



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

Faculté de Pharmacie

Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 27 Mai 2004

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par **Arnaud CONRAD**

Titulaire du diplôme d'Etudes Approfondies "Chimie et Microbiologie de L'Eau"

**Accumulation de molécules organiques modèles par
des agrégats biologiques de type boues activées**

26 30523

Membres du Jury

Président : Pierre LEROY	Professeur, Université UHP Nancy I (F)
Rapporteurs : Madeleine GOUTX	Directeur de Recherche, CNRS-Université de la Méditerranée (F)
Michel BAUDU	Professeur, Université de Limoges (F)
Juges : Pierre FAURE	Chargé de Recherche, CNRS-Université UHP Nancy I (F)
Jean-Claude BLOCK	Professeur, Université UHP Nancy I (F) (Directeur de thèse)
Invité : Philippe GINESTET	Docteur, CIRSEE-Ondéo services, Le Pecq (F)

Remerciements

Comme directeur de thèse, on peut difficilement rêver mieux que Jean-claude BLOCK (Pr. UHP Nancy 1) ! Il a su me laisser libre de mes orientations tout en étant présent à chaque fois que j'en ai eu besoin, que ce soit pour me fournir une idée au moment où j'en manquais que pour me rassurer quand les doutes me gagnaient. Merci à lui, pour ce petit bout de chemin ensemble, sa bonne humeur, son dynamisme et ses compétences scientifiques qui ont été pour moi de véritables atouts et qui m'ont permis de mener à bien cette étude. Enfin, merci du temps que tu as consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a tendance quelques fois à dérapier.

Que Jean-jacques EHRHARDT (Dir. CNRS) reçoive ici toute l'expression de ma reconnaissance pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement.

Mes remerciements sont également à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et dont les commentaires et les questions très constructrices ont apporté un point de vue très intéressant relatif à cette thématique de recherche.

Je suis reconnaissant à Madeleine GOUTX (DR. CNRS-Université de la Méditerranée) et Michel BAUDU (Pr., Université de Limoges) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie également Pierre LEROY (Pr. UHP Nancy 1) et Pierre FAURE, (CR. CNRS-UHP Nancy 1) pour leur accueil toujours très chaleureux au sein de leur équipe, leur soutien immédiat à la bonne réalisation de ce travail et leur participation à ce jury.

Je remercie Philippe GINESTET, (Dr. CIRSEE-Ondéo Services) qui a accepté de consacrer un peu de son temps à la lecture et au jugement de cette thèse en prenant part à ce jury en tant que membre invité.

Durant ce projet, de nombreuses personnes ont apporté leurs conseils scientifiques, leurs compétences techniques ou tout simplement leur amitié. Parmi toutes les personnes qu'il m'a été donné de rencontrer durant cette étude, je remercie aussi celles des différentes structures avec lesquelles nous avons collaboré. Je n'oublierai pas les aides reçues.

Tout d'abord, je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR 7564 CNRS-UHP). Ainsi mes remerciements s'adressent à tous les membres des différentes équipes du LCPME et plus particulièrement à Cédric CARTERET pour le temps qu'il a consacré pour m'initier aux analyses statistiques en composantes principales.

Par leur gentillesse, leur amitié et leur disponibilité, les membres du Laboratoire Environnement Minéralurgie (UMR 7569 CNRS-INPL) permanents ou doctorants, dont les

compétences scientifiques et techniques ont été très appréciables et qui ont grandement contribué à rendre cette étude vraiment agréable. Un grand merci, plus particulièrement, à Aude-Valérie JUNG que je remercie pour sa disponibilité et ses talents exceptionnels de chauffeur.

Merja KONTRO et Minna KEINÄNEN (Université d'Helsinki et Laboratory of Environmental Microbiology) pour leurs conseils avisés, leur implication très forte dans cette étude et les discussions scientifiques qui ont permis l'avancement de ce travail.

Mes plus vifs remerciements à Laurence Mansuy-Huault (CR. CNRS-UHP Nancy 1), pour son accueil et sa disponibilité dont j'ai peut être abusé.

Sans oublier tous mes collègues et amis du laboratoire, je leur exprime ma profonde gratitude. Merci à Hélène, David, les Josianes, Monique (sans qui, les mac seraient encore pour moi un mystère), Frédéric, Marie-antoinette (je me souviens de nos longues veillées auprès de nos boues...), Meng, Asfaw, Georges (B..b..s), Damien, Joël, Etienne et ceux que j'aurai malencontreusement oublié. Merci à Patricia qui a pris en main une partie du travail expérimental. J'adresse mes remerciements à Laurent DIEZ (Technicien, UHP Nancy 1), pour la sympathie qu'il m'a témoignée et l'aide technique concernant la CLHP. Toute mon amitié à Bruce avec qui j'ai partagé le bureau pendant quelques temps, et avec qui j'ai eu tant de discussions fructueuses (Shreck 2 vient de sortir !). Je vous souhaite à tous beaucoup de bien et une bonne continuation à ceux qui sont engagés dans cette aventure passionnante de la thèse.

En ce qui concerne les organismes qui ont participé aux soutiens financiers, je tiens à remercier le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, la Fédération de Recherche "CNRS-Eau-Sol-Terre", et la Zone Atelier du bassin de la Moselle (ZAM), sans lesquels ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je tiens à rendre ma plus sincère affection à mes amis qui ont toujours été présents et qui se sont dévoués tant au point de vue personnel que scientifique, pour leurs encouragements soutenus et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'adresse une pensée particulière à mes parents, qui m'ont donné un environnement idéal et en m'enseignant la valeur d'honnêteté avec laquelle j'essaye d'aborder mon travail scientifique.

Mes plus grands remerciements vont bien évidemment à Aurore qui m'a toujours soutenu et apporté sa tendresse et sa finesse intellectuelle me fournissant ainsi un cadre de vie extrêmement stimulant.

Merci à tous !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
1. INTRODUCTION	9
2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
2.1. Agrégats biologiques de boues activées	17
2.1.1. Composition des agrégats biologiques de boues activées	18
2.1.1.1. Analyse microbiologique	19
2.1.1.2. Caractérisation des exopolymères (EPS).....	20
2.1.1.2.1. Méthodes d'extraction des exopolymères (EPS)	20
2.1.1.2.2. Caractérisation chimique des EPS	23
2.2. Hydrophobicité et charge des agrégats biologiques de boues activées.....	25
2.2.1. Méthodes de mesure de l'hydrophobicité de la surface bactérienne, des agrégats biologiques et des exopolymères.....	26
2.2.1.1. Test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH)	27
2.2.1.2. Test d'agrégation des micro-organismes par le sulfate d'ammonium (SA).....	31
2.2.1.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH).....	31
2.2.2. Paramètres influençant le caractère hydrophobe des agrégats biologiques	31
2.3. Lipides dans l'environnement.....	32
2.3.1. Définition et nomenclature générale des lipides.....	32
2.3.2. Présence des lipides dans l'environnement	35
2.3.2.1. Phospholipides (PL) et lipopolysaccharides (LPS).....	35
2.3.2.2. Les polyhydroxyalcanoates (PHA)	36
2.3.3. Acides gras des phospholipides (PL) et des lipopolysaccharides (LPS) : Signature spécifique des micro-organismes ?	37
2.3.4. Effets des paramètres environnementaux sur la composition des acides gras des phospholipides des micro-organismes.....	39
2.3.4.1. Effet de la température	40

2.3.4.2. Effet de la concentration en oxygène dissous	40
2.3.4.3. Effet de stress chimique	41
2.3.4.4. Effet de la famine	41
2.3.4.5. Effet d'une croissance sous forme de biofilm	42
2.4. Biosorption et désorption par les agrégats biologiques de composés organiques des eaux usées.....	42
2.4.1. Transfert des composés organiques de la phase liquide vers les agrégats biologiques.....	43
2.4.1.1. Cinétique de transfert des composés organiques de la phase liquide vers l'agrégat biologique.....	43
2.4.1.2. Temps nécessaire pour atteindre le système adsorbat-adsorbant à l'équilibre.....	45
2.4.1.3. Modélisation de l'adsorption de la matière organique par les boues activées.....	45
2.4.2. Facteurs influençant la biosorption des composés organiques par des agrégats biologiques.....	46
2.4.2.1. Influence des caractéristiques des agrégats biologiques sur la biosorption.....	47
2.4.2.1.1. Participation des composants des agrégats biologiques à la biosorption	47
2.4.2.1.2. Effet de l'inactivation des agrégats biologiques par un traitement thermique sur la biosorption.....	49
2.4.2.1.3. Acclimatation des agrégats à des substrats	50
2.4.2.2. Effet des caractéristiques de l'adsorbat sur la biosorption	50
2.4.2.3. Influence de la charge organique sur la biosorption	50
2.4.2.4. Effets des caractéristiques du milieu sur la biosorption	51
2.4.2.5. Paramètres des stations de traitement des eaux usées sur la biosorption.....	52
2.4.3. Désorption de la matière organique des boues activées	52
3. MATERIEL ET METHODES	55
3.1. Sites de prélèvement et échantillonnage des boues activées et des eaux usées urbaines.....	57
3.2. Caractérisation physico-chimique des boues activées	57
3.2.1. Matières sèches totales (TS_{Boues}) et matières volatiles (MV_{Boues}) des boues activées.....	57
3.2.2. Test de décantabilité (dVSI et SVI : diluted Sludge Volume Index et Sludge Volume Index).....	58

3.3. Caractérisation des eaux usées brutes, épurées et de l'eau de rivière	58
3.3.1. Mesure de la turbidité	58
3.3.2. Mesures de pH et de conductivité	59
3.3.3. Analyse du carbone organique dissous (COD).....	59
3.3.4. Analyse du titre alcalimétrique complet (TAC)	59
3.4. Caractérisation des exopolymères (EPS) des boues activées	60
3.4.1. Extraction des exopolymères (EPS) par les ultrasons et une résine échangeuse de cations.....	60
3.4.1.1. <i>Lavage des boues activées</i>	60
3.4.1.2. <i>Extraction des EPS</i>	60
3.4.2. Caractérisation des EPS extraits des boues activées	61
3.4.2.1. <i>Matières sèches totales (TS_{EPS}) et matières volatiles (MV_{EPS}) des EPS</i>	61
3.4.2.2. <i>Dosage des protéines et des substances humiques par la méthode de Lowry</i>	61
3.4.2.3. <i>Dosage des protéines par la méthode de Bradford</i>	62
3.4.2.4. <i>Dosage des polysaccharides par la méthode de Dubois</i>	62
3.4.2.5. <i>Dosage des acides nucléiques par la méthode de Dériaz</i>	63
3.5. Mesure de l'hydrophobicité des agrégats biologiques et des exopolymères (EPS).....	63
3.5.1. Méthode de mesure de l'hydrophobicité des boues activées par le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH)	63
3.5.2. Mesure de l'hydrophobicité des EPS extraits des boues activées	64
3.5.2.1. <i>Précipitation des EPS par le sulfate d'ammonium (SA)</i>	64
3.5.2.2. <i>Fractionnement des EPS solubles par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)</i>	65
3.5.3. Détermination du potentiel zéta des boues dispersées par la mesure de la mobilité électrophorétique	65
3.6. Détermination des sulfonates d'alkylbenzènes (LAS) dans les eaux usées, les eaux de rivière et les boues activées.....	66
3.6.1. Séparation et quantification des LAS par extraction liquide/solide sur cartouches hydrophobes et par chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	66
3.6.1.1. <i>Extraction liquide/solide des LAS sur des cartouches hydrophobes</i>	66
3.6.1.2. <i>Quantification du C_{11}-LAS par CLHP</i>	67
3.6.2. Analyse des composés organiques des EPS et des boues activées	68

3.6.2.1. Extraction liquide/solide haute pression des composés organiques des EPS et des boues activées.....	68
3.6.2.2. Analyse des échantillons par le couplage Pyrolyse flash - Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse (PyCPG-SM).....	69
3.6.2.3. Couplage Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (CPG-SM).....	69
3.7. Dosage des azoprotéines (azoalbumine et azocaséine) par spectrophotométrie dans les eaux usées et de rivière.....	71
3.8. Analyse des acides gras des agrégats biologiques et des exopolymères.....	71
3.8.1. Extraction des lipides des boues et des exopolymères.....	71
3.8.2. Fractionnement des lipides sur de la silice activée.....	72
3.8.3. Extraction des lipopolysaccharides (LPS).....	72
3.8.4. Analyse et quantification des acides gras méthylés (FAME : Fatty acids methylesters).....	72
3.9. Traitement statistique des données.....	73
3.9.1. Comparaison de moyennes.....	73
3.9.2. Analyse statistique en composantes principales (ACP).....	74
4. ACIDES GRAS DES AGREGATS BIOLOGIQUES DES BOUES ACTIVEES ET DES SEDIMENTS DE RIVIERE.....	75
4.1. Introduction.....	77
4.2. Acides gras des exopolymères extraits d'agrégats biologiques de boues activées.....	78
4.2.1. Introduction.....	78
4.2.2. Fatty acid profiles of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs.....	81
4.2.2.1. Introduction.....	82
4.2.2.2. Experimental procedures.....	83
4.2.2.3. Results.....	87
4.2.2.3.1. Characteristics of the extracted EPS.....	87
4.2.2.3.2. Repeatability and reproducibility of FA analyses.....	87
4.2.2.3.3. Comparison of FAs in whole sludge and extracted EPS.....	88
4.2.2.3.4. Comparison of FAs in EPS extracted from sludges collected in September and January.....	90

4.2.2.3.5. Comparison of FA profiles in whole sludges from different treatment plants.....	90
4.2.2.4. Discussion	91
4.2.2.4.1. Fatty acids of EPS.....	91
4.2.2.4.2. Origin of lipid-bound FAs in activated sludge	97
4.2.2.4.3. Microbial relevance of FA signatures	97
4.2.2.4.4. Seasonal effects on EPS lipids	99
4.2.2.4.5. Lipids in whole sludges from two different wastewater treatment plants.....	99
4.2.2.5. Conclusion.....	99
4.3. Analyse des acides gras des sédiments de rivière	101
4.3.1. Introduction	101
4.3.2. Caractéristiques globales de l'eau de rivière et des matières en suspension au lieu des prélèvements	104
4.3.3. Composition des lipides des sédiments de rivière et des matières en suspension.....	106
4.3.4. Comparaison des zones de prélèvements (amont et aval) par une analyse des composantes principales (ACP)	107
4.3.4.1. Composition des acides gras des phospholipides (PL) des échantillons.....	115
4.3.4.1.1. Informations taxonomiques obtenues par la comparaison des acides gras des phospholipides.....	116
4.3.4.1.2. Indicateurs de l'état physiologique des micro-organismes	118
4.3.4.2. Composition des acides gras des glycolipides (GL) et des lipides neutres (NL) des échantillons prélevés en rivière.....	119
4.3.5. Séparation des agrégats biologiques de boues activées, de sédiments et des matières en suspension de rivière par l'analyse en composantes principales (ACP)	119
4.3.6. Conclusion	120
4.4. Conclusion générale	121
5. EFFET D'UN STRESS OXYGENE SUR L'HYDROPHOBICITE ET LES LIPIDES DES AGREGATS BIOLOGIQUES.....	123
5.1. Introduction et objectifs	125
5.2. Optimisation du test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures : effet de la composition ionique et du pH	126
5.3. Précipitation des exopolymères (EPS) par le sulfate d'ammonium (SA).....	131

5.4. Réponse des agrégats biologiques à des stress oxygène	134
5.4.1. Caractéristiques des boues activées (Toul et Nancy-Maxéville)	137
5.4.2. Effet des discontinuités en oxygène sur les agrégats biologiques	139
5.4.2.1. Variation des caractéristiques globales des boues activées	140
5.4.2.2. Variation de la quantité, de la composition et d'une propriété des EPS extraits des boues.....	146
5.4.2.3. Caractère hydrophobe des EPS déterminé par précipitation par le sulfate d'ammonium (SA) et par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH).....	149
5.4.2.4. Caractérisation des lipides des boues placés dans les réacteurs contrôle et stress.....	152
5.4. Discussion	160
5.5. Conclusion	164
 6. ADSORPTION ET DESORPTION DE MOLECULES ORGANIQUES MODELES PAR DES AGREGATS BIOLOGIQUES.....	 165
6.1. Introduction	167
6.2. A simple and robust high performance liquid chromatography method for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) analysis in river and waste water: application to sorption studies.....	172
6.2.1. Abstract	172
6.2.2. Introduction	173
6.2.3. Experimental procedure	176
6.2.4 Results and discussion	178
6.2.4.1. Optimisation of HPLC system	178
6.2.4.2. Development of solid-phase extraction	181
6.2.4. C ₁₁ -LAS adsorption and desorption onto/from activated sludge in river water.....	183
6.2.5. Conclusion	184
6.3. Adsorption/désorption de sulfonate d'alkylbenzène linéaire et de protéines par des boues activées en eau de rivière	185
6.3.1. Introduction	185
6.3.2. Adsorption/desorption of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and azoproteins by/from activated sludge flocs	187
6.3.2.1. Introduction	188
6.3.2.2. Material and methods	189
6.3.2.3. Results and discussion.....	192

6.3.2.3.1. Adsorption of model molecules by activated sludge.....	192
6.3.2.3.2. Model molecule desorption from activated sludge in river water or diluted wastewater.....	196
6.3.2.3. <i>Abstract</i>	199
 7. CONCLUSION GENERALE.....	201
 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	211
 9. ANNEXES	231
ANNEXE 1	233
ANNEXE 2	234

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acides gras
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
CIH	Chromatographie d'interaction hydrophobe
CLHP	Chromatographie en phase liquide haute performance
COD	Carbone organique dissous
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CV	Coefficient de variation
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCO	Demande chimique en oxygène
DLVO	Dejarguin, Landau, Verwey et Overbeek
dSVI	Diluted sludge volume index
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPS	Substances exopolymériques ou exopolymères
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridation (Hybridation de fluorescence <i>in situ</i>)
G-6-PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GL	Glycolipides
kDa	kiloDalton
LAS	Sulfonate d'alkylbenzène linéaire
LD	Limite de détection
LPS	Lipopolysaccharides
LQ	Limite de quantification
MES	Matières en suspension de rivière
Mr	Masse moléculaire
MS	Matières sèches en suspension
MV	Matières volatiles
MVS	Matières volatiles en suspension
NL	Lipides neutres
PBS	Solution de travail (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et NaCl)
PUM	Solution de travail (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , urée et $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
PHA	Polyhydroxyalcanoates
PL	Phospholipides
PVDF	Fluorure de polyvinylidène
REC	Résine échangeuse de cations
SA	Sulfate d'ammonium
SM	Spectromètre de masse
SVI	Sludge volume index
TAMH	Test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures
TAC	Titre alcalimétrique complet
TS	Matières sèches totales
UFC	Unité formant colonie
US	Ultrasons

1. INTRODUCTION GENERALE

Les polluants organiques amphiphiles ou hydrophobes dans les milieux hydriques sont généralement associés à des composés moléculaires dissous ou colloïdaux comme des substances humiques (Lafrance *et al.*, 1990; Traina *et al.*, 1996), des particules minérales (Matthijs et de Henau, 1985), et des agrégats organiques (Leppard *et al.*, 1998; Urano et Saito, 1984). Ainsi, ces ligands jouent un rôle primordial en tant que vecteurs dans le transport et la dispersion des polluants dans l'environnement. La distribution de l'adsorbat entre la phase eau et l'adsorbant, la stabilité physico-chimique du système polluant-vecteur et son transport sur de longues distances dépendent de la nature et des propriétés physico-chimiques du vecteur (densité, porosité, cohésion, charge et hydrophobicité), de l'effet stabilisant ou non de la liaison entre le polluant et le vecteur, de la diffusion et la dégradation du polluant.

De ce point de vue, les agrégats biologiques formés par agrégation/flocculation de la matière organique et de micro-organismes représentent des systèmes intéressants par leurs caractéristiques physico-chimiques : charge globale négative (Liao *et al.*, 2001; Mikkelsen, 2003) et domaines hydrophobes (Ganaye *et al.*, 1997; Olofsson *et al.*, 1998) qui constituent des sites d'adsorption, par leur dynamique de dispersion/agrégation qui améliore l'accessibilité aux sites d'adsorption (Chaignon *et al.*, 2002), par la présence d'enzymes extracellulaires capables d'hydrolyser la matière piégée par les agrégats (Cadoret *et al.*, 2002; Guellil *et al.*, 2001).

Les agrégats biologiques issus des stations d'épuration de traitement des eaux usées urbaines ne sont évidemment pas représentatifs de tous les environnements hydriques. Ils constituent cependant de bons modèles pour étudier les mécanismes d'accumulation de la matière organique par les agrégats biologiques. Ce sont en effet les structures biologiques agrégées les mieux étudiées ces dernières années. Leur structure est complexe, constituée d'une communauté très diversifiée de micro-organismes et d'une matrice de substances exopolymériques (EPS). Des protéines, des polysaccharides, des substances dites humiques, des acides nucléiques et des lipides composent les EPS (Comte *et al.*, 2003; Dignac *et al.*, 1998; Jorand *et al.*, 1995b; Nielsen et Jahn, 1999). Les lipides des EPS et des agrégats biologiques de boues activées ont été peu étudiés. Pourtant, l'analyse de cette classe de molécules organiques est très intéressante du fait de leur probable implication dans la formation des domaines hydrophobes et des propriétés adsorbantes des EPS des boues activées. En effet, l'adsorption au moins pour les macromolécules non directement assimilables ($M_r > 600$) a obligatoirement lieu dans l'espace intercellulaire qui de ce fait représente une zone d'intérêt majeur.

Notre travail participe à une réflexion générale sur *l'accumulation des composés amphiphiles par les agrégats biologiques issus des stations de traitements des eaux usées urbaines*.

Nos objectifs spécifiques ont été dans un premier temps de caractériser le domaine extracellulaire au sein des agrégats biologiques, domaine dont les propriétés physico-chimiques expliquent pour partie le piégeage de molécules hydrophobes :

- d'une part, nous avons recherché des signatures (analyse des acides gras) susceptibles de caractériser les agrégats biologiques ou le domaine extracellulaire. Les connaissances actuelles sur les exopolymères organiques sont en effet très pauvres sur le plan de la caractérisation chimique. De plus, cette signature chimique devrait permettre de localiser et suivre ces agrégats biologiques dans les milieux hydriques et de faire *a priori* la différence entre les agrégats biologiques de la rivière et ceux rejetés par les stations d'épuration, par exemple.
- d'autre part, nous avons tenté par application de discontinuités en oxygène de modifier les caractéristiques physico-chimiques de ces agrégats biologiques, l'espace extracellulaire en particulier, en modifiant la teneur en oxygène du milieu, paramètre environnemental facilement contrôlable qui affecterait le caractère hydrophobe des agrégats biologiques de boues activées. L'intérêt de cette étude serait de bénéficier d'adsorbants de caractéristiques physico-chimiques contrôlables en laboratoire.

Dans un deuxième temps, nous avons, en particulier, étudié l'adsorption et la désorption par ces agrégats biologiques de molécules organiques modèles : sulfonate d'alkylbenzène linéaire (LAS), azocaséine et azoalbumine. Pour effectuer cette étude, nous avons travaillé avec des agrégats biologiques prélevés en station d'épuration de type boues activées pour des raisons évidentes de facilité de prélèvement et de quantité disponible (comparativement au prélèvement d'agrégats biologiques en rivière même si nous l'avons réalisé au moins une fois). Notre travail n'a cependant pas eu pour objectif d'étudier l'efficacité du procédé de traitement d'épuration des eaux usées urbaines.

Au delà des chapitres Analyse bibliographique (chapitre 2) et Matériel et méthodes (chapitre 3), ce manuscrit a été organisé en 3 chapitres expérimentaux (chapitres 4 à 6) et une Conclusion générale (chapitre 7). Les résultats présentés dans les chapitres expérimentaux participent tous à une même réflexion générale visant à démontrer que le domaine extracellulaire se modifie en réponse aux conditions environnementales et qu'il intervient dans les propriétés adsorbantes et hydrophobes des agrégats.

L'analyse bibliographique (chapitre 2) rassemble les connaissances actuelles sur (i) la structure, la composition et les propriétés hydrophobes et adsorbantes des agrégats biologiques et (ii) les acides gras d'origine bactérienne.

Le chapitre 4 présente les analyses des acides gras des agrégats biologiques issus de l'environnement (boues activées, sédiments et matières en suspension de rivière). Ces analyses constituent un référentiel nouveau concernant cette

classe de composés. Certes, notre étude n'a porté que sur une faible fraction des lipides possibles présents dans les agrégats biologiques, mais ces analyses représentent un point de départ dans la connaissance de différentes catégories de lipides présentes (phospholipides, glycolipides, lipides neutres et lipopolysaccharides) et leur variabilité dans le domaine extracellulaire des agrégats biologiques. L'analyse des acides gras des phospholipides montre l'existence d'une importante diversité de micro-organismes associés aux exopolymères et aux agrégats. Ce travail a été valorisé par un article publié dans la revue *"Lipids"*.

L'analyse des acides gras a également été réalisée pour des sédiments et des matières en suspension de rivière prélevés en amont et en aval de la zone de rejet des eaux usées épurées. Les objectifs étaient de comparer leur composition avec celle des agrégats biologiques de boues activées et d'évaluer l'effet de l'apport de matière organique par les eaux épurées.

Le chapitre 5 présente l'effet d'applications discontinues *versus* continues d'oxygène sur les agrégats biologiques en réacteur. Ce travail a débuté par la standardisation des tests de mesure de l'hydrophobicité des agrégats biologiques par le test d'adhésion aux hydrocarbures et des exopolymères par leur rétention par un ligand hydrophobe. Cette étude avait pour objectif de créer en laboratoire des agrégats biologiques de propriétés définies par applications discontinues et brèves d'oxygène. L'application de discontinuités en oxygène de courte durée ne semble pas suffisante pour affecter rapidement les caractéristiques physico-chimiques du domaine extracellulaire, bien que quelques "signaux" aient été mis en évidence : la part d'EPS fortement retenus par un ligand hydrophobe et la quantité de phospholipides des agrégats augmentent.

Au chapitre 6, enfin, nous avons quantifié l'adsorption par des boues activées de trois molécules organiques (sulfonate d'alkylbenzène linéaire, azocaséine et azoalbumine) et la réversibilité de l'adsorption de ces trois molécules. Cette partie a nécessité l'adaptation d'outil analytique permettant l'analyse des sulfonates d'alkylbenzène dans les échantillons hydriques environnementaux. L'ensemble de ces résultats fait l'objet de deux articles en préparation pour *"Analytica Chimica Acta"* et *"Environmental Science and Technology"*.

Ce manuscrit se termine par une Conclusion générale (chapitre 7) qui regroupe et discute les principales observations faites au cours de cette étude.

2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Agrégats biologiques de boues activées

A l'observation microscopique, les agrégats biologiques n'apparaissent pas délimités dans l'espace par une membrane et de nombreuses ex-croissances sont visibles (Figure 2.1a). La disposition de l'ensemble des constituants des agrégats entraîne la formation de "pores" et "canaux" autorisant la circulation de l'eau à l'intérieur de l'agrégat. Ces agrégats peuvent être décrits par une géométrie de nature fractale (Figure 2.1b), ce qui traduit le fait que la répartition des micro-organismes au sein de l'agrégat biologique n'est pas aléatoire dans le plan de la section (Li et Ganczarczyk, 1990; Zartarian *et al.*, 1997). Les agrégats biologiques observés en microscopie électronique après un marquage spécifique de certains constituants sont organisés de façon non uniforme (Hoffman et Decho, 1999) avec des zones d'exopolymères plus ou moins denses autour des micro-organismes. Leur morphologie varie suivant la charge organique et minérale des eaux usées, la croissance bactérienne et l'âge de la boue (Eriksson *et al.*, 1992). Ainsi, des structures compactes sont observées avec des dimensions fractales de l'ordre de 2, mais également des structures lâches et poreuses avec des dimensions fractales de l'ordre de 1,78 (Dachs et Bayona, 1997).

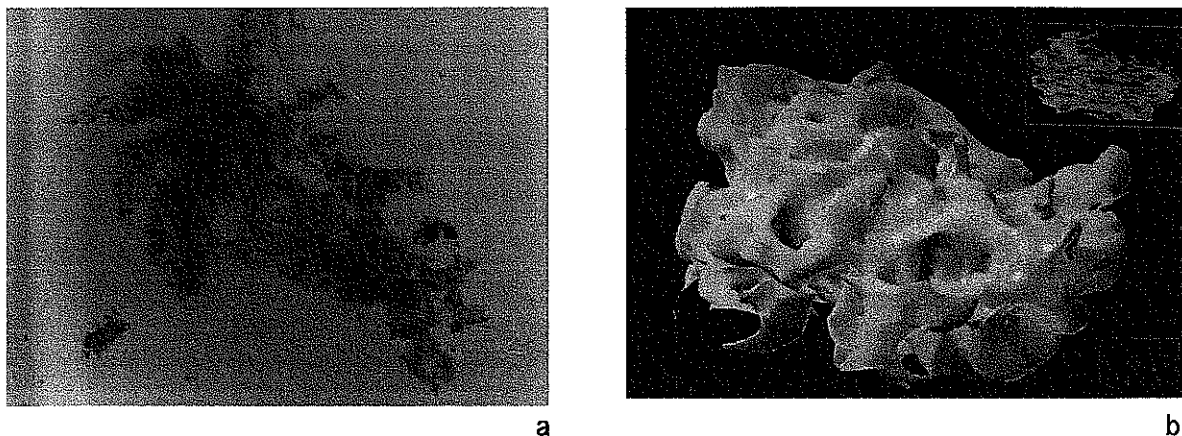


Figure 2.1 : (a) Photographie d'un agrégat biologique de boues activées en microscopie optique (1 cm = 20 μm). (b) Reconstruction tridimensionnelle d'un agrégat biologique de boues activées (Zartarian *et al.*, 1997) (1,8 cm = 100 μm).

Les agrégats biologiques de boues activées sont des structures dynamiques capables de se déstructurer (désagrégation) et de se reformer (agrégation) d'une façon réversible au cours du temps (Chaignon *et al.*, 2002). Aussi, les études granulométriques montrent des distributions continues avec des tailles variant de 0,5 à 1000 μm (Jorand *et al.*, 1995b; Schmid *et al.*, 2003), mais la taille des agrégats peut dépasser le millimètre permettant ainsi leur observation directement à l'œil nu. Les agrégats de petites tailles sont majoritaires en nombre, mais la majeure partie du volume est occupée par des agrégats de grande taille

(Droppo *et al.*, 1997). L'unité de base de l'agrégat biologique ne semble pas être un micro-organisme isolé, mais une entité de taille supérieure (une micro-colonie ou un micro-agrégat). Les agrégats visibles à l'œil nu (taille de quelques millimètres) résultent de l'agrégation d'agrégats de $125\ \mu\text{m}$ formés d'ensembles de $13\ \mu\text{m}$, eux-mêmes formés de micro-colonies bactériennes de $2,5\ \mu\text{m}$ (Jorand *et al.*, 1995b) (Figure 2.2).

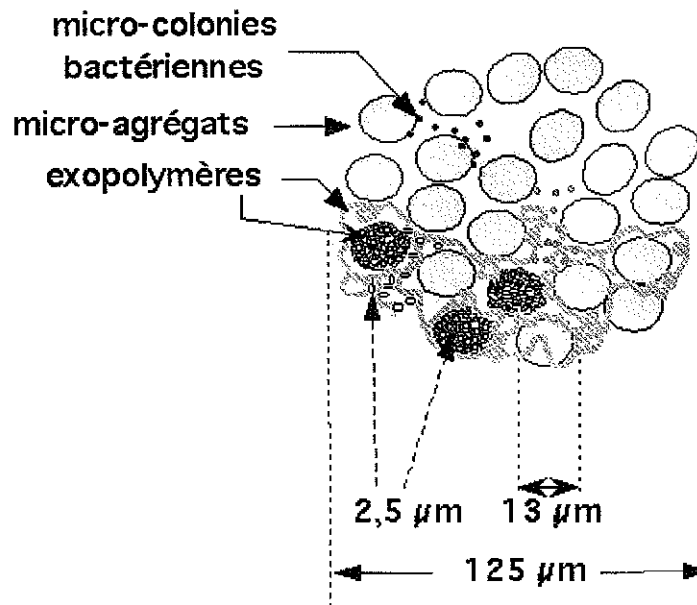


Figure 2.2 : Représentation schématique d'un agrégat biologique de boues (Jorand *et al.*, 1995b).

La cohésion des agrégats biologiques repose sur la multiplicité des interactions de type DLVO (forces de London et interactions électrostatiques) et non DLVO (interactions hydrophobes, forces stériques et enchevêtrements de polymères) qui existent entre les micro-organismes, les exopolymères et des cations multivalents comme le calcium et le magnésium (Flemming *et al.*, 2000; Zita et Hermansson, 1994).

2.1.1. Composition des agrégats biologiques de boues activées

Les agrégats biologiques sont composés d'une communauté diversifiée de micro-organismes, de polymères extracellulaires ou exopolymères (EPS), d'une fraction inorganique et d'eau. L'observation en microscopie électronique après un marquage spécifique des constituants des agrégats montre la présence d'EPS entre les micro-organismes (Figure 2.3). La fraction inorganique (ions et particules minérales), autre composant des agrégats, représente 20 à 32 % des matières sèches (Cadoret *et al.*, 2002; Dignac *et al.*, 1998; Frølund *et al.*, 1995; Jorand *et al.*, 1998; Urbain *et al.*, 1993a). L'analyse minérale des agrégats de boues activées montre une dominance de fer, de calcium et de phosphore (Tableau 2.1). De plus, les

agrégats biologiques sont des structures très hydratées, constituées de 95 à 98 % d'eau du fait de leur structure poreuse et de la forte capacité des EPS à retenir de l'eau. Moins de 2 % de matière organique des EPS sont capables de retenir plus de 98 % d'eau (Christensen et Characklis, 1990).

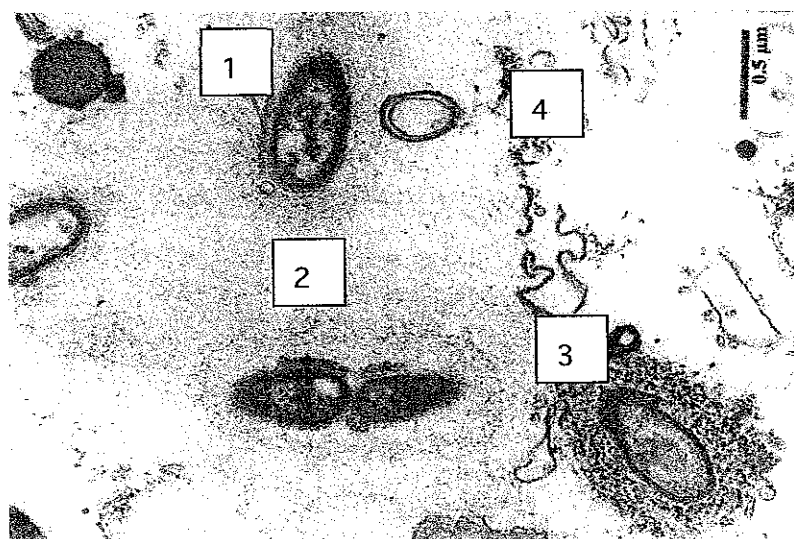


Figure 2.3 : Photographie en microscopie électronique d'une coupe ultrafine de floc de boue activée montrant le réseau de polymères extracellulaires (EPS) et les bactéries (Bleich et Nehrkorn, 1989). Barre = 0,5 μm (1): Bactéries; (2): Exopolymères avec une densité faible; (3) Exopolymères avec une densité importante; (4): Débris cellulaires.

Tableau 2.1 : Analyse minérale (mg g^{-1} de matière sèche en suspension) d'une boue activée (Bruus *et al.*, 1992).

	Ca	Mg	K	Fe	P
Boue + surnageant	47	4	3,6	74	31

2.1.1.1. Analyse microbiologique

La diversité des groupes bactériens présents semble très importante, mais reste mal connue (Seviour et Blackall, 1999). L'étude de la diversité des micro-organismes des agrégats par les techniques de bactériologie classique est limitée car elle nécessite la dispersion des agrégats pour libérer les micro-organismes et seuls 1 à 10 % des bactéries acceptent de se cultiver sur un milieu solide (Amann *et al.*, 1998). Grâce à l'apport des techniques de biologie moléculaire, l'étude de la diversité des populations bactériennes a pu être envisagée plus facilement.

L'utilisation de la technique d'hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) met en évidence une communauté bactérienne très diversifiée dans les boues activées et les populations bactériennes présentes sont très semblables dans des systèmes différents (Eschenhagen *et al.*, 2003). Les β -protéobactéries dominent et représentent 22 % des bactéries totales (Eschenhagen *et al.*, 2003; Kämpfer *et al.*, 1996), les α -protéobactéries, les bactéries du groupe *Cytophaga-Flavobacteria* et les bactéries à gram positif comportant un haut contenu en bases guanine et cytosine représentent 12 à 17 %, les γ -protéobactéries représentent 7,5 à 8,5 % (Eschenhagen *et al.*, 2003). Des bactéries filamenteuses du genre *Nocardia* ont aussi été observées dans les boues activées par une observation en microscopie optique (Eriksson *et al.*, 1992) et par l'analyse de certains acides gras des phospholipides considérés comme des marqueurs biologiques du genre *Nocardia* (Cha *et al.*, 1999).

De plus, l'utilisation des techniques moléculaires reposant sur l'hybridation de sondes oligonucléotidiques spécifiques de type ARNr montre aussi la présence d'une communauté complexe de protozoaires (flagellés, amibes, ciliés, *Cyrtophorida*, *Gymnostomatida*, *Heterotrichida*, *Hymenostomata*, et des *Hypotrichia*), des *Nassulida*, des *Pérित्रichia*, des *Pleurostomatida*, des *Prostomatida*, des *Suctoria*, de métazoaires (némathelminthes, rotifères, nématodes, gastrotriches, tardigrades, plathelminthes, turbellaria, annélides, oligochaetes) (Amann *et al.*, 1998). Des champignons et des algues sont également présents dans les agrégats de boues activées (Kämpfer *et al.*, 1996; Seviour et Blackall, 1999).

2.1.1.2. Caractérisation des exopolymères (EPS)

Les EPS des agrégats biologiques de boues activées ont trois origines possibles : (i) le métabolisme (Morgan *et al.*, 1990) et l'excrétion microbienne (Mian *et al.*, 1978; Ramos *et al.*, 2001a; Williams et Wimpenny, 1977), (ii) la lyse microbienne et (iii) l'accumulation dans les agrégats de la matière organique véhiculée par les eaux usées (Guellil *et al.*, 2001). La caractérisation des EPS passe généralement par une étape d'extraction, bien qu'une observation *in situ*, après un marquage, combinée à la microscopie optique ou confocale soit très instructive (Bleich et Nehrkorn, 1989; Neu et Lawrence, 1999; Wolfaardt *et al.*, 1998).

Selon les auteurs, de 50 à 90 % du carbone organique total (COT) mesuré dans les boues activées correspondrait aux exopolymères (Christensen et Characklis, 1990; Frølund *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997).

2.1.1.2.1. Méthodes d'extraction des exopolymères (EPS)

De nombreuses méthodes ont été développées pour extraire les EPS des agrégats biologiques de boues activées, de biofilms ou de cultures pures. Ainsi, des techniques plus ou moins efficaces, comme la centrifugation à haute vitesse (Carr et Ganczarczyk, 1974 ; Novak et Haugan, 1981), l'utilisation des ultrasons (Jorand *et al.*, 1995b; King et Forster, 1990;

Urbain *et al.*, 1993a), l'application de la vapeur (Azeredo *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999), mais également des méthodes chimiques comme l'ajout d'EDTA (Bruus *et al.*, 1992), d'éthers couronnes (Wuertz *et al.*, 2001), de soude (Sato et Ose, 1980), de glutaraldéhyde (Azeredo *et al.*, 1998; Horan et Eccles, 1986; Novak et Haugan, 1981), des résines échangeuses de cations (Azeredo *et al.*, 1999; Jahn et Nielsen, 1995) ont été développées. D'autres méthodes associent les ultrasons avec une résine échangeuse de cations (Cadoret *et al.*, 2002), la centrifugation et l'utilisation de l'éthanol (Wase et Balasundaram, 1980) ou l'ajout de formaldéhyde et de soude (Liu et Fang, 2002). Une liste des principales méthodes d'extraction est présentée dans le Tableau 2.2. Mais à l'heure actuelle, aucune méthode universelle n'est reconnue par les auteurs (Nielsen et Jahn, 1999) et quelle que soit la méthode d'extraction, le rendement d'extraction des EPS n'est malheureusement jamais déterminé. Des estimations ont été tentées pour déterminer ce rendement d'extraction en se basant par exemple sur la quantité totale de protéines mesurée dans un agrégat (bactéries et EPS) et la quantité théorique de protéines des bactéries (Nielsen et Jahn, 1999). Cette approche reste difficilement applicable car le volume des bactéries et la quantité de protéines dans une bactérie varient au cours du temps, en fonction des conditions de culture et de la souche bactérienne. De fait, la quantité de polymères extraits dépend fortement de la méthode d'extraction engagée (Tableau 2.2).

