brut		Boue concentrée		Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD.g-1)
	essai a	essai b	essai a'	essai b'		
3	47,22	46,6	10,42	10,78	36,34	1,89
15	44,87	45,68	10,48	11,3	35,42	2,87
30	44,92	45,4	-	11,37	32,73	5,73
60	45,03	44,55	-	11,59	31,79	6,73
120	-	43,42	11,36	11,85	30,88	7,70
15 h	42,79	43,03	9,212	9,577	26,93	9,87
<i>moy. et éc.type</i>	44,86	1,39	11,14	0,52		
<i>idem pour 15h</i>	42,91	0,17	9,39	0,26		

Mélange boue + influent :*dilution 1/2 de l'influent* : CODto = 20,17 mg COD.L-1**c = 19,8 mg COD g-1**

Temps de contact (min)	Influent dilué 1/2		Boue concentrée		Mélange boue+Influent			
	essai a	essai b	essai a'	essai b'	essai 1	essai 2	m	ec
(mg COD L-1) 3	23,61	23,3	10,42	10,78	17,75	17,8	17,775	0
15	22,435	22,84	10,48	11,3	-	17,47	17,47	
30	22,46	22,7	-	11,37	17,025	16,84	16,9325	0,1
60	22,515	22,275	-	11,59	15,195	14,85	15,0225	0,2
120	-	21,71	11,36	11,85	14,925	-	14,925	
15 h	21,395	21,515	9,212	9,577	9,955	10,185	10,07	0,2
<i>moy. et éc.type</i>	22,43	0,70	11,14	0,52				
<i>idem pour 15h</i>	21,46	0,08	9,39	0,26				

Temps (min)	Biosorption (mg COD g-1)			
	essai 1	essai 2	m	ec
3	2,64	2,58	2,61	0,04
15	-	2,94	2,94	
30	3,42	3,62	3,52	0,14
60	5,41	5,79	5,60	0,27
120	5,71	-	5,71	
15 h	9,88	9,63	9,75	0,18

Mélange boue + influent :*dilution 1/4 de l'influent*

CODto = 11,20 mg COD.L-1

c = 9,9 mg COD g-1

Temps de contact (min)	Influent dilué 1/4 essai a	essai b	Boue concentrée		Mélange	Biosorption (mg COD g-1)
			essai a'	essai b'		
3	11,805	11,65	10,42	10,78	10,106	1,20
15	11,218	11,42	10,48	11,3	9,554	1,81
30	11,23	11,35	-	11,37	9,052	2,36
60	11,258	11,138	-	11,59	8,796	2,64
120	-	10,855	11,36	11,85	7,712	3,83
15 h	10,698	10,758	9,212	9,577	5,656	5,28
<i>moy. et éc.type</i>	11,22	0,35	11,14	0,52		
<i>idem pour 15h</i>	10,73	0,04	9,39	0,26		

Exp. le 11/01/94, boue et influent du 10/01 conservés 24h à +4°C

MESboue = 3,91 g.L-1

Mélange boue + influent :

MESboue = 0,783

MEST = 0,839 g L-1

g/L

Température de l'expérience = +4°C

c = 19 mg COD g-1 CODto = 16,20 mg COD.L-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD.L-1)	Boue (mg COD.L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD.g-1)
(mg COD.L-1) 3	18,97	6,79	13,42	3,31
10	18,74	7,25	13,08	3,72
15	-	-	11,80	5,24
20	18,21	6,64	11,33	5,80
30	18,95	6,53	11,00	6,20
45	18,97	6,42	10,88	6,34
60	17,71	6,14	10,42	6,89
<i>moy. et éc.type</i>	18,59 0,52	6,63 0,32		

Température de l'expérience = +19°C

c = 17,8 mg COD g-1 CODto = 15,21 mg COD.L-1

Temps de contact (min)	Influent brut (mg COD.L-1)	Boue (mg COD.L-1)	Mélange boue+Influent	Biosorption (mg COD.g-1)
(mg COD.L-1) 3	18,44	6,47	12,78	2,89
10	17,69	6,83	12,08	3,73
15	-	-	11,13	4,86
20	16,89	6,50	10,39	5,74
30	17,60	6,44	10,25	5,91
45	16,62	6,28	9,31	7,03
60	17,11	6,29	8,94	7,47
<i>moy. et éc.type</i>	17,39 0,66	6,47 0,18		