De plus, il est impossible d'apprécier correctement si les EPS sont contaminés par des composants du domaine intracellulaire libérés par la lyse cellulaire. La lyse bactérienne est importante à déterminer car elle induit directement une surestimation des EPS en comptabilisant des constituants intracellulaires. Quelques études ont tenté de quantifier la lyse bactérienne engendrée par les méthodes d'extraction en se basant sur :

- l'augmentation de l'ADN extrait (Frølund *et al.*, 1995; Palmgren et Nielsen, 1996), mais cette augmentation ne peut être clairement assimilée à la lyse bactérienne car la matrice d'exopolymères en accumule une quantité non négligeable dont le niveau de base est difficilement quantifiable,
- un comptage en microscopie du nombre de cellules bactériennes totales marquées par l'acridine orange ou par le DAPI (Frølund *et al.*, 1996; Jahn et Nielsen, 1995), qui diminue avec la lyse bactérienne,
- un comptage du nombre d'unités formant colonies, lequel diminue de façon importante lors de l'extraction des EPS, certainement du fait des dommages de l'enveloppe ou de structure cellulaires (Frølund *et al.*, 1996),
- un marqueur intracellulaire, l'activité glucose-6-phosphate deshydrogénase (G-6-PDH) essentiellement intracellulaire dont l'augmentation dans les extraits d'EPS (Frølund *et al.*, 1995; Frølund *et al.*, 1996) est considérée comme le meilleur indicateur de lyse cellulaire (Wuertz *et al.*, 1998).

Tableau 2.2 : Composition en mg g⁻¹ de MV des EPS extraits de boues activées.

Méthodes d'extraction	Protéines	Polysaccharides	ADN	Subst. Humiques	Ac. Uroniques	Lipides	Références
Température (80 °C, 1h)	121	8	ND	ND	2,2	ND	Frølund <i>et al.</i> (1996)
Vapeur 10 min	77,1	15,8	3,7	ND	ND	ND	Brown et Lester (1980)
US (50 W, 2 x 15 s)	279,9	60,5	67,3	ND	ND	ND	Urbain <i>et al.</i> (1993a)
US (60 s, 37 W, glace)	90,3	27,5	ND	ND	ND	ND	Jorand <i>et al.</i> (1998)
puis REC (60g/g MS, 180 tr min ⁻¹ , 1h, 4 °C)							
REC (70-75 g g ⁻¹ MV, 900 tr min ⁻¹ , 1h, 4 °C)	70	14	7	70	3,9	ND	Frølund <i>et al.</i> (1996)
REC (70-75 g g ⁻¹ MV, 900 tr min ⁻¹ , 17h, 4 °C)	243	48	ND	126	6,1	ND	Frølund <i>et al.</i> (1996)
REC (70 g g ⁻¹ MV, 4 °C, 600 tr min ⁻¹ , 1h)	17,6	12,7	0,14	16,4	1,2	ND	Liu et Fang (2002)
REC (75 g g ⁻¹ MV, 4 °C, 900 tr min ⁻¹ , 4h)	68,7	12,2	4,3	53,7	2,0	ND	Wilén <i>et al.</i> (2003)
REC (75 g g ⁻¹ MV, 4 °C, 900 tr min ⁻¹ , 4h)	51,9	8,9	3,0	29,1	1,6	ND	Wilén <i>et al.</i> (2003)
REC (75 g g ⁻¹ MV, 4 °C, 900 tr min ⁻¹ , 4h)	63,4	12,9	5,6	46,5	1,4	ND	Wilén <i>et al.</i> (2003)
REC (10 g g ⁻¹ MS, 3h, glace)	68	11	ND	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> (2001)
US (37 W, 20 s, 4 °C)	434	99	109	115	ND	18	Conrad <i>et al.</i> (2003)
puis REC (70 g g ⁻¹ MV, 4 °C, 400 tr min ⁻¹ , 45 min)							
ETDA (30 mM, 10 mL, 3h, glace)	21	3	ND	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> (2001)
EDTA 2 % (10 mL, 4 °C, 3 h)	22,9	12,4	0,47	59,2	2,1	ND	Liu et Fang (2002)
NaOH (pH 11, 1h)	96	22	ND	ND	3,1	ND	Frølund <i>et al.</i> (1996)
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h)	54,6	40,5	0,35	50,4	4,2	ND	Liu et Fang (2002)
puis soude 1 N (4 mL, 4 °C, 3h)							
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h)	20,4	28,9	0,13	18,9	1,8	ND	Liu et Fang (2002)
puis US (60 W, 2,5 min)							
Formaldéhyde 36,5 % (0,06 mL, 4 °C, 1 h)	12,3	15,9	0,07	10,9	1,1	ND	Liu et Fang (2002)
Glutaraldéhyde (3 % v/v, 4 °C, 12 h, 50 tr min ⁻¹)	71	17	6,2	ND	ND	ND	Sponza (2002b)
Ethers couronnes	44	7	ND	ND	ND	ND	Wuertz <i>et al.</i> (2001)
(30 mM, 10 mL g ⁻¹ MS, 400 tr min ⁻¹ , 1h, glace)							

ND : non déterminé ; US, ultrasons ; REC, résine échangeuse de cations ; MV, matières volatiles.

2.1.1.2.2. Caractérisation chimique des EPS

La composition et la quantité des exopolymères extraits des boues activées sont variables suivant l'origine et la date du prélèvement (Jorand *et al.*, 1995b; Liu et Fang, 2002; Morgan *et al.*, 1990; Urbain *et al.*, 1993b), suivant la composition des eaux usées (Bura *et al.*, 1998), mais également selon les méthodes d'extraction et d'analyse employées (Tableau 2.2). Mais dans tous les cas, la caractérisation chimique des exopolymères (EPS) extraits des boues activées met en évidence des protéines, des polysaccharides, des acides uroniques, des composés assimilés aux substances humiques, des acides aminés, des acides nucléiques (ADN et ARN) et en moindre mesure des lipides (Figure 2.4 et Tableau 2.2).

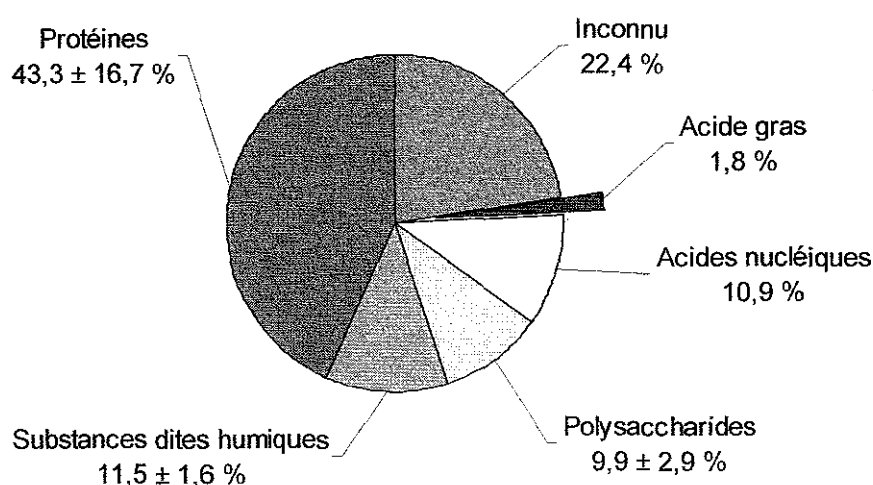


Figure 2.4 : Proportions (% de matières volatiles des EPS) des protéines, des substances dites humiques, des polysaccharides, des acides nucléiques et des acides gras dans les EPS extraits des boues activées par les ultrasons et une résine échangeuse de cations ($n = 2$ boues, excepté pour les acides nucléiques et les acides gras $n = 1$ boue) (Conrad *et al.*, 2003).

Les protéines des EPS extraits sont composées de 24,8 % d'acides aminés chargés négativement, de 26,9 % d'acides aminés hydrophiles et de 48,3 % d'acides aminés hydrophobes (Dignac *et al.*, 1998), ce qui conforte les observations de Jorand *et al.* (1998) pour lesquels 12 % des protéines extraites des boues sont retenues sur une résine hydrophobe de type XAD.

Les polysaccharides extraits des agrégats de boues activées sont constitués d'oses neutres comme le glucose, le galactose, le rhamnose, le mannose, le fucose, le ribose, l'arabinose, le xylose, de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique (Dignac *et al.*, 1998; Horan et Eccles, 1986).

Quelques études ont caractérisé les lipides des EPS et supposent par l'observation des spectres infrarouge l'existence d'acides gras provenant des lipides neutres (mono-, di- et triglycérides), des phospholipides et des stérols, et ne mettent pas en évidence de polyhydroxyalcanoates (Dignac *et al.*, 1998; Goodwin et Forster, 1985), alors que les polyhydroxyalcanoates sont mis en évidence dans les

boues activées (Comeau *et al.*, 1998 ; Hesselmann *et al.*, 1999 ; Odham *et al.*, 1986). Conrad *et al.* (2003) montrent, après extraction et séparation des lipides des EPS, que des phospholipides, des glycolipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharides sont présents dans les EPS extraits des boues par les ultrasons et une résine échangeuse de cations, alors que Bura (2000) n'en mesure aucun dans les EPS extraits de boues certainement du fait d'un dosage colorimétrique peu sensible.

L'existence d'hétéropolymères au sein des agrégats de boues comme des glycoprotéines est vraisemblable car 77 % des protéines et 64,6 % des polysaccharides extraits des boues par les ultrasons et une résine échangeuse de cations sont trouvés simultanément dans la fraction précipitée des EPS à pH = 2,0 (Jorand *et al.*, 1998). De plus, la séparation par chromatographie d'exclusion de taille des EPS extraits laisse apparaître des associations possibles entre polysaccharides et protéines car ils sont mis en évidence simultanément dans les mêmes fractions (Görner *et al.*, 2003) (Figure 2.5). Dans les fractions D1 à D7, caractérisées par micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, une forte association entre un seul type de polysaccharides dont la masse moléculaire est inférieure à 1 kDa, et deux types de protéines (A et B) avec des masses moléculaires variant de 45 à 670 kDa est suggérée (Figure 2.5). Cependant, le suivi de l'absorbance à 280 nm n'est pas spécifique des protéines; d'autres molécules pourraient aussi être présentes dans ses mêmes fractions. De plus, Esparza-Soto et Westerhoff (2001) montrent que 80 % des EPS facilement extractibles par une étape de lavage réalisée dans des conditions neutres, sont composés de polymères de masse moléculaire supérieure à 0,5 kDa, alors que 55 % des EPS extraits par la soude sont des composés de masse moléculaire inférieure à 0,5 kDa. Les exopolymères extraits pourraient être ainsi différents selon les méthodes d'extraction.

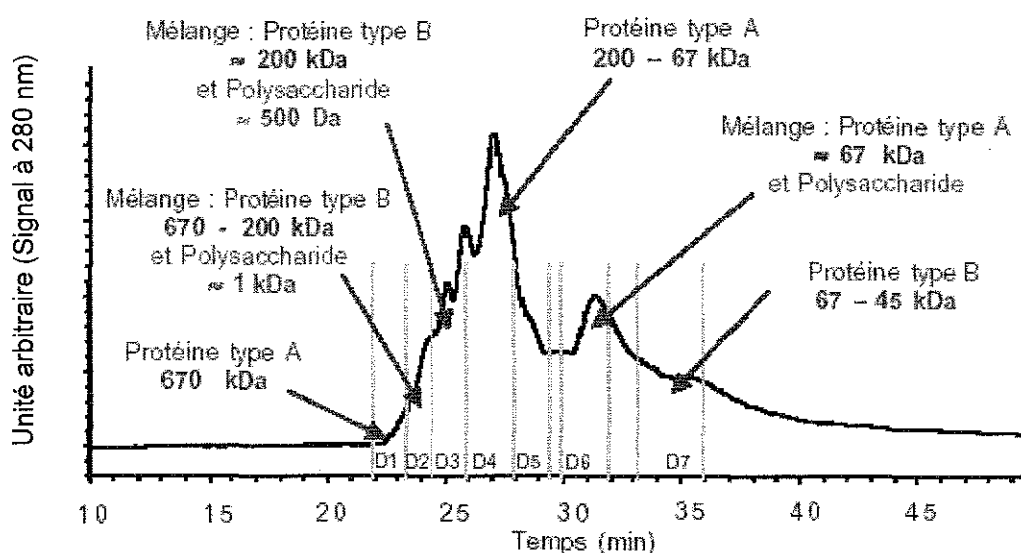


Figure 2.5 : Séparation par chromatographie d'exclusion de taille des EPS extraits des boues activées par une résine échangeuse de cations (Görner *et al.*, 2003).

La charge des EPS mesurée par la technique de titration colloïdale est négative et varie de $-0,07$ à $-6,24$ meq L^{-1} d'EPS extraits (Mikkelsen, 2003) ayant certainement pour origine les groupements fonctionnels négativement chargés comme des groupements hydroxyles, phosphates et carboxyles.

2.2. Hydrophobicité et charge des agrégats biologiques de boues activées

L'hydrophobicité des agrégats de boues activées est un paramètre important à évaluer car il est impliqué dans (i) la cohésion des agrégats biologiques (Urbain *et al.*, 1993a), (ii) le piégeage des molécules organiques hydrophobes (Ganaye *et al.*, 1997) et par voie de conséquence (iii) la qualité des eaux usées traitées (Zita et Hermansson, 1997b). Ainsi, les bactéries, qui ont une surface hydrophile, s'adsorbent plus faiblement aux agrégats de boues activées que les bactéries ayant une surface hydrophobe, ce qui provoque une augmentation de la turbidité des eaux usées traitées (Zita et Hermansson, 1997b).

Les agrégats biologiques de boues activées possèdent un caractère hydrophobe prononcé (Ganaye *et al.*, 1997), mais ce sont également des entités négativement chargées et hydratées capables de former avec l'eau des liaisons hydrogènes. La charge globale des agrégats biologiques généralement mesurée varie de $-0,11$ à $-0,61$ meq g^{-1} de matières volatiles en suspension (Liao *et al.*, 2001; Sponza, 2002a, 2002b). Les mesures des deux caractéristiques, hydrophobicité et charge des agrégats biologiques, varient généralement de façon opposée. Des agrégats biologiques faiblement chargés négativement (de $-0,11$ à $-0,25$ meq g^{-1} de MVS) montrent un caractère hydrophobe marqué (de 37 à 42° déterminé par la mesure de l'angle de contact) et inversement des agrégats biologiques avec une charge négative importante (de $-0,55$ à $-0,61$ meq g^{-1} de MVS) présentent un caractère hydrophobe peu prononcé (de 7 à 9°) (Sponza, 2002b). Van Loosdrecht *et al.* (1987) trouvent également une relation entre l'hydrophobicité et la charge des surfaces cellulaires et l'adhésion à une surface hydrophobe (Figure 2.6).

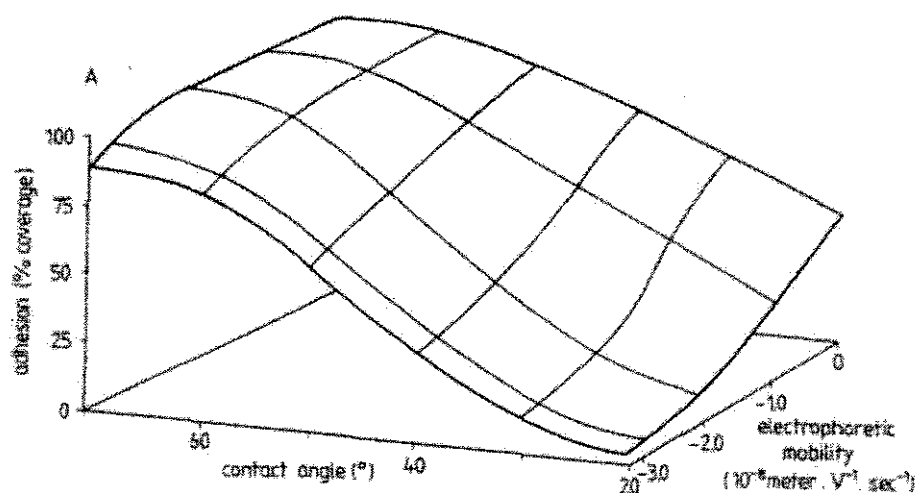


Figure 2.6 : Relation entre l'adhésion bactérienne (23 souches) à une surface hydrophobe (polystyrène), la charge et l'hydrophobicité des surfaces cellulaires (van Loosdrecht *et al.*, 1987).

Par conséquent, la détermination de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires ne peut être appréhendée sans tenir compte également de leur charge. En effet, les méthodes de détermination de l'hydrophobicité impliquent généralement un jeu compliqué d'interactions hydrophobes, attractives de van der Waals, et électrostatiques répulsives (Busscher *et al.*, 1995; van der Mei *et al.*, 1995) (cf. § 2.2.1.1). Ces interactions sont influencées par les paramètres de l'environnement comme le pH et la composition ionique du milieu. Une diminution des valeurs de pH ou l'augmentation de la composition ionique du milieu induit une diminution de la charge et une augmentation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires car les répulsions électrostatiques diminuent (van der Mei *et al.*, 1995). De plus, la mesure de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires est également influencée par les molécules et les propriétés structurales de la surface bactérienne (Dillon *et al.*, 1986; Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993; Mozes *et al.*, 1988). Une bactérie ayant une surface hydrophile avec des *fimbriae*, qui ont des propriétés de liaisons hydrophobes, peut être caractérisée comme hydrophobe (Kjelleberg et Hermansson, 1984). La configuration spatiale des composants membranaires peut changer d'orientation afin de maximiser leur interaction avec l'eau et la surface hydrophobe, ce qui permet à *E. coli* de s'accumuler autour des gouttelettes d'hexadécane, alors que sa surface est hydrophile (Ferreirós et Criado, 1984; Li et McLandsborough, 1999).

2.2.1. Méthodes de mesure de l'hydrophobicité de la surface bactérienne, des agrégats biologiques et des exopolymères

De nombreuses méthodes ont été proposées pour déterminer l'hydrophobicité des surfaces cellulaires de cultures de souches pures dispersées, comme le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures, le test d'agrégation des micro-organismes par le sulfate d'ammonium, la mesure de l'angle de contact, la chromatographie d'interaction hydrophobe, le test d'adhésion des micro-organismes à des surfaces solides et le piégeage de sondes fluorescentes hydrophobes ou de particules hydrophobes à la surface des bactéries (Tableau 2.3). Cette partie a pour objectif de montrer les difficultés rencontrées dans la mesure de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires.

Seuls les tests d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH), de précipitation par le sulfate d'ammonium et de chromatographie d'interaction hydrophobe sont développés dans cette partie car ils ont été utilisés dans le cadre de notre étude.

Tableau 2.3 : Principales méthodes de mesure de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires et des agrégats biologiques.

Méthodes		Références
Adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures	Souches pures	Rosenberg et Kjelleberg (1986) van der Mei <i>et al.</i> (1995)
	Boues activées dispersées	Jorand <i>et al.</i> (1994) Guellil <i>et al.</i> (1998) Boyette <i>et al.</i> (2001)
Agrégation des micro-organismes par le sulfate d'ammonium	Souches pures	Lindahl <i>et al.</i> , 1981 Donion et Colleran (1993) Dillon <i>et al.</i> (1986) Rosenberg et Kjelleberg (1986)
	Boues activées dispersées	Martin-Cereceda <i>et al.</i> (2001)
Mesure de l'angle de contact	Souches pures	Lyklema <i>et al.</i> (1989) Rosenberg et Kjelleberg (1986) Mozes <i>et al.</i> (1988)
	Boues activées	Liao <i>et al.</i> (2001)
Chromatographie d'interaction hydrophobe	Souches pures	Dillon <i>et al.</i> (1986) Rosenberg et Kjelleberg (1986) Mozes <i>et al.</i> (1988) Stenström (1989)
	Boues activées dispersées	Olofsson <i>et al.</i> (1998)
Répartition entre deux phases non miscibles	Souches pures	Rosenberg et Kjelleberg (1986)
Adhésion des micro-organismes à une surface solide (polystyrène, polyméthacrylate)	Souches pures	van Loosdrecht <i>et al.</i> (1987) Dillon <i>et al.</i> (1986) Rosenberg et Kjelleberg (1986) Harkes <i>et al.</i> (1991)
	Souches pures	Dillon <i>et al.</i> (1986)
Adhésion de microsphères (billes de latex et bactéries exprimants des protéines fluorescentes)	Souches pures	Dillon <i>et al.</i> (1986)
	Boues activées	Olofsson <i>et al.</i> (1998) Nielsen <i>et al.</i> (2001)
Adsorption de molécules hydrophobes (phénanthrène et pyrène)	Souches pures	Kim <i>et al.</i> (2000)
	Boues activées	Ganaye <i>et al.</i> (1997)

2.2.1.1. Test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH)

Traditionnellement, le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures est utilisé pour sa simplicité et sa rapidité. Le principe de cette méthode repose sur l'adhésion des bactéries à une surface apolaire formée par les gouttelettes d'hydrocarbure (Rosenberg, 1984, 1991). Ce test consiste à mélanger vigoureusement une suspension bactérienne lavée avec un tampon de composition physico-chimique déterminée, en présence soit d'un hydrocarbure linéaire (n-octane, hexadécane), ou d'un hydrocarbure cyclique (benzène, toluène, p-xylène) dans des conditions bien définies de pH, de

température et d'agitation. Les bactéries adhèrent à l'émulsion qui se forme (Figure 2.7) et les bactéries qui n'adhèrent pas à l'émulsion sont généralement dénombrées dans la phase aqueuse par microscopie ou par la mesure de la turbidité à 600 nm.

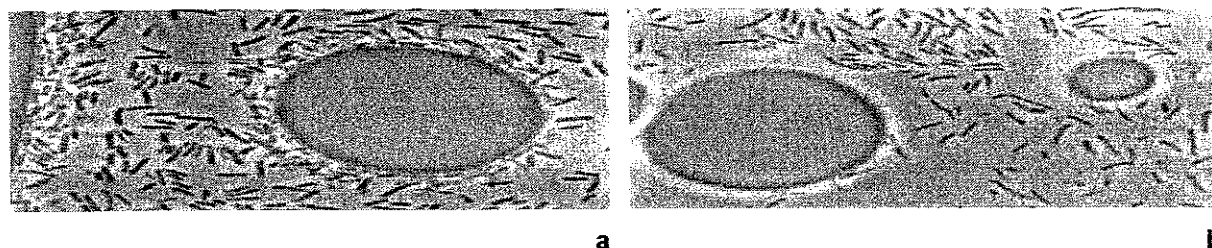
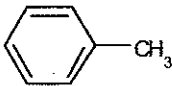


Figure 2.7 : Observation microscopique de gouttelettes de n-octane avec *Escherichia coli* JA300 accumulées (a) et non accumulées (b) (Aono et Kobayashi, 1997).

L'hydrocarbure choisi pour le test ne semble pas avoir d'effet sur la valeur relative de l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Ainsi, les valeurs de l'hydrophobicité obtenues pour différents micro-organismes avec de l'octane ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec l'hexane (Boyette *et al.*, 2001; Donlon et Collieran, 1993), le p-xylène (Dillon *et al.*, 1986; van der Mei *et al.*, 1995) ou l'hexadécane (Dillon *et al.*, 1986; van der Mei *et al.*, 1995), de même avec le p-xylène et l'hexadécane (Dillon *et al.*, 1986; Ferreirós et Criado, 1984; van der Mei *et al.*, 1995), bien que les hydrocarbures aromatiques soient considérablement plus hydrophobes que les hydrocarbures aliphatiques avec un nombre d'atomes de carbones similaires (Tanford, 1980) (Tableau 2.4) et que la charge des gouttelettes d'hydrocarbure soit différente.

Tableau 2.4 : Caractéristiques des principaux hydrocarbures utilisés dans le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures.

Hydrocarbures	Formules chimiques	Point isoélectrique (pH) **	Log (K_{ow}) *
n-hexadécane	$ \begin{array}{cccccccc} H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 \\ & & & & & & & \\ H_3C & -C & -C & -C & -C & -C & -C & -C & -CH_3 \\ & & & & & & & \\ H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 & H_2 \end{array} $	2 - 4	6,12
n-octane	$ \begin{array}{ccccccc} & H_2 & & H_2 & & H_2 & \\ & & & & & & \\ H_3C & -C & -C & -C & -C & -C & -CH_3 \\ & & & & & & \\ & H_2 & & H_2 & & H_2 & \end{array} $	2 - 3	5,18
toluène		2 - 5	2,78
p-xylène		2 - 5	3,15

* d'après Ren (2002) ; ** : Buscher *et al.* (1995).

En effet, le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures met en jeu non seulement des interactions hydrophobes entre les gouttelettes d'hydrocarbure et les surfaces cellulaires, mais également des interactions électrostatiques (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993; Rosenberg et Kjelleberg, 1986; van der Mei *et al.*, 1995). Ainsi, les valeurs mesurées dépendent du rapport qui existe entre les interactions hydrophobes et les attractions/répulsions électrostatiques. Par conséquent, van der Mei *et al.* (1995) insistent sur le fait que les études doivent être réalisées à une valeur de pH correspondant à une valeur nulle de potentiel zéta des bactéries ou des gouttelettes d'hydrocarbure afin de minimiser les attractions/répulsions électrostatiques. La charge apparente de la surface cellulaire de toutes les souches étudiées devient moins négative avec la diminution des valeurs de pH au voisinage du point isoélectrique (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993; Mozes *et al.*, 1988; van der Mei *et al.*, 1995; van der Wal *et al.*, 1997). Busscher *et al.* (1995) montrent que quelles que soient la composition physico-chimique et la valeur de pH du tampon de lavage utilisé, les gouttelettes de n-octane, d'hexadécane, de xylène ou de toluène portent toujours une charge apparente négative (de -20 à -60 mV). L'origine de cette charge négative s'expliquerait par l'orientation des molécules d'eau autour des gouttelettes d'hydrocarbure et l'adsorption des ions hydroxyles, phosphates et nitrates de l'eau à la surface des gouttelettes de l'hydrocarbure (Busscher *et al.*, 1995; Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993).

Les conditions de réalisation du test TAMH doivent être standardisées car elles influencent nettement la répétabilité et la reproductibilité du test TAMH (Kjelleberg et Hermansson, 1984; Rosenberg, 1984, 1991; van der Mei *et al.*, 1995). Ainsi doivent être pris en compte :

(i) la solubilisation dans la phase aqueuse d'une partie des hydrocarbures, qui ont des solubilités différentes dans l'eau à 25 °C (Tanford, 1980), ce qui modifie ainsi les caractéristiques et la composition de la phase liquide,

(ii) la température qui n'est malheureusement que rarement mentionnée dans les études, alors que les interactions hydrophobes sont régies par les lois de la thermodynamique et sont gouvernées par l'équation thermodynamique de Gibbs qui fait intervenir la température (T) : $\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$ avec ΔG la variation d'énergie libre, ΔH la variation d'enthalpie libre et ΔS la variation d'entropie libre (Gerschel, 1995),

(iii) La composition ionique et le pH du milieu influencent le rapport existant entre les interactions hydrophobes et électrostatiques des surfaces cellulaires. La théorie de la stabilité colloïdale ou théorie de DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) prend en compte la résultante des forces attractives de van der Waals et des forces électrostatiques répulsives lors du rapprochement de deux entités colloïdales (Hermansson, 1999). La résultante de ces deux forces est influencée par la distance séparant les deux entités, la composition ionique et le pH du milieu. Par conséquent, à de faibles valeurs de pH ou à une force ionique importante du milieu, la charge est neutralisée car les groupements fonctionnels sont protonés ou "neutralisés" par des contre-ions. Ceci conduit à une augmentation de la composante attractive entre les surfaces cellulaires et les gouttelettes d'hydrocarbure par diminution de la composante répulsive. Dans ce cas, les résultats de la mesure de

l'hydrophobicité des surfaces cellulaires montrent une hydrophobicité plus importante qu'à des valeurs de pH supérieures ou des forces ioniques plus faibles (Busscher *et al.*, 1995; Dillon *et al.*, 1986; Magnusson, 1980; van der Mei *et al.*, 1995).

(iv) la durée et la force d'agitation du mélange, qui influencent la taille des gouttelettes, et par conséquent la surface accessible des gouttelettes d'hydrocarbures aux bactéries. Ceci expliquerait que les cellules bactériennes adhèrent mieux à l'octane et au xylène (gouttelettes de petites tailles) qu'à l'hexadécane (gouttelettes de tailles plus grandes) (Donlon et Collieran, 1993),

Dans les systèmes agrégés comme les boues activées, le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures nécessite une dispersion des agrégats par les ultrasons pour libérer les micro-organismes (Guellil *et al.*, 1998; Jorand *et al.*, 1994). Par contre, la formation d'une émulsion importante et stable lors du mélange des boues dispersées avec un hydrocarbure complique le test en immobilisant mécaniquement dans l'émulsion des micro-organismes. Aussi, Guellil *et al.* (1998) ont proposé de reprendre et de laver plusieurs fois de suite l'émulsion précédemment formée avec un tampon de composition physico-chimique déterminée afin d'éliminer les particules non hydrophobes piégées dans l'émulsion puis de déplacer par des lavages successifs les particules hydrophobes. Ainsi, les bactéries qui adhèrent à la surface des gouttelettes d'hydrocarbures sont libérées successivement par les étapes de lavage dans la phase aqueuse. Ces étapes successives de lavage permettent d'atteindre un coefficient qui s'approche d'un "coefficient de partage" (K_e) reposant sur un modèle d'équilibre de Freundlich défini par l'équation $Q_{em} = K_e \times Q_{wp}^{1/n}$ où Q_{em} et Q_{wp} représentent respectivement le nombre de bactéries formant des colonies (UFC) adhérentes à l'émulsion et le nombre de UFC à l'équilibre dans la phase aqueuse (Figure 2.8).

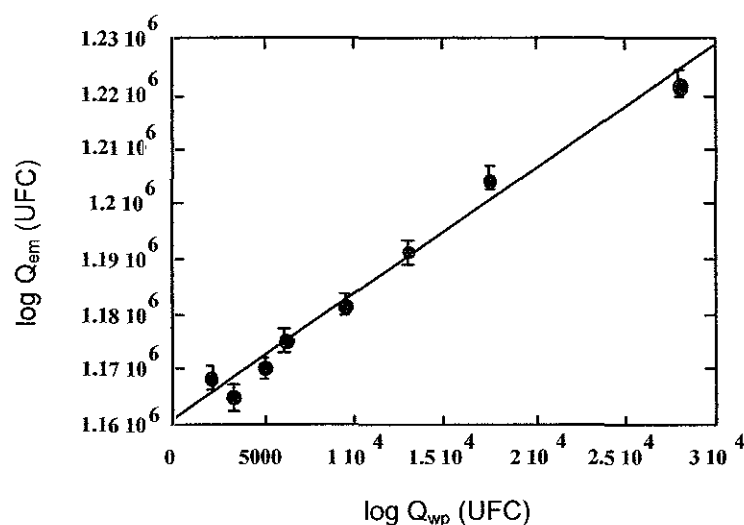


Figure 2.8 : Expression du nombre de bactéries formant des colonies (UFC) adhérentes à l'émulsion (Q_{em}) en fonction du nombre de UFC à l'équilibre dans la phase eau (Q_{wp}) (Guellil *et al.*, 1998).

2.2.1.2. Test d'agrégation des micro-organismes par le sulfate d'ammonium (SA)

Le test d'agrégation des cellules bactériennes par le sulfate d'ammonium a été décrit par Lindahl *et al.* (1981) et repose sur le même principe qui gouverne la précipitation des protéines en phase aqueuse par les sels dits anti-chaotropiques comme le sulfate d'ammonium (Chen et Sun, 2003; Hjertén, 1981). La mise en œuvre du test est relativement simple : les agrégats biologiques après leur dispersion par des ultrasons ou les exopolymères extraits sont mélangés avec des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium. Après un temps fixé et à une température définie, le mélange est centrifugé et les bactéries ou les exopolymères non précipités par le sulfate d'ammonium sont déterminés par la mesure de la turbidité à 600 nm du surnageant. L'hydrophobicité s'exprime généralement comme la pente de la droite reliant la concentration de sel ajoutée et la turbidité à 600 nm (Martín-Cereceda *et al.*, 2001; Urbain *et al.*, 1993a). Cette technique est influencée par la température, le pH, la concentration initiale de la suspension et le temps de contact. Néanmoins, une forte concentration en sulfate d'ammonium peut entraîner des modifications structurales des cellules bactériennes dues au changement de la composition physico-chimique du milieu et conférer ainsi un biais méthodologique non négligeable.

2.2.1.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)

A l'origine, la chromatographie d'interaction hydrophobe a été développée pour séparer des protéines (Szepesy et Rippel, 1992), mais elle peut être étendue à la séparation des cellules bactériennes (Dillon *et al.*, 1986; Donlon et Colleran, 1993; Jana *et al.*, 2000; Mafu *et al.*, 1991; Mozes *et al.*, 1988) et aux exopolymères extraits (Jorand, 2000) selon leurs propriétés hydrophobes. Cette technique consiste à mesurer par microscopie en épifluorescence ou par la turbidité à 600 nm la quantité de bactéries non retenues par un ligand hydrophobe (octyl- ou phényl-sépharose) par des interactions de faible énergie (Olofsson *et al.*, 1998; Stenström, 1989; Zita et Hermansson, 1997a). De nombreux paramètres influencent la rétention des cellules bactériennes comme le pH, la température, la concentration et le type de sels, le gradient appliqué de la phase stationnaire et la phase éluante (Szepesy et Rippel, 1992). Le problème majeur de cette technique repose sur le colmatage des gels hydrophobes par les cellules bactériennes ou des agrégats biologiques.

2.2.2. Paramètres influençant le caractère hydrophobe des agrégats biologiques

En réponse à la variation de nombreux paramètres environnementaux (pouvant être rencontrés dans les bassins aérés des stations d'épuration), les micro-organismes s'adaptent en modifiant les propriétés de leur surface cellulaire et ainsi modifient le caractère hydrophobe des agrégats biologiques.

La différence du caractère hydrophobe des agrégats peut être due à plusieurs paramètres :

(i) à la composition différente des eaux usées. Sponza (2002a, 2002b) montre que les agrégats biologiques issus des stations de traitement d'effluents des industries pétrochimique, textile et papetière ont un caractère hydrophobe plus important (angle de contact de 37 à 42 °) que les agrégats biologiques issus des traitements d'effluents municipaux (angle de contact de 7 à 9 °). Wick

et al. (2002) montrent que la formation d'acides mycoliques plus hydrophobes contenant une plus grande proportion d'acides gras est induite lorsqu'un substrat hydrophobe est ajouté au milieu de culture de mycobactéries. Donlon et Colleran (1993) montrent que *Butyribacterium methyltrophicum* est significativement plus hydrophobe quand la source de carbone est du méthanol et non pas du glucose,

(ii) à l'adsorption de composés par les agrégats qui les rendent ainsi plus hydrophobes. La surface cellulaire de *Acinetobacter venetianus* VE-C3 devient plus hydrophobe par incorporation de gouttelettes d'hydrocarbure dans le lipopolysaccharide hydrophile (Aono et Kobayashi, 1997). De même, l'adsorption de lipides à la surface des agrégats augmenteraient le caractère hydrophobe des agrégats biologiques de boues activées (Liss *et al.*, 2001),

(iii) à la concentration en oxygène du milieu. En réponse à une forte concentration en oxygène (concentration en oxygène dissous de $8,0 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de O_2), l'hydrophobicité de la surface de certaines bactéries isolées des boues activées (*Acinetobacter johnsonii*, *Klebsiella oxytoca* et *Leclercia adecarboxylata*) augmente (Palmgren *et al.*, 1998),

(iv) à l'âge des boues. L'âge des boues influence le caractère hydrophobe des agrégats biologiques (Bura, 2000; Frølund *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 2001). Le caractère hydrophobe augmente de 50 % pour des boues âgées de 4 à 9 jours à 80 % pour des boues âgées de 16 à 20 jours (Bura, 2000). Les auteurs expliquent cette variation par une évolution de la diversité des micro-organismes présents dans les boues en réponse aux changements de l'âge des boues (Liao *et al.*, 2001). Certaines bactéries isolées des boues activées montrent des variations des propriétés de surface (balance hydrophile/hydrophobe) au cours des phases de croissance (Jorand *et al.*, 1994). L'expression de constituants cellulaires peut réguler positivement (Balagué *et al.*, 2001; Jonsson et Wadström, 1983; Zita et Hermansson, 1997b) ou négativement (Aono et Kobayashi, 1997; Arino *et al.*, 1998; Baldi *et al.*, 1999; Stratton *et al.*, 2002) l'hydrophobicité de la surface cellulaire des micro-organismes en réponse aux conditions environnementales.

2.3. Lipides dans l'environnement

2.3.1. Définition et nomenclature générale des lipides

D'une manière générale, les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont définis par une propriété physique, alors que les autres familles de molécules sont définies par leurs structures chimiques. Les lipides sont des substances qui sont faiblement solubles dans l'eau, mais facilement solubles dans les solvants organiques non polaires (Ratledge et Wilkinson, 1988). Deux catégories de lipides sont généralement définies :

(i) Les lipides qui contiennent des acides gras. Ces lipides résultent de la condensation d'acides gras avec des alcools par une liaison ester ou amide. Parmi l'ensemble des lipides qui constituent cette catégorie, seuls les lipides en rapport avec nos études sont présentés dans cette partie.

Dans cette classe, se distinguent les acides gras qui sont des lipides à part entière et des parties de lipides (Louisot, 1983). La formule générale d'un acide gras est : $C_x : y \text{ n-m}$ ou simplement $x : y \text{ n-m}$, où x est le nombre total d'atomes de carbone, y est le nombre total d'insaturation et m correspond à la position de la double liaison à partir du groupement terminal. Les critères de classification portent sur la longueur de leur chaîne, le nombre de doubles liaisons et la configuration spatiale de leur chaîne. Lorsque la chaîne aliphatique des acides gras est mono- ou poly-éthylénique, la configuration de la chaîne aliphatique est notée : cis- ou c- et trans- ou t-. Les acides gras présentant une ramification en position $n-1$ sont dénommés iso- ou i-. Les acides gras ramifiés en position $n-2$ sont dénommés antéiso- ou a- (Ratledge et Wilkinson, 1988). Les principaux types d'acides gras présents chez les procaryotes sont présentés dans le Tableau 2.5. Dans cette catégorie se distinguent également des esters de glycérol pouvant être estérifiés par un ou plusieurs acides gras, les glycérides ou lipides neutres (Figure 2.9a), mais aussi les glycérophospholipides et les glycéroglycolipides qui dérivent de l'acide phosphatidique. Les glycérophospholipides ou phospholipides sont des molécules amphiphiles (Figure 2.9b). Les glycéroglycolipides ou glycolipides sont liés à un ose par une liaison osidique. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des glycolipides (Wilkinson, 1988) avec un constituant, le lipide A, qui contient des acides gras hydroxylés en position 2 ou 3.

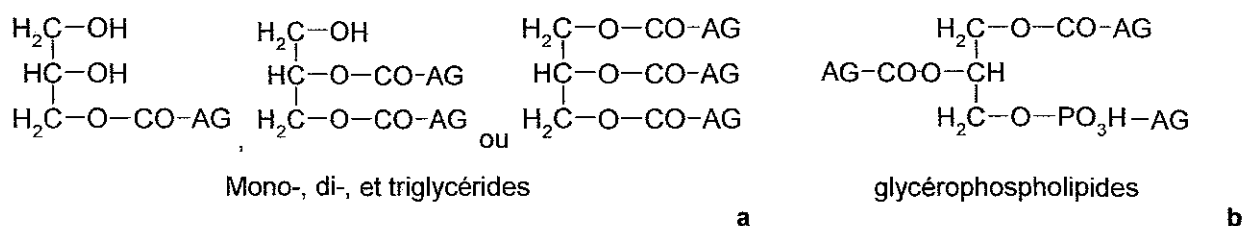


Figure 2.9 : (a) Formule générale des glycérides et (b) des glycérophospholipides (AG : Acide gras).

(ii) Les structures à caractère lipidique qui dérivent de l'isoprène comme les terpènes et les stérols. Cette catégorie ne sera pas développée plus en détail car elle n'a pas été inscrit dans notre thématique de recherche.

Tableau 2.5 : Principaux types d'acides gras trouvés chez les procaryotes (Goldfine, 1982).

Acides gras	Formules	Désignations courtes		Nom commun
Saturés	$H_3C-(CH_2)_a-COOH$			
a =				
12		14:0	C _{14:0}	Acide myristique
14		16:0	C _{16:0}	Acide palmitique
16		18:0	C _{18:0}	Acide stéarique
Monoinsaturés	$CH_3(CH_2)_a-CH=CH-(CH_2)_b-COOH$			
b =	a =			
7	5	16:1n-7	C _{16:1n-7}	Acide palmitoléique
9	5	18:1n-7	C _{18:1n-7}	Acide vaccénique
7	7	18:1n-9	C _{18:1n-9}	Acide oléique
Ramifiés				
Iso-	$H_3C-\overset{\overset{CH_3}{ }}{CH}-(CH_2)_a-COOH$			
Antéiso-	$H_3C-CH_2-\overset{\overset{CH_3}{ }}{CH}-(CH_2)_a-COOH$			
Cyclopropane				
	$CH_3(CH_2)_a-\overset{\overset{CH_2}{\diagup}}{CH}-CH-(CH_2)_b-COOH$			
b =	a =			
7	5	cy-17:0		
9	5	cy-19:0		Acide lactobacillique
Hydroxylés				
2-OH	$H_3C-(CH_2)_a-\overset{\overset{OH}{ }}{CH}-COOH$			
3-OH	$H_3C-(CH_2)_a-\overset{\overset{OH}{ }}{CH}-CH_2-COOH$			
a =				
8		3-OH14:0		Acide hydroxymyristique

2.3.2. Présence des lipides dans l'environnement

Généralement, les études se sont intéressées aux phospholipides, aux lipopolysaccharides qui participent à la composition des membranes cellulaires et aux polyhydroxyalcanoates (PHA) qui sont des produits de stockage.

2.3.2.1. Phospholipides (PL) et lipopolysaccharides (LPS)

Toutes les cellules des micro-organismes contiennent des phospholipides (PL). Les PL sont les constituants majeurs des membranes cellulaires des archaebactéries (Smith, 1988), des bactéries à gram négatif (Wilkinson, 1988), des bactéries à gram positif (O'Leary et Wilkinson, 1988), des mycobactéries (Brennan, 1988), des levures (Ratray, 1988), des champignons (Lösel, 1988; Sasaki *et al.*, 2001) et des algues (Wood, 1988) et peuvent atteindre jusqu'à 90 % du total des lipides extraits. La possibilité de quantifier la biomasse totale dans un échantillon de l'environnement par la seule quantification des PL est certainement surestimée par les auteurs. Certes, des PL ont été mesurés dans de nombreux systèmes naturels comme les sols (Bai *et al.*, 2000; Frostegård *et al.*, 1991; Zelles et Bai, 1993), les sédiments (Mudge *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1997; Smoot et Findlay, 2001; Tunlid *et al.*, 1989; Virtue *et al.*, 1996; White *et al.*, 1979), les boues activées (Cha *et al.*, 1999; Hesselmann *et al.*, 1999; Werker *et al.*, 2003; Werker et Hall, 1998), les biofilms (Keinänen *et al.*, 2002, 2003; Suutari *et al.*, 1997), les eaux naturelles (Mills *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 1992), le compost (Klamer et Bååth, 1998) et la tourbe (Rannekleiv et Bååth, 2003). Des facteurs de conversion ont été établis entre la quantité de PL et de biomasse par différents auteurs. Ainsi, de 10 à 100 μmol de PL g^{-1} de matière sèche sont équivalents à $2,5 \times 10^{12}$ cellules respectivement pour des souches bactériennes isolées des sédiments (White *et al.*, 1996b) et pour les souches bactériennes en condition aérobie présentées dans le Tableau 2.6 (Brinch-Iversen et King, 1990). Mais, les PL présents dans les échantillons environnementaux proviennent d'une population bactérienne très diversifiée à laquelle s'ajoute des eucaryotes. La quantité de PL varie d'un micro-organisme à un autre et en fonction des conditions de culture. Par exemple, *E. coli* contient 3 fois plus de phospholipides que *D. brightwellii* (Tableau 2.6) et le passage de la condition anaérobie à aérobie provoque aussi une augmentation de la quantité de PL qui augmente de 160 à 280 μmol g^{-1} de matière sèche (Frerman *et al.*, 1967, cités par Brinch-Iversen *et al.*, 1990). Les acides gras des bactéries à gram positif peuvent varier de façon importante d'un groupe à un autre, d'une espèce à une autre, d'une souche à une autre et en fonction des conditions de croissance (O'Leary et Wilkinson, 1988). De plus, les conditions de culture des souches de référence ne sont pas représentatives des conditions rencontrées dans l'environnement. Elles sont cultivées généralement sur des sources carbonées rapidement utilisables comme le glucose.

Tableau 2.6 : Quantité de phospholipides (PL) présente chez différentes bactéries (Brinch-Iversen et King, 1990).

Bactéries	$\mu\text{mol de PL g}^{-1} \text{ MS}$		
<i>E. coli</i>	336,2	±	21,8
<i>P. dentrificans</i>	126,8	±	43,6
<i>Desulfovibrio sp.</i>	254,6	±	30,8
<i>Desulfobulbus sp.</i>	506,8	±	71,6
<i>Desulfobacter sp.</i>	236,2	±	29,4
<i>D. brightwelli</i>	106,8	±	15,8

MS : Matières sèches

La quantification des PL peut-elle donner une estimation de la biomasse intacte, non lysée ?

Les PL ont un turn-over rapide de l'ordre de la minute ou de l'heure dans les sédiments selon White *et al.* (1979) et ils ne sembleraient pas s'accumuler à l'extérieur des bactéries (Boulton, 1988). La diminution des acides gras des phospholipides provient de leur dégradation par des phospholipases qui transforment les phospholipides des membranes des cellules mortes en lipides neutres (White *et al.*, 1979). Cependant, la disparition des PL ne peut pas être attribuée seulement à leur biodégradation car cette disparition peut aussi être due à une activité bactérienne réduite. La quantité de PL dans les cellules bactériennes dépend donc du rapport existant entre vitesse de dégradation et taux de synthèse. L'élévation de la température de 25 à 55 °C d'un échantillon de tourbe provoque un ralentissement de l'activité métabolique des micro-organismes contribuant à diminuer la production de PL (Ranneklev et Bååth, 2003). White *et al.* (1979) extraient une quantité plus importante de PL dans les sédiments mis en suspension dans un milieu aérobie ($0,207 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment) que dans les sédiments mis en suspension dans un milieu anaérobie ($0,147 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment), ce qui peut traduire le résultat d'un changement de l'activité bactérienne.

En conséquence, les acides gras hydroxylés des LPS ne peuvent pas être retenus pour la quantification de la biomasse viable car même si les LPS sont facilement dégradés dans les sédiments des estuaires (Saddler et Wardlaw, 1980), les acides gras hydroxylés dérivants des LPS sont capables de s'accumuler de façon extracellulaire (Boulton, 1988).

2.3.2.2. Les polyhydroxyalcanoates (PHA)

Les PHA sont mesurés dans les boues activées (Comeau *et al.*, 1988; Hesselmann *et al.*, 1999; Odham *et al.*, 1986), mais ne sont pas mesurés dans les EPS extraits des boues activées par l'éthanol (Goodwin et Forster, 1985). Les PHA s'accumuleraient seulement à l'intérieur de la cellule et formeraient des inclusions insolubles dans l'eau (Liu *et al.*, 2001). Les PHA dominants dans les boues

activées sont les acides 3-hydroxybutyrique (56 %) (Figure 2.10), 3-hydroxyhexanoïque (5 %) et 3-hydroxyoctanoïque (39 %) (Hesselmann *et al.*, 1999). Les PHA sont des composés de stockage bactérien qui sont accumulés par de nombreuses bactéries lorsque les conditions de croissance varient (*i.e.* anaérobie et aérobie) et en présence d'un excès de source carbonée (Kessler et Witholt, 2001).

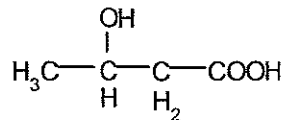


Figure 2.10 : Acide 3-hydroxybutyrique (Hesselmann *et al.*, 1999).

2.3.3. Acides gras des phospholipides (PL) et des lipopolysaccharides (LPS) : Signature spécifique des micro-organismes?

L'identification des micro-organismes et la différenciation de différents sous-ensembles d'une communauté de micro-organismes par l'analyse des acides gras des PL est souvent justifiée en complément des techniques de bactériologie classique. L'utilisation des acides gras des PL, dans le but d'identifier des micro-organismes, n'est applicable que si ces biomarqueurs, bien évidemment, sont indépendants des conditions de culture et spécifiques d'une famille ou d'un micro-organisme (Taylor et Parkes, 1985). Les principaux acides gras des PL qui permettent une identification des organismes sont présentés dans le Tableau 2.7. Le fait de choisir tel ou tel acide gras comme biomarqueur est facile dans certains cas comme les acides gras polyénoïques qui sont rarement présents chez les bactéries mais plutôt caractéristiques des eucaryotes (Ratledge et Wilkinson, 1988), mais peut aussi être difficile si la composition des acides gras des PL d'une bactérie n'a jamais été détaillée.

Tableau 2.7 : Acides gras caractéristiques de micro-organismes.

Signatures (Acides gras)	Micro-organismes possibles	Références bibliographiques
a-15:0, i-15:0, a-17:0, i-17:0, 15:1 et 17:1	bactéries à gram positif	Gharaibeh et Voorhees (1996) Rajendran <i>et al.</i> (1997) Suutari <i>et al.</i> (1997)
16:1, 16:0, 18:1, cy-17:0 et cy-15:0 (proportion importante)	bactéries à gram négatif	Wakeham et Canuel (1990) cités dans Basile <i>et al.</i> (1995) Boon <i>et al.</i> (1977) Mudge <i>et al.</i> (1998) Smith <i>et al.</i> (2000) White <i>et al.</i> (1996a, 1996b)
Acide 11-cyclohexyundécanoïque	Bacillus acidocaladrius	de Rosa <i>et al.</i> (1974)
Acide 13-cyclohexyltridécanoïque		
i-17:1n-7c	Bactéries sulfato-réductrices	Taylor et Parkes (1983) Virtue <i>et al.</i> (1996) White <i>et al.</i> (1996b)
10-Me16:0	Desulfobacter	Taylor et Parkes (1983) Virtue <i>et al.</i> (1996) White <i>et al.</i> (1996b)
monoénoïques à 16 atomes de carbone	Methylococcus et Methylomonas	Virtue <i>et al.</i> (1996)
16:1n-5t, 16:1n-5c, 16:1n-6c et 16:1n-8c	Methylsossinus et Methylocystis	Virtue <i>et al.</i> (1996)
18:1n-8c	Méthanotrophes de type 2 capables d'oxyder le méthane	Bowman <i>et al.</i> (1993) White <i>et al.</i> (1996b)
18:2n-6	Champignons, algues et protozoaires	Basile <i>et al.</i> (1995) Boon <i>et al.</i> , (1977) White <i>et al.</i> (1996b)
20:4n-6 et 20:5n-3	micro-organismes marins	Mudge <i>et al.</i> (1998)
acides gras polyramifiés	Mycobactéries	Smith <i>et al.</i> (2000)
acides gras mycolique	Actinomycètes (<i>Rhodococcus</i> spp et <i>Gordonia</i> spp)	Stratton <i>et al.</i> (1999)

L'étude des acides gras des PL reste-t-elle applicable aux échantillons environnementaux ?

La discrimination des micro-organismes présents dans un échantillon de l'environnement par la seule analyse des acides gras des PL reste difficile car les proportions des acides gras des phospholipides provenant d'un échantillon environnemental représentent la somme des acides gras de chacun des micro-organismes présents (Haack *et al.*, 1994), à laquelle s'ajoute les acides gras traduisant l'adaptation des micro-organismes à l'environnement et enfin une contamination anthropique certaine du milieu. C'est pourquoi, il est souvent préférable d'analyser l'intégralité des profils des acides gras des phospholipides (Barshick *et al.*, 1999; Basile *et al.*, 1995; Frostegård *et al.*, 1991; Gharaibeh et Voorhees, 1996; Haack *et al.*, 1994; Ingram *et al.*, 2003) et de tenter de relier les profils des acides gras à un peuplement particulier. L'analyse conjointe des acides gras hydroxylés des lipopolysaccharides (LPS) donne une information complémentaire de la communauté bactérienne présente dans un écosystème (Zelles et Bai, 1993), car les LPS entrent essentiellement dans la composition de la membrane externe des bactéries à gram négatif (Lüderitz *et al.*, 1982; Wilkinson, 1988). La détermination des acides gras hydroxylés en position 3 des LPS caractérise la présence des bactéries sulfato-réductrices (Boon *et al.*, 1977). L'analyse des acides gras dans les biofilms de réseau de distribution d'eau potable montre une communauté prédominée par les bactéries à gram négatif (Keinänen *et al.*, 2002) qui ont également été mises en évidence dans différents écosystèmes comme les sédiments (Parker *et al.*, 1982), les estuaires et les plages (Saddler et Wardlaw, 1980). Enfin, *Nocardia amarae* est mis en évidence dans les boues activées en recherchant uniquement trois acides gras (16:1n-6c, 2-OH-i-15:0 et 2-OH-19:1n-8) (Cha *et al.*, 1999).

En conclusion, l'analyse des acides gras des phospholipides dérivant des membranes biologiques présente de grandes possibilités pour observer la biomasse présente dans les échantillons environnementaux. Cependant, les micro-organismes s'adaptent continuellement à la variation de paramètres environnementaux en modifiant la composition des acides gras des phospholipides de leur membrane cellulaire et ces adaptations doivent être prises en compte pour étudier la biomasse.

2.3.4. Effets des paramètres environnementaux sur la composition des acides gras des phospholipides des micro-organismes

L'adaptation des micro-organismes à leur environnement inclut la modification de la composition des constituants de la membrane cellulaire, en particulier les acides gras des phospholipides (Galdiero *et al.*, 1993) et reflète le comportement dynamique de la membrane cellulaire. Le changement de la composition des acides gras des phospholipides concerne l'augmentation ou la diminution (a) du rapport des acides gras saturés sur les acides gras insaturés, (b) du rapport des acides gras insaturés de la configuration trans- sur ceux de la configuration cis-, et (c) des acides gras cyclopropanes. Mais également, la modification (d) du rapport entre les acides gras ramifiés et les acides gras non ramifiés, et (e) de la structure, du type de ramifications et de la longueur des chaînes aliphatiques (Denich *et*

al., 2003) dans le cas de la variation brutale de la température (Jahnke *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 2000), de la concentration en oxygène (de Rosa *et al.*, 1974; Jahnke et Nichols, 1986; Mazumder *et al.*, 2000), d'un stress chimique (Heipieper *et al.*, 1992, 1995; Macnaughton *et al.*, 1997; Sykkema *et al.*, 1995) et de la famine (Guckert *et al.*, 1986).

2.3.4.1. Effet de la température

La température induit des changements de la composition des acides gras membranaires des levures, des champignons et des bactéries gram positif et négatif afin de réguler la fluidité membranaire (Suutari et Laasko, 1994; Suutari *et al.*, 1990). Aussi, le nombre d'insaturations, de ramifications et de cyclisations et la longueur des chaînes aliphatiques des acides gras des phospholipides diminuent, augmentent, ou restent constante chez la levure (Suutari et Laasko, 1994). Nichols *et al.* (2002) montrent que la composition des acides gras ramifiés de *Listeria monocytogenes* varie de façon importante en fonction de la température du milieu de culture. La proportion des acides gras à 17 atomes de carbone augmente linéairement lorsque la température passe de 14 à 26 °C. Par contre en augmentant la température de 5 à 45 °C, la proportion des acides gras i-17:0 des phospholipides augmentent légèrement (de 2,2 à 8 % des acides gras totaux analysés) et celle des acides gras ramifiés a-15:0 diminuent (de 53 à 34 %) alors que la somme de tous les acides gras analysés reste constante (Nichols *et al.*, 2002). Une diminution brutale de la température (de 20 à 0 °C) du milieu de culture provoque une diminution rapide (moins de 60 minutes) de la longueur des chaînes des acides gras des phospholipides de *Micrococcus cryophilus*, alors que l'augmentation brutale de la température (de 0 à 20 °C) induit une augmentation de la longueur de chaînes aliphatiques des acides gras (McGibbon et Russell, 1985). L'effet de l'élévation de la température d'incubation de 55 à 70 °C chez *Bacillus acidocaldarius* est dépendant du pH du milieu. En effet, à faible valeur de pH (pH = 3,0), l'élévation de la température contribue à augmenter la proportion des acides gras ramifiés iso- et antéiso-, mais à des valeurs de pH plus élevées (pH = 5,0) l'effet de l'élévation est inversé et la proportion des acides gras 11-cyclohexylundécanoïque et 13-cyclohexyltridécanoïque augmente (de Rosa *et al.*, 1974).

La composition des acides gras des phospholipides est différente entre les micro-organismes (Suutari *et al.*, 1990). Par exemple, les micro-organismes thermophiles possèdent une proportion plus importante d'acides gras saturés que les micro-organismes psychrophiles d'acides gras insaturés (Langworthy, 1982; Meziane et Tsuchiya, 2002). Aussi, la comparaison directe de la modification des acides gras par un stress est impossible à généraliser.

2.3.4.2. Effet de la concentration en oxygène dissous

Des cultures de *Bacillus acidocaldarius* réalisées dans des conditions très oxygénées montrent que la proportion des acides gras ramifiés iso-17:0 et antéiso-17:0 augmente de 29 à 53 %, alors que les acides 11-cyclohexylundécanoïque et 13-cyclohexyltridécanoïque diminuent de 66 à 38 % par rapport à des conditions moins oxygénées (de Rosa *et al.*, 1974). Chez les levures, l'augmentation de la

concentration en oxygène dissous du milieu induit une augmentation des acides gras polyénoïques 18:2 et 18:3 et de l'acide gras saturé 16:0, mais la proportion des acides gras 18:0 et 18:1 diminue (Ratnay, 1988). Par ailleurs, une augmentation brutale du taux d'oxygène de 11 à 100 % dans le milieu de culture de *P. jessenii* provoque une augmentation de la proportion des acides gras cy-17:0 d'un facteur 5 (Mazumder *et al.*, 2000). Jahnke et Nichols (1986) montrent que le passage de la concentration en oxygène de 10,6 à 0,2 % de la saturation provoque une augmentation de la proportion des acides gras cyclopropanes (cy-17:0 et cy-19:0) de 2,3 à 23,5 % chez *Methylococcus capsulatus*. Ceci est en accord avec les travaux de Jacques et Hunt (1980) qui proposent que l'activité cyclopropane synthétase de *Pseudomonas denitrificans* est induite par une diminution brutale de la concentration en oxygène du milieu en présence de succinate comme source carbonée.

2.3.4.3. Effet de stress chimique

L'ajout de phénol, de 4-chlorophénol ou de polyéthylène glycol à une culture de *Pseudomonas putida* P8 provoque une conversion des acides gras insaturés à 16 ou 18 atomes de carbone de la configuration cis- en trans- (Halverson et Firestone, 2000; Heipieper *et al.*, 1992). Ainsi, le rapport des acides gras insaturés trans-/cis- augmente et est supérieur à 0,1. Cette conversion des acides gras cis- en trans- serait un mécanisme de protection contre les solvants organiques (Heipieper *et al.*, 1992) en modifiant la fluidité membranaire car la configuration trans- de la chaîne aliphatique des acides gras insaturés est plus rigide et plus stable que la configuration cis-. De même, le rapport entre les acides gras insaturés et saturés des phospholipides diminue en présence d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique chez *Escherichia coli* (Balagué *et al.*, 2001) ou en présence d'eugénol chez *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* (Blank *et al.*, 1991). Cette modification contribue aussi à modifier la fluidité membranaire. Heipieper *et al.* (1995) observent également une corrélation négative entre l'hydrophobicité des composés ajoutés au milieu de culture et le rapport des acides gras insaturés (16 et 18 atomes de carbones) trans- et cis- chez *Pseudomonas putida*.

Suite au contact avec l'hypochlorite de sodium, les acides gras insaturés du type 16:1n-7c et 18:1n-7c des bactéries à gram négatives seraient convertis en acides gras cyclopropanes cy-17:0 et cy-19:0 (Smith *et al.*, 2000).

Certes, le changement de la composition des acides gras des phospholipides, lors d'un ajout d'un composé toxique, est le résultat de la synthèse de nouveaux acides gras par les cellules bactériennes, de la conversion des acides gras cyclopropane (Smith *et al.*, 2000) et des acides gras insaturés de la configuration cis- en trans- par des enzymes (Junker et Ramos, 1999; Ramos *et al.*, 2001b), mais aussi de la transformation chimique des acides gras (époxydation) (Smith *et al.*, 2000).

2.3.4.4. Effet de la famine

Chez des bactéries marines psychrophiles, Oliver *et al.* (1984) mesurent une diminution de 65 % des phospholipides pendant la première semaine de famine et une augmentation de 57 % des lipides neutres. Des sédiments mis en suspension dans un milieu aérobie alimenté seulement en carbone, en

azote et en phosphate présentent une quantité de phospholipides ($0,147 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment) inférieure à ceux mis en suspension dans un milieu aérobie alimenté avec de l'extrait de levure ($0,513 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment) (White *et al.*, 1979). Pendant une période famine, les acides gras insaturés 16:1n-7c de *Vibrio cholerae* diminuent alors que les acides gras saturés, les acides gras cyclopropanes et les acides gras insaturés dans la configuration trans- augmentent (Guckert *et al.*, 1986) (Tableau 2.8). Généralement, les bactéries non stressées possèdent un rapport acides gras trans/cis inférieur ou égal à 0,05. Un rapport acides gras trans/cis supérieur à 1 est un indicateur d'un état de stress dû à la famine et sa détermination permet de caractériser le statut nutritionnel des micro-organismes (Guckert *et al.*, 1986; Nichols *et al.*, 2002; Virtue *et al.*, 1996).

Un stress dû à la famine se traduit généralement par l'augmentation du rapport des acides gras saturés et des acides gras cyclopropanes (Guckert *et al.*, 1986; Wick *et al.*, 2002).

Tableau 2.8 : Evolution (% des acides gras totaux) des acides gras 16:1n-7 pendant une période de famine de 30 jours chez *Vibrio cholerae* (Guckert *et al.*, 1986).

Temps (jour)	16:1n-7c	16:1n-7t	Rapport trans-/cis-
0	39 %	1 %	0,02
30	-11 %	17 %	1,56

2.3.4.5. Effet d'une croissance sous forme de biofilm

La composition des acides gras des phospholipides est différente selon que *Pseudomonas atlantica* est sous une forme libre ou attachée (Tunlid *et al.*, 1989). Les bactéries sous forme attachée présentent une proportion d'acides gras saturés et insaturés en configuration trans- supérieure aux cellules libres. Cette différence de composition des acides gras peut être une adaptation à l'environnement. Valeur *et al.* (1988) montrent que les bactéries à gram négatif fixées ont un rapport des acides gras C18/C16 supérieur (0,4) à celui des bactéries planctoniques (0,2) dans les réseaux de distribution d'eau potable.

2.4. Biosorption et désorption par les agrégats biologiques de composés organiques des eaux usées

Par définition, la biosorption des composés organiques est considérée comme étant la conséquence des interactions électrostatiques et hydrophobes ayant lieu entre l'adsorbant et l'adsorbat et sans biodégradation de l'adsorbat (Blackburn *et al.*, 1984; Jorand *et al.*, 1995c). Les agrégats biologiques sont capables de biosorber des particules comme des bactéries (Soda *et al.*, 1999; Zita et Hermansson, 1997b), de la matière organique véhiculée par les eaux urbaines (Guellil *et al.*, 2001; Jorand *et al.*, 1995c; Pujol et Canler, 1992; Tan et Chua, 1997; Torrijos *et al.*, 1994), des protéines

(Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983), des acides gras à longue chaîne (Hwu *et al.*, 1998), des polysaccharides (Carlson et Silverstein, 1998), des polluants organiques hydrophobes et amphiphiles comme le pyrène, le phénanthrène et les sulfonates d'alkylbenzènes linéaires (Ganaye *et al.*, 1997; Steen et Karickhoff, 1981; Szymanski *et al.*, 2003; Urano et Saito, 1984). De fait, une partie des composés organiques sont transportés par le biais des agrégats biologiques, puis pour partie, libérés dans la phase liquide. Dans certains cas, les composés organiques se lient de façon covalente avec l'adsorbant limitant ainsi la redistribution avec la phase liquide. Parfois, les composés organiques piégés peuvent être hydrolysés par des enzymes extracellulaires associées aux EPS comme cela a été montré dans les sols (Burns, 1989; Morra, 1997; Novotny *et al.*, 1999), les sédiments (Talbot et Bianchi, 1997; Talbot *et al.*, 1997), les biofilms et les boues activées (Boczar *et al.*, 1992; Boczar *et al.*, 2001; Cadoret *et al.*, 2002; Confer et Logan, 1997a, 1997b; Frølund *et al.*, 1995; Griebel *et al.*, 1997; Wuertz *et al.*, 2001). Struijs *et al.* (1991) ont modélisé l'élimination des sulfonates d'alkylbenzènes au cours du traitement des eaux usées et ont montré qu'une partie de ces surfactants amphiphiles (environ 2 %) s'accumule dans les agrégats biologiques sans être dégradée, malgré leur forte biodégradabilité. Les processus de biosorption et de désorption sont importants car ils contrôlent en partie le devenir des composés organiques dans l'environnement (Westall *et al.*, 1999), en rivière par exemple.

2.4.1. Transfert des composés organiques de la phase liquide vers les agrégats biologiques

Le transfert des composés organiques de la phase liquide vers les agrégats est défini par la cinétique de disparition des composés de la phase liquide au cours du temps et par le temps nécessaire pour atteindre un état de pseudo-équilibre. Des modèles sont généralement appliqués aux données expérimentales pour décrire simplement le transfert des composés organiques de la phase liquide vers les agrégats.

2.4.1.1. Cinétique de transfert des composés organiques de la phase liquide vers l'agrégat biologique

Une fraction de la matière organique est rapidement éliminée de la phase liquide par les agrégats biologiques, lors du mélange de l'eau usée avec des boues activées (Guellil, 1999; Guellil *et al.*, 2001; Pujol et Canler, 1992; Torrijos *et al.*, 1994). Ainsi, 5 à 93 % de la matière organique des eaux usées sont éliminés par biosorption dans les quelques dizaines de minutes qui suivent le temps de contact avec les boues activées (Guellil *et al.*, 2001; Jorand *et al.*, 1995c; Pujol et Canler, 1992; Riffat et Dague, 1995; Torrijos *et al.*, 1994). Ce transfert de la matière organique de la phase liquide vers l'agrégat biologique s'ajuste parfois à une cinétique de premier ordre (Jorand *et al.*, 1995c). De même, Guellil *et al.* (2001) ont montré un ajustement possible à une cinétique de premier ordre aussi bien pour la fraction soluble que colloïdale des eaux usées (Figure 2.11). Ces cinétiques sont influencées par la présence simultanée de différents adsorbats dans la phase liquide. Hwu *et al.* (1998) ont montré qu'environ 90 % d'un mélange d'acides gras à longues chaînes (50 % acide oléique, 35 %

d'acide palmitique et 15 % d'acide stérique) sont transférés de la phase liquide vers des granules anaérobies en 3 h, alors qu'il faut 24 h pour biosorber 40 à 60 % d'acide oléique de la phase liquide si il est le seul adsorbat présent dans la phase liquide.

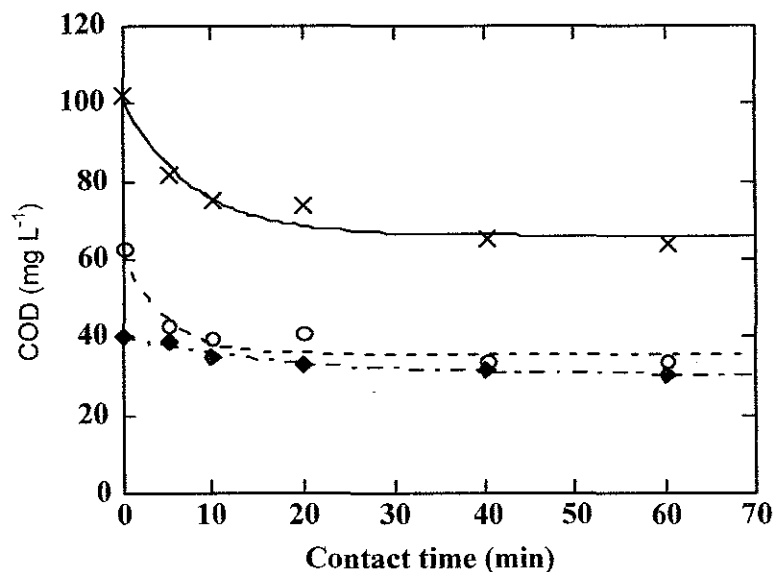


Figure 2.11 : Ajustements à une cinétique de premier ordre de la disparition du COD_{colloidal et soluble} (X), COD_{colloidal} (O) et COD_{soluble} (◆) de la phase liquide vers les boues activées (Guellil *et al.*, 2001).

La quantité de matière organique biosorbée dépend du temps de contact entre la matière organique et les agrégats biologiques (Tableau 2.10). Quelle que soit la charge organique, la quantité de matière organique biosorbée augmente avec le temps de contact.

Tableau 2. 10 : Quantités de matière organiques biosorbée (b) en fonction de la charge organique et du temps (Jorand, 1995a).

Charge organique (mg COD g ⁻¹ MS)	b (mg COD g ⁻¹ MS)	
	15 min	60 min
10	1,8	2,5
20	3	5,3
40	2,9	6,5

2.4.1.2. Temps nécessaire pour atteindre le système adsorbat-adsorbant à l'équilibre

Le temps nécessaire pour atteindre un pseudo-équilibre entre la phase liquide et les agrégats biologiques nécessite généralement quelques dizaines de minutes (Blackburn *et al.*, 1984; Guellil *et al.*, 2001; Jorand *et al.*, 1995c; Pujol et Canler, 1992). Le transfert de la fraction soluble de la phase liquide vers les agrégats biologiques atteint un équilibre en 20 min, alors qu'il nécessite un temps légèrement supérieur (de 40 min) pour la fraction colloïdale (Guellil *et al.*, 2001) (Figure 2.6). Cette différence est certainement le reflet de mécanismes de transfert différents pour les deux fractions. De même, le temps nécessaire pour atteindre un état d'équilibre augmente avec la masse moléculaire des polysaccharides (Carlson et Silverstein, 1998).

Il est souvent difficile d'atteindre un système adsorbant-adsorbat parfaitement à l'équilibre car (i) les adsorbats sont instables (transformation des adsorbats par des enzymes extracellulaires associées aux agrégats) et (ii) les adsorbats diffusent plus ou moins rapidement dans la matrice d'exopolymères, aussi le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre pour les petites molécules est nécessairement plus long (Carlson et Silverstein, 1998) car elles sont capables de migrer plus en profondeur dans la structure des agrégats.

2.4.1.3. Modélisation de l'adsorption de la matière organique par les boues activées

Différents modèles d'équilibre sont généralement utilisés pour décrire le transfert de la matière organique de la phase liquide vers des agrégats biologiques. Aussi, les modèles de Freundlich et de Langmuir sont classiquement utilisés pour décrire ces phénomènes d'équilibre entre deux phases. L'isotherme d'adsorption est la relation, liant à une température donnée, la quantité d'adsorbat adsorbée à la concentration d'adsorbat à l'équilibre en solution après un temps défini.

Le modèle de Freundlich considère que les sites présents à la surface de l'adsorbant peuvent être de nature différente. Cette isotherme à l'équilibre définit une relation non linéaire car l'affinité d'adsorption diminue de manière non linéaire avec l'avancement de la réaction. Le phénomène d'adsorption est décrit par l'isotherme de Freundlich représenté par l'équation suivante :

$$Q_e = K \times C_e^{1/n} \quad (\text{Equation 2.1})$$

où Q_e correspond à la quantité de molécules adsorbées par unité de masse d'adsorbant (mg g^{-1}), C_e correspond à la concentration de molécules non adsorbées à l'équilibre (mg L^{-1}) et K et $1/n$ représentent les constantes caractéristiques du couple adsorbant-adsorbat. K s'exprime en $\text{mg}^{1-1/n} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n}$ (Chen *et al.*, 1999). La constante K indique la capacité d'adsorption de l'adsorbant et $1/n$ l'intensité de l'adsorption (Aksu, 2001; Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983).

- Dans le cas où $1/n = 1$, l'attraction du soluté reste identique pour l'adsorbat quelle que soit la concentration et le modèle de Freundlich se simplifie à une isotherme linéaire. L'équation 2.1 devient $Q_e = K \times C_e$ et K s'exprime en L kg^{-1} avec Q_e en mg kg^{-1} et C_e en mg L^{-1} . Dans les systèmes

parfaitement définis, K est considéré comme caractéristique du système adsorbant-adsorbat et K prend les valeurs de la quantité d'adsorbat adsorbé pour $C_e = 1$.

- $1/n$ inférieur à 1 reflète la situation dans laquelle à forte concentration de deux entités, il devient de plus en plus difficile d'adsorber des molécules supplémentaires. Cela se produit dans le cas où les sites restants sont moins attractifs pour les molécules de l'adsorbat.
- $1/n$ supérieur à 1 définit une situation dans laquelle les molécules préalablement adsorbées tendent à modifier la surface en favorisant l'adsorption.

Ce modèle ne présente pas de limite théorique pour la quantité d'adsorbat que peut adsorber la surface solide. Par contre, la comparaison des constantes K de Freundlich ne peut être réalisée si C_e est différente de 1, si les valeurs de $1/n$ sont différentes entre deux études ou si les unités de mesure sont différentes.

Le modèle de Langmuir a été développé pour décrire le phénomène d'adsorption de type monocouche et les sites présents à la surface de l'adsorbant doivent être de même nature. En effet, dans ce cas, une surface possède un nombre défini de sites d'adsorption potentiels. L'expression du modèle de Langmuir est l'équation 2.2.

$$Q_e = \frac{Q_o \times b \times C_e}{1 + b \times C_e} \quad (\text{Equation 2.2})$$

où Q_e correspond à la quantité de molécules adsorbées par unité de masse d'adsorbant (mg g^{-1}), C_e correspond à la concentration de molécules non adsorbées à l'équilibre (mg L^{-1}), Q_o et b représentent les caractéristiques du modèle de Langmuir. Q_o (mg g^{-1}) correspond à la quantité maximale de molécules adsorbées par unité de masse de l'adsorbant pour former une monocouche sur la totalité de l'adsorbant et b (L mg^{-1}) est une constante liée à l'affinité des sites de liaison.

En conclusion, l'ajustement des données d'adsorption à des modèles ne peut pas être traduit de façon mécanistique pour des systèmes aussi complexes. La comparaison des données avec celles de la littérature est souvent impossible car les essais de biosorption sont réalisés dans des conditions différentes avec des unités de mesure différentes. Néanmoins, ces modèles permettent de décrire objectivement et simplement la biosorption des composés organiques par les boues activées. La diversité des mécanismes de biosorption (adsorption, diffusion ...) contribue à des isothermes non linéaires qui permettent aussi l'utilisation du modèle de Freundlich.

2.4.2. Facteurs influençant la biosorption des composés organiques par des agrégats biologiques

Les interactions entre l'adsorbant et l'adsorbat, qui contribuent au phénomène de biosorption, sont influencées par les caractéristiques de l'adsorbant (conditionnement et composition), de l'adsorbat (masse moléculaire, charge et hydrophobicité) aussi bien que par les caractéristiques du milieu (pH, composition ionique et température).

2.4.2.1. Influence des caractéristiques des agrégats biologiques sur la biosorption

Les agrégats biologiques possèdent des propriétés de biosorption liées à leur composition (diversité des populations de micro-organismes et EPS). Le conditionnement des agrégats (acclimatation, inactivation) influence également la biosorption.

2.4.2.1.1. Participation des composants des agrégats biologiques à la biosorption

Les agrégats biologiques sont composés d'une grande diversité de micro-organismes, d'exopolymères et d'une fraction inorganique qui confèrent à l'agrégat ses propriétés de biosorption. Lors des tests de biosorption, une partie de la matière organique est quelque fois désorbée à faible charge organique (Guellil *et al.*, 2001). Les paramètres K et 1/n du modèle de Freundlich permettent de suivre la variabilité de la capacité de biosorption. La biosorption de protéines (Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983) ou de sulfonates d'alkylbenzène (Urano et Saito, 1984) par des boues activées est variable d'un essai à l'autre (respectivement $K = 0,35 \pm 0,14 \text{ L g}^{-1}$ et $1/n = 1,97 \pm 4,10$; K de 0,9 à $5,2 \text{ L kg}^{-1}$ et 1/n de 1,0 à 1,4). Cette variation des valeurs de K traduit la variabilité de la capacité de biosorption due aux caractéristiques de l'adsorbant. D'un essai à l'autre, la diversité bactérienne ou la composition des EPS varie sensiblement et peut expliquer ces différences de biosorption.

- Les micro-organismes

Une grande diversité de micro-organismes est présente dans les agrégats biologiques de boues activées, mais tous les micro-organismes ne possèdent pas des surfaces cellulaires de même caractéristique, notamment en terme d'hydrophobicité. Les caractéristiques de leur membrane cellulaire interviennent dans la capacité de biosorption.

À partir de bactéries isolées des boues activées, Jorand *et al.* (1995c) montrent que les bactéries ayant une surface hydrophobe (*Enterococcus hirae*) sont capables d'adsorber une plus grande quantité de matière organique des eaux usées que les souches ayant des propriétés de surface hydrophile (*Klebsiella oxytoca*). Dès lors, la capacité de biosorption des bactéries fait intervenir les membranes biologiques et leur composition. Tsezos et Bell (1989) montrent que l'enveloppe cellulaire de *R. arrhizus* est capable de piéger 16 % du lindane et 25 % du diazinon. Les lipides des membranes cellulaires sont impliqués dans les propriétés des surfaces cellulaires et pourraient ainsi être impliqués dans la capacité d'adsorption de la matière organique par les boues activées. Le contenu des lipides membranaires des algues (*Chlamydomonas* et *Dunalliella*) est corrélé avec l'accumulation de α -chlorophénol (Canton *et al.*, 1977).

- Les exopolymères

La comparaison de la biosorption des LAS par certaines bactéries par rapport aux agrégats biologiques de boues activées montre que les agrégats biologiques possèdent une capacité de biosorption nettement supérieure aux bactéries (Tableau 2.9). Ces résultats renforcent l'importance de la structure agrégée et des exopolymères des boues activées dans la capacité de biosorption.

Tableau 2.9 : Valeurs des paramètres $1/n$ et K du modèle de Freundlich obtenu pour différents adsorbants avec des sulfonates d'alkylbenzènes (Urano et Saito, 1984).

	Boues activées	<i>E. coli</i>	<i>E. subtilis</i>
$K \text{ (L kg}^{-1}\text{)}^*$	0,89 à 5,2	0,28	0,34
$1/n$	1,0 à 1,37	1,19	1,2

* Ce et Q_e sont respectivement exprimés en mg L^{-1} et en mg g^{-1} .

En effet, les agrégats biologiques possèdent un caractère hydrophobe marqué (Ganaye *et al.*, 1997) et une fraction des EPS extraits des boues activées, essentiellement des protéines, possède des propriétés hydrophobes (Jorand *et al.*, 1998). Les EPS s'organiseraient pour former des domaines hydrophobes qui seraient à l'origine de la biosorption des composés hydrophobes. De fait, les EPS sont capables de piéger des composés hydrophobes comme le rouge de Nil et le méthyle diclofop (Wolfaardt *et al.*, 1998). L'extraction du méthyle diclofop des biofilms par l'hexane ou du diéthylether n'a pu être réalisée, ce qui souligne une liaison forte entre les composants des biofilms et les composés hydrophobes. L'adsorption du 4-chlorophénol par les EPS extraits d'un biofilm est largement supérieure à celle du résidu non extractible contenant les micro-organismes (Wang *et al.*, 2002). De la même façon, Späth *et al.* (1998) montrent que les EPS extraits des biofilms avec des éthers couronnes sont capables de lier les composés hydrophobes (benzène, toluène et xylène) en plus forte proportion que le résidu non extractible (Figure 2.12).

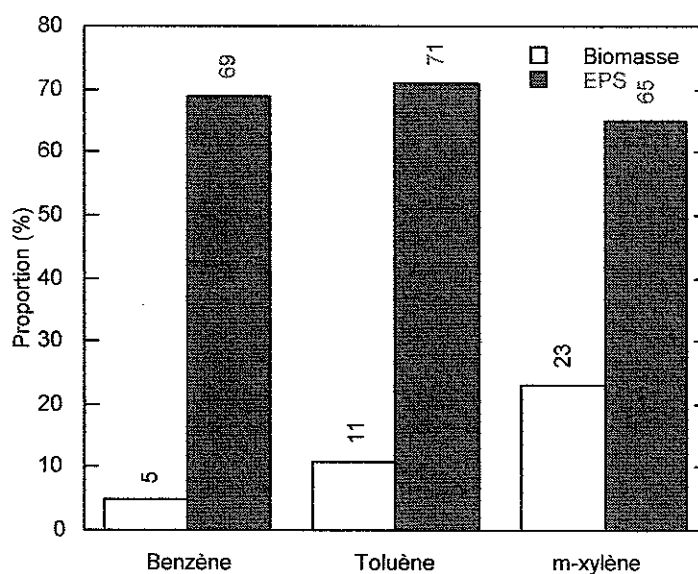


Figure 2.12 : Distribution des composés organiques hydrophobes (Benzène, Toluène et m-xylène) dans les biofilms après extraction des exopolymères (EPS) par des éthers couronnes (EPS ■ ; Biomasse □) (Späth *et al.*, 1998).

Il a également été montré que les EPS des agrégats biologiques intervenaient aussi dans la biosorption des composés chargés. Les agrégats biologiques de boues activées sont ainsi capables de piéger de nombreux cations métalliques comme le cadmium, le cuivre, le nickel et le zinc (Arican et Yetis, 2003; Artola *et al.*, 2000) et de nombreuses études ont montré la capacité des exopolymères à lier les métaux lourds à partir d'EPS extraits des boues activées (Brown et Lester, 1980).

Ainsi, les EPS possèdent des sites capables de piéger des molécules organiques hydrophobes et des molécules chargées comme les molécules amphiphiles.

- La fraction inorganique

La fraction inorganique pourrait participer à la biosorption de molécules amphiphiles. Ainsi, Matthijs et de Henau (1985) montrent que les LAS s'adsorbent sur les oxydes de fer ou d'aluminium. De plus, Gustafsson et Gschwend (1999) montrent que les résidus de calcination des sédiments sont capables d'adsorber des composés organiques hydrophobes. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la contribution de la fraction inorganique sur la biosorption des composés hydrophobes par des agrégats biologiques de boues activées.

2.4.2.1.2. Effet de l'inactivation des agrégats biologiques par un traitement thermique sur la biosorption

Afin d'étudier les différents paramètres environnementaux sur la biosorption, il est essentiel de travailler avec une biomasse dite fraîche afin de conserver l'intégrité des propriétés des cellules bactériennes, des EPS et des boues activées. Cependant, certains auteurs utilisent des échantillons inactivés par des traitements thermiques (autoclavage ou séchage à 105 °C) pour disposer d'un adsorbant en grande quantité ayant des propriétés similaires pour les différentes études. L'inactivation des agrégats biologiques permet de diminuer la biodégradation des adsorbats qui influence les tests de biosorption. Cependant, l'effet de ces traitements thermiques peut considérablement modifier la structure des agrégats et par conséquent leur capacité de biosorption.