Nom, Prénom : J O R A N D Frédéric

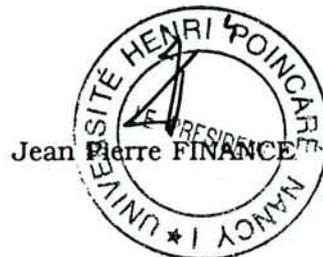
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 20 NOV. 1995 ~ 398

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Résumé :

La sédimentation de la biomasse microbienne formée au cours du procédé nommé "boues activées" est une étape clé du traitement biologique des eaux usées. Son efficacité dépend, outre de la présence de bactéries filamenteuses, de la structure physico-chimique des agrégats bactériens ou "flocs".

L'analyse bibliographique souligne le caractère hydrophobe des micro-organismes et son effet sur la floculation. Afin d'améliorer la sédimentation des boues, nous avons cherché à expliquer et à contrôler le caractère hydrophobe des flocs.

La microscopie électronique et des analyses granulométriques d'agrégats dispersés, montrent la structure hétérogène des flocs. Ceux dont le diamètre moyen est égal à 125 μm sont constitués de micro-agrégats de 13 μm et de particules de 2.5 μm . Certains micro-agrégats correspondent à des micro-colonies bactériennes. Le floc est constitué de bactéries et d'une matrice d'hétéropolymères. Ces hétéropolymères, extraits par les ultrasons, sont constitués de protéines, de sucres et d'ADN.

Par chromatographie d'adsorption à pH acide sur résines non ioniques, le caractère hydrophobe des hétéropolymères solubles est mis en évidence.

Le test d'adhésion microbienne à l'octane révèle la coexistence dans les boues, de bactéries "hydrophobes" et de bactéries "hydrophiles". Le caractère "hydrophobe / hydrophile" de certaines de ces souches varie en fonction des paramètres environnementaux qui agissent sur la croissance bactérienne (nutriments, oxygène, ...).

Le contrôle de ces paramètres devrait permettre, en favorisant les populations bactériennes hydrophobes et/ou la production de polymères hydrophobes, d'assurer la formation de flocs présentant une bonne aptitude à décanter.

Cependant, les plus faibles capacités de "biosorption" de la matière organique des eaux usées par les boues activées sont obtenues avec les flocs les plus denses. Il est alors nécessaire de trouver le compromis entre une bonne sédimentation des boues et une bonne capacité de biosorption.

Mots clés : agrégats bactériens, hydrophobicité, boue activée, adsorption, sédimentation, granulométrie, résines XAD, polymères exo-cellulaires.

Abstract :

Settling of microbial biomass formed during the "activated sludge" process is a key step of biological wastewater treatment. Its efficiency is known to be influenced by filamentous bacteria. Besides this, evidence is present that this settleability is mainly governed by the physico-chemical structure of bacterial aggregates ("flocs"). Then, a better knowledge of the structure and the factors governing the floc formation is necessary to well control the settling step. The hydrophobic character of activated sludge floc components has been studied to elucidate the effect on sludge settleability.

Electronic microscopy and granulometric analysis of dispersed flocs, showed the heterogeneous structure. Flocs with an average diameter of 125 μm are constituted of 13 μm micro-aggregates and 2.5 μm particles. Some of the micro-flocs are bacterial colonies. The flocs are shown to consist of bacteria along exo-cellular polymers. Polymers, extracted by ultrasonication, are found to be composed of proteins, sugars and DNA.

Adsorption chromatography in acidic conditions with no ionic resins, showed the hydrophobic character of the soluble heteropolymers constituting the floc matrix.

By using the microbial adhesion test to octane, we demonstrated that "hydrophobic" and "hydrophilic" bacteria coexist into the sludges. The "hydrophobic / hydrophilic" character of some of these strains, changes as a function of the environmental parameters (nutrient load, oxygen concentration,...). The control of these parameters should be able, by favouring the hydrophobic bacterial populations, or/and the production of hydrophobic polymers, to produce flocs with good settleability.

However, measurements of "biosorption" of organic matter in wastewater by activated sludges, comparing with other floc characteristics, showed that the flocs with the nicest structure (best settlement), present the lower adsorption ability. Also, it is necessary to find a compromise between the best settleability of sludge and the best biosorption properties.

Key words : bacterial aggregates, hydrophobicity, activated sludge, adsorption, settling, granulometric analysis, XAD resin, exo-cellular polymers.