Szymanski *et al.* (2003) montrent que des boues activées inactivées par la chaleur sont capables d'accumulées 3,5 fois plus de surfactant anionique que les boues n'ayant subi aucun traitement. De même, l'adsorption du lindane par la biomasse vivante (*R. arrhizus*) est inférieure à celle des bactéries inactivées par un séchage à 105 °C puis une homogénéisation au mortier, alors que le contraire est obtenu pour l'adsorption du pentachlorophénol (Tsezos et Bell, 1989). Toutefois, l'inactivation par la chaleur ne semble pas modifier la biosorption des sulfonates d'alkylbenzène (LAS) par les boues activées (Kerr *et al.*, 2000; Urano et Saito, 1984). Les constantes de Freundlich de la biosorption des LAS par des boues inactivées ou des boues fraîches sont du même ordre de grandeur (Urano et Saito, 1984). De même, Canton *et al.* (1977) ne notent aucune différence dans la capacité de biosorption de l' α -hexachlorocyclohexane par des algues vivantes par rapport à des algues inactivées par la chaleur.

2.4.2.1.3. Acclimatation des agrégats à des substrats

L'acclimatation des agrégats biologiques à des substrats qui seront ultérieurement utilisés comme adsorbat augmente leur capacité de biosorption.

Des boues activées non adaptées à un substrat lipidique sont capables de biosorber 114 mg de COD soluble g^{-1} de matières volatiles, alors que des boues activées acclimatées avec un substrat lipidique piègent 343 mg COD soluble g^{-1} de matière volatile (Hwu *et al.*, 1998). Cette différence dans la quantité biosorbée peut être due à l'adsorption de lipides sur l'agrégat qui rend ainsi les agrégats plus hydrophobes, ou peut être attribuée à un changement de la diversité bactérienne et de la composition des EPS qui après acclimatation sont peut-être plus hydrophobes.

2.4.2.2. Effet des caractéristiques de l'adsorbat sur la biosorption

Les caractéristiques de l'adsorbat influencent sa biosorption par les agrégats biologiques comme sa masse moléculaire, sa charge et son hydrophobicité.

Ainsi, le cellobiose de masse moléculaire 342,3 s'adsorbe mieux que le dextrane de masse moléculaire 40000 (Carlson et Silverstein, 1998). De plus, les molécules chargées négativement sont moins bien adsorbées que les molécules neutres probablement à cause des répulsions électrostatiques entre l'adsorbant et l'adsorbat à masse moléculaire équivalente. Par exemple, 27 % de la chondrosine (chargé négativement, 6,5 meq g^{-1} de DCO) sont biosorbés contre 88 % du cellobiose (neutre) et 20 % pour le dextrane (neutre) (Carlson et Silverstein, 1998). Par contre, aucune différence entre le dextrane (40 000) et l'acide hyaluronique (50 000) n'est observée, l'effet électrostatique répulsif ne l'emporte plus pour les molécules de masse moléculaire élevée.

L'hydrophobicité des composés organiques influence également leur adsorption par les boues activées. Ainsi, plus les composés sont hydrophobes et plus ils sont intensément adsorbés par les boues activées (Struijs *et al.*, 1991; Tsezos et Bell, 1989). Tsezos et Bell (1989) trouvent une bonne corrélation entre la biosorption par les boues activées de composés organiques hydrophobes (lindane, diazinon et 2-chlorobiphényle) et le coefficient de partage de ces composés entre l'eau et l'octanol (Kow).

2.4.2.3. Influence de la charge organique sur la biosorption

Les quantités de matière organique biosorbée varient en fonction de la charge organique (Eikelboom, 1982; Guellil *et al.*, 2001; Pujol et Canler, 1992). La quantité de matière organique biosorbée est déterminée expérimentalement au pseudo-équilibre en mesurant la concentration d'adsorbat restante dans la phase liquide après un temps défini et à une température donnée et s'exprime généralement en mg de COD par g^{-1} de matières sèches (Eikelboom, 1982). Les quantités biosorbées augmentent linéairement avec l'augmentation de la charge organique de 0 à environ 100 mg de DCO g^{-1} de MS, puis pour des valeurs supérieures l'augmentation de la quantité de matière organique biosorbée est moindre suggérant que la saturation de l'agrégat est obtenue (Eikelboom, 1982; Pujol et Canler, 1992). Comme l'indique la Figure 2.13, une saturation des sites d'adsorption disponibles de l'agrégat

n'est pas systématiquement obtenue (Guellil *et al.*, 2001). Dans un cas, la quantité biosorbée atteint un plateau à une charge organique supérieure à 100 mg de COD par gramme de matière sèche, alors que dans un autre cas la quantité biosorbée continue à augmenter en fonction de la charge organique.

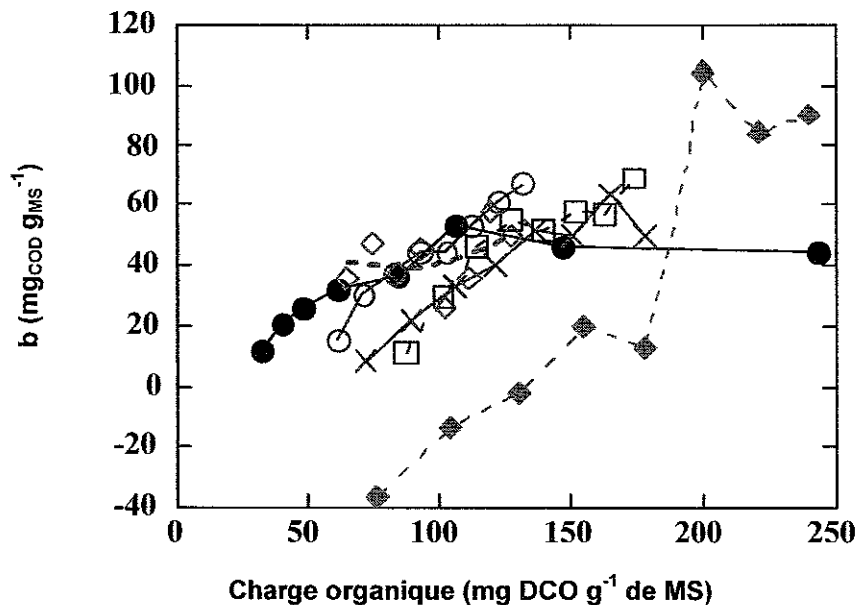


Figure 2.13 : Quantités de matière organique biosorbées (b) par des boues activées (◇, ○, ×, ■, ◆ et ●) en fonction de la concentration initiale de DCO des eaux usées (Guellil *et al.*, 2001).

2.4.2.4. Effets des caractéristiques du milieu sur la biosorption

Les caractéristiques du milieu comme la composition et la force ionique du milieu influencent la biosorption des composés organiques chargés, en particulier lorsque des ions inorganiques peuvent entrer en compétition pour les mêmes sites de liaisons que les composés organiques.

L'adsorption de colorants négativement chargés par les boues activées est affectée par la force ionique et le pH du milieu qui modifient les interactions possibles entre l'adsorbat et l'adsorbant (Aksu, 2001; Wang *et al.*, 1998). Aussi, à de faibles valeurs de pH, les groupements fonctionnels sont protonés limitant ainsi les répulsions ce qui favorise la biosorption. De même, la biosorption de substances humiques par les boues activées est améliorée lorsque les tests de biosorption sont réalisés à de faibles valeurs de pH ou à de fortes valeurs de force ionique (Esparza-Soto et Westerhoff, 2003).

Normalement, l'élévation de la température contribue à diminuer la biosorption des composés organiques (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Or, tous les auteurs montrent que la biosorption de la

matière organique par les agrégats biologiques de boues activées augmente avec l'élévation de la température. Pujol et Canler (1992) montrent que l'élévation de la température de 3 à 24 °C augmente de 10 mg de COD g⁻¹ de MS à 35 mg de COD g⁻¹ de MS. De même, Riffat et Dague (1995) obtiennent une quantité de matière organique biosorbée plus importante par les granules anaérobies à 35 °C qu'à 20 °C. Jorand (1995a) montre que la quantité de COD biosorbée (mg COD g⁻¹ de MS) par des boues préalablement stockées à 4 °C pendant 24 h n'est pas influencée par la température (4 °C et 19 °C) pendant les trente premières minutes de contact. A des temps de contact supérieurs, les boues placées à 19 °C biosorbent une quantité supérieure de COD pouvant être attribuée à l'activité bactérienne. Ainsi, la biodégradation de la matière organique biosorbée permet de libérer les sites de biosorption des agrégats biologiques qui sont ainsi de nouveau disponibles.

2.4.2.5. Paramètres des stations de traitement des eaux usées sur la biosorption

Les conditions, anoxie et aérobie, rencontrées dans les systèmes de traitement des eaux usées ne semblent pas influencer par la biosorption des substances humiques par les boues activées (Esparza-Soto et Westerhoff, 2003). La capacité de biosorption de la matière organique est plus importante lorsque l'âge des boues est inférieur à 3 jours comparativement à des âges de boues supérieurs à 14 jours (Jacobsen *et al.*, 1993). De même, l'hydrophobicité des agrégats biologiques est influencée par l'âge de boues (Bura *et al.*, 1998), ainsi la différence d'hydrophobicité des agrégats biologiques pourrait expliquer les capacités de biosorption différentes de la matière organique.

2.4.3. Désorption de la matière organique des boues activées

Classiquement, l'étude de la désorption de composés organiques par des agrégats implique le remplacement de la phase liquide par une phase liquide exempte d'adsorbat. Ceci permet d'établir un nouvel état de pseudo-équilibre entre la phase liquide et l'adsorbant. De cette façon, Guellil *et al.* (2001) montrent que de la matière organique est transférée des agrégats biologiques de boues activées vers la phase liquide (valeur de *b* inférieure à 0) (Figure 2.11).

La désorption a surtout été étudiée dans les sols et les sédiments pour des composés organiques hydrophobes (Cornelissen *et al.*, 1998; Dohse et Lion, 1994; Huang *et al.*, 1998; LeBoeuf et Weber, 1999; van Noort *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 1998). A titre d'exemple, les données expérimentales de la désorption de phénanthrène par des sédiments sont non linéaires et peuvent être ajustées au modèle de Freundlich pour décrire le système adsorbat-adsorbant (Figure 2.14). Tsezos et Wang (1991) montrent que la désorption du lindane par une boue inactivée atteint rarement un état de pseudo-équilibre même après une période de 180 min. La désorption de 1,2,3,4-tétrachlorobenzène, de pentachlorobenzène et de 2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle par des sédiments est rapide pendant les 50 premières heures, mais n'atteint jamais un état de pseudo-équilibre même après 300 h de désorption (Cornelissen *et al.*, 1997).

Par conséquent, un phénomène d'hystérésis plus ou moins marqué est parfois obtenu traduisant la réversibilité réduite d'un phénomène par rapport à un autre. La réversibilité complète de l'adsorption

des composés organiques n'est pas générale et dépend du composé testé (Kennedy *et al.*, 1992; Tsezos et Bell, 1989). La biosorption de pentachlorophénol par des granules anaérobies est réversible (Kennedy *et al.*, 1992) c'est-à-dire que le phénomène d'hystérésis est peu marqué traduisant une force de liaison faible entre le pentachlorophénol et les granules anaérobies. Par contre, une phase de transition apparaît dans le cas d'un échange faiblement ou non réversible (Huang *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1998), ce qui est observé pour la désorption du phénanthrène par des sédiments (Figure 2.14).

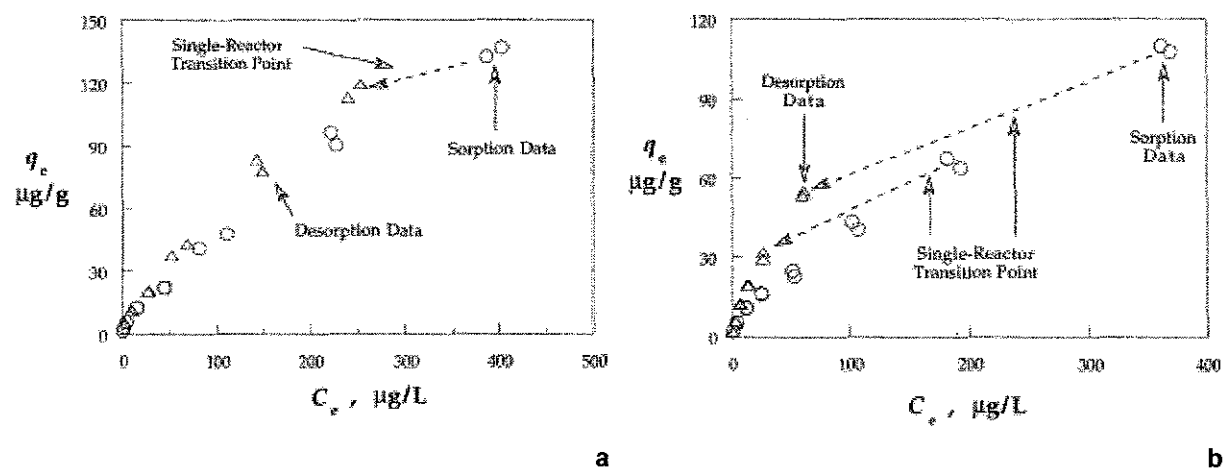


Figure 2.14 : Données de biosorption et de désorption du phénanthrène par un sédiment de rivière (a : hystérésis faiblement marquée ; b : hystérésis marquée) (Huang *et al.*, 1998). (C_e : Concentration à l'équilibre dans la phase liquide; Q_e : Quantité de phénanthrène adsorbée par unité de masse).

L'hystérésis peut probablement être liée (i) à une diffusion limitée ou lente des composés organiques dans la matrice d'EPS ou de la solubilisation des composés organiques dans des phases hydrophobes (Cornelissen *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Schwarzenbach *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1998), (ii) à une liaison irréversible par des interactions fortes de l'adsorbat et/ou (iii) à la dégradation des composés biosorbés par des enzymes associées aux agrégats biologiques qui ne sont ainsi plus échangés.

La désorption du chlorobenzène par des sols et des sédiments se produit en deux étapes : une étape de désorption rapide mais partielle, c'est-à-dire que la totalité des composés organiques biosorbés n'est pas désorbée, suivie d'une étape lente pouvant provenir (i) de la diffusion limitée des composés organiques dans les sédiments ou les sols (Cornelissen *et al.*, 1998), (ii) d'une liaison faiblement réversible entre les composés organiques et les constituants des sédiments ou des sols et/ou (iii) de leurs dégradations. Cette étape dite lente est rarement mesurée par les tests de désorption classique. C'est pourquoi, la désorption des composés organiques peut être étudiée en remplaçant successivement la phase liquide par une phase liquide exempte d'adsorbat plusieurs fois de suite.

Ainsi, Matthijs et de Henau (1985) trouvent que 36,3 % à 65,9 % des LAS biosorbés, dont 18,3 à 37,1 % lors de la première étape de lavage, sont libérés par les sédiments dans les phases de lavage (Tableau 2.11). De même, la matière organique soluble et colloïdale, exprimée en COD, est désorbée par des lavages successifs des agrégats biologiques avec un tampon de caractéristiques physico-chimiques proches de celle des eaux usées et ses dilutions (Guellil, 1999).

Tableau 2.11 : Pourcentage de LAS désorbé, préalablement biosorbé par des sédiments ($n = 4$ sédiments) de rivière en fonction du nombre de lavage dans un tampon de lavage ($KCl = 0,01\text{ M}$) (Matthijs et de Henau, 1985).

Nombre de lavages successifs	Concentration initiale de LAS utilisée pour l'étape de biosorption (mg L^{-1})	
	1 mg L^{-1}	15 mg L^{-1}
1	18,3 à 37,1	20,3 à 36,3
2	10,4 à 18,9	9,4 à 13,1
3	8,8 à 10,6	6,6 à 8,4
<i>Total</i>	<i>49,8 à 65,9</i>	<i>36,3 à 53,0</i>

La mise en suspension d'agrégats biologiques de boues activées dans un milieu de très faible composition ionique provoque un transfert de macromolécules et d'ions des agrégats vers la phase liquide conduisant à la dispersion des agrégats biologiques entraînée par la sortie des cations et de macromolécules (Bruus *et al.*, 1992; Keiding et Nielsen, 1997; Zita et Hermansson, 1994). Les étapes de lavage sont très instructives, mais elles entraînent une désagrégation des agrégats biologiques qui biaise l'étude de la désorption. Ainsi, l'étude de la désorption est préférentiellement réalisée en une seule étape de lavage.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Sites de prélèvement et échantillonnage des boues activées et des eaux usées urbaines

Les caractéristiques principales des stations d'épuration sont présentées dans le Tableau 3.1. Les échantillons de boues activées ont été prélevés manuellement avec une perche munie d'un Becher dans les bassins d'aération moins d'une heure avant l'analyse. Ces échantillons sont placés dans des bidons en plastique de 5 L, préalablement rincés avec des boues activées, fermés par un bouchon hermétique. Les bidons sont rapportés au laboratoire dans une voiture non climatisée et sont conservés à 4 °C en chambre froide pendant 2 h au maximum.

Tableau 3.1 : Caractéristiques des stations d'épuration de prélèvement.

Localisation	Maxéville (54, France)	Toul (54, France)	Liverdun (54, France)
Capacité (Equivalent-Habitant)	480000	25375	21000
Débit ($\text{m}^3 \text{j}^{-1}$)	118110	10558	820 (04/08/03)
Charge massique de DBO_5 admissible (kg j^{-1})	28857	1522	1260
Débit horaire de pointe nominal ($\text{m}^3 \text{h}^{-1}$)	8363	568	304
Temps de rétention hydraulique (h)	3,5 – 4,0 h	3,5 h	-
Concentration en oxygène (mg/L)	0,5 – 3,5	0,5 – 3,5	-
Age des boues (j)	3,5	13	-
Type de station	Boues activées à forte charge	Boues activées à aération prolongée	Boues activées à aération prolongée

DBO_5 : Demande biologique en oxygène à 5 j; -: inconnu.

Les prélèvements d'eaux usées brutes et épurées ont lieu à la sortie des décanteurs primaires et secondaires de ces mêmes stations d'épuration. Les eaux de rivière sont prélevées dans la Moselle à 100 m en amont de la zone de rejet de la station d'épuration de la station de Toul (54, France) et à 250 m en amont et 500 m en aval de la zone de rejet de la station d'épuration de la station de Liverdun (54, France).

3.2. Caractérisation physico-chimique des boues activées

3.2.1. Matières sèches totales (TS_{Boues}) et matières volatiles (MV_{Boues}) des boues activées

Les capsules en aluminium et les filtres utilisés pour réaliser ces mesures sont préalablement passées au four à 550 °C pendant 3,5 h et sont stockés dans une étuve à 105 °C.

50 mL de boue activée sont introduits dans une capsule en aluminium préalablement pesée. Les capsules sont placées à 105 °C pendant 12 h. Les matières sèches totales (TS_{Boues}) sont égales à la

différence de masse (g) entre la capsule vide et la capsule contenant l'extrait sec multipliée par 1000 et divisée par le volume d'échantillon utilisé (exprimé en mL). Les résultats sont exprimés en g L^{-1} .

Les capsules précédemment utilisées pour la détermination des TS_{Boues} sont ensuite placées à 550 °C pendant 3,5 h. La perte de masse représente les matières volatiles. Les matières volatiles sont égales à la différence de masse (g) entre la capsule placée à 105 °C et la capsule placée à 550 °C multipliée par 1000 et divisée par le volume d'échantillon utilisé (exprimé en mL). Les résultats sont exprimés en g L^{-1} . L'essai est réalisé en triplicata.

Par contrainte de certaines expérimentations, les TS_{Boues} et MV_{Boues} des boues activées sont déterminées de façon plus rapide. 25 mL de boues sont filtrés à l'aide d'une fiole Büchner sur un filtre en microfibre de verre de porosité 1,2 μm (Whatman GF/C, 1822047) préalablement pesé. Le filtre est placé à l'étuve à 105 °C pendant 45 min, pesé, puis placé au four à 550 °C pendant 20 min.

3.2.2. Test de décantabilité (dVSI et SVI : diluted Sludge Volume Index et Sludge Volume Index)

La capacité à décanter des agrégats biologiques est déterminé par le volume occupé par les agrégats biologiques après sédimentation dans une éprouvette en verre de 1 L à 21 ± 3 °C (Clesceri *et al.*, 1998). Si le volume de boues après 30 min de décantation est supérieur à 300 mL, les boues sont diluées avec de l'eau usée épurée préalablement filtrée sur une membrane GF-C de porosité 1,2 μm (Whatman GF/C, 1822047) (Clesceri *et al.*, 1998) et le test de décantabilité est réalisé de nouveau. Les essais sont réalisés en triplicat. Le SVI et le dSVI s'expriment en mL g^{-1} de TS_{Boues} . Plus la valeur de SVI ou le dSVI sont faibles, plus les agrégats biologiques ont une bonne capacité à décanter.

3.3. Caractérisation des eaux usées brutes, épurées et de l'eau de rivière

Les eaux usées et de rivière sont caractérisées par les mesures des matières sèches totales, des matières en suspension, du pH, de la conductivité, de la turbidité et du carbone organique dissous. Les matières sèches totales (TS_{Eau}) et les matières volatiles (MV_{Eau}) sont déterminées de façon similaire à celle des boues activées, mais en remplaçant les 50 mL d'échantillon de boues activées par 100 mL d'échantillon d'eau (*cf.* § 3.2.1).

3.3.1. Mesure de la turbidité

La turbidité est mesurée de la façon suivante : 30 mL du surnageant de la boue précédemment laissée décanter pendant 30 min sont prélevés. 50 mL d'échantillon d'eau est homogénéisé par trois retournements manuels. L'appareil utilisé est un turbidimètre en mode ratio (Hach modèle 2100N). Sa gamme de mesure est comprise entre 0 et 4000 NTU (unités néphélométriques de turbidité). L'étalon primaire utilisé pour la gamme de calibrage est la formazine (Hach, 246142). Des étalons secondaires gélifiés (Hach, 2589000) sont utilisés pour contrôler le calibrage avant chaque série de mesures. Les résultats sont exprimés en NTU.

3.3.2. Mesures de pH et de conductivité

Les mesures de pH et de conductivité sont réalisées à 20 °C sur le surnageant de boues, précédemment laissée décantée pendant 30 min, grâce (i) à un pHmètre (HANNA instruments HI 9321) équipé d'une sonde pH préalablement étalonnée à 25 °C avec des solutions étalon à des valeurs de pH de 4,0 et de 7,0 et (ii) à un conductivimètre (Bioblock WTW LF320) équipé d'une sonde (Bioblock, WTW A325) préalablement étalonné à 20 °C avec une solution étalon de chlorure de potassium à 0,1 M, respectivement pour les mesures de pH et de conductivité.

3.3.3. Analyse du carbone organique dissous (COD)

Les tubes et les flacons utilisés pour réaliser la gamme d'étalonnage et les dosages sont préalablement passés au four à 550 °C durant 3 heures. La vaisselle ne résistant pas à la chaleur (fioles jaugées, éprouvettes et pipettes) est nettoyée avec un mélange sulfochromique (Acros, 29551-0010) par trempage, puis rincée abondamment avec de l'eau désionisée.

La première étape consiste à filtrer l'échantillon sur une membrane PVDF de porosité 0,45 µm (Roth, P812.1), puis à acidifier à l'échantillon filtré avec de l'acide chlorhydrique (2 M) de façon à obtenir une valeur de pH proche de 2. Ainsi, le carbone inorganique contenu dans l'échantillon est transformé en CO₂ puis est éliminé sous un flux de dioxygène pendant un temps de purge d'environ 10 min. Les échantillons acidifiés sont conservés au maximum 48 h à 4 °C et à l'abri de la lumière. Dans un second temps, l'échantillon ainsi dégazé est dilué dans de l'eau désionisée de façon à obtenir une teneur en carbone inférieure à 4 mg L⁻¹ et est injecté dans l'analyseur de carbone total (Shimadzu, TOC 5000A). L'analyse du COD est réalisée en triplicata.

La gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère d'hydrogénéphthalate de potassium (Acros, 177121000) à 200 mg de carbone L⁻¹ de Carbone dans de l'eau désionisée à partir d'une solution concentrée à 2 g de carbone L⁻¹. Une gamme étalon est préparée à partir de la solution à 200 mg de carbone L⁻¹ (0, 1, 2 et 4 mg L⁻¹ C) dans des fioles jaugées de 100 ml avec de l'eau désionisée. Chacune des solutions diluées est ensuite acidifiée avec de l'HCl (2 M) et dégazée sous un flux d'oxygène. Chaque point de la gamme est réalisé en triplicata.

3.3.4. Analyse du titre alcalimétrique complet (TAC)

Les mesures du TAC des eaux usées et de rivière ont été réalisées selon la méthode décrite dans *L'analyse de l'eau* (Rodier, 1996).

2 gouttes d'une solution alcoolique de phénolphthaléine sont ajoutées à 100 mL d'échantillon d'eau. La coloration rose obtenue est décolorée par un volume connu d'acide sulfurique 0,02 M titré à l'aide d'hydroxyde de sodium à 0,1 M (Merck, 9141.1000). Ce volume d'acide ajouté permet la détermination de l'acidité de l'eau qui dans notre cas a toujours été nulle. Ensuite, 2 gouttes de méthylorange sont ajoutés au mélange précédent qui est titré de nouveau avec l'acide sulfurique

0,02 M jusqu'au virage de la coloration jaune à jaune-orangé du mélange. Le volume d'acide ajouté (mL) multiplié par 10 permet d'exprimer le TAC en mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$.

3.4. Caractérisation des exopolymères (EPS) des boues activées

3.4.1. Extraction des exopolymères (EPS) par les ultrasons et une résine échangeuse de cations

Pour extraire les polymères, une combinaison de deux techniques d'extraction a été utilisée après un lavage de la boue : ultrasons (Jorand *et al.*, 1994) et traitement par une résine échangeuse de cations (Frølund *et al.*, 1995).

3.4.1.1. Lavage des boues activées

1 L de boue est homogénéisé manuellement dans des bidons hermétiques, puis placé dans une éprouvette en verre de 1 L. Les boues activées sont laissées décanter pendant 30 min à 4 °C et 500 mL de surnageant sont retirés par aspiration et remplacés avec 500 mL d'un tampon phosphate de lavage à 4°C (Frølund *et al.*, 1995) de composition suivante : Na_3PO_4 (Sigma, S-7778) 2 mM, NaH_2PO_4 (Prolabo, 28011.291) 4 mM, NaCl (Aldrich, 22.351-4) 9 mM et KCl (Labosi A4870351) 1 mM. L'homogénéisation s'effectue par retournement de l'éprouvette après sa fermeture avec un morceau de papier parafilm. Le lavage est répété trois fois de suite. Les boues lavées sont conservées à 4 °C jusqu'à l'extraction des exopolymères.

3.4.1.2. Extraction des EPS

Par fraction de 50 mL, les boues activées lavées sont refroidies dans la glace pendant 10 min puis sont soumises aux ultrasons (homogénéisateur à ultrasons Labsonic 2000U, B. Braun équipé d'une sonde de 19 mm de diamètre, à 37 W) pendant 20 s dans des flacons en verre à fond rond. L'étalonnage du générateur à ultrasons est auparavant réalisé en effectuant des mesures de transfert de chaleur à l'aide d'un calorimètre selon la méthode décrite par North (1976), dans le but de connaître la puissance de la sonde à ultrasons utilisée pour disperser les agrégats biologiques.

Les boues dispersées sont mises en contact avec une résine échangeuse de cations de type Dowex 50 (Dowex G50x8, forme Na^+ , Merck 44445) à raison de 70 g de résine par gramme de MV_{Boues} et agitées par une hélice plate pendant 45 min à 500 rpm à 4 °C dans un Becher à baffles. Avant son utilisation, la résine est lavée avec un tampon phosphate (*cf.* § 3.4.1.1) : 1 kg de résine est placée sous agitation (180 rpm) avec 2 L de tampon phosphate pendant 1 h puis après décantation de 5 min, le surnageant est éliminé. Ce lavage est répété trois fois avec de l'eau déminéralisée.

Les boues mélangées à la résine sont laissées décanter pendant 5 min et le surnageant est centrifugé 15 min à 4 °C à 20000 x g. Le surnageant de centrifugation contenant les EPS est prélevé et conservé à 1 °C dans la glace fondante.

3.4.2. Caractérisation des EPS extraits des boues activées

Dans tous les cas, la lecture des absorbances s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre HITACHI (U-2000), les dosages sont réalisés en triplicata et sont effectués dans des tubes à essais en verre Pyrex passés préalablement à 550 °C pendant 3,5 h. Les blancs réactifs sont réalisés en double pour régler le zéro du spectrophotomètre et les gammes d'étalonnage sont réalisées à chaque renouvellement des solutions de dosage.

3.4.2.1. Matières sèches totales (TS_{EPS}) et matières volatiles (MV_{EPS}) des EPS

25 mL d'extraits d'EPS sont introduit dans une capsule en aluminium préalablement pesée. Les capsules sont placées à 105 °C pendant 12 h. Les matières sèches totales (TS_{EPS}) sont égales à la différence de masse (g) entre la capsule vide et la capsule contenant l'extrait sec multipliée par 1000 et divisée par le volume d'échantillon utilisé (mL). Les résultats sont exprimés en $g\ L^{-1}$.

Les capsules précédemment utilisées pour la détermination des TS_{EPS} sont ensuite placées à 550 °C pendant 3,5 h. La perte de masse représente les matières volatiles. Les matières volatiles (MV_{EPS}) sont égales à la différence de masse (g) entre la capsule placée à 105 °C et la capsule placée à 550 °C multipliée par 1000 et divisée par le volume d'échantillon utilisé (mL). Les résultats sont exprimés en $g\ L^{-1}$. L'essai est réalisé en triplicata.

3.4.2.2. Dosage des protéines et des substances humiques par la méthode de Lowry

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951) fait intervenir le réactif de Folin-Ciocalteu. Les complexes protéines/cuivre formés à l'aide d'une solution cuivrique alcaline (réaction de Biuret) réduisent le réactif contenant un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique. Comme cela a été proposé par Frølund *et al.* (1995), les dosages sont également réalisés en absence de cuivre afin de s'affranchir des interférences engendrées par les substances humiques et les acides aminés chromogènes. Cette méthode permet de mesurer le développement de couleur en présence et en absence de $CuSO_4$.

En absence de $CuSO_4$, le développement de couleur est dû aux composés humiques et aux acides aminés chromogènes. Il vient les égalités suivantes :

Abs totale = Abs protéine + Abs humique

Abs blanc = 0,2 * Abs protéine + Abs humique

Abs protéine = 1,25 * (Abs totale - Abs blanc)

Abs humique = Abs blanc - 0,2 * Abs protéine

Abs totale : absorbance totale en présence de $CuSO_4$

Abs blanc : absorbance totale en absence de $CuSO_4$.

Les réactifs utilisés sont : (A) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1 % m/v) (Merck 2790), (B) tartrate de potassium et de sodium (2 % m/v) (Merck 1,08087), (C) NaOH (0,2 M) (Analypur Fisher A4895003), (D) carbonate de

potassium (4 % m/v) (Merck 104928), (E) Réactif de Folin-Ciocalteu (2 M) (Sigma F9252). Les solutions suivantes sont préparées extemporanément avant chaque dosage : (F) = 49 mL de réactif (D) + 49 mL de réactif (C) + 1 mL de réactif (A) + 1 mL de réactif (B) et (G) = réactif de Folin-Ciocalteu dilué au demi.

2,5 mL de réactif (F) sont ajoutés à 0,5 mL d'échantillon. L'ensemble est agité au Vortex puis repose 10 min. Ensuite 0,25 mL de réactif (G) sont ajoutés. L'ensemble est agité au vortex et repose pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est lue à 750 nm contre un blanc réactif.

La concentration en protéines totales de l'échantillon est établie à partir d'une gamme d'étalonnage de 5 à 100 mg L⁻¹ réalisée avec de la sérum albumine bovine (Sigma, A7906). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de sérum albumine bovine par g de MV_{EPS}. La limite de détection des protéines par cette méthode est estimée à 3,5 mg L⁻¹.

La quantité de substances humiques est obtenue en omettant le CuSO₄ dans le mélange (F). Elle est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage réalisée de 5 à 100 mg L⁻¹ avec des acides humiques (Aldrich, H-1675-2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent substances humiques par g de MV_{EPS}. La limite de détection a été estimée à 3,6 mg L⁻¹.

3.4.2.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) fait intervenir un colorant qui se fixe sur certains acides aminés des protéines, en particulier l'arginine.

Le réactif de Bradford est préparé à partir de 50 mg de bleu de Coomassie dissous dans un mélange de 25 mL d'éthanol et de 50 mL d'acide phosphorique puis le volume est complété à 500 mL avec de l'eau ultrapure. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de 0,45 µm de porosité (Whatman GF/C, 1822047) et stockée à l'obscurité et à 4 °C.

1 mL de ce réactif est ajouté à 0,1 mL d'échantillon. Le mélange est agité. Au bout de 5 min exactement, l'absorbance est lue à 595 nm contre un blanc réactif.

La concentration en protéines est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée avec de la sérum albumine bovine (Sigma, A7906). Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine par g de MV_{EPS}. La limite de détection a été estimée à 0,2 mg L⁻¹.

3.4.2.4. Dosage des polysaccharides par la méthode de Dubois

La méthode de Dubois *et al.* (1956) permet le dosage des oses neutres. Cette méthode est basée sur l'hydrolyse en milieu acide et à chaud des polysaccharides en monosaccharides, qui sont déshydratés en dérivés furfural par le phénol.

1 mL d'échantillon est mélangé avec 1 mL de phénol (5 %, m/v) (Merck, 206) puis 5 mL d'acide sulfurique concentré (Prolabo, 1830). Immédiatement après agitation au Vortex, les tubes hermétiquement fermés sont placés dans un bain-marie à 100 °C pendant 5 min exactement. Après

refroidissement à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est lue à 492 nm contre un blanc réactif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent glucose par g MV_{EPS}.

La concentration en polysaccharides correspondante est obtenue par référence à une gamme d'étalonnage (1 à 100 mg L⁻¹) réalisée à partir d'une solution de glucose (Merck, 8337) à 1 g L⁻¹. La limite de détection a été estimée à 1,2 mg L⁻¹.

3.4.2.5. Dosage des acides nucléiques par la méthode de Dériaz

Les acides nucléiques sont dosés par la méthode de Deriaz *et al.* (1949), qui fait intervenir la réaction de Dische (réaction à la diphenylamine) après hydrolyse des acides nucléiques à chaud en milieu acide. Les acides nucléiques sont hydrolysés à chaud et en milieu acide.

Une solution de diphenylamine (Merck, 3086) à 1 % est préparée dans un mélange d'acide acétique (SDS, 0070515) / acide sulfurique (Prolabo, 1830) dans les proportions suivantes 97,25:2,75 (v/v). 2 mL de cette solution sont ajoutés à 1 mL d'échantillon. Immédiatement après agitation au Vortex, les tubes hermétiquement fermés sont placés à 90 °C pendant 10 min. L'absorbance est lue à 595 nm après une heure à température ambiante contre un blanc réactif. La concentration en acides nucléiques est évaluée grâce à une gamme d'étalonnage (5 à 100 mg L⁻¹) réalisée à partir d'une solution d'ADN (Sigma, D1501). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'ADN par g MV_{EPS}.

3.5. Mesure de l'hydrophobicité et du potentiel zéta des agrégats biologiques et des exopolymères (EPS)

3.5.1. Méthode de mesure de l'hydrophobicité des boues activées par le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH)

Le principe de la mesure de l'hydrophobicité des agrégats biologiques par le test TAMH repose sur l'adhésion des agrégats biologiques dispersés à des gouttelettes d'octane (Jorand *et al.* 1994; Guellil *et al.*, 1998).

Par fraction de 50 mL, les boues sont dispersées par les ultrasons (37 W, sonde de 19 mm, 4 °C) pendant 30 s dans la glace fondante et dans des tubes en verre à fond rond (Jorand *et al.*, 1994). 20 mL de boues dispersées sont centrifugés à 4 °C pendant 5 min à 2900 x g. Le surnageant est éliminé et remplacé par 20 mL de tampon phosphate PBS de composition : 0,68 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,87 g L⁻¹ de K₂HPO₄ et 8,77 g L⁻¹ de NaCl et ajusté à une valeur de pH de 4,5 ± 0,2 avec de l'acide chlorhydrique (0,1 M) (van der Mei *et al.*, 1995). Cette opération est réalisée trois fois de suite. Les boues sont laissées décanter 15 min à 4 °C pour éliminer les grosses particules. Les boues sont ajustées à une turbidité à 600 nm entre 0,3 et 0,33 avec le tampon PBS. Le tampon PBS est conservé et utilisé à la température de 4 °C.

2,5 mL de boues diluées (Turb_{i 600 nm} ≈ 0,3) sont mélangés à 1 mL d'octane pendant 120 s exactement avec un agitateur vibrant à la puissance maximale (Heidolph, DSG 302). Après 5 min de séparation des deux phases, la phase aqueuse est prélevée à la pipette Pasteur et la turbidité à 600 nm est

déterminée ($Turb_{f\ 600\ nm}$) contre un blanc contenant du tampon PBS. Le terme A% est déterminé selon l'équation 3.1.

$$A\ (\%) = \left(1 - \frac{Turb_f}{Turb_i}\right) \times 100 \quad (\text{Equation 3.1})$$

Chaque émulsion est ensuite lavée. Après le test d'adhésion à l'octane, la phase aqueuse est éliminée. L'émulsion est ensuite mélangée vigoureusement avec 2,5 mL de tampon PBS pendant 120 s à la puissance maximale. Après 5 min de décantation, la phase aqueuse est prélevée à la pipette Pasteur et sa turbidité à 600 nm est déterminée ($Q_{wp}=n$). Cette étape est répétée jusqu'à 10 fois. La quantité de particules restantes dans l'émulsion est déterminée par l'équation 3.2.

$$Q_{em} = Turb_i - \sum Q_{wp} \quad (\text{Equation 3.2})$$

Le coefficient de partage (K_e) correspond à la pente de la droite $Q_{em} (Turb_{600\ nm}) = fct (Q_{wp} (Turb_{600\ nm}))$ (Guellil *et al.*, 1998).

3.5.2. Mesure de l'hydrophobicité des EPS extraits des boues activées

Le principe de la mesure de l'hydrophobicité des EPS extraits des boues activées repose sur deux étapes successives : (i) Précipitation des EPS par le sulfate d'ammonium (SA) suivie (ii) de la séparation des EPS dits solubles par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH).

3.5.2.1. Précipitation des EPS par le sulfate d'ammonium (SA)

Les exopolymères extraits des boues activées (*cf.* § 3.4.1) sont précipités par le sulfate d'ammonium qui a pour effet de faire s'agréger les particules ayant des domaines hydrophobes à leurs surfaces par ses propriétés anti-chaotropiques. L'ajout du sulfate d'ammonium provoque un changement de la structure de l'eau à proximité des particules et ainsi favorise les interactions hydrophobes entre les particules ce qui permet leur agrégation.

100 mL d'EPS extraits sont mélangés avec le sulfate d'ammonium à la concentration finale de 0,5 M à 4 °C et ajustés à une valeur de pH de 7,0 avec de l'acide chlorhydrique (1 M). Après une heure de mélange à 300 rpm et à 4 °C sur une plaque d'agitation, le mélange est centrifugé à 13200 x g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est prélevé et le culot est dissous dans 50 mL de soude (0,1 M). Ces deux fractions sont caractérisées par la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les EPS du surnageant sont dits EPS solubles selon la définition de Jorand *et al.* (2000) et sont conservés à -18 °C pendant 12 h jusqu'à leur dépôt sur une colonne contenant un adsorbant hydrophobe dans des conditions de pH, de force ionique et de température définies.

3.5.2.2. Fractionnement des EPS solubles par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)

La seconde étape repose sur la séparation des EPS non précipités par le sulfate d'ammonium par chromatographie d'interaction hydrophobe. Les EPS sont séparés en fonction de leur affinité pour un ligand hydrophobe.

2 mL de résine hydrophobe (Pharmacia CL 4B) sont déposés dans une colonne en verre (Pharmacia C10/10) et sont équilibrés avec 20 mL de tampon phosphate (0,01 M, pH 7,0) avec un débit de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ à 20°C . 10 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0), puis 20 mL d'EPS solubles sont déposés sur la colonne. Les EPS sont élués ensuite selon la programmation suivante : les EPS non retenus par la résine sont élués avec 20 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0) et 0,5 M de sulfate d'ammonium, les EPS faiblement retenus par la résine sont élués avec 20 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0) et les EPS fortement retenus par la résine sont élués avec 30 mL de soude (0,1 M) (Figure 3.1).

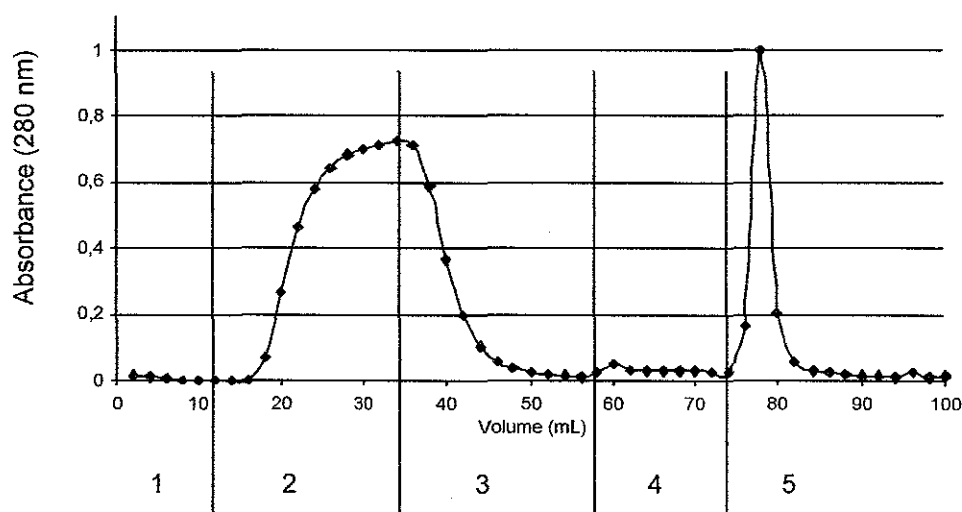


Figure 3.1 : Profil d'élution des EPS solubles par chromatographie d'interaction hydrophobe. 1 : 10 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0) ; 2 : 20 mL d'EPS solubles ; 3 : 20 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0) avec 0,5 M de sulfate d'ammonium ; 4 : 20 mL de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,0) ; 5 : 30 mL de NaOH (0,1 M).

3.5.3. Détermination du potentiel zéta des boues dispersées par la mesure de la mobilité électrophorétique

La détermination du potentiel zéta de boues dispersés est effectuée au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, UMR 7569 CNRS-INPL, Nancy, France) selon le protocole de Prelot B. (2001). Le principe de la mesure du potentiel zéta par micro-électrophorèse consiste à mesurer la vitesse de migration électrophorétique des particules en suspension dans un capillaire lors de leur déplacement

dans un champ électrique à partir de l'analyse des trajectoires des particules, dans une cellule en quartz Suprasil de dimensions 2 x 5 x 7.5 mm, à l'aide d'un microscope optique muni d'un laser (orienté à 90 °, HeNe, 2 mV) et surmonté d'une caméra vidéo CCD (Mintron) et d'un logiciel d'analyse d'images (Zétaphorémètre ZIII, SEPHY-CAD Instrumentations) (Prelot B., 2001).

Après la dispersion des boues activées par des ultrasons (30 s, 4 °C, sonde de 19 mm) suivi d'un lavage des boues dispersées avec le tampon PBS (*cf.* § 3.5.1), les boues lavées sont diluées à une absorbance de 0,3 avec le tampon PBS et sont ajustées à différentes valeurs de pH de 3 à 10 avec HCl (0,1 M) ou KOH (0,1 M). Les échantillons sont conservés au maximum 15 min à 4 °C avant la détermination du potentiel zéta. Trois étalonnages préalables sont nécessaires : le calibrage de la température, de la conductivité et le positionnement du plan stationnaire supérieur. La suspension à étudier est injectée dans la cellule par l'une des extrémités via une seringue et des tubes en Tygon (R3603). Soumises à un champ électrique de 80 V, la vitesse de déplacement des particules, de taille supérieure à 1 μm , est déterminée par analyse d'images des clichés instantanés pris lors du mouvement des particules. L'appareil réalise ensuite une série de clichés toutes les 0,5 s (10 mesures dans un sens, inversion du champ électrique, puis 10 mesures dans l'autre sens). La reconstitution des trajectoires par le logiciel d'analyse d'images permet ensuite le calcul de la mobilité électrophorétique des particules à partir de la norme du vecteur vitesse. Le logiciel calcule ensuite la mobilité moyenne des particules ($\mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}^{-1}$) et cette mesure est convertie par le logiciel en potentiel zéta (mV) (Prelot B., 2001).

3.6. Détermination des sulfonates d'alkylbenzènes (LAS) dans les eaux usées, les eaux de rivière et les boues activées

3.6.1 Séparation par extraction liquide/solide et quantification des LAS par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'extraction des LAS de l'échantillon d'eau est réalisée en phase solide à partir de la méthode de Sarrazin *et al.* (1997a, 1999). L'échantillon est acidifié puis les LAS sont extraits sur des cartouches hydrophobes, l'extrait est séché puis injecté dans le système de CLHP.

3.6.1.1. Extraction liquide/solide des LAS sur des cartouches hydrophobes

Le pH de 30 mL d'échantillon d'eau est ajusté à une valeur de 1,5 avec 90 μL d'acide chlorhydrique concentré (Riedel de Haën, 30721, 37 %, 36,46 g mol^{-1} , 1,19) sous une agitation douce avec un barreau magnétique dans des flacons en verre de 100 mL préalablement passés à 550 °C pendant 3,5 heures afin d'éliminer les traces de matières organiques. Le pH est vérifié au moyen de bandelettes réactives (Macherey-Nagel, 14910).

Les cartouches d'extraction en phase solide Bond Elut- C_{18} d'une capacité de 6 mL et contenant 500 mg de silice greffée avec des groupements $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (Varian, 12102052) sont disposées sur une unité de filtration JT Baker équipé d'un manomètre. 10 mL d'acétone sont passés à travers la

cartouche, suivis de 10 mL d'eau ultrapure sans jamais laisser sécher la cartouche. Après homogénéisation de l'échantillon, 10 mL d'échantillon sont déposés et passés à travers la cartouche Bond Elut-C₁₈ préalablement conditionnée à un débit 1,7 mL min⁻¹ à l'aide de l'unité de filtration munie d'une pompe à vide (200 mbar). 1 mL d'eau ultrapure est ensuite passé sur la cartouche afin d'éliminer les molécules sans affinité pour la phase solide. Après 1 minute de séchage sous un vide d'environ 400 mbar, les LAS adsorbés sont élués, dans un tube propre préalablement pesé et passé à 550 °C pendant 3,5 h, par 6 mL d'acétone. L'extrait est ensuite mis à évaporer sous un flux d'azote à 35 °C pendant 15 min. Après évaporation de l'acétone sous un courant d'azote dans un bain à sable à 30 °C, le volume résiduel d'évaporation est mesuré par pesée en effectuant la différence de masse entre le tube contenant l'extrait et le tube propre. Le résidu d'évaporation est repris dans 1,0 mL de phase mobile et homogénéisé au vortex avant l'injection dans le système de CLHP. L'acétone (Carlo Erba, 412502), l'acétonitrile (Carlo Erba, 412412) sont de qualité CLHP.

3.6.1.2. Quantification des C₁₁-LAS par CLHP

Le système analytique comporte une pompe (Jasco, LG-1580-04 et PU-980), un injecteur automatique (Biorad, AS-48) équipé d'une boucle d'injection calibrée de 20 µL (Rheodyne 7125), une colonne Nucleosil 100 (C18, HD, 5 µm, 250 x 4,6 mm) thermostatée à 20 ± 5 °C, un détecteur spectrophotométrique UV/visible (Merck, L-4000) et un logiciel d'acquisition et de traitement des données (Datalys, Azur v 3.0.3.0).

50 µL d'échantillon concentré (10 x) sont injectés dans une boucle calibrée de 20 µL dans le système de CLHP à l'aide d'une seringue de 100 µL. La phase mobile est réglée à un débit de 0,8 mL min⁻¹ (pression environ 150 bars). La colonne est maintenue à 35 ± 1 °C à l'aide d'un four. La séparation des LAS est réalisée en condition d'éluion isocratique d'acétonitrile et de tampon phosphate (0,008 M) à pH 2,2 dans les proportions 60:40 (v/v). La détection est faite avec un détecteur spectrophotométrique UV/visible à 225 nm.

La phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate dans les proportions suivantes 60:40 (v/v). Le tampon phosphate est réalisé en dissolvant du KH₂PO₄ (0,008 M) dans de l'eau ultrapure et est ajusté à pH 2,2 avec H₃PO₄. Après filtration du mélange sur une membrane de porosité 0,45 µm (Millipore, HLVP), la phase mobile est conservée 7 jours au maximum à 4 °C.

La gamme d'étalonnage est réalisée en effectuant les dilutions aux concentrations 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 et 1,0 mg L⁻¹ dans de l'eau épurée filtrée sur une membrane GF-C (Whatman) à 4 °C à partir d'une solution mère de LAS à 1000 mg L⁻¹ réalisée dans de l'eau ultrapure. Un blanc est réalisé avec de l'eau usée non surchargée avec des LAS. Les dilutions de LAS sont ensuite ajustées à une valeur de pH de 1,5, extraites avec des cartouches Bond Elut-C₁₈ (cf. § 3.6.1.1) et injectés dans le système de CLHP (cf. § 3.6.1.2).

3.6.2. Analyse des composés organiques des EPS et des boues activées

Cette partie a été réalisée en collaboration avec L. Mansuy-Huault et P. Faure du laboratoire de Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques (UMR 7566 CNRS-UHP Nancy I, France).

Les EPS ont été extraits par les ultrasons et une résine échangeuse de cations (cf. § 3.4.1.2). Les échantillons sont ensuite congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et lyophilisés. Les échantillons lyophilisés sont conservés sous une atmosphère d'azote pour éviter l'altération des molécules et à l'abri de la lumière dans des tubes propres en verre passés préalablement à $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 3,5 h. Toute la verrerie utilisée est préalablement lavée avec du chloroforme. Les pesées sont effectuées à l'aide d'une balance (Mettler AT 201) avec une précision d'affichage de 0,01 mg. Les solvants organiques sont de qualité analytique.

3.6.2.1. Extraction liquide/solide haute pression des composés organiques des EPS et des boues activées

L'extraction par solvant accéléré (Dionex ASE 200) permet d'isoler l'extrait organique du reste de l'échantillon (matrice minérale et résidu organique insoluble). Cette étape permet d'éliminer les composés organiques faiblement associés aux agrégats biologiques de boues activées. Elle est basée sur une extraction liquide-solide à pression et température élevées en utilisant des solvants ou des combinaisons de solvants. La caractérisation de l'extrait organique d'une part et du résidu solide d'autre part peut être effectuée. Le résidu solide correspond à la matière organique non-extractible et aux phases minérales. L'appareil comporte une cellule d'extraction en acier reliée à un système de chauffage et de pompes contrôlées électroniquement. Le maintien des conditions de température et de pression sélectionnées est ainsi assuré.

Avant l'extraction, un filtre en silice est inséré à la base de la cellule pour empêcher le passage des particules d'échantillon dans le système et des billes de verre sont ensuite introduites dans la cellule, permettant une meilleure dispersion de l'échantillon et un rendement d'extraction optimum. Après une phase de lavage sans échantillon de la cartouche avec une combinaison de solvant organique dichlorométhane et méthanol dans les proportions suivantes 65:35 (v/v), l'échantillon est placé dans la cellule. Les composés extraits de l'échantillon sont ensuite extraits à nouveau selon les conditions présentées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Paramètres utilisés pour les extractions liquide/solide par l'automate ASE 200. "flush" désigne le volume de solvant utilisé pour rincer la cellule (% du volume de la cellule) et "heat" désigne la durée de chauffage de la cellule ; la purge de la cellule est faite avec de l'azote.

	Rinçage	Extraction
Température (°C)	120	80
Pression (bars)	100	100
Flush (%)	75	75
Purge (s)	200	200
Heat (min)	6	5
Phase statique (min)	2	7

3.6.2.2. Analyse des échantillons par le couplage Pyrolyse flash - Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse (PyCPG-SM)

Afin d'obtenir des informations sur la structure des macromolécules présentes accumulées dans les agrégats biologiques de boues activées, nous avons eu recours à la pyrolyse flash car la structure complexe des agrégats biologiques ne permet pas une analyse chromatographique directe. Tout d'abord, les grosses molécules sont brisées en fragments plus petits. La chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse peut alors être utilisée pour séparer puis identifier les fragments générés. La nature de ces fragments permet de connaître plus en détail la structure des macromolécules des agrégats biologiques (proportion de chaînes aliphatiques, de noyaux aromatiques, de composés oxygénés, soufrés et azotés) ainsi que détecter des composés piégés ou inclus dans les structures macromoléculaires.

Un prélèvement d'échantillon sous forme de poudre (1 à 2 mg) est placé dans un tube en quartz lequel est bouché à chaque extrémité par de la laine de quartz. Ce tube est inséré au cœur du filament de la canne du pyrolyseur et placé dans l'interface chauffée à 200 °C. Le pyrolyseur (*CDS Pyroprobe 2000*) qui est constitué d'une interface et d'une canne chauffante. Cette canne possède un filament de tungstène dont la température peut atteindre 700 °C très rapidement. Le contrôle de la température s'effectue par le biais d'un boîtier électronique qui régule l'intensité du courant qui traverse le filament préalablement calibré par *CDS analytical*. Le programme de température de la pyrolyse est : 25 °C pendant 1 seconde, montée en température de 25 °C à 620 °C à 200 °C mS⁻¹, palier de 15 secondes à 620 °C. Les effluents générés par la pyrolyse sont ensuite transférés par le gaz vecteur (hélium) dans l'injecteur du chromatographe via l'interface. La pyrolyse est déclenchée en même temps que le programme de température du chromatographe.

3.6.2.3. Couplage Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (CPG-SM)

L'analyse est assurée par un chromatographe HP 5890 série II couplé à un spectromètre de masse HP 5972. L'injecteur est un injecteur Split-Splitless maintenu à une température de 300°C. La

séparation chromatographique est réalisée avec une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W Scientific (longueur : 60 m ; diamètre : 0,25 mm ; épaisseur de film : 0,1 μm) à phase non polaire (5 % phényl-méthylpolysiloxane) selon le programme de température: de -30 à 40 °C à 15 °C min⁻¹, de 40 à 300 °C à 3 °C min⁻¹, palier de 15 min à 300 °C, le débit d'hélium étant constant à 1 mL min⁻¹.

Compte tenu de la forte diversité des composés générés, et en particulier des composés légers (n-hexane, benzène, ...) et du temps de pyrolyse (15 secondes), il est nécessaire de refroidir l'enceinte du chromatographe à -30 °C en utilisant du CO₂ avant de lancer la chromatographie afin que tous les composés commencent leur transfert au même moment.

Le chromatographe est couplé au spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée à 280 °C. Le gaz vecteur est éliminé par pompage (le vide dans le spectromètre de masse est inférieur à 10⁻⁵ Torr) alors que les molécules arrivant successivement dans la chambre d'ionisation sont bombardées par un faisceau d'électrons de 70 eV. Les molécules séparées se fragmentent en ions moléculaires qui eux-mêmes vont continuer à se fragmenter ou se réarranger pour former des ions positifs plus petits ou des molécules neutres.

Les ions sont ensuite accélérés par une forte différence de potentiel, concentrés en un faisceau grâce à une série de lentilles utilisant des champs électromagnétiques et envoyés à travers le spectromètre de masse. Il s'agit d'un quadropôle constitué de deux pôles positifs et deux pôles négatifs. Les ions, sélectionnés selon le rapport masse/charge, vont ensuite frapper un détecteur (multiplicateur d'électron et amplificateur connectés à un système informatique d'acquisition).

L'analyse en mode "Fullscan" (Total Ion Monitoring) permet d'enregistrer les ions dont les rapports m/z sont compris entre 50 et 550. Ce mode de détection permet l'analyse et l'enregistrement de l'ensemble des ions produits par l'ionisation des composés. Cette méthode est utilisée pour identifier les composés présents dans les fractions à analyser. Chaque pic chromatographique donne lieu à un spectre de masse caractéristique de la structure du composé. Il est constitué de l'ion moléculaire, de l'ion caractéristique et des fragments générés lors de la collision avec les électrons. L'ion caractéristique est spécifique à chaque composé ou famille de composés et peut être identique à l'ion moléculaire. Les spectres de masse et les temps de rétention des composés permettent l'identification des molécules présentes sur le chromatogramme.

En théorie, les spectres de masse obtenus permettent d'identifier les composés analysés. Compte tenu de la richesse des composés pouvant être générés pendant la pyrolyse, plusieurs composés peuvent avoir des temps de rétention identiques (coélution), ce qui conduit à l'obtention d'un spectre de masse composite. Une bonne connaissance de la distribution des composés d'une même famille est alors nécessaire afin d'éviter toute confusion.

3.7. Dosage des azoprotéines (azoalbumine et azocaséine) par spectrophotométrie dans les eaux usées et de rivière

Les deux protéines utilisées, azoalbumine (Sigma, A2382) et azocaséine (Sigma, A2765), ont été choisies pour le groupement azoïque qui leur confère une couleur rouge orangé détectable en spectrophotométrie à 440 nm, après alcalinisation par la soude (Sarath *et al.*, 1989).

Les azoprotéines sont dosées dans le surnageant de boue après centrifugation. Pour chaque mesure, 3 fois 10 mL de boue sont prélevés et centrifugés à 3000 x g pendant 10 min. 1 mL de surnageant est transféré dans un tube à essai contenant 1 mL de soude 0,1 M, l'ensemble est agité vigoureusement et l'absorbance du mélange est lue à 440 nm contre un blanc des réactifs.

La concentration en azoalbumine est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage réalisée entre 2 et 1000 mg L⁻¹ d'azoalbumine en solution dans l'eau déminéralisée contre un blanc réactif. La limite de détection de l'azoalbumine dans l'eau usée épurée est 0,45 mg L⁻¹ et la limite de quantification est 4,5 mg L⁻¹.

La concentration en azocaséine est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage réalisée entre 2 et 200 mg L⁻¹ d'azocaséine en solution dans l'eau déminéralisée contre un blanc réactif. La limite de détection de l'azocaséine dans l'eau usée épurée est 0,42 mg L⁻¹ et la limite de quantification est 4,2 mg L⁻¹.

3.8. Analyse des acides gras des agrégats biologiques et des exopolymères

Les analyses des acides gras des lipides ont été réalisées par Merja Kontro et Minna Keinänen du laboratoire National Public Health Institute situé à Kuopio (Finlande).

La verrerie utilisée pour l'analyse des lipides des EPS et des boues activées est préalablement passée à 550 °C (Hobbyceram, Milano, Italie) pendant 6 h afin d'éliminer les traces éventuelles d'acides gras. L'extraction des lipides et la conservation des lipides à -20 °C sont effectués sous une atmosphère d'azote.

Les réactifs utilisés pour les analyses des acides gras sont de qualité analytique (Merck, Darmstadt, Germany), à l'exception des solvants (Rathburn LTD, Peeblesshire, United Kingdom), du 3-hydroxytridécanoate de méthyle (Larodan AB, Malmö, Sweden), des standards d'acides gras (Sigma, St. Louis, MO, USA), de NaOH (FF-Chemicals, Yli-Ii, Finland), de l'acide chlorhydrique (Riedel- de Haën, Seelze, Germany) et de l'acétone (Fluka, Buchs, Switzerland).

3.8.1. Extraction des lipides des boues et des exopolymères

Les extractions de lipides sont réalisées en duplicata sur les boues lyophilisées et les exopolymères extraits (*cf.* § 3.4.1.2). Les lipides sont extraits avec 28,2 mL d'un mélange de chloroforme/méthanol/tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 dans les proportions 1,0:2,0:0,8 (v/v/v) en les mélangeant 12 h une température de 21 ± 2 °C. A la fin de l'extraction, un standard interne

(dihéptadécanoylphosphatidylcholine) est ajouté pour aider à la quantification des phospholipides, et l'échantillon est ensuite mélangé pendant 5 min. Après une centrifugation de 2000 x g à 4 °C, le chloroforme et le tampon phosphate sont ajoutés à la phase organique dans les proportions finales chloroforme/méthanol/tampon phosphate (50 mM, pH 7,4) de 1,0:1,0:0,9 (v/v/v). Ensuite, la phase organique est récupérée et évaporée dans un évaporateur sec (Jouan RC10.10, Jouan S.A., Saint-Herblain, France). L'extrait sec est dissous par ajouts successifs le long de la paroi du tube de 4 fois 100 µL de chloroforme.

3.8.2. Fractionnement des lipides sur de la silice activée

L'extrait sec solubilisé dans le chloroforme est déposé en haut d'une colonne en verre (hauteur 100 mm, diamètre interne 6 mm) contenant 0,75 g d'acide silicique (100-200 mesh size, Unisil, Clarkson Chemical, Williamsport, Pennsylvania, USA). Juste avant utilisation, l'acide silicique est activé à 120 °C pendant 12 h, et ensuite lavé avec du chloroforme. Les lipides sont élués en fonction de leur affinité avec l'acide silicique activé. Les lipides neutres sont élués en premier à partir de la colonne avec 10 mL de chloroforme, les glycolipides avec 20 mL d'acétone et les phospholipides avec 10 mL de méthanol. Chacune des fractions est mise à évaporer indépendamment pour éviter les contaminations. Après évaporation à sec dans un évaporateur de chacune des fractions, les standards sont ajoutés (tridécanoate de méthyle et nonadécanoate de méthyle) à chacune des fractions. Les acides gras sont ensuite saponifiés, méthylés et extraits (Jantzen *et al.*, 1989).

3.8.3. Extraction des lipopolysaccharides (LPS)

Les standards internes (3-hydroxytridécanoate de méthyle et 2-hydroxyoctadécanoate de méthyle) sont ajoutés aux résidus d'extraction des lipides (*cf.* § 3.8.2) et les acides gras 2-OH et 3-OH des lipopolysaccharides sont analysés après une hydrolyse douce acide. Les acides gras hydroxylés des LPS sont méthylés avec une solution d'acétylchlorure/méthanol (1,5:10, v/v) et extraits avec de l'hexane (Jantzen *et al.*, 1989; Torkko *et al.*, 1998).

3.8.4. Analyse et quantification des acides gras méthylés (FAME : Fatty acids methylesters)

Les FAME sont analysés en utilisant une chromatographie en phase gazeuse (Hewlett-Packard gas chromatograph, G1800A, Palo Alto, California, USA) équipée d'un détecteur de masse sélective, d'un échantillonneur automatique (HP 7673) et d'une colonne capillaire (HP-5, 30 m x 0,2 mm x 0,11 µm) greffée avec 5 % de phénylméthylsilicone. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur (1,0 ml min⁻¹). L'injecteur est en mode "splitless" et la température de l'injecteur réglée à 250 °C. La température du détecteur est de 270 °C. L'augmentation de la température est régulée de la façon suivante : stabilisation de la température à 50 °C pendant 1 min, puis augmentation de 30 °C par min jusqu'à une température de 160 °C et enfin de 5 °C par min jusqu'à 270 °C.

Les acides gras des fractions phospholipides, glycolipides et lipides neutres sont analysés en utilisant soit le mode "Fullscan", soit le mode "SIM" (cf. § 3.6.1.3.3.) en suivant les ions m/z 74 and 199, excepté pour les acides gras 16:1 (m/z 268), *cy*-17:0 (m/z 250), *i*-18:0 et 18:0 (m/z 298), 18:2n-6 (m/z 294), 18:1 (m/z 264), 10-Me-18:0 et 19:0 (m/z 312), *cy*-19:0 (m/z 278) et 20:0 (m/z). Les acides gras méthylés sont détectés en mode SIM et les ions caractéristiques suivis sont m/z 103 pour les acides gras 3-OH et m/z 90 et m/z 59 pour les acides gras 2-OH.

Les gammes d'étalonnage sont réalisées à partir d'acides gras standards bactériens entre 0,02 et 2 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ pour l'acide gras 16:0. Les standards internes sont comparés par rapport à ces gammes d'étalonnage.

Les pics des acides gras méthylés sont identifiés par comparaison de leur spectre de masse et de leur temps de rétention avec ceux des standards. Les acides gras sont exprimés en pourcentage par rapport à la somme des pics de l'ensemble des acides gras déterminés. La quantification des acides gras est calculée par rapport aux standards internes et le contenu total des acides gras est défini par la somme des acides gras méthylés.

3.9. Traitement statistique des données

3.9.1. Comparaison de moyennes

Le test de Student est un test de signification qui peut être employé lors de la comparaison de deux moyennes ou pour tester la signification d'un coefficient de régression au seuil de probabilité de 95 % ou de 99 % (Geller, 1979). Le test t est calculé en effectuant le rapport de la différence des moyennes sur l'erreur standard.

Pour être considérée comme non significative au seuil de probabilité de 95 %, la différence des moyennes ($d = m_1 - m_2$) devra être inférieure à $t_{0,05} \times \text{Sd}$.

Sd est la variance standard, exprimée en fonction de la variance estimée de chacun des échantillons (Se), elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{Sd} = \text{Se} \cdot \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)} \text{ avec } \text{Se} = \sqrt{(n_1 \cdot s_1^2 + n_2 \cdot s_2^2)/(n_1 + n_2 - 2)}.$$

n_1 : effectif de l'échantillon 1, m_1 : moyenne de l'échantillon 1, s_1 : écart-type de l'échantillon 1, n_2 : effectif de l'échantillon 2, m_2 : moyenne de l'échantillon 2 et s_2 : écart type de l'échantillon 2

La valeur observée est comparée aux valeurs contenues dans la table du t de Student. La table de t donne en fonction des effectifs n_1 et n_2 de chaque échantillon et plus précisément du nombre de degré de liberté n (ici $n = n_1 + n_2 - 2$) la valeur limite $t_{0,05}$ du paramètre qui a 5 chances sur 100 d'être dépassé par suite des fluctuations fortuites.

Le produit $t_{0,05} \times \text{Sd}$ peut alors être calculé. Il permet de vérifier si la différence constatée entre deux moyennes est, ou non significative au seuil de probabilité de 95 %.

Si la valeur absolue du t calculé est supérieure à la valeur du t de la table de Student, la conclusion est soit que la différence est significative, soit que le coefficient est significativement différent de 0, selon l'emploi du test de Student. On considère communément qu'une valeur de t correspondant à un

seuil $p < 0,05$ traduit une différence significative entre les moyennes. Les tests de Student sont effectués avec le logiciel KaleidaGraph (version 3.51).

3.9.2. Analyse statistique en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique de tri qui consiste à réduire le nombre de variables (paramètres mesurés) nécessaires à la description des individus (ou échantillons) en minimisant la perte d'information (Baléo *et al.*, 2003).

L'ACP revient à modéliser les données sous la forme d'une matrice $X_{n,p} = T_{n,l} P_{l,p} + E_{n,p}$, où X représente les p paramètres mesurés dans les n échantillons, T , P sont respectivement des variables aléatoires à valeur dans un sous-espace de dimension l et p , E est un terme d'erreur ou de bruit (d'espérance nulle) à valeurs dans l'espace de dimension n , l correspond aux nombres de composantes principales ($l < p$). Géométriquement, le processus de la mise en facteurs revient à placer des axes dans une hypersphère formée par les p paramètres mesurés dans les n échantillons. Dans le cas de p dimensions, il est peu probable que nous amassions suffisamment d'informations sur une seule droite, le long de ce grand axe de cette hypersphère, droite appelée première composante principale. Par convention, nous représentons la deuxième dimension par une droite perpendiculaire à la première composante principale. Ce deuxième axe, ou deuxième composante principale, se définit comme la droite qui "explique" la plus grande partie de l'information restante (aucune autre droite qui "expliquerait" autant ou d'avantage ne pourrait être tracée perpendiculairement à la première composante principale). Généralement, les deux premières composantes principales sont suffisantes pour expliquer le maximum de données.

Graphiquement, l'ACP consiste à représenter soit les coordonnées ou "scores" de chaque échantillon, déterminé à partir de la matrice T , dans le plan formé par les composantes principales significatives, soit les coefficients de chaque variables ou "load" de la matrice de passage P dans le plan formé par les composantes principales significatives.

L'interprétation des représentations graphiques repose sur les points suivants : (i) plus les coordonnées de deux variables sont fortes sur un facteur et plus la variable a de liens avec ce facteur et (ii) plus deux variables sont proches, plus leur lien est sensé être fort. Mais, l'interprétation des résultats par la seule base des représentations graphiques est difficile car le graphique en deux dimensions représente les variables situées dans un espace vectoriel et certains "effets d'optique" peuvent intervenir dans l'interprétation des liens des variables.

Les analyses des composantes principales sont réalisées avec le logiciel MiniTab (version 13).

4. ACIDES GRAS DES AGREGATS BIOLOGIQUES DES BOUES ACTIVEES ET DES SEDIMENTS DE RIVIERE

4.1. Introduction

Les agrégats biologiques de boues activées représentent une communauté très diversifiée de micro-organismes présents dans une matrice de substances exopolymériques (EPS). La caractérisation chimique des EPS extraits des boues activées met en évidence des protéines, des polysaccharides, des acides uroniques, des substances dites humiques, des acides aminés, des acides nucléiques (ADN et ARN) et en moindre mesure des lipides (Azeredo *et al.*, 1998; Bura *et al.*, 1998; Bura, 2000; Dignac *et al.*, 1998; Forster and Clarke, 1983; Frølund *et al.*, 1995, 1996; Goodwin et Forster, 1985; Jorand *et al.*, 1998; Nielsen et Jahn, 1999; Palmgren et Nielsen, 1996; Urbain *et al.*, 1993b). Une fraction de ces polymères ou hétéropolymères extracellulaires (glycolipides, glycoprotéines, lipopolysaccharides ...) s'organiserait en domaines hydrophobes au sein des agrégats biologiques mis en évidence indirectement par (i) la variation de la fluorescence du pyrène piégé dans les agrégats bactériens (Ganaye *et al.*, 1997), (ii) la capacité de sorption de molécules organiques hydrophobes (Leppard *et al.*, 1998; Späth *et al.*, 1998; Steen et Karickhoff, 1981) ou amphiphiles (Garcia *et al.*, 2002; Urano et Saito, 1984), et enfin (iii) le piégeage efficace de particules hydrophobes (Olofsson *et al.*, 1998).

La caractérisation exacte de ces domaines hydrophobes n'est pas connue à ce jour et nous formulons l'hypothèse que les lipides jouent un rôle considérable dans leur organisation et *a fortiori* dans la capacité d'accumulation des agrégats biologiques vis-à-vis des composés organiques. Les rares publications relatives aux lipides des agrégats biologiques de boues activées se sont intéressées à une analyse quantitative globale des lipides (Bura, 2000; Comte *et al.*, 2003; Dignac *et al.*, 1998; Forster and Clarke, 1983; Liss *et al.*, 2001) au sein des agrégats biologiques, lesquels représenteraient moins de 32 mg g⁻¹ de TS_{EPS} (Comte *et al.*, 2003; Dignac *et al.*, 1998) et parfois qualitative (Dignac *et al.*, 1998; Goodwin et Forster, 1985). Quelques études ont caractérisé les lipides des EPS et supposent par l'observation des spectres infrarouge l'existence d'acides gras provenant des lipides neutres (mono-, di- et triglycérides), des phospholipides et des stérols, et ne mettent pas en évidence de polyhydroxyalcanoates (Dignac *et al.*, 1998 ; Goodwin et Forster, 1985). Ces lipides associés aux agrégats biologiques peuvent avoir plusieurs origines, en particulier (i) le métabolisme microbien car certaines bactéries isolées de l'eau de mer sont capables de libérer dans le milieu de culture de 43 à 102 µg de lipides par mg⁻¹ de carbone (Goutx *et al.*, 1990) et (ii) l'adsorption par des agrégats biologiques des lipides des eaux usées (Hwu *et al.*, 1998).

Dans une première étape, les lipides du domaine extracellulaire (extraits par une dispersion des agrégats biologiques par des ultrasons et une résine échangeuse de cations) et des boues ont été extraits par une combinaison de solvant organique et ont été analysé par CPG-SM. L'analyse de cinq grandes classes de lipides (phospholipides, glycolipides, lipides neutres, acides 2-OH lipopolysaccharidiques et acides 3-OH lipopolysaccharidiques) extraits des EPS a été effectuée par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en mode simple ion.

La seconde étape a cherché à caractériser les lipides des sédiments et des matières en suspension de rivière, prélevés de part et d'autre de la zone de rejet d'une station d'épuration, par l'analyse des acides gras des phospholipides, des glycolipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharidiques. Cette étude a pour but de trouver des signatures chimiques e.g. acides gras qui permettraient, d'une part, de montrer l'effet du rejet d'une station sur les sédiments de rivière et les matières en suspension prélevés de part et d'autre de la zone de rejet d'une station d'épuration et d'autre part de montrer la présence en rivière des agrégats biologiques rejetés par les stations d'épuration.

Cette approche, qui consiste à analyser les acides gras des phospholipides pour estimer la contribution de la station d'épuration à la contamination de la rivière, s'appuie sur le fait que les effluents contribuent à supplémer les milieux aquatiques de matière organique et de bactéries (Servais *et al.*, 1999).

4.2. Acides gras des exopolymères extraits d'agrégats biologiques de boues activées

4.2.1. Introduction

Des agrégats biologiques de boues activées ont été prélevés dans les bassins aérés de deux stations d'épurations d'eaux usées urbaines et les exopolymères (EPS) de ces mêmes boues ont été séparés par des ultrasons et une résine échangeuse de cations (*cf.* § 3.4.1). Les acides gras des phospholipides (PL), des glycolipides (GL), des lipides neutres (NL) et les acides gras hydroxylés en position 2 et 3 des lipopolysaccharides (LPS 3-OH et LPS 2-OH) ont été déterminés dans les agrégats biologiques et les EPS après (i) leur extraction par une combinaison de solvants organiques, (ii) de leur séparation sur une colonne de silice activée en fonction de leur polarité et (iii) de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (*cf.* § 3.8).

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'un article dans la revue scientifique *Lipids* : A. Conrad, M. Kontro, M. M. Keinänen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault et J-C. Block (2003), Fatty acid profiles of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs, *Lipids*, 38, 10, 1093-1105.

La caractérisation des EPS extraits (% MV_{EPS}) a montré que les EPS sont principalement composés de protéines (43,4 %), de substances dites humiques (11,5 %), d'acides nucléiques (10,9 %), de polysaccharides (9,9 %) et en moindre proportion d'acides gras (1,8 %) (Figure 4.1).

Les acides gras mesurés dans les boues et les exopolymères entrent dans la composition des glycolipides, des phospholipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharides respectivement dans les proportions suivantes : 61, 21, 16 and 2 % (Figure 4.2). Les profils des acides gras des lipides

(incluant environ 85 acides gras différents) des boues activées et de leurs exopolymères extraits sont similaires. Les boues activées sont principalement composées d'acides gras avec un nombre pair d'atomes de carbone. La présence de levures, de champignons, de bactéries sulfato-réductrices, de bactéries à gram positif et négatif et en moindre proportion des mycobactéries a été montrée dans les boues activées en utilisant certains acides gras établis comme biomarqueurs d'un micro-organisme.

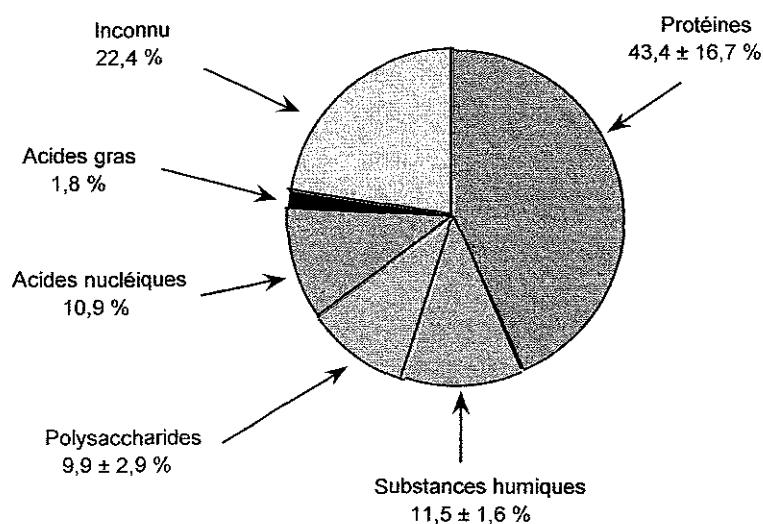


Figure 4.1 : Proportions (% de MV_{EPS}) des protéines, des substances dites humiques, des polysaccharides, des acides nucléiques et des acides gras dans les EPS extraits des boues activées M_1 et M_2 par des ultrasons et une résine échangeuse de cations (Moyenne $\pm$ écartype; $n = 6$), excepté pour les acides gras extraits seulement des EPS extraits de la boue M_1 (Moyenne $\pm$ écart-type; $n = 2$).

La comparaison des dates de prélèvements (janvier et septembre) a montré que les EPS extraits (ultrasons et résine échangeuse de cations) des boues prélevées en janvier sont composés d'une proportion plus importante d'acides gras insaturés que les EPS extraits des boues prélevées en septembre. Cette augmentation des acides gras insaturés peut être partiellement attribuée à l'adaptation des micro-organismes due à la variation de température. Parallèlement, les boues activées prélevées en janvier contiennent une proportion supérieure d'acides gras cyclopropanes et le rapport acides gras C18/C16 est plus important suggérant une communauté microbienne dans un état physiologique plus stressé que les prélèvements effectués en septembre.

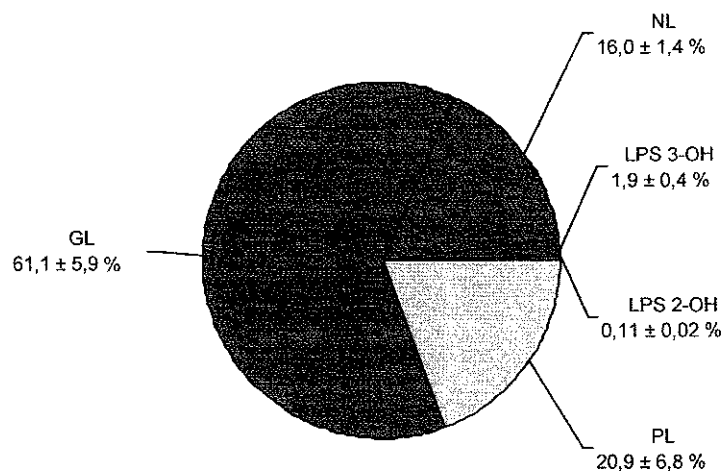


Figure 4.2 : Proportions des acides gras des PL, GL, NL, LPS 3-OH et LPS 2-OH) dans les lipides extraits des EPS de la boue M₁ (Moyenne $\pm$ écart-type, n=2).

La comparaison des prélèvements effectués sur les deux stations d'épuration a montré que les profils d'acides gras sont similaires, bien que des différences dans la communauté bactérienne aient été observées. Des bactéries à gram négatif sont présentes dans les agrégats biologiques prélevés dans deux stations d'épuration différentes (Maxéville et Toul), mais les agrégats biologiques présents dans les bassins aérés de la station d'épuration de Toul contiennent plus de bactéries à gram positif, de levures et de champignons.

Les résultats détaillés de ce travail sont analysés dans le paragraphe 4.2.2.

4.2.2. Fatty acid profiles of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs

Arnaud Conrad^a, Merja Kontro (Suutari)^{b,c}, Minna M. Keinänen^b, Aurore Cadoret^a, Pierre Faure^d, Laurence Mansuy-Huault^d and Jean-Claude Block^{a,*}

^a L.C.P.M.E., UMR 7564 CNRS - Université Henri Poincaré, Faculté de Pharmacie, Pôle de l'Eau, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, ^b Laboratory of Environmental Microbiology, National Health Public Institute, 70701 Kuopio, Finland, ^c University of Helsinki, Department of Ecological and Environmental Sciences, Niemenkatu 73, 15140 Lahti, Finland, and ^d G2R, UMR 7566 CNRS - Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Parue dans la revue *Lipids* (2003), 38, 10, 1093-1105.

Key words - Activated sludge, Extracellular polymeric substances, Fatty acids, Glycolipids, Lipopolysaccharides, Neutral lipids, Phospholipids.

Abbreviations - *a*-, *anteiso*-branched FA; *br*-, methyl-branched; *cy*-, cyclopropane FA; CV, coefficient of variation; EPS, extracellular polymeric substances; FA, fatty acid; FAME, FA methyl ester; GL, glycolipid; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; GLFA, glycolipid FA; *i*-, *iso*-branched FA; LPS 2-OH-FA, lipopolysaccharide 2-hydroxy FA; LPS 3-OH-FA, lipopolysaccharide 3-hydroxy FA; 10-Me-16:0, 10-methylhexadecanoic acid; NL, neutral lipid; NLFA, neutral lipid FA; PL, phospholipid, PLFA, phospholipid FA; *t*-, conformation *trans* of double bond; TBSA, tuberculostearic acid.

4.2.2.1. Introduction

The activated sludge process, in which micro-organisms are aerobically grown in a flocculated form called activated sludge flocs, is a widely utilized biological process undertaken in urban wastewater treatment plants. These activated sludge flocs contain a diverse community of micro-organisms (Seviour and Blackhall, 1999), which are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS). EPS are typically made up of large amounts of proteins, humic substances, carbohydrates, lipids and nucleic acids (Frølund *et al.*, 1995; Goodwin and Forster, 1985; Nielsen and Jahn, 1999; Urbain *et al.*, 1993b). Some of these polymers can be organized into heteropolymers such as glycoproteins (Jorand *et al.*, 1998).

EPS are involved in the architecture of the aggregates, and they contribute to the physico-chemical properties of activated sludge flocs (Flemming *et al.*, 2000). For instance, the cohesiveness of activated sludge aggregates is due to the electrostatic interactions that exist between the multivalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) and negatively charged EPS (Bruus *et al.*, 1992; Frølund *et al.*, 1996; Higgins and Novak, 1997; Urbain *et al.*, 1993a), as well as hydrophobic interactions (Jorand *et al.*, 1998; Urbain *et al.*, 1993a). Hydrophobic domains represent sorption sites for hydrophobic and amphiphilic organic compounds. The capacity and the importance of these hydrophobic domains have been estimated using techniques that determine: (i) the variation in the fluorescence spectrum of the pyrene trapped in the activated sludge (Ganaye *et al.*, 1997); (ii) the accumulation of organic molecules in EPS such as pyrene, benzene, toluene (Späth *et al.*, 1998; Steen *et al.*, 1981), fluoranthene, phenanthrene (Leppard *et al.*, 1998) and alkylbenzene sulphonates (Struijs *et al.*, 1991); and (iii) the efficient capture of hydrophobic bacteria (Olofsson *et al.*, 1998). Lipids could play an important role in the hydrophobic properties of activated sludge EPS. These properties have been reported by Jorand *et al.* (1995b).

Lipid profiles could be correlated to the microbial ecology of sludge. For instance, the presence of phospholipid FAs (PLFAs) allows the characterization of microbial populations in activated sludges (Cha *et al.*, 1999), as well as in soils (White *et al.*, 1996b), drinking water and biofilms (Keinänen *et al.*, 2002). Fatty acids (FAs) may also allow conclusions to be drawn concerning the physiological state (starvation, temperature and stress adaptation) of the microbial communities (White *et al.*, 1996b; Smith *et al.*, 2000; Suutari *et al.*, 1990). Data on other FAs, such as the lipopolysaccharide 2-OH and 3-OH FAs (LPS 2-OH- and 3-OH-FAs), are also used to monitor gram-negative species (Ratledge and Wilkinson, 1988).

In order to complete the relatively scant information available on lipids in activated sludge flocs and EPS, we measured the FAs of phospholipids (PLs), glycolipids (GLs) and neutral lipids (NLs), and of LPS 2-OH- and 3-OH-FAs. For practical reasons, this study focuses on the FAs with 14 to 20 carbons in the PLs, GLs and NLs, and on the 2-OH and 3-OH FAs with 9 to 25 carbons in the LPS. EPS were recovered by combining floc dispersion techniques (sonication, cation exchange resin and centrifugation). Lipids were extracted (Bligh and Dyer, 1959) and fractionated in a silica column (King

et al., 1977), and their FA content was determined by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (Keinänen *et al.*, 2002).

4.2.2.2. Experimental procedures

Sludge samples. The activated sludge samples (mixed liquor or whole sludge) were collected directly from the aeration tank of the wastewater treatment plant. Two sludge samples (M_1 and M_2) were collected from Maxéville, one in September, 2000 (M_1), and one in January, 2001 (M_2), and a sampling was performed in duplicate in Toul in June, 2002: T_1 and T_{1bis} . Some of the characteristics of the wastewater treatment plants are summarized in Table 4.1.

Table 4.1 : Characteristics of wastewater treatment plants (Maxéville and Toul) and activated sludge samples (M_1 , M_2 , and T_1 and T_{1bis}).

	Sample M_1	Sample M_2	Samples T_1 and T_{1bis}
Wastewater treatment plant	Maxéville (Average load)		Toul (Average load)
Capacity (inhabitant equivalents)	480,000		25,375
TS_{Sludge} (g L ⁻¹)	2.04 ± 0.03	2.45 ± 0.02	3.35 ± 0.03
VS_{Sludge} (g L ⁻¹)	1.49 ± 0.01	1.32 ± 0.04	1.78 ± 0.05
SVI (mL g ⁻¹ of TS_{Sludge})	113 ± 2	66 ± 1	84 ± 2
pH _{20°C}	7.3	7.5	7.5
Conductivity (k _{20°C})	854	649	855
Flow (m ³ day ⁻¹)	53,827	56,310	5,607
Hydraulic retention time (hour)	4.0	3.5	4.0
Sludge age (day)	3.5	3.5	13
Oxygen concentration (mg L ⁻¹)	0.5 – 3.5	0.5 – 3.5	0.5 – 3.5
Temperature (°C)	18	10	22

Sludge analyses and EPS extraction were carried out no more than 1 hour after sampling. The activated sludge samples were characterized by total solids (TS_{Sludge}), volatile solids (VS_{Sludge}), sludge volume index after 30 minutes of settling (SVI), pH_{20 °C}, k_{20 °C} and temperature (Clesceri *et al.*, 1998). TS_{Sludge} (g L⁻¹ of sludge) was measured as the dried weight of sludge (dried for 12 hours at 105 °C). VS_{Sludge} (g L⁻¹ of sludge) was calculated by subtracting the weight of sludge dried for 3.5 hours at 550 °C from the weight of sludge dried for 12 hours at 105 °C (Clesceri *et al.*, 1998). The Sludge Volume Index (SVI) was determined by dividing the sludge volume after 30 minutes of settling in a 1 L graduated glass tube by the TS_{Sludge} value. These measurements were performed in triplicate (Table 4.1). The pH_{20 °C} (pH-meter: Hanna instruments, HI 9321, Madrid, Portugal) and conductivity k_{20 °C} (conductimeter: Bioblock Scientific, WTW LF320, probe WTW A325, Weilheim, Germany) were determined from the supernatant of the sludge after 30 minutes of settling. Sludge temperature was measured directly in the aeration tank.

EPS extraction. At each step of the EPS extraction procedure, the sludges (samples M₁ and M₂) and the de-ionized water used for washing were purged using N₂ (Alphagaz N₂, France) to avoid oxidation of the lipids.

In order to remove weakly sorbed organic matter, the activated sludge samples were washed before experimentation, as follows: 2 L of whole sludge were settled for 30 minutes at 20 ± 1 °C and the supernatant (1 L) was replaced by de-ionized water filtered on 0.22 µm of porosity (Millipore, USA). After three gentle homogenizations, the sludge was settled again and 1 L of the supernatant was replaced by de-ionized water. The washed sludge was dispersed by combining sonication (Jorand *et al.*, 1995b) and the cation exchange method (Frølund *et al.*, 1995). 50 mL fractions of washed sludge were treated for 20 s at 37 W with a 19 mm ultrasound probe (Braun Sciencetec, Labsonic 2000U, USA) immersed 15 mm into the liquid. The sludge was placed and maintained in crushed ice for 15 min prior to and throughout the ultrasound treatment. Then, cation extraction was performed by mixing a cation exchange resin (Merck, Dowex-Na⁺ 50 × 8, 44445, Strasbourg, France) in the amount of 70 g g⁻¹ of volatile solids into the ultrasound-treated sludge. This mixture was stirred (IKA Labortechnik, Eurostar, Germany) with a plate paddle at 400 rpm at 4 °C for 45 min in a baffle beaker, as described by Frølund *et al.* (1995). After 5 minutes of resin settling, the samples were centrifuged (Kontron Instruments, Centrikon T124, Milan, Italy) at 20,000 × g for 45 min at 4 °C to separate the extracellular polymeric substances (EPS) from the biomass. The extracted EPS were carefully removed by pipetting the supernatant, and these EPS were kept on crushed ice prior to experimentation. For lipid analysis, samples were freeze-dried (Sentry Virtis, New York, USA) and stored under N₂ atmosphere (atmospheric pressure).

EPS characterization. Values for the total solids (TS_{EPS}) and the volatile solids (VS_{EPS}) in the extracted EPS were determined by the same procedure as illustrated above for the activated sludge samples. Both TS_{EPS} and VS_{EPS} were expressed as g L⁻¹ of extracts.

The protein (*i.e.* a substance containing two or more peptide bonds) concentrations and the humic-like substances were measured using a Folin-Ciocalteu phenol reagent (Lowry *et al.*, 1951) in a 2-step process. The first step is a Biuret reaction in which the peptide bonds react with copper in an alkaline solution creating a copper-treated protein. The second step is the reduction of the active phosphomolybdic and phosphotungstic acids by the copper-treated protein. As proposed by Frølund *et al.* (1995), the results were corrected for non-specific colour development caused by humic-like substances by measuring absorbance at 750 nm (Hitachi, U-2000 spectrophotometer, France) with and without CuSO₄. The equations used for calculating the corrected protein and humic-like substance absorbencies were the following:

$$\text{Abs}_{\text{protein}} = 1.25 * (\text{Abs}_{\text{withCuSO}_4} - \text{Abs}_{\text{withoutCuSO}_4}) \text{ and } \text{Abs}_{\text{humic}} = \text{Abs}_{\text{withoutCuSO}_4} - 0.2 * \text{Abs}_{\text{protein}}.$$

The protein concentration was expressed as mg equivalent bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, A-7906, Steinheim, Germany) g^{-1} VS_{EPS} and mg equivalent humic acid (Sigma-Aldrich, H1 675-2, Steinheim, Germany) g^{-1} VS_{EPS} for the humic-like substance concentrations.

The carbohydrate concentrations were determined using a phenol sulphuric acid method (Dubois *et al.*, 1956). Briefly, the sulphuric acid hydrolysed polysaccharides to monosaccharides during heating at 90 °C for 5 minutes, and the phenol reagent (5 %) dehydrated the monosaccharides to furfural derivatives. This reaction developed an orange colour, which was measured spectrophotometrically at 492 nm (Hitachi, U-2000 spectrophotometer, France). The carbohydrate concentration was expressed as mg equivalent D-glucose (Prolabo, 379.294, France) g^{-1} VS_{EPS}.

The nucleic acids were measured using a diphenylamine method (Deriaz *et al.*, 1949). Briefly, acetic and sulphuric acids hydrolysed the DNA at 100 °C for 10 minutes, the hydrolysed DNA in turn reacting with the diphenylamine reagent. This reaction developed a blue coloration, which was measured spectrophotometrically at 595 nm (Hitachi, U-2000 spectrophotometer, France). The DNA concentration was expressed as mg equivalent DNA of calf thymus (Sigma-aldrich, D-1501, Steinheim, Germany) g^{-1} VS_{EPS}.

The EPS characteristics were determined in triplicate and the average of variability coefficients on the measures were 4.2 %, 2.9 %, 2.9 % and 2.2 % for proteins, humic-like substances, carbohydrates and nucleic acids respectively.

Lipid extraction and analysis from whole activated sludge and extracted EPS. The glassware used in the lipid analyses was heated to 550 °C for 6 hours (Hobbyceram, Milano, Italy) prior to use as a method to remove FA from the surface of the glass. Lipid extractions and the storage of lipids at -20 °C were performed under nitrogen atmosphere (atmospheric pressure). Duplicate lyophilised EPS extract samples of 43.8 and 71.1 mg (M₁ EPS), and of 150.5 and 186.8 mg (M₂ EPS), and sludge samples of 1.25 and 1.23 g (M₂ Sludge), 1.74 and 1.70 g (T₁ Sludge), and of 1.73 and 1.68 g (T₁ bis Sludge) were extracted with 28.2 mL of a mixture of chloroform/methanol/50 mM phosphate buffer, pH 7.4 (1: 2: 0.8, by vol) by shaking overnight at a temperature of 21 ± 2 °C (Bligh and Dyer, 1959; White *et al.*, 1979,1996b). At the end of the lipid extractions, diheptadecanoylphosphatidylcholine was added as an internal standard to aid in the quantification of phospholipids, and the samples were then shaken for a further 5 minutes. After centrifugation (2,000 x g), chloroform and a buffer were added to the solvent phase to give a final ratio of chloroform/methanol/phosphate buffer (pH 7.4) of 1:1:0.9 (by vol) (Bligh and Dyer, 1959). Next, the solvent phases were separated and then evaporated to dryness in a centrifugal evaporator (Jouan RC10.10, Jouan S.A., Saint-Herblain, France). The dry lipid extract was then dissolved in chloroform (4 x 100 μL) and applied at the top of a glass column (height 100 mm, inner diameter 6 mm) containing 0.75 g of silicic acid (100-200 mesh size, Unisil, Clarkson Chemical, Williamsport, Pennsylvania, USA). Prior to use, the silicic acid was activated at 120 °C overnight, and then washed with chloroform. Neutral lipids were eluted first from the column with

10 mL of chloroform, glycolipids with 20 mL of acetone, and phospholipids with 10 mL of methanol (Zelles and Bai, 1993). The fractions containing neutral lipids, glycolipids and phospholipids were evaporated to dryness in a centrifugal evaporator. After the lipids had been dried, internal standards (tridecanoic and nonadecanoic acid methyl esters) were added to each lipid fraction. Fatty acids were then saponified, methylated and extracted as methylesters, as described earlier by Jantzen *et al.* (1989). Internal standards (3-OH tridecanoic acid and 2-OH-octadecanoic acid methyl esters) were added to the lipid extraction residues, and LPS 2-OH- and 3-OH-substituted FAs were analysed by mild acid hydrolysis. LPS OH FAs were methylated in acetylchloride/methanol solution (1.5:10, by vol), and extracted with hexane (Jantzen *et al.*, 1989; Torkko *et al.*, 1998). The FA methylesters were analysed using a Hewlett-Packard gas chromatograph (Palo Alto, California, USA) model G1800A equipped with a mass selective detector, HP7673 automatic sampler and HP-5 capillary column (30 m x 0.2 mm x 0.11 μ m) coated with crosslinked 5 % Ph Me Silicone. Helium (1.0 mL min⁻¹) was used as the carrier gas. The injection was splitless, and the injector temperature was 250 °C. The detector temperature was 270 °C. The oven temperature was programmed to hold 50 °C for 1 min, and then to increase 30 °C min⁻¹ up to 160 °C, and thereafter 5 °C min⁻¹ up to 270 °C. The FAs of phospholipid, glycolipid and neutral lipid fractions were analysed using either total ion monitoring (for T₁ and T_{1 bis} only) or selected ion monitoring (SIM) by following the ions m/z 74 and 199, except that the latter ion was m/z 268 for 16:1 acids, m/z 250 for *cy*-17:0, m/z 298 for *i*-18:0 and 18:0, m/z 294 for 18:2n-6, m/z 264 for 18:1 acids, m/z 312 for 10-Me-18:0 and 19:0, m/z 278 for *cy*-19:0, and m/z 326 for 20:0.

Calibration standards with a known ratio of bacterial FAs relative to the internal standard methyl nonadecanoate (19:0) were used to construct the calibration curves (Tunlid *et al.*, 1989; White *et al.*, 1996b). The standards contained FAs at four to five concentrations ranging from 0.02 to 2 nmol μ L⁻¹ for 16:0 with an internal standard amount of 68 pmol μ L⁻¹. In the SIM of LPS OH FA methyl esters, the ion followed was m/z 103 for 3-OH FAs, and m/z 90 and M-59 for 2-OH FAs (Keinänen *et al.*, 2003; Gradowska and Larson, 1994; Wollenweber and Rietschel, 1990). The peaks of FA methyl esters were identified by comparing their mass spectra and retention times with those of standards.

Chemicals. The analytical reagents for the lipid analyses were from Merck (Darmstadt, Germany), with the following exceptions: solvents (Rathburn LTD, Peeblesshire, United Kingdom), 3-hydroxytridecanoic acid methyl ester (Larodan AB, Malmö, Sweden), other FA standards (Sigma, St. Louis, MO, USA), NaOH (FF-Chemicals, Yli-Ii, Finland), HCl (Riedel- de Haën, Seelze, Germany) and acetylchloride (Fluka, Buchs, Switzerland).

Calculations. Fatty acid composition was expressed as a percentage of the total peak area. The quantitative amounts of FAs were calculated using internal standards, and the total FA content was defined as the sum of the FA methyl esters. Amounts of C18/C16 FAs were calculated as the

percentage ratio of 18:0 and 18:1 FAs to 16:0 and 16:1 FAs. All results are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The standard deviation for the FA analysis of pure microbial culture ($n=8$) was $< 0.9 \%$ (Suutari *et al.*, 1990). The coefficient of variation (CV) was calculated as the ratio of the standard deviation to the mean value.

4.2.2.3. Results

4.2.2.3.1. Characteristics of the extracted EPS

The EPS extracted from the activated sludges M_1 and M_2 ($M_{1\text{ EPS}}$ and $M_{2\text{ EPS}}$) by sonication and cation exchange resin represented 18.4 % of VS_{sludge} . The EPS contained mainly proteins (43.4 % VS_{EPS}), humic-like substances (11.5 % VS_{EPS}), nucleic acids (10.9 % VS_{EPS}), carbohydrates (9.9 % VS_{EPS}) and FAs (1.8 % VS_{EPS}) (Table 4.2).

Lipids were extracted from the EPS (sample M_1) by a mixture of chloroform, methanol and phosphate buffer. Lipids extracted were then separated into phospholipid (PL), glycolipid (GL) and neutral lipid (NL) fractions as a function of their different polarities on the silica column. The FAs of these fractions, and the LPS 2-OH-FAs and 3-OH-FAs of the extraction residue were quantified. The largest amounts of FAs were partitioned into GL (61.1 %), PL (20.9 %) and NL (16.0 %) fractions, and to a lesser extent to LPS 3-OH-FAs (1.9 %) and 2-OH-FAs (0.1 %) (Table 4.3). GC-MS analyses revealed a high diversity of FAs: 35 different FAs in the PLs, GLs and NLs (Tables 4.4, 4.5 and 4.6), 29 FAs in the LPS 3-OH-FAs (Table 4.7) and 21 FAs in the LPS 2-OH-FAs (Table 4.8). Fatty acids were separated into saturated, unsaturated, branched-chain (*iso*-, *anteiso*- and *middle*-branched) and cyclopropane.

4.2.2.3.2. Repeatability and reproducibility of FA analyses.

The analytical repeatability (intrinsic measurement variability) in lipid-bound FA extraction, fractionation and derivatisation, and GC-MS analysis was estimated from the standard deviations presented in Tables 4-8. The average CV for FA percentages detected in amounts $> 1 \%$ in PLFAs, GLFAs, NLFAs, LPS 3-OH and 2-OH FAs was 7.2, 9.0, 14.1, 6.6 and 6.7 % respectively. For the different lipid fractions (PL, GL, NL, LPS 3-OH and LPS 2-OH), the average of all CVs was 18% (range of variation 9-32 %).

Two samples (T_1 Sludge and T_1 bis Sludge) were collected on the same day at the same wastewater treatment plant in order to estimate overall reproducibility, of both sampling and the FA analytical procedure. For the total saturated FAs of PL, GL and NL, and LPS 2-OH and 3-OH (Tables 4.4-4.8), the variations between the two samples were 0.4, 0.3, 12.2, 2.2, and 0.8 % respectively. For the total unsaturated FAs, the variations were 2.7, 2.8 and 9.7 %, respectively for the PL, GL and NL. For the total branched-chain FAs, the variations were 2.2, 3.1, 2.4, 2.2 and 1.1 % respectively for the PL, GL, NL, LPS 2-OH and 3-OH FAs.

Table 4.2 : Proportions (% of VS_{EPS}) of proteins, humic-like substances, carbohydrates, nucleic acids and FAs in the EPS extracted from whole sludges M₁ and M₂ by sonication and cation exchange resin.

Parameters		M ₁ EPS		M ₂ EPS		Proportions of polymers (% of VS _{EPS})	
Proteins	(mg g ⁻¹ VS _{Sludge})	68.8	± 0.6	63.2	± 4.8		
	(mg g ⁻¹ VS _{EPS})	552.6	± 4.8	315.8	± 23.8	43.4	± 16.7
Humic-like substances	(mg g ⁻¹ VS _{Sludge})	15.7	± 0.3	20.8	± 0.8		
	(mg g ⁻¹ VS _{EPS})	126.1	± 2.7	104.0	± 3.9	11.5	± 1.6
Carbohydrates	(mg g ⁻¹ VS _{Sludge})	14.9	± 0.5	15.8	± 0.4		
	(mg g ⁻¹ VS _{EPS})	119.7	± 4	79.0	± 1.9	9.9	± 2.9
Nucleic acids	(mg g ⁻¹ VS _{Sludge})		nd	21.9	± 0.5		
	(mg g ⁻¹ VS _{EPS})		nd	109.2	± 2.4	10.9	
Fatty acids	(mg g ⁻¹ VS _{Sludge})	2.05	± 0.96		nd		
	(mg g ⁻¹ VS _{EPS})	17.85	± 8.34		nd	1.8	
VS _{Sludge} (g L ⁻¹)		1.49	± 0.01	1.32	± 0.04		
VS _{EPS} (g g ⁻¹ VS _{Sludge})		0.171	± 0.01	0.197	± 0.007		

Mean ± SD (n=3), except for FAs extracted from the EPS of sludge M₁ (Mean ±SD ; n=2) ; nd, not determined.

4.2.2.3.3. Comparison of FAs in whole sludge and extracted EPS

M₂ Sludge was collected to further compare the FA profiles of lipid fractions between sludge (M₂ Sludge) and extracted EPS (M₂ EPS). As shown in Table 4.4, the PLFAs of both whole sludge and extracted EPS included more unsaturated acids than FAs of the other types. The saturated and branched-chain FAs were detected in nearly equal proportions of 23.5-28.4 %. Comparison of PLFA profiles between sludge and extracted EPS showed differences in the saturated, unsaturated, cyclopropane, *iso*- and middle-branched FAs (Table 4.4). The PLFAs of both whole sludge and extracted EPS were dominated by 16:0, monoenoic 16 and 18 carbon, and *i*-15:0 FAs, except for the *br*-19:1 acid which was more important in the PLFAs of sludge. These FAs represented 70-71 % of all PLFAs of sludge and extracted EPS. Branched-chain acids were dominated by *i*-15:0, *a*-15:0 and *br*-15 in EPS and sludge.

Moreover, the amount of branched-chain acids (*i*-15:0, *i*-16:0, *i*-17:0, *i*-18:0 and *br*-17:1) was slightly greater in the EPS than in the sludge. *i*-14:0, 10-Me-16:0, *br*-19:1 and TBSA were contained in only small proportions in the PLFAs of sludge and EPS, but *i*-14:0, *br*-19:1 and TBSA were found in greater proportion in the sludge. The unsaturated PLFAs contained a greater proportion of FAs, with 16 and 18 carbons found in different positions of the double bond, including 16:1n-9, 16:1n-7, 18:1n-7 and 18:1n-7t. The total amount of 16:1 FAs in the PLFAs of the sludge (26.7 %) was greater than in those of the EPS (20.6%). The cyclopropane FA percentage was greater in the sludge PLFAs. The total amount of 18:1 FAs in the PLFAs of the sludge (17.2 %) was less than in those of the EPS (24.6 %).

Consequently, the ratio of C18 to C16 FAs in the sludge PLFAs (0.58 ± 0.10 %) was less than in the same fraction of EPS (0.77 ± 0.01 %).

Table 4.3 : Proportions (% of FAs) of phospholipids (PLs), glycolipids (GLs), neutral lipids (NLs), lipopolysaccharides 3-hydroxy, 2-hydroxy (LPS 3-OH and LPS 2-OH) in lipids extracted from EPS of sludge M₁.

Parameters	mg g ⁻¹ VS _{EPS}			Proportions of polymers (% of FAs)		
PLs	18.95	±	2.53	20.94	±	6.78
GLs	55.28	±	28.33	61.09	±	5.86
NLs	14.45	±	8.03	15.97	±	1.36
LPS 3-OH	1.72	±	0.39	1.90	±	0.41
LPS 2-OH	0.09	±	0.01	0.10	±	0.02

For GLs and NLs, both the EPS and the sludge contained saturated and unsaturated FAs in particular (Tables 4.5 and 4.6), but their distribution was different from that obtained for PLFAs (Table 4.4). The GLFAs and NLFAs of the sludge and extracted EPS were dominated by 14:0, 16:0, 18:0 and monoenoic 16 and 18 carbon acids, representing 79-87 % of all acids. In the sludge, the GLFAs contained 3-fold, and NLFAs 1.8-fold, more branched-chain FAs than the same fractions of EPS. The most common acids were *i*-14:0, *i*-15:0, *i*-17:0, *a*-15:0, *a*-17:0, *br*-15 and *br*-19:1. The total amount of 16:1 FAs in the NLFAs of the sludge was greater than in those of extracted EPS, whereas the values obtained for sludge GLFAs were lower than those of extracted EPS. The total amount of 18:1 FAs in the GLFAs and NLFAs of the sludge was less than in the GLFAs and NLFAs of extracted EPS. Consequently, the ratio of C18 to C16 FAs in sludge GLFAs (0.89 ± 0.05) and NLFAs (0.61 ± 0.02) was less than in EPS GLFAs (1.14 ± 0.14) and (1.09 ± 0.05) NLFAs EPS. The GLFAs and NLFAs of both sludge and extracted EPS contained a few cyclopropane FAs (Tables 4.5 and 4.6).

The percentage of saturated, straight-chain 3-OH-FAs was greater in the LPS of extracted EPS (74.2 %) than of sludge (60.9 %) (Table 4.7), due mainly to the large amount of FAs with an even number of carbons. The dominating saturated and straight-chain 3-OH-FAs of EPS and sludge were 3-OH-10:0, 3-OH-12:0, 3-OH-14:0 and 3-OH-16:0. The sum of *iso*- and *anteiso*-branched 3-OH-FAs was greater in the sludge than in extracted EPS. The major *iso*-branched FAs contained 9 to 17 carbons, whereas the most common *anteiso*-branched acids were 3-OH-*a*-15:0 and 3-OH-*a*-17:0. There was fewer saturated, straight-chain LPS 2-OH-FAs in the EPS (75.6 %) than in the sludge (90.4 %) (Table 4.8), so that the proportion of short-chain acids 2-OH-10:0, 2-OH-11:0, 2-OH-12:0 and 2-OH-15:0 was greater in the EPS than in the sludge, contrary to the case of the long-chain acids 2-OH-22:0, 2-OH-23:0, 2-OH-24:0 and 2-OH-25:0 that dominate in the sludge. Instead, the proportion of branched-chain LPS 2-OH acids was greater in the EPS (24.4 %) than in the sludge (9.6 %), due mainly to the large amount of 2-OH-*i*-15:0 present in the EPS.

4.2.2.3.4. Comparison of FAs in EPS extracted from sludges collected in September and January

Two EPS extracts (M_1 EPS and M_2 EPS) were analysed to compare the seasonal effect on the FA composition of lipid fractions. Results presented in Tables 4.4-4.8 show differences in the FA profiles of the EPS extracted. The amount of unsaturated FAs in the PLs and GLs of the January sample, M_2 EPS, was greater than in the respective fractions of the September sample, M_1 EPS, (Tables 4.4 and 4.5), whereas that in NL was nearly equal in both samples (Table 4.6). The proportion of 16:1n-9, br-17:1, monoenoic C18 acids and 18:2n-6 in the PLFAs of M_2 EPS was higher than in those of M_1 EPS (Table 4.4). Cyclopropane FAs were only detected in the January sample M_2 EPS. The percentage of C15 to C20 saturated FAs in the PLs, GLs and NLs of M_1 EPS was equal to, or slightly higher than, that in M_2 EPS, which was compensated in particular by the increase in the short-chain 14:0 in M_2 EPS (Tables 4.4, 4.5 and 4.6). Consequently, the ratio of C18 to C16 FAs was higher in M_2 EPS (0.77 ± 0.01) than in M_1 EPS (0.49 ± 0.01). The PLs, GLs and NLs of M_1 EPS contained more branched-chain FAs than the same fractions of M_2 EPS, due to the greater or equal proportions of i-15:0, i-16:0, i-17:0, anteiso-17:0 and 10-Me-16:0 in M_2 EPS. In contrast, the amount of middle-branched (br-15, br-17:1) FAs was greater in the PLFAs and GLFAs of sample M_2 EPS than in those of sample M_1 EPS. For LPS 2-FAs and 3-OH-FAs, M_1 EPS contained more saturated FAs and fewer branched-chain FAs than M_2 EPS (Tables 4.7 and 4.8). The percentage of 3-OH-14:0 was much greater in M_1 EPS than in M_2 EPS, contrary to the case of M_1 EPS, in which the proportion of 2-OH-12:0 is smaller. The proportions of all branched-chain 3-OH-FAs in M_1 EPS were equal to or smaller than in M_2 EPS.

4.2.2.3.5. Comparison of FA profiles in whole sludges from different treatment plants

The two activated sludge samples (M_2 and T_1) were collected to compare the FA profiles of sludges originating from two different wastewater treatment plants (M_2 Sludge and T_1 Sludge). The even carbon FAs such as 16:0 and 18:0, monoenoic C16 and C18 acids, and i-15:0 and a-15:0 dominated the PL, GL and NL profiles of sludges collected in both wastewater treatment plants. However, the sum of unsaturated FAs in the PLs and GLs of T_1 Sludge was greater than in those of M_2 Sludge, contrary to the case of the NLFAs (Tables 4.4, 4.5 and 4.6). A remarkable amount of polyunsaturated FAs (18:2n-6, 20:2, 20:3 and 20:4) was found in the PLFAs, GLFAs, and NLFAs of T_1 Sludge, whereas 18:2n-6 was scarcely detected in lipid fractions of the M_2 Sludge. The small amount of polyunsaturated FAs in M_2 Sludge, and a similar amount in the M_2 Sludge sample which was smaller than that in the T_1 Sludge, may have led to the situation that C20 polyunsaturates were below the detection limit in the M_2 Sludge. The percentage of monoenoic C16 acids was higher in the PLFAs of T_1 sludge than in those of the M_2 Sludge, nearly equal in the GLFAs of both samples and lower in the NLFAs of the T_1 sludge than in the M_2 Sludge. The greatest proportion of cyclopropane acid cy-17:0 was detected in the PLFAs of the M_2 Sludge. The amount of saturated PLFAs and GLFAs was nearly the same for the two samples, whereas in the NLs more saturated FAs were detected in the T_1 Sludge. However, the ratio of C18 to C16 acids was almost the same in the T_1 Sludge PLFAs (0.47 ± 0.06) as in the M_2 Sludge PLFAs (0.58 ± 0.10). The PLFAs, GLFAs and NLFAs of the T_1 Sludge contained fewer branched-chain FAs than the same fractions of the

M₂ Sludge, due to the equal or lower proportions of nearly all *iso*- and *anteiso*-branched acids, and acids with unknown methyl branch positions (Tables 4.4, 4.5 and 4.6). In the LPS, the sum of branched-chain 3-OH acids was lower in the T₁ Sludge than in the M₂ Sludge (Table 4.7).

4.2.2.4. Discussion

4.2.2.4.1. Fatty acids of EPS

The EPS extracted from activated sludges was composed of proteins, carbohydrates, nucleic acids and humic-like substances, in agreement with the literature (Bura *et al.*, 1998; Frølund *et al.*, 1995, 1996; Jorand *et al.*, 1995b; Palmgren *et al.*, 1996; Urbain *et al.*, 1993a), and proteins were the main polymers recovered. Although the EPS extraction efficiency is unknown, the method combining sonication and cation exchange resin is considered to be one of the methods of choice for extracting the extracellular polymers to the extent that cell lysis is limited (Jahn and Nielsen, 1995; Jorand *et al.*, 1995b). The real amount of this EPS fraction (representing 18 % of VS_{Sludge}) associated with the cells may then be underestimated.

The EPS extracted contained 1.8 % FAs, a value similar to that in Dignac *et al.* (1998), where neutral lipids and phospholipids represented less than 1% of the total organic carbon of the extracted EPS. However, 22 % of the uncharacterized EPS could contain a large amount of lipids, which are not taken into account by the FA analysis, such as the non-FA moieties of lipid molecules, poly- β -hydroxyalkanoates (Odham *et al.*, 1986) and steroids containing no FAs (Fujii *et al.*, 2002).

Table 4.4 : Phospholipid FA compositions (wt %) in total sludges and extracted EPS.

Types of FA	M ₁ EPS	M ₂ EPS	M ₂ Sludge	T ₁ Sludge	T _{1bis} Sludge
Saturated					
14:0	4.13 ± 0.16	4.82 ± 0.03	4.62 ± 0.31	2.41 ± 0.33	2.88
15:0	1.51 ± 0.04	1.40 ± 0.09	1.86 ± 0.14	0.55 ± 0.16	0.65
16:0	19.82 ± 0.90	17.99 ± 0.01	11.90 ± 0.10	16.49 ± 0.68	15.57
18:0	4.34 ± 0.05	3.77 ± 0.05	4.83 ± 0.06	1.49 ± 0.51	2.17
20:0	0.57 ± 0.01	0.43 ± 0.06	0.29 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.13
<i>Total saturated</i>	<i>30.37 ± 0.83</i>	<i>28.41 ± 0.17</i>	<i>23.50 ± 0.33</i>	<i>20.99 ± 0.34</i>	<i>21.39</i>
Unsaturated					
14:1	0.28 ± 0.01	0.43 ± 0.22	0.48 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.23
15:1	nd	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.12
16:1n-5	1.52 ± 0.09	1.68 ± 0.33		2.17 ± 0.11	2.37
16:1n-7	15.10 ± 0.31	14.40 ± 0.06	26.68 ± 3.24 ^a	37.37 ± 4.07	31.66
16:1n-7t	1.36 ± 0.10	0.33 ± 0.06		nd	nd
16:1n-9	3.65 ± 0.07	4.15 ± 0.03		1.34 ± 0.69	2.49
br-17:1	nd	1.71 ± 0.13	0.29 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.22
18:1n-5	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.02		nd	0.14
18:1n-7	8.55 ± 0.21	15.27 ± 0.10	17.24 ± 1.93 ^b	9.85 ± 0.16	9.93
18:1n-7t	5.51 ± 0.06	6.86 ± 0.14		nd	nd
18:1n-9	1.08 ± 0.04	2.03 ± 0.12		8.45 ± 0.88	9.09
18:2n-6	0.27 ± 0.38	1.19 ± 0.03	nd	6.98 ± 0.58	7.35
br-19:1	nd	0.26 ± 0.03	7.04 ± 0.20	0.35 ± 0.05	0.58
20:2	nd	nd	nd	0.10 ± 0.03	0.12
20:3	nd	nd	nd	0.08 ± 0.02	0.11
20:4	nd	nd	nd	1.09 ± 0.09	1.12
<i>Total unsaturated</i>	<i>37.72 ± 0.74</i>	<i>48.89 ± 0.24</i>	<i>51.92 ± 1.10</i>	<i>68.17 ± 1.68</i>	<i>65.51</i>
Branched-chain					
<i>i</i> -14:0	0.65 ± 0.04	0.92 ± 0.02	2.57 ± 0.11	0.67 ± 0.13	0.85
<i>i</i> -15:0	16.46 ± 1.10	7.55 ± 0.04	7.03 ± 0.05	5.10 ± 0.42	5.64
<i>i</i> -16:0	4.30 ± 0.37	1.64 ± 0.07	nd	nd	nd
<i>i</i> -17:0	2.40 ± 0.03	1.48 ± 0.37	0.07 ± 0.04	0.41 ± 0.09	0.60
<i>i</i> -18:0	nd	1.15 ± 0.01	nd	nd	nd
<i>a</i> -15:0	3.63 ± 0.11	4.01 ± 0.37	3.95 ± 0.11	2.16 ± 0.27	2.58
<i>a</i> -17:0	1.87 ± 0.14	1.10 ± 0.12	1.11 ± 0.32	0.21 ± 0.07	0.31
br-15	1.19 ± 0.01	3.40 ± 0.22	3.88 ± 0.13	1.52 ± 0.19	1.96
br-17:0	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.32 ± 0.07	nd	nd
br-17:1	nd	1.71 ± 0.13	0.29 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.22
br-19:1	nd	0.26 ± 0.03	7.04 ± 0.20	0.35 ± 0.05	0.58
10-Me-16:0	1.10 ± 0.09	0.26 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07
TBSA	0.12 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.08
<i>Total branched-chain</i>	<i>31.91 ± 1.57</i>	<i>23.61 ± 0.12</i>	<i>26.66 ± 0.74</i>	<i>10.66 ± 1.29</i>	<i>12.89</i>
Cyclopropane					
cy-17:0	nd	0.75 ± 0.11	5.02 ± 0.25	0.53 ± 0.10	0.78
cy-19:0	nd	0.07 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.23
<i>Total cyclopropane</i>	<i>nd</i>	<i>0.82 ± 0.06</i>	<i>5.24 ± 0.28</i>	<i>0.69 ± 0.14</i>	<i>1.01</i>

Data are presented as mean ± SD, n=2; nd: not detected; (^a): Sum of C_{16:1} FAs; (^b): Sum of C_{18:1} FAs.

Table 4.5 : Glycolipid FA compositions (wt %) of total sludges and extracted EPS.

Types of FA	M ₁ EPS	M ₂ EPS	M ₂ Sludge	T ₁ Sludge	T ₁ bis Sludge
Saturated					
14:0	4.93 ± 0.06	5.88 ± 1.23	3.63 ± 0.22	4.76 ± 0.48	5.16
15:0	1.61 ± 0.02	1.35 ± 0.45	1.17 ± 0.08	1.23 ± 0.20	1.20
16:0	23.56 ± 0.25	21.01 ± 1.14	23.59 ± 1.21	27.66 ± 3.99	26.71
17:0	1.16 ± 0.01	tr	tr	0.74 ± 0.14	0.69
18:0	9.76 ± 0.35	9.55 ± 0.52	11.65 ± 0.01	9.72 ± 0.68	10.63
20:0	1.61 ± 0.04	0.57 ± 0.19	2.79 ± 0.37	nd	nd
Total saturated	42.62 ± 0.24	38.36 ± 1.24	42.83 ± 1.15	44.11 ± 4.81	44.39
Unsaturated					
14:1	0.35 ± 0.03	0.41 ± 0.07	0.25 ± 0.16	0.24 ± 0.02	0.21
15:1	nd	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07
16:1n-5	1.76 ± 0.08	0.90 ± 0.40	0.47 ± 0.03	1.51 ± 0.23	1.24
16:1n-7	13.62 ± 0.05	9.54 ± 0.86	9.82 ± 0.05	9.13 ± 1.01	10.29
16:1n-7t	1.27 ± 0.08	tr	0.21 ± 0.02	nd	nd
16:1n-9	4.35 ± 0.16	6.58 ± 2.30	1.43 ± 0.13	1.13 ± 0.15	0.80
br-17:1	nd	0.11 ± 0.05	0.79 ± 0.07	0.28 ± 0.11	0.22
18:1n-5	0.76 ± 0.02	33.81 ± 5.05 ^b	1.38 ± 0.32	2.60 ± 0.48	2.97
18:1n-7	14.72 ± 0.03		11.72 ± 0.02	5.37 ± 0.25	5.17
18:1n-7t	4.69 ± 0.14		5.37 ± 0.25	nd	nd
18:1n-9	2.07 ± 0.02		1.34 ± 0.07	13.91 ± 0.16	14.87
18:2n-6	0.35 ± 0.07	tr	tr	7.99 ± 0.36	9.27
br-19:1	0.58 ± 0.19	0.41 ± 0.26	4.34 ± 0.88	0.28 ± 0.14	0.16
20:2	nd	nd	nd	0.09 ± 0.00	0.10
20:3	nd	nd	nd	0.13 ± 0.01	0.04
20:4	nd	nd	nd	0.35 ± 0.04	0.43
Total unsaturated	44.53 ± 0.26	52.52 ± 3.55	37.40 ± 1.51	43.08 ± 1.55	45.84
Branched-chain					
i-14:0	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.19	0.92 ± 0.10	0.63 ± 0.15	0.56
i-15:0	6.03 ± 0.37	2.30 ± 0.60	5.03 ± 0.30	4.91 ± 1.45	3.76
i-16:0	1.84 ± 0.09	0.98 ± 0.48	1.95 ± 0.07	0.82 ± 0.19	0.35
i-17:0	1.18 ± 0.01	0.64 ± 0.19	0.93 ± 0.00	0.70 ± 0.19	0.55
i-18:0	nd	tr	0.50 ± 0.07	nd	nd
a-15:0	1.74 ± 0.03	1.70 ± 0.22	5.77 ± 0.32	2.61 ± 0.68	2.00
a-17:0	1.02 ± 0.03	0.63 ± 0.19	1.13 ± 0.05	0.57 ± 0.12	0.36
br-15	nd	0.77 ± 0.16	2.34 ± 0.02	1.20 ± 0.32	0.94
br-17:0	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.06	tr	nd	nd
br-17:1	nd	0.11 ± 0.05	0.79 ± 0.07	0.28 ± 0.11	0.22
br-19:1	0.58 ± 0.19	0.41 ± 0.26	4.34 ± 0.88	0.28 ± 0.14	0.16
10-Me-16:0	0.23 ± 0.02	0.13 ± 0.04	tr	0.35 ± 0.11	0.29
TBSA	0.21 ± 0.01	tr	nd	0.44 ± 0.01	0.52
Total branched-chain	13.43 ± 0.68	8.32 ± 2.36	23.78 ± 0.16	12.79 ± 3.47	9.69
Cyclopropane					
cy-17:0	nd	1.09 ± 0.31	0.93 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.39
cy-19:0	nd	0.18 ± 0.05	nd	0.09 ± 0.01	0.07
Total cyclopropane	nd	1.26 ± 0.35	0.93 ± 0.03	0.58 ± 0.06	0.46

Data are presented as mean ± SD, n=2; nd: not detected; (^a): Sum of C_{16:1} FAs; (^b): Sum of C_{18:1} FAs.

Table 4.6 : Neutral lipid FA compositions (wt %) of total sludges and extracted EPS.

Types of FA	M ₁ EPS	M ₂ EPS	M ₂ Sludge	T ₁ Sludge	T _{1 bis} Sludge
Saturated					
14:0	4.65 ± 0.31	9.08 ± 0.19	7.07 ± 0.47	5.06 ± 0.66	5.53
15:0	1.26 ± 0.27	1.49 ± 0.04	2.09 ± 0.24	0.68 ± 0.18	1.00
16:0	25.25 ± 1.96	23.40 ± 0.89	19.47 ± 0.52	37.70 ± 5.26	24.90
17:0	1.26 ± 0.03	tr	tr	0.45 ± 0.03	0.48
18:0	10.48 ± 1.73	9.18 ± 0.36	10.54 ± 0.65	10.14 ± 0.73	9.36
20:0	0.78 ± 0.04	0.49 ± 0.06	0.95 ± 0.07	0.73 ± 0.24	1.24
<i>Total saturated</i>	<i>43.68 ± 3.10</i>	<i>43.65 ± 1.15</i>	<i>40.12 ± 1.95</i>	<i>54.76 ± 4.89</i>	<i>42.52</i>
Unsaturated					
14:1	0.57 ± 0.07	0.79 ± 0.14	1.89 ± 0.29	0.24 ± 0.16	0.45
15:1	nd	0.15 ± 0.01	0.28 ± 0.09	0.14 ± 0.06	0.24
16:1n-5	0.95 ± 0.19	0.72 ± 0.16		0.91 ± 0.05	1.22
16:1n-7	7.75 ± 1.30	6.34 ± 0.05	26.13 ± 1.26 ^a	8.73 ± 1.49	12.12
16:1n-7t	0.75 ± 0.11	0.19 ± 0.10		nd	nd
16:1n-9	5.04 ± 0.40	7.22 ± 0.17		0.38 ± 0.54	0.38
br-17:1	nd	0.39 ± 0.20	0.18 ± 0.03	nd	0.09
18:1n-5	0.64 ± 0.16	0.70 ± 0.48		1.19 ± 1.42	2.67
18:1n-7	21.34 ± 0.22	25.92 ± 0.74	15.97 ± 0.13 ^b	5.45 ± 0.03	5.43
18:1n-7t	5.65 ± 0.09	3.11 ± 0.50		nd	nd
18:1n-9	2.72 ± 0.01	0.24 ± 0.11		14.37 ± 0.89	13.45
18:2n-6	0.62 ± 0.12	2.26 ± 0.16	tr	8.91 ± 2.19	13.63
br-19:1	3.35 ± 0.28	0.61 ± 0.06	1.25 ± 0.06	nd	0.04
20:2	nd	nd	nd	0.29 ± 0.04	0.32
20:3	nd	nd	nd	0.03 ± 0.02	0.06
20:4	nd	nd	nd	0.47 ± 0.08	0.74
<i>Total unsaturated</i>	<i>49.39 ± 2.20</i>	<i>48.64 ± 1.21</i>	<i>47.04 ± 3.52</i>	<i>41.16 ± 3.92</i>	<i>50.86</i>
Branched-chain					
<i>i</i> -14:0	0.34 ± 0.08	0.38 ± 0.02	1.30 ± 0.21	0.19 ± 0.13	0.44
<i>i</i> -15:0	2.47 ± 0.38	1.46 ± 0.06	3.96 ± 0.61	1.53 ± 0.25	2.50
<i>i</i> -16:0	0.77 ± 0.13	0.59 ± 0.05	nd	nd	nd
<i>i</i> -17:0	1.04 ± 0.09	0.49 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.44
<i>i</i> -18:0	nd	nd	tr	nd	nd
<i>a</i> -15:0	1.12 ± 0.14	1.31 ± 0.10	3.05 ± 0.54	0.86 ± 0.18	1.56
<i>a</i> -17:0	0.64 ± 0.03	0.52 ± 0.01	0.69 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.40
br-15	nd	0.64 ± 0.14	2.05 ± 0.35	0.32 ± 0.34	0.32
br-17:0	0.11 ± 0.02	0.53 ± 0.07	0.12 ± 0.10	nd	nd
br-17:1	nd	0.39 ± 0.20	0.18 ± 0.03	tr	0.09
br-19:1	3.35 ± 0.28	0.61 ± 0.06	1.25 ± 0.06	nd	0.05
10-Me-16:0	0.38 ± 0.04	0.46 ± 0.25	0.11 ± 0.03	tr	0.06
TBSA	0.08 ± 0.00	0.28 ± 0.02	tr	0.32 ± 0.04	0.45
<i>Total branched-chain</i>	<i>10.28 ± 1.18</i>	<i>7.65 ± 0.30</i>	<i>13.36 ± 1.53</i>	<i>3.85 ± 0.97</i>	<i>6.30</i>
Cyclopropane					
cy-17:0	nd	1.01 ± 0.01	0.86 ± 0.03	0.28 ± 0.06	0.43
cy-19:0	nd	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.05	nd	0.04
<i>Total cyclopropane</i>	<i>nd</i>	<i>1.06 ± 0.03</i>	<i>0.91 ± 0.08</i>	<i>0.28 ± 0.06</i>	<i>0.46</i>

Data are presented as mean ± SD, n=2; nd: not detected; (^a): Sum of C_{16:1} FAs; (^b): Sum of C_{18:1} FAs.

Table 4.7 : Lipopolysaccharide 3-OH FA compositions (wt %) in total sludges and extracted EPS.

Types of FA	M ₁ EPS	M ₂ EPS	M ₂ Sludge	T ₁ Sludge	T _{1 bis} Sludge
Saturated					
-OH-8:0	1.00 ± 0.22	1.57 ± 0.03	1.99 ± 0.06	1.15 ± 0.03	1.11 ± 0.09
-OH-9:0	0.21 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.08 ± 0.01	nd	nd
-OH-10:0	14.67 ± 3.06	14.74 ± 0.77	13.35 ± 0.63	13.96 ± 0.33	13.23 ± 0.15
-OH-11:0	0.41 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01
-OH-12:0	17.71 ± 0.12	23.68 ± 0.18	13.12 ± 0.24	12.18 ± 0.14	11.73 ± 0.02
-OH-14:0	33.63 ± 3.43	16.87 ± 0.38	11.68 ± 0.79	17.26 ± 0.22	16.80 ± 0.28
-OH-15:0	1.30 ± 0.04	1.21 ± 0.06	1.47 ± 0.08	1.46 ± 0.03	1.39 ± 0.08
-OH-16:0	10.54 ± 0.36	11.33 ± 0.06	14.44 ± 0.73	16.00 ± 0.24	16.47 ± 0.14
-OH-17:0	1.44 ± 0.12	1.42 ± 0.03	1.48 ± 0.15	1.30 ± 0.01	1.26 ± 0.06
-OH-18:0	2.70 ± 0.43	2.18 ± 0.03	2.72 ± 0.39	2.01 ± 0.04	1.96 ± 0.04
-OH-19:0	0.16 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	nd	nd
-OH-20:0	0.18 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Total saturated	83.95 ± 0.96	74.21 ± 0.08	60.87 ± 1.92	65.67 ± 0.21	64.87 ± 0.01
Unsaturated					
-OH-14:1	0.15 ± 0.21	0.95 ± 0.06	0.52 ± 0.01	0.28 ± 0.06	0.30 ± 0.03
-OH-18:1	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.30 ± 0.16	0.54 ± 0.05
Total unsaturated	0.22 ± 0.23	1.05 ± 0.10	0.76 ± 0.04	0.59 ± 0.21	0.84 ± 0.11
Branched-chain					
-OH- <i>i</i> -9:0	tr	tr	3.80 ± 2.52	nd	nd
-OH- <i>i</i> -10:0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.29 ± 0.01	nd	nd
-OH- <i>i</i> -11:0	0.82 ± 0.12	1.53 ± 0.16	2.21 ± 0.16	nd	nd
-OH- <i>i</i> -12:0	1.15 ± 0.09	2.80 ± 0.05	2.85 ± 0.15	1.04 ± 0.08	1.00 ± 0.04
-OH- <i>i</i> -13:0	0.56 ± 0.02	0.62 ± 0.01	1.14 ± 0.10	0.75 ± 0.05	0.72 ± 0.05
-OH- <i>i</i> -14:0	0.69 ± 0.08	0.81 ± 0.01	1.04 ± 0.11	0.58 ± 0.02	0.51 ± 0.01
-OH- <i>i</i> -15:0	3.90 ± 0.14	5.45 ± 0.19	9.90 ± 0.30	10.28 ± 0.52	10.65 ± 0.20
-OH- <i>i</i> -16:0	0.58 ± 0.03	1.06 ± 0.02	1.98 ± 0.24	1.80 ± 0.02	1.74 ± 0.08
-OH- <i>i</i> -17:0	6.52 ± 0.04	9.92 ± 0.03	10.96 ± 0.21	13.49 ± 1.11	14.29 ± 0.17
-OH- <i>i</i> -18:0	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.46 ± 0.03
-OH- <i>a</i> -9:0	tr	tr	0.02 ± 0.01	nd	nd
-OH- <i>a</i> -11:0	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.02	nd	nd
-OH- <i>a</i> -13:0	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02
-OH- <i>a</i> -15:0	0.59 ± 0.01	0.98 ± 0.02	1.66 ± 0.22	1.92 ± 0.36	1.99 ± 0.08
-OH- <i>a</i> -17:0	0.70 ± 0.19	1.21 ± 0.01	2.06 ± 0.04	3.30 ± 0.11	3.27 ± 0.12
Total branched-chain	15.83 ± 0.72	24.72 ± 0.01	38.37 ± 1.96	33.74 ± 0.01	34.82 ± 1.13

Data are presented as mean ± SD (n = 2); nd: not detected; tr: trace amount.

Table 4.8 : Lipopolysaccharide 2-OH FA compositions (wt %) in total sludges and extracted EPS.

Types of FA	M ₁ EPS	M ₂ EPS	M ₂ Sludge	T ₁ Sludge	T ₁ bis Sludge
Saturated					
-OH-10:0	nd	4.29 ± 0.15	1.00 ± 0.01	0.54 ± 0.30	0.28 ± 0.01
-OH-11:0	nd	2.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.51 ± 0.05
-OH-12:0	51.24	9.06 ± 0.75	2.13 ± 0.03	3.70 ± 0.04	2.75 ± 0.20
-OH-13:0	7.39	nd	nd	nd	nd
-OH-14:0	15.30	10.87 ± 0.53	10.60 ± 0.59	7.96 ± 0.31	6.69 ± 0.57
-OH-15:0	nd	1.01 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.79 ± 0.09	0.66 ± 0.05
-OH-16:0	20.26	13.67 ± 0.26	16.15 ± 0.32	15.86 ± 1.20	14.56 ± 1.17
-OH-17:0	0.44	0.99 ± 0.10	0.25 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.05
-OH-19:0	nd	0.59 ± 0.05	tr	0.26 ± 0.10	0.18 ± 0.01
-OH-20:0	1.49	6.08 ± 0.55	3.47 ± 0.16	2.57 ± 0.28	2.54 ± 0.04
-OH-21:0	nd	1.37 ± 0.05	0.86 ± 0.07	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.02
-OH-22:0	nd	7.69 ± 0.39	12.37 ± 0.61	11.61 ± 1.43	12.61 ± 0.35
-OH-23:0	nd	2.70 ± 0.45	11.84 ± 0.18	6.20 ± 0.37	7.11 ± 0.06
-OH-24:0	nd	13.68 ± 0.73	26.63 ± 0.49	21.10 ± 1.06	24.96 ± 2.07
-OH-25:0	nd	1.01 ± 0.03	4.49 ± 0.15	2.20 ± 0.01	2.44 ± 0.01
-OH-26:0	nd	nd	nd	2.47 ± 0.17	2.82 ± 0.16
<i>Total saturated</i>	<i>96.10</i>	<i>75.25 ± 0.63</i>	<i>90.39 ± 0.56</i>	<i>76.75 ± 2.51</i>	<i>78.95 ± 0.21</i>
Branched-chain					
-OH- <i>i</i> -15:0	nd	21.44 ± 0.58	2.80 ± 0.08	17.24 ± 3.52	15.73 ± 0.01
-OH- <i>i</i> -16:0	nd	0.35 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.81 ± 0.03	0.68 ± 0.06
-OH- <i>i</i> -17:0	3.33	1.70 ± 0.09	nd	1.85 ± 0.30	1.40 ± 0.05
-OH- <i>a</i> -15:0	nd	1.00 ± 0.14	6.61 ± 0.44	2.47 ± 0.97	1.98 ± 0.65
-OH- <i>a</i> -17:0	0.57	0.27 ± 0.02	nd	0.87 ± 0.38	1.26 ± 0.87
<i>Total branched-chain</i>	<i>3.90</i>	<i>24.75 ± 0.83</i>	<i>9.61 ± 0.56</i>	<i>23.24 ± 2.51</i>	<i>21.05 ± 0.23</i>

Data are presented as mean ± SD (n = 2); nd: not detected; tr: trace amount.

4.2.2.4.2. Origin of lipid-bound FAs in activated sludge

Phospholipids, glycolipids, neutral lipids and lipopolysaccharides are major components of lipids, and could originate from three sources: (i) direct sorption by activated sludge of lipids (Quéménéur and Marty, 1994; Hwu *et al.*, 1998), such as other wastewater compounds (Crombie-Quilty and McLoughlin, 1983; Guellil *et al.*, 2001); (ii) cell lysis; and (iii) metabolism of micro-organisms (Finnerty, 1988; Galdiero *et al.*, 1993; King *et al.*, 1977). The FA distribution was relatively complex, possibly because of these three sources, as well as strong microbial and eukaryotic diversity (Seviour and Blackhall, 1999; Amann *et al.*, 1998) combined with environmental parameters, including oxygen, pH and temperature, which may exert an influence on the FA composition of micro-organisms (O'Leary and Wilkinson, 1988; Zelles *et al.*, 1993). Indeed, 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-7t FAs measured in both EPS and sludge have been found in seawater (Mudge *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1992) and wastewater (Quéménéur and Marty, 1994; Casado *et al.*, 1998; Dignac *et al.*, 2000). These could originate from vegetable fats, animal fats (Stefanoudaki *et al.*, 2000) and micro-organisms (Brennan, 1988; Dionisi *et al.*, 1999; O'Leary and Wilkinson, 1988; Rattray, 1988), unlike lipopolysaccharides which are likely to originate from the cell walls of gram-negative bacteria (Brennan, 1988; Munford *et al.*, 1980; Rivera *et al.*, 1988; Wilkinson, 1988).

4.2.2.4.3. Microbial relevance of FA signatures

PLFAs could be a marker of the viable microbial community, as they are quickly degraded by exogenous and endogenous phospholipases within minutes to hours once cells die (White *et al.*, 1979). Qualitatively, the FA profiles of total sludge and extracted EPS were similar for the PLs, GLs, NLs and LPS. Terminally-branched FAs such as *a*-15:0, and in the *i*-15:0 detected in the PLFAs of both EPS and sludges, are characteristic of many gram-positive bacteria (O'Leary and Wilkinson, 1988), but also of some gram-negative bacteria such as the sulphate-reducing bacteria (Boon *et al.*, 1977). The PLFAs *br*-17:0, *br*-17:1 and 10-Me-16:0 found in small amounts in both EPS and sludge are common in anaerobic sulphate-reducing bacteria of the genera *Desulfobacter* and *Desulfovibrio* (Guckert *et al.*, 1985; Taylor and Parkes, 1983). Tuberculostearic acid (TBSA), which generally indicates the presence of mycobacteria and actinomycetes (Brennan, 1988), was not observed in large amounts in EPS or sludge PLFAs, GLFAs or NLFAs. In EPS and sludge, monoenoic 16- and 18-carbon PLFAs are indicative of prokaryotes, and, in particular, 18:1n-7 is considered to result from anaerobic prokaryotic biosynthesis (Schweizer *et al.*, 1989; Wilkinson, 1988). The 18:2n-6, 20:2, 20:3 and 20:4 FAs found in small amounts indicated the presence of microeukaryotes including yeasts and fungi (Rattray, 1988). Thus, these sludges were made up of a very diverse microbial community, which included gram-positive and gram-negative bacteria, the *Desulfobacter* and *Desulfovibrio* genera of sulphate-reducing bacteria, actinomycetes, and yeast and fungi. Some relations between the FA signatures in EPS and sludge and the presumptive bacteria are summarized in Table 4.9.

Table 4.9 : Presumptive origin of phospholipid FAs (PLFA) found in sludge and EPS (Sample M₂).

Fatty acid signatures found in EPS and sludge	Presumptive origin	References
<i>br</i> -15:0, 15:0, 15:1, <i>br</i> -17:0, 17:0, 17:1, <i>br</i> -17:1 and <i>br</i> -19:1	Bacteria	Rajendran <i>et al.</i> (1997)
16:1, 16:0, 18:1, <i>cy</i> -17:0 and <i>cy</i> -19:0	Gram-negative bacteria	Basile <i>et al.</i> (1995)
<i>a</i> -15:0, <i>i</i> -15:0	Sulphate-reducing bacteria	Boon <i>et al.</i> (1977)
<i>br</i> -17:0, <i>br</i> -17:1 and middle-chain monoenoic	Anaerobic <i>Desulfovibrio</i> type sulphate-reducing bacteria	Guckert <i>et al.</i> (1985)
10-Me-16:0	<i>Desulfobacter</i> type sulphate-reducing bacteria	Wilkinson (1988)
<i>a</i> -15:0, <i>i</i> -15:0, and 17:0	Gram-positive bacteria	O'Leary and Wilkinson (1988)
Tuberculostearic acid (TBSA)	Mycobacterium, Actinomycetes	Brennan (1988)
16:1 n-7c, 16:1 n-5t, 18:1 n-7 and 18:1 n-8c	Bacteria anaerobic pathway, Methanotrophs	Bowman <i>et al.</i> (1993)
18:2n-6, 20:2, 20:3 and 20:4	Yeast, fungus, and microeukaryote aerobic pathway	Rattray (1988) White <i>et al.</i> (1996b)

The percentages of monounsaturated FAs were higher in the PLs and GLs of EPS than in the same fractions of the sludge. The amounts of 3-OH-12:0 and 3-OH-14:0, common for the LPS of gram-negative bacteria, were also greater in the EPS than in the sludge. Indeed, gram-negative bacteria are known to excrete LPS extracellularly (Wilkinson, 1988). In contrast, the proportion of methyl-branched acids in sludge GLFAs was higher than in EPS GLFAs. *Iso*- and *anteiso*-branched acids are commonly related to gram-positive bacteria and glycolipids to gram-positive actinomycetes (Brennan, 1988). However, due to the small amount of TBSA, actinomycetes of the genus *Mycobacterium* seemed not to be very common in the sludge or the EPS.

The differences in the PLFA profiles of EPS and sludge may also be indicative of differences in the physiological states of the microbes in the samples. The amount of *cy*-17:0 was greater in the sludge PLFAs than in those of the EPS. These cyclopropane FAs are synthesised in particular in the stationary growth phase or in stress conditions such as low pH, high incubation temperature and ion concentration (Gorgan and Cronan, 1997). In addition, the ratio of C18 to C16 FAs in sludge PLFAs was smaller than in those of EPS. The lower ratio of C18 to C16 FAs has been found in free-living bacteria as compared to those adhered (Valeur *et al.*, 1988). The amount of long-chain 2-OH FAs with 22 to 25 carbons was also greater in the LPS of sludge than in that of EPS. Long-chain hydroxy FAs are found in anaerobic lake sediments (Keinänen *et al.*, 2003).

4.2.2.4.4. Seasonal effects on EPS lipids

In EPS extracted from sludges collected from the same treatment plant in September and January, few differences were observed in the FAs of lipid fractions, which could reflect a microbial response, and could be partly attributed to bacterial community compositional changes and/or microbial physiological responses. The wastewater treatment plant was not controlled, and so these differences could also be attributed to a multi-parametric effect (Table 4.1). The EPS extracted from the sample collected in January contained more unsaturated PLFAs (16:1n-9, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:1n-7t, 18:2n-6) than that collected in September. This increase could be a typical phenomenon of temperature adaptation in membrane lipids (Denich *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 2000; Suutari *et al.*, 1990), which could not be seen in the NLFAs. In addition, the higher proportion of cyclopropane FAs and ratio of C18/C16 acids in the EPS PLFAs of the January sample could be related to an adaptation to stress, such as a temperature decrease and consequently a slower microbial growth (Gorgan and Cronan, 1997; Valeur *et al.*, 1988). In winter conditions, the bacterial communities seemed to contain more bacteria in a physiologically stressed state. By contrast, differences in the community structure of gram-negative bacteria with monoenes (Wilkinson, 1988) can also be assumed, due to differences in the LPS OH-FA profiles of the EPS between January and September. The proportion of gram-positive bacteria, suggested by the *iso*- and *anteiso*-branched signatures (Brennan, 1988), was elevated in the August EPS sample compared to that collected in January. The *Desulfobacter* spp. were found in a higher proportion in September, and the *Desulfovibrio* spp. in January, as suggested by the 10-Me-16:0 and br-17:1 signatures (Boon *et al.*, 1977; Taylor and Parkes, 1983).

4.2.2.4.5. Lipids in whole sludges from two different wastewater treatment plants

The comparison of the lipid profiles from two wastewater treatment plants showed differences in microbial community structures. The PLFAs of T₁ Sludge from Toul and M₂ Sludge from the Maxéville wastewater treatment plant indicated that both had gram-negative bacteria with monoenes (Nichols *et al.*, 2000; Wilkinson, 1988) among the dominating microbial groups. However, the M₂ Sludge contained methyl-branched FAs more typical for gram-positive bacteria (Brennan, 1988) than T₁ Sludge, whereas the latter was characterized with eukaryotes having 18:2n-6, 20:2, 20:3 and 20:4 (Ratray, 1988; White *et al.*, 1996b). The T₁ Sludge contained fewer bacteria in a stressed physiological state, as suggested by the low values of the cyclopropane FA signatures and ratio of C₁₈/C₁₆ acids. The wastewater treatment plants were not controlled, and these differences could be attributed to a multi-parametric effect such as the wastewater composition, different processes in the two wastewater treatment plants, sludge age and seasonal effect.

4.2.2.5. Conclusion

In conclusion, our work was aimed at analysing the lipid-bound FAs associated with EPS extracted from activated sludge. The fractionation of PL, GL, NL and LPS by this method has apparently not been used before for sludge and EPS analysis. This method showed good repeatability, however,

except for the single FAs present in very low proportions. Lipid-bound FAs accounted for 1.8% of extracted EPS, and were distributed as a function of their polarities between GL, PL and NL, and to a lesser extent LPS. Despite their low proportion, lipids could bring important properties to the EPS, such as hydrophobicity. Lipid-bound FAs were made up of methyl-branched, saturated, unsaturated and cyclopropane FAs. The distribution of FAs was variable in the PL, GL, NL and LPS fractions. The source of lipids associated with EPS remains uncertain. However, on the basis of differences in PLFA between EPS and sludge, it is tempting to assume that the EPS extraction selectively co-extracted a group of. The activated sludge contained a diverse community of micro-organisms such as gram-negative and gram-positive bacteria, actinomycetes and eukaryotes. Moreover, the unsaturated PLFAs showed an increase in numbers in winter, and changes in cyclopropane FA signatures and the ratio of C₁₈/C₁₆ could suggest a more stressed microbial physiological status. The comparison between the two wastewater treatment plants showed that the whole activated sludges were dominated by similar types of FAs. Nevertheless, some signatures were different, and showed that one plant contained fewer gram-positive bacteria (as suggested by *i*-15:0, *i*-17:0, *a*-15:0 and *a*-17:0 signatures) and more microeukaryotes including yeasts and fungi (as suggested by 18:2n-6 and C20 polyunsaturates) than the other plant, gram-negative bacteria being common to both plants.

Acknowledgements

This work was carried out in the framework of the "Contrat de Plan État-Région Lorraine" (CPER), and the "Zone Atelier du Bassin de la Moselle" (ZAM), and was also funded by the Research Federation "Eau-Sol-Terre" (Nancy, France) and the "Ministère de l'Éducation Nationale" (Paris, France).

4.3. Analyse des acides gras des sédiments de rivière

4.3.1. Introduction

Dans les eaux naturelles comme l'eau de rivière, le devenir des polluants organiques dépend en partie de leur adsorption par les matières en suspension et les sédiments de rivière. Means et Wijayaratne (1982) suggèrent que les colloïdes naturels sont importants dans le transport des pesticides (atrazine et linuron) dans les environnements aquatiques. Les sulfonates d'alkylbenzène retrouvés dans l'eau de rivière à des dizaines de kilomètres de leur point de décharge (Rapaport et Eckhoff, 1990) pourraient être transportés associés à des colloïdes naturels. L'adsorption des composés organiques dépend des caractéristiques physiques et chimiques des colloïdes naturels (Rao *et al.*, 1993) et des caractéristiques physico-chimiques de l'eau de rivière (pH et conductivité) (Means et Wijayaratne, 1982).

L'étude comparative entre les agrégats fluviaux et les agrégats biologiques trouvés dans les systèmes industriels révèle une organisation similaire, mais la composition globale est quantitativement différente (Liss *et al.*, 1996). Les particules en suspension sont des structures très hétérogènes et dynamiques (Lartiges *et al.*, 2001), aussi les distributions de taille varient de 2 à 62 µm (Jorand *et al.*, 1995b; Rao *et al.*, 1993). Les particules en suspension proviennent de l'agrégation de micro-flocs et peuvent être décrits par une géométrie de nature fractale de dimension moyenne 2,4 (Stone et Krishnappan, 2003). Ces particules en suspension sont composées de colloïdes inorganiques, de débris biogéniques, de cellules bactériennes et de polymères extracellulaires (Beveridge *et al.*, 1993; Droppo *et al.*, 1997; Droppo *et al.*, 1996; Lartiges *et al.*, 2001; Leppard, 1997; Leppard et Burnison, 1990; Liss *et al.*, 1996).

L'analyse de biomarqueurs comme les acides gras des phospholipides a permis de caractériser la communauté microbienne présente dans de nombreux systèmes naturels comme les sédiments (Mudge *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1997; Smoot et Findlay, 2001; Tunlid *et al.*, 1989; Virtue *et al.*, 1996; White *et al.*, 1979), les sols (Bai *et al.*, 2000; Frostegård *et al.*, 1991; Zelles et Bai, 1993), les boues activées (Cha *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 2003; Werker et Hall, 1998; Werker *et al.*, 2003), les biofilms (Keinänen *et al.*, 2002; Keinänen *et al.*, 2003; Suutari *et al.*, 1997), les eaux naturelles (Mills *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 1992), le compost (Klamer et Bååth, 1998) et la tourbe (Rannekleiv et Bååth, 2003). L'analyse complémentaire des acides gras hydroxylés des lipopolysaccharides (LPS) donne une information complémentaire de la communauté bactérienne présente dans un écosystème (Zelles et Bai, 1993), car les LPS entrent essentiellement dans la composition de la membrane externe des bactéries à gram négatif (Lüderitz *et al.*, 1982; Wilkinson, 1988). L'analyse des acides gras des LPS dans les biofilms de réseau de distribution d'eau potable montre une communauté prédominée par les bactéries à gram négatif (Keinänen *et al.*, 2002), mais aussi dans les sédiments (Parker *et al.*, 1982), les estuaires et les plages (Saddler et Wardlaw, 1980). L'analyse des acides gras des phospholipides donne des renseignements complémentaires sur l'état physiologique des micro-organismes. Les micro-organismes adaptent la composition des acides gras

des phospholipides face à des stress environnementaux, comme la variation brutale de la température (de Rosa *et al.*, 1974; Jahnke *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 2000; Suutari *et al.*, 1990; Suutari et Laasko, 1994), de la concentration en oxygène (de Rosa *et al.*, 1974; Jahnke et Nichols, 1986; Mazumder *et al.*, 2000), d'un stress chimique (Balagué *et al.*, 2001; Blank *et al.*, 1991; Halverson et Firestone, 2000; Heipieper *et al.*, 1992, 1995; Macnaughton *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000; Sykkema *et al.*, 1995) et de la carence (Guckert *et al.*, 1986; Wick *et al.*, 2002).

Le but de cette étude était de caractériser et comparer les sédiments et les matières en suspension (MES) de la rivière Moselle en amont et en aval de la zone de rejet de la station de traitement des eaux usées urbaines de Liverdun (54, France). L'originalité de ce travail repose sur la technique de prélèvements des matières en suspension de l'eau de rivière par une centrifugation en continu directement sur le terrain. Aussi, nous avons mesuré les acides gras des phospholipides (PL), des glycolipides (GL), des lipides neutres (NL) et les acides gras hydroxylés en position 2- et 3- des lipopolysaccharides (LPS). Pour des raisons pratiques, l'étude des acides gras a été limitée à ceux ayant un nombre d'atomes de carbone entre 14 et 20 pour les PL, GL et NL. Les lipides ont été extraits des sédiments et des MES par une combinaison de solvants organiques (Bligh et Dyer, 1959) et fractionnés sur une colonne de silice activée (King *et al.*, 1977) et le contenu des acides gras de chacune des fractions a été déterminé par une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Keinänen *et al.*, 2002). Afin de simplifier l'importante quantité de données concernant les acides gras, les résultats ont été traités par une analyse statistique multivariée de type analyse des composantes principales afin de réduire le nombre de variables.

Protocole

Des sédiments de rivière et des matières en suspension ont été prélevés en amont (le 06 août 2003) et en aval (le 05 août 2003) de la zone de rejet de la station d'épuration de traitements des eaux usées urbaines de Liverdun (54, France) pendant une période de forte sécheresse (Figure 4.3).

Les sédiments ont été prélevés manuellement avec une louche en aluminium à 1,5 m du bord de la rive et à une profondeur d'eau de 1,5 m après élimination des gros débris (galets) déposés sur le fond de la rivière. Les sédiments ont été séparés avec un tamis de 2 mm de maille et ont été placés dans un réfrigérateur à 8 °C jusqu'au retour au laboratoire. Les sédiments ont ensuite été congelés à -80 °C et lyophilisés.

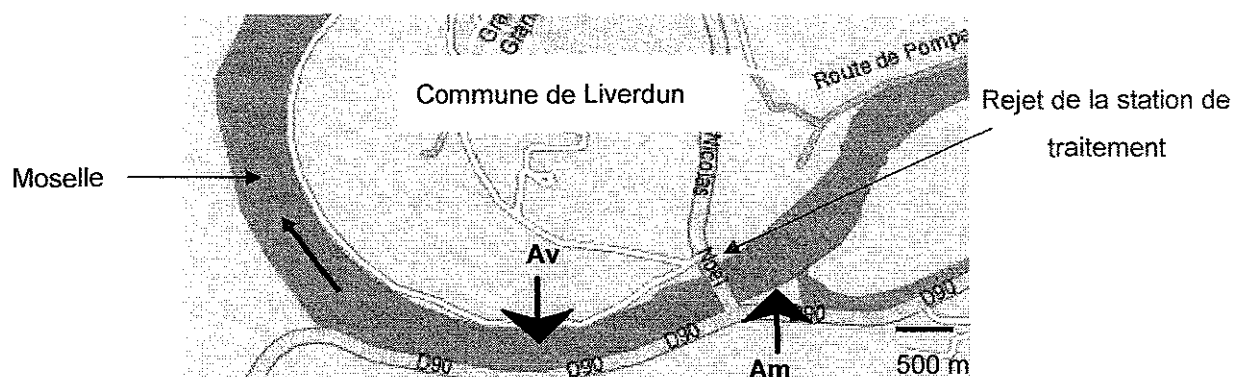


Figure 4. 3 : Zones de prélèvement situées en amont (Am) et en aval (Av) de la zone de rejet de la station de traitement des eaux usées urbaines de Liverdun.

Les prélèvements de matières en suspension (MES) ont été effectués à l'aide d'un tuyau muni d'un flotteur et d'une pompe à eau à 4 m du bord de la rive et entre 20 à 30 cm sous la surface de l'eau et à une distance d'au moins 1,5 m du fond de la rivière. Les MES ont été récupérées dans l'eau de rivière par une centrifugation (Cepa Padberg, Allemagne) à 17000 tours min^{-1} en continu à la température ambiante. Le débit de pompage de l'eau de rivière a été réglé à 1 $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$. Après 5 h de pompage (soit un prélèvement de 5000 L d'eau de rivière) et de centrifugation, les MES ont été recueillies en récupérant les trois bandes de téflon qui tapissent les parois du séparateur placés dans la centrifugeuse. Les MES ont été placées dans des flacons en verre préalablement passés à 550 °C pendant 3,5 h pour éviter les risques de contamination et ont été placés à 8 °C jusqu'au retour au laboratoire, puis les MES ont été congelées à -80 °C et lyophilisées.

Les flacons contenant les MES et les sédiments lyophilisés sont hermétiquement fermés sous un flux d'azote pour éviter les risques d'oxydation des acides gras. Les lipides ont été extraits des sédiments et des MES (cf. § 3.8.1) séparés en fonction de leur polarité sur une colonne de silice activée en phospholipides (PL), glycolipides (GL), lipides neutres (NL) et lipopolysaccharides (LPS) (cf. § 3.8.2 et § 3.8.3) et ces fractions ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (cf. § 3.8.4). Les résultats de l'analyse des acides gras ont été traités par une analyse des composantes principales (cf. § 3.9.2).

De l'eau de rivière a été prélevée et caractérisée au début et à la fin de la période de prélèvement des matières en suspension par les mesures de la température, de la turbidité, des matières sèches et volatiles, le pH, la conductivité, la concentration en oxygène et le carbone organique dissous (cf. § 3.3). Les prélèvements d'eau de rivière ont été effectués entre la crépine de prélèvement et la pompe de prélèvement de l'eau de rivière.

4.3.2. Caractéristiques globales de l'eau de rivière et des matières en suspension (MES) au lieu des prélèvements

L'eau de rivière au niveau des deux zones de prélèvements présente des caractéristiques similaires (Tableau 4.10). Les valeurs moyennes des paramètres mesurés varient légèrement au cours de la journée.

Tableau 4.10 : Caractéristiques de l'eau de rivière au cours des prélèvements (Moyenne $\pm$ écart-type ; n = 3 mesures).

Prélèvement	Amont	Aval
Température air (°C)	29,2	30,4 $\pm$ 2,6
Température eau (°C)	26,9 $\pm$ 0,9	26,5 $\pm$ 0,6
pH	8,3 $\pm$ 0,1	8,6 $\pm$ 0,1
Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	530 $\pm$ 2	526 $\pm$ 3
Turbidité (NTU)	10 $\pm$ 3	8,5 $\pm$ 0,5
Oxygène (mg L^{-1})	3,8 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 1,3
COD (mg L^{-1})	5,4 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,3
TS (mg L^{-1})	550 $\pm$ 68	525 $\pm$ 43
VS (mg L^{-1})	122 $\pm$ 26	100 $\pm$ 33

Les matières en suspension et les sédiments de rivière ont été caractérisés par Aude-Valérie Jung et Philippe Lambert du Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, UMR 7569 CNRS-INPL, France) dans le cadre de leur étude. Aussi, le matériel et les méthodes expérimentales ne sont pas détaillées et seuls les résultats marquants concernant ces caractérisations sont présentés dans ce manuscrit.

La comparaison des spectres infra-rouge à transformée de Fourier, rayons X et de fluorescence des MES prélevées en amont et en aval ne montre pas de différence qualitative. A titre d'exemple, les spectres infra-rouge à transformée de Fourier réalisé en mode transmission des MES prélevées en amont et en aval sont présentés dans la Figure 4.4.

Par contre, l'analyse des cations des MES amont et aval par spectrométrie de masse et d'émission montre quelques différences quantitatives pour certains métaux (Tableau 4.11). D'une façon marquante, les matières en suspension (MES) prélevées en aval contiennent 4,8 fois plus de Cd, 4 fois plus de Cu, 2,6 fois plus de Ni, 5,9 fois plus de Zn et 5,7 fois plus de Pb que les MES amont. Ces métaux lourds sont certainement rejetés dans la rivière avec les eaux usées et originaires, pour certains d'entre eux, des conduites de distribution d'eau pour le cuivre ou d'alliages pour le Ni et le Zn (Carr et Herr, 1989).

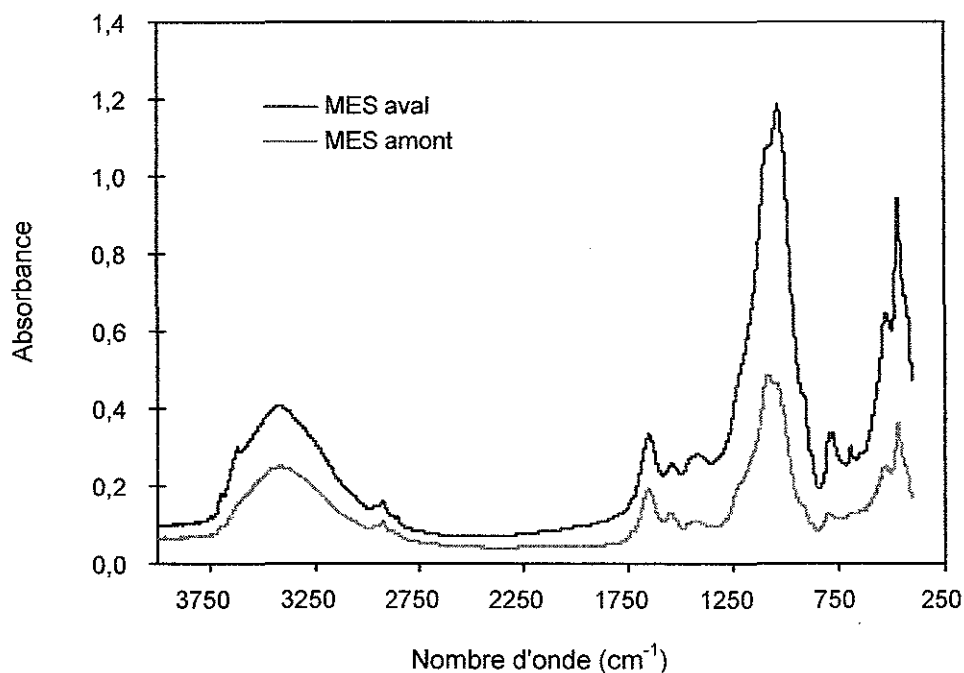


Figure 4.4 : Spectres infra-rouge à transformée de Fourier réalisés en transmission des MES prélevées en amont et en aval de la zone de rejet de la station d'épuration.

Tableau 4.11 : Quantités des métaux ($\mu\text{g L}^{-1}$) montrant des différences entre les MES prélevées en amont et en aval de la zone de rejet de la station d'épuration.

MES	Amont	Aval
Cd	0,12	0,57
Cu	2,45	9,82
Ni	3,27	8,51
Pb Total	< LD	0,06
Zn	18,09	106,13

LD : Limite de Détection

La séparation des différents constituants des sédiments en fonction de leur vitesse de sédimentation dans une colonne de caractéristiques définies et ainsi de leur taille montre que les sédiments de rivière sont essentiellement composés de sable fin et grossier (Tableau 4.12). Néanmoins, les sédiments de la zone aval possèdent une proportion supérieure de sable fin, du même ordre de grandeur pour les argiles et inférieure pour les limons fins et grossiers et les sables grossiers. Cette distribution des constituants dans les différentes fractions peut être due à la configuration du lit mineur de la rivière (la partie immergée du pied de la berge était nettement moins pentue pour le prélèvement aval qu'amont). De plus, les spectres rayon X des sédiments amont et aval sont similaires.

Tableau 4.12 : Séparation des constituants des sédiments prélevés en amont et en aval de la zone de rejet de la station d'épuration en fonction de leur taille. (*Sables : particules de granulométrie comprise entre 50 μm et 2 mm ; Limons : 2 à 50 μm ; Argiles : < 2 μm (Robert, 1996).*)

Proportions (%)	Amont	Aval
Sables fins	36,4	61,2
Sables grossiers	25,4	14,0
Limons fins	6,6	4,1
Limons grossiers	5,1	4,1
Argiles	3,4	4,2
Particules > 50 μm	23,1	12,4

4.3.3. Composition des lipides des sédiments de rivière et des matières en suspension (MES)

La quantité d'acides gras dans les MES est supérieure à celle dans les sédiments probablement du fait d'une part minérale plus importante dans les sédiments que dans les MES. De plus, les prélèvements amont (sédiments et MES) contiennent une quantité moins importante d'acides gras que les prélèvements aval (sédiments et MES) (Tableau 4.13).

Les prélèvements réalisés en aval de la zone de rejet de la station d'épuration contiennent une plus grande quantité d'acides gras que la zone amont suggérant une influence de la zone de rejet de la station d'épuration de Liverdun renforcé par la présence des métaux lourds mesurés en quantité plus importante dans les MES aval. Néanmoins, les prélèvements ont été effectués pendant une période de canicule occasionnant un débit de la rivière très faible (non mesurable expérimentalement) suggérant une stagnation des eaux au niveau de la zone de rejet. Des débits épisodiquement plus importants sont toutefois observés visuellement lors de l'ouverture de l'écluse présente en aval des zones de prélèvements. De plus, le débit des eaux usées épurées était de $820 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ et les caractéristiques des eaux usées épurées étaient de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de matières sèches en suspension et une demande chimique en oxygène de $74,7 \text{ mg L}^{-1}$.

Dans tous les échantillons (MES et sédiments), des phospholipides (PL), des glycolipides (GL) et des lipides neutres (NL) sont déterminés, mais aucun lipopolysaccharide (LPS) n'a pu être mis en évidence (Tableau 4.4). Les PL sont majoritaires, en proportion, dans les sédiments, suivi des GL et des NL et cette tendance est curieusement inversée pour les MES. Les proportions de PL, GL et de NL entre les prélèvements amont et aval pour les MES ou les sédiments sont du même ordre de grandeur, mais significativement différents au seuil de probabilité de 95 % ($p < 0,05$). De même, la comparaison par un test de Student sur l'ensemble des PL, GL et NL montre que les sédiments amont ou aval sont significativement différents au seuil de probabilité de 99 % des MES amont ou aval.

Tableau 4.13 : Quantités de lipides et proportions de phospholipides (PL), de glycolipides (GL), de lipides neutres et de lipopolysaccharides (LPS) dans les sédiments et les matières en suspension de rivière en amont et en aval de la zone de rejet d'eaux usées épurées de la station d'épuration.

	Sédiments		Matières en suspension	
	Amont	Aval	Amont	Aval
Acides gras ($\mu\text{g g}^{-1}$ de lyophilisat)	68 $\pm$ 7	122 $\pm$ 6	54746 $\pm$ 5705	85320 $\pm$ 4094
PL (%)	57,1 $\pm$ 1,3	47,4 $\pm$ 1,6	16,3 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 0,4
GL (%)	23,0 $\pm$ 1,7	28,1 $\pm$ 0,5	34,5 $\pm$ 1,0	29,1 $\pm$ 0,8
NL (%)	19,9 $\pm$ 2,2	24,4 $\pm$ 1,3	49,2 $\pm$ 0,6	59,7 $\pm$ 1,3
LPS (%)	nd	nd	nd	nd

nd : non détecté ; Moyenne $\pm$ écart-type (n = 3 mesures).

Les quantités respectives d'acides gras des PL mesurées dans les sédiments amont, les sédiments aval, les MES amont et les MES aval sont de 38,7, 57,9, 8923,6 et 9560,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de lyophilisat. Il n'est pas possible de revenir à la concentration d'acides gras présente dans les eaux de rivière car la totalité des MES n'a pas pu être récupérée à l'intérieure de la centrifugeuse, ce qui induit une erreur importante dans la détermination de la masse des MES obtenue après 5 h de centrifugation en continu.

Ces valeurs s'écartent largement de celles obtenues dans les sédiments marins dans lesquels les acides gras des PL représentaient 0,7 à 1,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de sédiment sec (Rajendran *et al.*, 1997). Ces quantités plus importantes peuvent être dues au fait que la température de l'eau de rivière est plus élevée ce qui favorise la croissance des algues et des micro-organismes. L'estimation de la quantité de biomasse basée sur la quantité de PL n'a pas été réalisée car les échantillons issus de l'environnement contiennent une grande diversité de micro-organismes, à laquelle s'ajoute la contribution des eucaryotes et des pollutions anthropiques éventuelles. Gérin et Goutx (1993) et Goutx (1994) montrent que les quantités de lipides dans des eaux de mer sont variables et varient de 9 à 113 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour la fraction soluble et de 3 à 84 $\mu\text{g L}^{-1}$ pour la fraction particulaire. Gérin et Goutx (1993) et Goutx (1994) proposent qu'un écosystème jeune possède une proportion importante de phospholipides (constituants membranaires) et faible de lipides neutres (constituants de réserves), alors qu'un écosystème mature possède une proportion plus importante de lipides neutres et plus faible de PL. Ceci sous-entendrait que les sédiments constitueraient plutôt un écosystème jeune, alors que les MES formeraient plutôt un écosystème mature.

4.3.4. Comparaison des zones de prélèvements (amont et aval) par une analyse en composantes principales (ACP)

L'ensemble des acides gras peut être comparé simultanément par le traitement des données par une analyse statistique multivariée du type analyse en composantes principales. Cette analyse des acides gras des PL est largement utilisée pour séparer des échantillons de sols (Bai *et al.*, 2000), de sédiments (Keinänen *et al.*, 2002; White *et al.*, 1996b), de compost (Klamer and Bååth, 1998). Mais, le

traitement des données par une ACP permet également le suivi de la dynamique d'une population bactérienne (Werker and Hall, 2001), de différencier des communautés bactériennes modèles (Haack *et al.*, 1994) et la séparation d'une biomasse en suspension d'une biomasse sous forme de biofilms (Werker and Hall, 1998). Aussi, les échantillons de sédiments (amont et aval) et de MES (amont et aval) sont séparés en fonction de la composition des acides gras de chacune des fractions (PL, GL ou/et NL) par une analyse des composantes principales. Les proportions des différents acides gras des PL, des GL et des NL sont présentés dans les Tableaux 4.14, 4.15 et 4.16 (pages 102, 103 et 104). Les analyses ACP reposent sur la présence ou l'absence des acides gras et sont réalisées en utilisant les valeurs de chaque acide gras (pourcentage des acides gras totaux).

L'analyse en composantes principales en utilisant l'ensemble des acides gras des PL permet (i) selon la composante principale 1, qui explique 74,6 % des résultats, de faire la séparation entre les MES et les sédiments : les MES possèdent des valeurs de scores négatives et les sédiments des valeurs de scores positives et (ii) selon la composante principale 2, qui explique 14,6 % des résultats, de séparer de la zone de prélèvement amont et aval (Figure 4.5). De plus, chacun des réplicats de chaque échantillon (MES et sédiments) a été traité indépendamment par une analyse en composantes principales. La Figure 4.5 montre que les triplicats de chacun des échantillons sont proches et ainsi sont considérés homogènes.

Les acides gras 18:0, i-13:0, i-14:0, i-15:0, i-16:0, i-17:0, a-13:0, a-15:0, a-17:0, br-19:1, 15:1, 16:1n-5, 16:1n-7t, 16:1n-7c, 16:1n-9, 18:1n-5, 18:1n-7, 20:1, 20:4^a, cy-17:0 et cy-19:0 des PL sont plus communément trouvés dans les sédiments que les MES (Figure 4.6). Par contre, les acides gras 16:0, 20:0, 14:1, br-15:1, 18:1n-9, 18:2 et 18:3 sont plutôt caractéristiques des MES prélevées en amont et les acides gras 14:0, 15:0, TBSA, br-17:0, 16:3, 20:3 et 20:4^b sont plutôt caractéristiques des MES prélevées en aval.

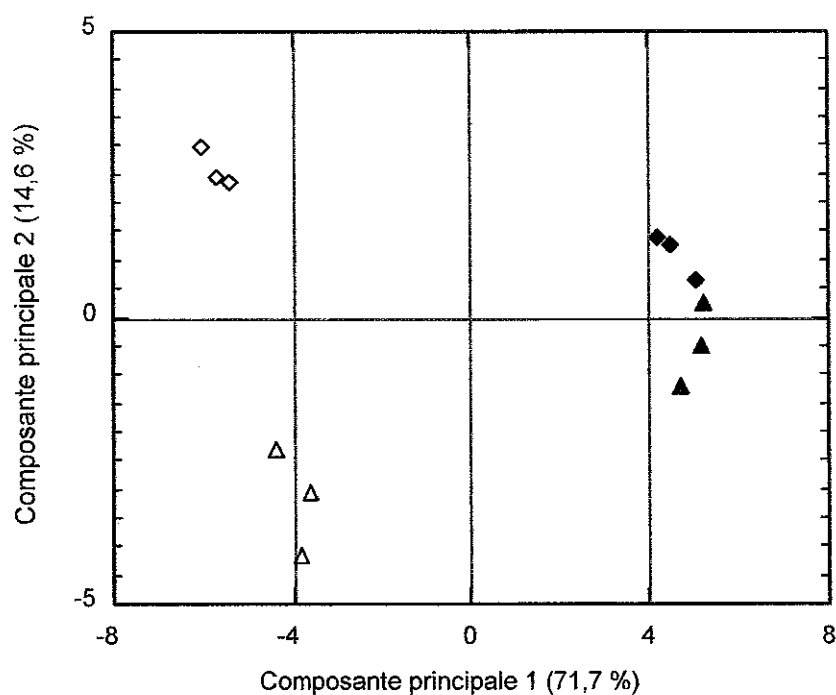


Figure 4.5 : Représentation des valeurs des scores des différents échantillons (Sédiments amont (▲) et aval (◆) et Matières en suspension amont (△) et aval (◇)) dans l'espace vectoriel des composantes principales 1 et 2 obtenus par une analyse en composantes principales à partir des acides gras des phospholipides.

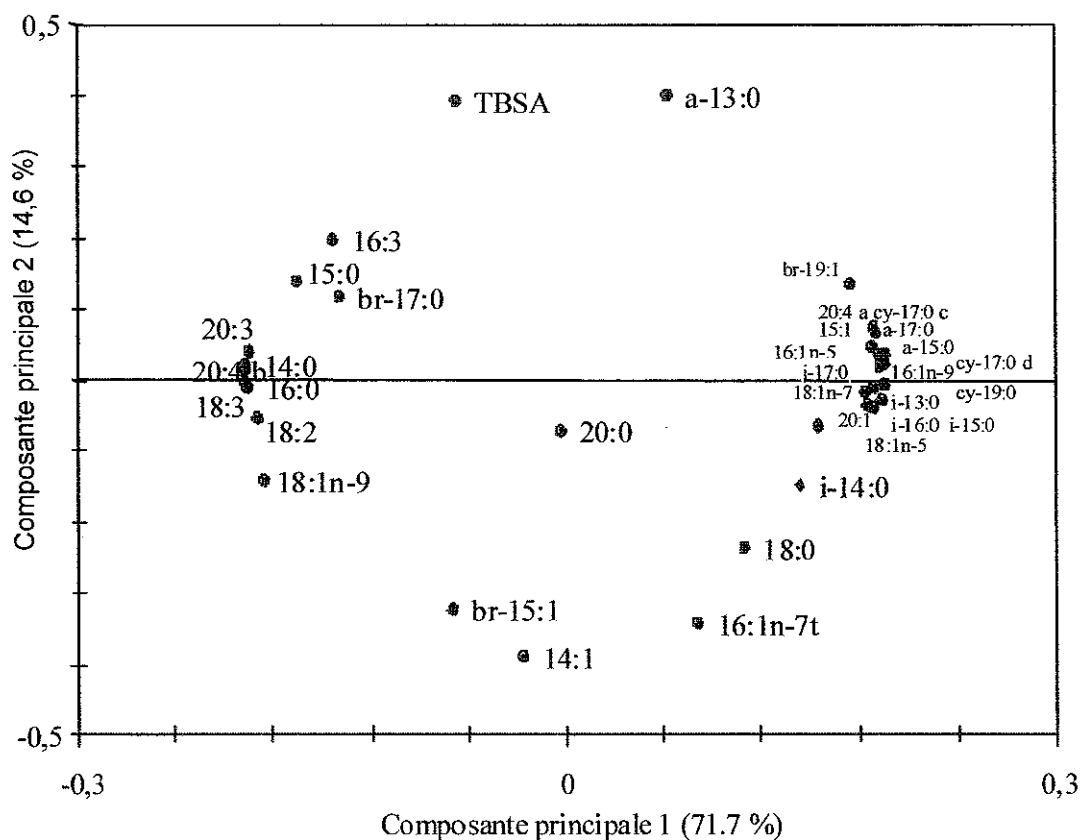


Figure 4.6 : Représentation des valeurs de "loading" des acides gras des phospholipides des différents échantillons dans le repère composante principale 1 – composante principale 2.

La séparation d'échantillon par une analyse en composantes principales reposant sur la présence ou l'absence des acides gras des GL et des NL a été également envisagée et montre que la composition des acides gras des GL (Figure 4.7) ou des NL (Figure 4.8) permet également la séparation des 4 types d'échantillons. Les triplicats sont plus homogènes dans le cas des NL que des GL. Les matières en suspension amont et aval sont moins bien séparées par l'ACP quand les acides gras des lipides neutres sont utilisés, mais les acides gras des lipides neutres permettent de mieux séparer les sédiments amont et aval. Les acides gras des GL 14:0, 16:0, i-16:0, br-17:0, 16:1n-7t, 16:1n-9, 18:1n-9, 16:3, 18:3 et 20:3 sont plus communs dans les matières en suspension. De même, les acides gras des NL 16:0, 17:0, i-16:0, 16:1n-7c, 16:1n-7t, 16:3, 18:3, 20:3 et 20:4 sont plutôt caractéristiques des matières en suspension.

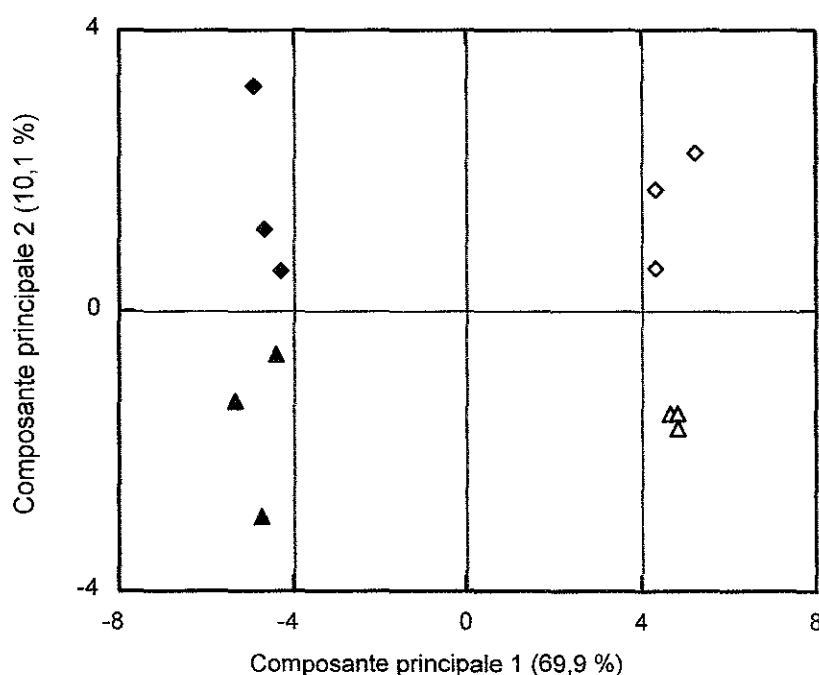


Figure 4. 7 : Représentation des valeurs des scores des différents échantillons (Sédiments amont (▲) et aval (◆), Matières en suspension amont (△) et aval (◇)) dans l'espace vectoriel des composantes principales 1 et 2 obtenus par une analyse en composantes principales à partir des acides gras des glycolipides.

L'intégralité des acides gras des PL, des GL et des NL permet également de séparer clairement les 4 échantillons, mais n'apporte pas plus d'informations supplémentaires que l'analyse seulement basée sur les acides gras des PL par ACP. De plus, il n'est pas possible de répartir les différents acides gras des PL, GL et NL entre les échantillons comme pour le cas des PL car l'importante quantité d'acides gras reportée sur la représentation graphique est difficilement lisible.

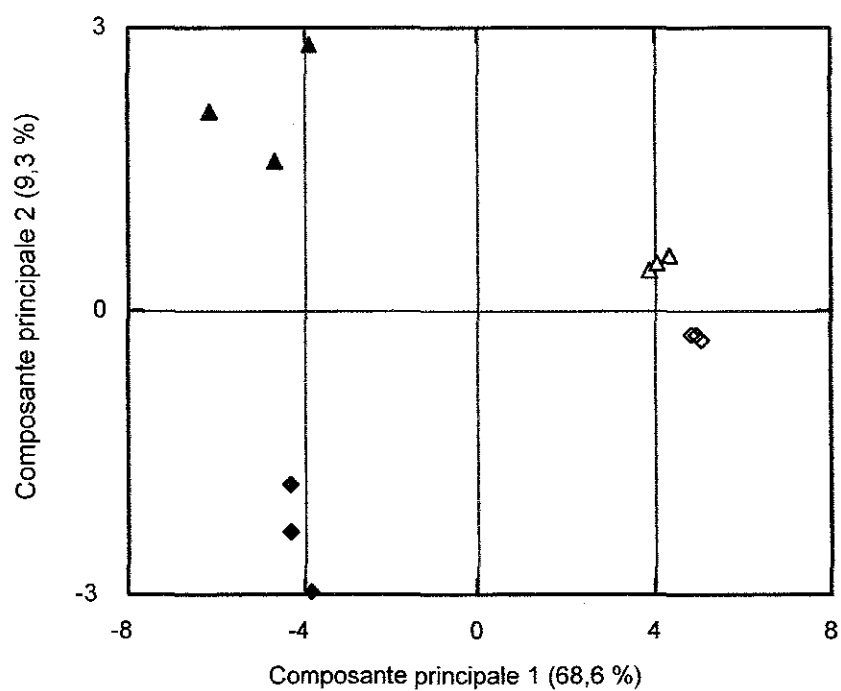


Figure 4. 8 : Représentation des valeurs des scores des différents échantillons (Sédiments amont (▲) et aval (◆), Matières en suspension amont (△) et aval (◇)) dans l'espace vectoriel des composantes principales 1 et 2 obtenus par une analyse en composantes principales à partir des acides gras des lipides neutres.

Tableau 4.14 : Proportions (% en masse) des acides gras des phospholipides des sédiments et des matières en suspension de rivière en aval et en amont de la zone de rejet de la station de Liverdun (Moyenne $\pm$ Écart-type, n=3 mesures).

	Sédiments		Matières en suspension	
	Aval	Amont	Aval	Amont
Saturés				
14:0	3,51 $\pm$ 0,34	2,66 $\pm$ 0,09	12,70 $\pm$ 0,62	10,70 $\pm$ 0,89
15:0	1,31 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,05	1,39 $\pm$ 0,06
16:0	22,59 $\pm$ 0,44	20,56 $\pm$ 0,84	33,07 $\pm$ 0,12	31,96 $\pm$ 0,10
18:0	2,39 $\pm$ 0,06	3,49 $\pm$ 0,61	1,84 $\pm$ 0,05	2,67 $\pm$ 0,61
20:0	0,26 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,04
Total Saturés	30,06 $\pm$ 0,68	28,13 $\pm$ 1,44	49,43 $\pm$ 0,60	47,01 $\pm$ 0,42
Ramifiés				
i-13:0	0,15 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01
i-14:0	1,28 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,08
i-15:0	5,44 $\pm$ 0,11	5,34 $\pm$ 0,28	1,38 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,15
i-16:0	1,24 $\pm$ 0,10	1,28 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,01
i-17:0	1,29 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,05
a-13:0	0,10 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,00
a-15:0	5,50 $\pm$ 0,02	5,87 $\pm$ 0,28	0,52 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,06
a-17:0	1,07 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,04
br-15:1	0,33 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,08
br-17:0	nd	nd	0,29 $\pm$ 0,11	0,15 $\pm$ 0,25
br-19:1	0,59 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,16
TBSA	0,20 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,01
Total ramifiés	16,27 $\pm$ 0,12	16,22 $\pm$ 0,62	5,01 $\pm$ 0,42	6,35 $\pm$ 0,31
Insaturés				
14:1	0,07 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,02
br-15:1	0,33 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,08
15:1	0,39 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,03
16:1n-5	2,31 $\pm$ 0,06	3,09 $\pm$ 0,28	0,60 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,08
16:1n-7c	23,01 $\pm$ 1,41	21,06 $\pm$ 0,84	20,75 $\pm$ 0,32	18,30 $\pm$ 1,20
16:1n-7t	1,29 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,15	nd	1,61 $\pm$ 0,16
16:1n-9	1,28 $\pm$ 0,21	1,42 $\pm$ 0,18	0,14 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,06
16:3	1,36 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,26	1,80 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,06
18:1n-5	0,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02	nd	0,04 $\pm$ 0,03
18:1n-7	8,81 $\pm$ 0,40	9,93 $\pm$ 0,28	3,83 $\pm$ 0,36	4,98 $\pm$ 0,34
18:1n-9	5,02 $\pm$ 0,21	5,82 $\pm$ 0,38	9,29 $\pm$ 0,19	10,27 $\pm$ 0,71
18:2	1,50 $\pm$ 0,04	2,17 $\pm$ 0,38	4,37 $\pm$ 0,19	4,09 $\pm$ 0,33
18:3	nd	nd	0,94 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,09
br-19:1	0,59 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,16
20:1	1,54 $\pm$ 0,44	3,36 $\pm$ 0,21	0,65 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,54
20:3	nd	nd	0,20 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02
20:4 ^a	nd	nd	0,92 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,03
20:4 ^b	2,95 $\pm$ 0,06	2,50 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,02
Total insaturés	50,60 $\pm$ 0,13	52,72 $\pm$ 0,91	45,16 $\pm$ 0,35	46,26 $\pm$ 0,65
Cyclopropanes				
cy-17:0	0,70 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01
cy-17:0	1,93 $\pm$ 0,44	1,76 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,06	tr
cy-19:0	0,44 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01
Total cyclopropane	3,07 $\pm$ 0,51	2,92 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,07

^a et ^b : position de la double liaison différente, mais non identifiée ; ^a : acide gras différent des 20:4 trouvés dans les boues ; ^b : acide gras identique à celui présent dans les boues.

Tableau 4.15 : Proportions (% en masse) des acides gras des glycolipides des sédiments et des matières en suspension de rivière en aval et en amont de la zone de rejet de la station de Liverdun (Moyenne $\pm$ Écart-type, n=3 mesures).

	Sédiment		Matières en suspension	
	Aval	Amont	Aval	Amont
Saturés				
14:0	4,92 $\pm$ 0,12	4,88 $\pm$ 0,18	12,76 $\pm$ 0,30	14,16 $\pm$ 0,31
15:0	2,02 $\pm$ 0,16	1,38 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,03
16:0	24,91 $\pm$ 0,35	23,52 $\pm$ 0,52	30,93 $\pm$ 2,37	28,04 $\pm$ 0,59
17:0	0,86 $\pm$ 0,28	0,93 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,02
18:0	4,44 $\pm$ 0,49	3,82 $\pm$ 3,30	0,63 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,10
20:0	1,55 $\pm$ 0,08	1,22 $\pm$ 0,13	nd	nd
Total saturés	38,70 $\pm$ 0,62	35,76 $\pm$ 3,64	45,56 $\pm$ 2,42	44,31 $\pm$ 0,26
Ramifiés				
i-13:0	0,09 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	nd	0,01 $\pm$ 0,00
i-14:0	0,36 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01
i-15:0	2,01 $\pm$ 0,10	2,59 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,05
i-16:0	0,71 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,06	2,30 $\pm$ 0,44	3,29 $\pm$ 0,26
i-17:0	0,84 $\pm$ 0,11	1,15 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,35	0,56 $\pm$ 0,01
a-13:0	tr	tr	nd	nd
a-15:0	1,36 $\pm$ 0,02	1,77 $\pm$ 0,24	tr	0,09 $\pm$ 0,00
a-17:0	0,49 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,08	nd	nd
br-15:1	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	tr	0,04 $\pm$ 0,01
br-17:0	nd	nd	0,31 $\pm$ 0,27	0,61 $\pm$ 0,17
br-19:1	tr	0,02 $\pm$ 0,04	tr	nd
TBSA	nd	nd	nd	nd
Total ramifiés	5,95 $\pm$ 0,08	7,84 $\pm$ 0,38	3,31 $\pm$ 1,16	5,10 $\pm$ 0,32
Insaturés				
14:1	tr	tr	tr	0,12 $\pm$ 0,02
br-15:1	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	tr	0,04 $\pm$ 0,01
15:1	0,19 $\pm$ 0,05	tr	tr	0,03 $\pm$ 0,00
16:1n-5	0,70 $\pm$ 0,13	1,08 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,19	0,30 $\pm$ 0,09
16:1n-7c	29,32 $\pm$ 0,75	29,14 $\pm$ 1,55	21,03 $\pm$ 1,31	19,42 $\pm$ 0,64
16:1n-7t	2,20 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,31	7,81 $\pm$ 2,15	7,08 $\pm$ 0,41
16:1n-9	tr	0,29 $\pm$ 0,15	0,29 $\pm$ 0,25	0,66 $\pm$ 0,10
16:3	3,93 $\pm$ 0,56	2,39 $\pm$ 0,29	6,29 $\pm$ 0,44	6,88 $\pm$ 0,11
18:1n-5	nd	nd	nd	nd
18:1n-7	2,09 $\pm$ 0,30	2,88 $\pm$ 0,38	0,26 $\pm$ 0,44	0,36 $\pm$ 0,63
18:1n-9	4,38 $\pm$ 0,17	5,86 $\pm$ 0,64	7,12 $\pm$ 0,53	8,57 $\pm$ 0,67
18:2	2,34 $\pm$ 0,13	3,76 $\pm$ 0,36	1,18 $\pm$ 0,05	1,31 $\pm$ 0,07
18:3	0,53 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,03	2,75 $\pm$ 0,28	2,27 $\pm$ 0,02
br-19:1	tr	tr	tr	nd
20:1	0,41 0,31	0,35 0,30	tr	nd
20:3	tr	tr	3,84 $\pm$ 0,55	3,51 $\pm$ 0,09
20:4 ^a	tr	tr	tr	nd
20:4 ^b	7,99 $\pm$ 0,19	7,54 $\pm$ 0,24	0,06 $\pm$ 0,06	nd
Total insaturés	54,44 $\pm$ 0,49	55,53 $\pm$ 3,43	51,04 $\pm$ 1,19	50,56 $\pm$ 0,06
Cyclopropanes				
cy-17:0	0,55 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,13	tr	tr
cy-17:0	0,35 $\pm$ 0,30	0,55 $\pm$ 0,09	tr	nd
cy-19:0	0,02 $\pm$ 0,03	nd	nd	nd
Total cyclopropane	0,92 $\pm$ 0,22	0,87 $\pm$ 0,17	0,09 $\pm$ 0,08	0,02 $\pm$ 0,04

^a et ^b : position de la double liaison différente, mais non identifiée ; ^a : acide gras différent des 20:4 trouvés dans les boues ; ^b : acide gras identique à celui présent dans les boues.

Tableau 4.16 : Proportions (% en masse) des acides gras des lipides neutres des sédiments et des matières en suspension de rivière en aval et en amont de la zone de rejet de la station de Liverdun (Moyenne $\pm$ Écart-type, n=3 mesures).

	Sédiment		Matières en suspension	
	Aval	Amont	Aval	Amont
Saturés				
14:0	6,51 $\pm$ 0,28	6,57 $\pm$ 0,26	10,53 $\pm$ 0,24	10,37 $\pm$ 0,21
15:0	2,79 $\pm$ 0,22	2,08 $\pm$ 0,20	1,55 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,07
16:0	27,31 $\pm$ 1,75	27,16 $\pm$ 1,46	34,52 $\pm$ 0,70	36,01 $\pm$ 0,16
17:0	nd	nd	0,27 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
18:0	2,39 $\pm$ 0,23	1,97 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,09	1,50 $\pm$ 0,08
20:0	1,22 $\pm$ 0,21	0,81 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,23	nd
Total saturés	40,22 $\pm$ 2,15	38,59 $\pm$ 1,57	48,09 $\pm$ 0,79	49,98 $\pm$ 0,46
Ramifiés				
i-13:0	0,36 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,02	nd	nd
i-14:0	0,36 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02
i-15:0	2,13 $\pm$ 0,10	2,47 $\pm$ 0,26	0,18 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
i-16:0	0,60 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,43	0,81 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,12
i-17:0	0,96 $\pm$ 0,24	2,73 $\pm$ 2,72	0,42 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,03
a-13:0	2,55 $\pm$ 0,60	1,91 $\pm$ 1,76	nd	nd
a-15:0	3,03 $\pm$ 0,24	4,08 $\pm$ 1,70	0,05 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
a-17:0	1,26 $\pm$ 0,18	1,98 $\pm$ 0,40	0,01 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00
br-17:0	nd	0,99 $\pm$ 0,20	nd	nd
br-15:1	0,31 $\pm$ 0,27	0,34 $\pm$ 0,31	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
br-19:1	nd	nd	nd	nd
TBSA	0,18 $\pm$ 0,16	0,22 $\pm$ 0,19	nd	nd
Total ramifiés	11,42 $\pm$ 0,90	15,73 $\pm$ 5,47	1,54 $\pm$ 0,05	2,08 $\pm$ 0,12
Insaturés				
14:1	nd	nd	nd	nd
br-15:1	0,31 $\pm$ 0,27	0,34 $\pm$ 0,31	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
15:1	1,40 $\pm$ 1,22	1,25 $\pm$ 1,09	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00
16:1n-5	0,78 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,08	0,39 $\pm$ 0,10
16:1n-7c	25,36 $\pm$ 1,31	23,65 $\pm$ 1,59	30,08 $\pm$ 0,53	28,09 $\pm$ 0,25
16:1n-7t	1,41 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,20	3,01 $\pm$ 0,31	2,68 $\pm$ 0,37
16:1n-9	nd	tr	nd	nd
16:3	1,20 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,14	2,47 $\pm$ 0,11	1,99 $\pm$ 0,14
18:1n-5	nd	nd	nd	nd
18:1n-7	1,97 $\pm$ 0,30	3,58 $\pm$ 0,33	0,94 $\pm$ 0,15	1,17 $\pm$ 0,14
18:1n-9	3,84 $\pm$ 0,64	5,49 $\pm$ 0,72	4,89 $\pm$ 0,22	5,80 $\pm$ 0,14
18:2	4,00 $\pm$ 2,51	3,28 $\pm$ 0,62	1,33 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,01
18:3	tr	nd	0,27 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,00
br-19:1	nd	nd	nd	nd
20:1	0,94 $\pm$ 1,02	0,19 $\pm$ 0,33	0,05 $\pm$ 0,08	nd
20:3	2,18 $\pm$ 1,52	0,42 $\pm$ 0,36	6,04 $\pm$ 0,29	5,60 $\pm$ 0,18
20:4 ^a	nd	nd	0,32 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,05
20:4 ^b	2,55 $\pm$ 0,57	1,66 $\pm$ 0,14	0,31 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,01
Total insaturés	45,96 $\pm$ 3,66	43,02 $\pm$ 3,34	50,24 $\pm$ 0,68	47,78 $\pm$ 0,32
Cyclopropanes				
cy-17:0	1,89 $\pm$ 0,19	1,86 $\pm$ 0,22	tr	0,12 $\pm$ 0,01
cy-19:0	0,51 $\pm$ 0,45	0,53 $\pm$ 0,46	nd	nd
Total cyclopropane	2,40 $\pm$ 0,63	2,66 $\pm$ 0,60	0,12 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,03

^a et ^b : position de la double liaison différente mais non identifiée ; ^a : acide gras différent des 20:4 trouvés dans les boues ; ^b : acide gras identique à celui présent dans les boues.

4.3.4.1. Composition des acides gras des phospholipides (PL) des échantillons

Les profils obtenus en CPG-SM des échantillons de sédiments et de MES révèlent une importante diversité d'acides gras présents avec un nombre d'atomes de carbones qui varie entre 14 et 20. 36 acides gras identiques sont cherchés dans chacune des classes (PL, GL et NL). Les acides gras sont séparés en saturés, insaturés, ramifiés (en position iso-, antéiso- ou centrale) et cyclopropane (Tableaux 4.14, 4.15 et 4.16).

Les matières en suspension contiennent une proportion plus importante d'acides gras saturés (en moyenne 48 %) que les sédiments (en moyenne 29 %) et ceci pour les deux points de prélèvement amont et aval (Tableau 4.14). Les sédiments contiennent un peu plus d'acides gras insaturés (51,7 %) que les matières en suspension (45,7 %). Ainsi, le rapport des acides gras insaturés et saturés est 1,9 fois supérieur pour les sédiments (1,78) que les matières en suspension (0,95) (Tableau 4.17). De même, les sédiments contiennent plus d'acides gras ramifiés (16,3 %) que les matières en suspension (5,7 %).

Les profils des acides gras des PL sont similaires entre les deux points de prélèvements pour les sédiments de rivière et les matières en suspension, mais certains acides gras diffèrent en proportion. Les 6 acides gras 16:0, 16:1n-7c, 18:1n-7, a-15:0, i-15:0 et 18:1n-9 représentent 70,4 et 68,6 % du total des acides gras des PL dans les sédiments de rivière en amont et en aval de la zone de rejet de la station de Liverdun (Tableau 4.14), alors que les 3 acides gras 16:0, 16:1n-7c, 18:1n-9 représentent respectivement 60,5 et 63,1 % du total des acides gras des PL des matières en suspension amont et aval. Les acides gras ramifiés des sédiments sont essentiellement composés des acides gras i-15:0 et a-15:0 représentant environ 70 % des acides gras ramifiés. Le rapport des acides gras antéiso- et iso- est plus important dans les sédiments (0,9) que dans les matières en suspension (0,3) (Tableau 4.17). Les acides gras br-17:0, 18:3, 20:4 et 20:3 ne sont pas déterminés dans les sédiments de rivière et les acides gras 16:1n-7t et 18:1n-5 ne sont pas déterminés dans les matières en suspension pour le prélèvement amont.

Tableau 4.17 : Rapports acides gras antéiso/iso, insaturés/saturés, C16/C18, 16:1n-7t/16:1n-7c, cy-19:0/18:1n-7 et cy-17:0/16:1n-7c

	Sédiments		Matières en suspension	
	Amont	Aval	Amont	Aval
antéiso/iso	0,92 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,00
insaturés/Saturés	1,88 ± 0,12	1,68 ± 0,04	0,98 ± 0,02	0,91 ± 0,02
C16/C18	2,24 ± 0,19	2,91 ± 0,20	2,40 ± 0,26	2,78 ± 0,10
16:1n-7t/16:1n-7c	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	-
cy-19:0/18:1n-7	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
cy-17:0/16:1n-7c	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

4.3.4.1.1. Informations taxonomiques obtenues par la comparaison des acides gras des phospholipides

Les acides gras des PL sont largement utilisés pour caractériser la communauté bactérienne présente dans des échantillons environnementaux (Conrad *et al.*, 2003; Haack *et al.*, 1994; Rajendran *et al.*, 1997). Ainsi, les sédiments (amont et aval) contiennent plus d'acides gras saturés ramifiés en position terminale (a-15:0, a-17:0, i-15:0 et i-17:0) et de fait sans doute plus de bactéries à gram positif que les matières en suspension (amont et aval). En effet, les acides gras ramifiés en position terminale comme les acides gras iso- et antéiso- sont considérés être des indicateurs de la présence des bactéries à gram positif dans les échantillons (Basile *et al.*, 1995; O'Leary et Wilkinson, 1988; Zelles et Bai, 1993), mais aussi des bactéries sulfato-réductrices (Boon *et al.*, 1977) et sont absents des bactéries à gram négatif (Gharaibeh et Voorhees, 1996). White *et al.* (1979) montrent la présence des *Clostridium* dans les sédiments. La séparation des bactéries à gram positif et à gram négatif sur la base de la totalité des profils des acides gras des phospholipides est néanmoins possible (Ingram *et al.*, 2003; Whittaker *et al.*, 2003). Les acides gras 14:0, 16:1, 18:1, 15:0, cy-19:0 et cy-17:0 et la forte proportion de l'acide gras 16:0 présents dans tous nos échantillons sont caractéristiques des bactéries à gram négatif (Barshick *et al.*, 1999; Basile *et al.*, 1995; Gharaibeh et Voorhees, 1996). Les acides gras mono-énoïques comme 16:1 et 17:1 présents dans nos échantillons sont considérés comme des biomarqueurs des bactéries à gram négatif (Wilkinson, 1988). Cependant, les acides gras hydroxylés en position 2 et 3 des lipopolysaccharides, sont caractéristiques des bactéries à gram négatif (Lüderitz *et al.*, 1982). Les LPS sont généralement mesurés dans les sédiments (Keinänen *et al.*, 2003; White *et al.*, 1996b), néanmoins ils sont facilement dégradés dans les sédiments des estuaires (Saddler et Wardlaw, 1980), ce qui peut expliquer le fait qu'ils ne sont pas déterminés dans nos essais ou que leur quantité était trop faible. La présence d'une proportion plus importante de l'acide gras monoénoïque 18:1n-7 et des acides gras avec un nombre impair d'atomes de carbone dans les sédiments que dans les MES signifie que les sédiments contiennent plus de bactéries anaérobies que les MES (Edlung *et al.*, 1985; Wilkinson, 1988). Ces biomarqueurs sont aussi présents dans les sédiments marins de 'Le vivier sur mer' (Meziane et Tsuchiya, 2002). Les acides gras 16:1n-7c sont trouvés chez les espèces de *Thiobacillus*, les méthanotrophes de type 1, chez un grand nombre d'espèces de *Pseudomonas*; cet acide gras est un composant majeur de *Geobacter metallireducens* et est présent chez *Shewanella* indiquant que les échantillons contiennent des bactéries sulfato- et ferriréductrices. Des bactéries sulfato-réductrices sont communément trouvées dans les sédiments (Batten et Scow, 2003; Li *et al.*, 1999; Rajendran *et al.*, 1997; Taylor et Parkes, 1985; White *et al.*, 1996b).

Les rapports C₁₆/C₁₈ sont du même ordre de grandeur et supérieurs à 2 pour les sédiments et les matières en suspension. Ce rapport est considéré comme un indicateur de la contribution des diatomées dans les sédiments (Saliot *et al.*, 1991; cités par Meziane et Tsuchiya (2002)). Aussi, une importante contribution des diatomées est présumée.

Les matières en suspension contiennent plus de champignons que les sédiments comme le montre la proportion de l'acide gras 18:2 qui est proposé comme un indicateur de la présence des champignons (Brontz *et al.*, 2004; Frostegård *et al.*, 1991). Les acides gras polyénoïques des PL sont exclusivement trouvés chez les eucaryotes (Rattray, 1988; White *et al.*, 1996b). Aussi, la présence des acides gras polyénoïques 20:4 et 20:3 présents dans les échantillons montrent la présence d'eucaryotes supérieurs. Par ailleurs, la présence de l'acide tuberculostéarique (TBSA) présent essentiellement dans les MES en aval est caractéristique des actinomycètes (Brennan, 1988).

Le Tableau 4.18 résume la distribution des principaux acides gras des PL dans les matières en suspension et les sédiments.

Tableau 4.18 : Répartition des principaux biomarqueurs (acides gras des PL) dans les matières en suspension et les sédiments de rivière.

Matières en suspension	Sédiments
	a-15:0, a-17:0, i-15:0 et i-17:0 => Bactéries à gram positif
14:0, 16:1, 18:1, 15:0, cy-17:0, cy-19:0 et 16:0 => Bactéries à gram négatif	
	18:n-7 et 16:1n-7c => Bactéries anaérobies
C16/C18 > 2 => Diatomées	
18:2 => Champignons	
Acides gras polyénoïques 20:3, 20:4 => Eucaryotes supérieurs	
TBSA => Actinomycètes	

Les prélèvements effectués en aval présentent une proportion d'acides gras saturés supérieure à celle des prélèvements amont et les sédiments aval contiennent plus d'acides gras insaturés de configuration trans. Le rapport acides gras C18/C16 est supérieur pour les prélèvements amont qu'aval en accord avec la quantité plus importante de lipides en aval qu'en amont. Tunlid *et al.* (1989) montrent que *Pseudomonas atlantica* sous forme attachée présente une proportion d'acides gras saturés et insaturés en configuration trans- supérieure par rapport aux cellules libres. Valeur *et al.* (1988) montrent que les bactéries à gram négatif fixées ont un rapport des acides gras C18/C16 supérieur (0,4) à celui des bactéries planctoniques (0,2) dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ainsi, les prélèvements d'eau en aval de la station posséderaient une proportion supérieure de cellules libres par rapport aux prélèvements amont et cette hypothèse est renforcée par la quantité

d'acides gras des MES qui est supérieure en aval qu'en amont de la zone de rejet de la station d'épuration.

4.3.4.1.2. Indicateurs de l'état physiologique des micro-organismes

Des indicateurs traduisant l'état physiologique des micro-organismes sont généralement recherchés. Les quantités d'acides gras supérieures dans les sédiments aval pourraient être dues à la famine. Des sédiments mis en suspension dans un milieu aérobic alimenté seulement en carbone, en azote et en phosphate présentent une quantité de phospholipides ($0,147 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment) inférieure à ceux mis en suspension dans un milieu aérobic alimenté avec de l'extrait de levure ($0,513 \mu\text{mol g}^{-1}$ de sédiment) (White *et al.*, 1979).

De plus, le rapport acides gras insaturés trans/cis est considéré comme un témoin de stress dû à la famine (Guckert *et al.*, 1986), à une surconsommation de nutriments (Heipieper *et al.*, 1992) ou à la présence d'un composé organique toxique (Heipieper *et al.*, 1995). Généralement, un rapport acides gras trans/cis supérieur à 1 est un indicateur d'un état de stress due à la famine (Guckert *et al.*, 1986; Nichols *et al.*, 2002; Virtue *et al.*, 1996) et des bactéries "non stressées" possèdent un rapport acides gras trans/cis inférieur ou égal à 0,05. Le rapport acides gras 16:1n-7t/16:1n-7c est inférieur ou égal à 0,1 pour les sédiments aval, amont et les matières en suspension amont certainement à cause de la très faible proportion des acides gras 16:1n-7t dans les sédiments et les matières en suspension (Tableau 4.17). Ceci suggère que les populations bactériennes ne sont pas dans des conditions de croissance exponentielle (Albrechtsen *et al.*, 1995). La présence de composés organiques toxiques provoque une augmentation des acides gras insaturés de la configuration trans (Halverson et Firestone, 2000; Heipieper *et al.*, 1992). Ainsi, le rapport des acides gras insaturés trans-/cis- augmente et est supérieur à 0,1. Le rapport acides gras des phospholipides insaturés sur saturés diminue en présence de composés organiques toxiques (Balagué *et al.*, 2001; Blank *et al.*, 1991). La présence de métaux lourds en quantité plus importante dans les MES aval peut certainement provoquer des modifications de la composition des acides gras des phospholipides.

Les acides gras cyclopropanes sont des témoins de stress (Heipieper *et al.*, 1992). Les acides gras monoéniques 16:1n-7c et 18:1n-7c sont bien connus pour être convertis en acides gras cyclopropanes chez de nombreuses bactéries en phase stationnaire de croissance c'est-à-dire quand la population est âgée. Les rapports cy-17:0/16:1n-7c et le rapport cy-17:0/18:1n-7 supérieurs pour les sédiments que les matières en suspension signifient que les micro-organismes des sédiments se trouverait en phase stationnaire de croissance (Tableau 4.17). Les acides gras cy-17:0 et cy-19:0 présents en faible proportion dans tous les échantillons sont en plus forte proportion (+ 7,7 fois) dans les sédiments amont et aval que les matières en suspension amont et aval. Ce qui signifierait que la population bactérienne présente dans les sédiments de rivière est dans un état plus stressé que les bactéries des matières en suspension.

4.3.4.2. Composition des acides gras des glycolipides (GL) et des lipides neutres (NL) des échantillons prélevés en rivière

Les profils des acides gras des GL entre les prélèvements amont et aval sont similaires, à quelques différences près dans les proportions. Les glycolipides sont principalement composés d'acides gras insaturés (plus de 50 %) (Tableau 4.15). Plus d'acides gras saturés et moins d'acides gras ramifiés sont trouvés dans les matières en suspension que dans les sédiments. Les acides gras 16:0, 16:1n-7c, 18:1n-9 et 20:4 sont majoritaires dans les sédiments amont et aval, alors que les acides gras 14:0, 16:0, 16:1n-7c et 18:1n-9 sont majoritairement trouvés dans les matières en suspension. Les sédiments contiennent plus d'acides gras cyclopropanes (0,9 %) que les matières en suspension (traces).

Les profils des acides gras des NL en amont et en aval sont similaires (Tableau 4.16) à quelques différences près dans les proportions entre les prélèvements. Les acides gras des NL sont essentiellement composés d'acides gras saturés et insaturés. Les sédiments contiennent une proportion plus importante d'acides gras ramifiés (13,4 %) que les matières en suspension (1,8 %). Des acides gras cyclopropanes sont mesurés en plus forte proportion dans les sédiments de rivière en amont et en aval (2,5 %) que dans les matières en suspension (0,14 %). Les acides gras 14:0, 16:0, 16:1n-7c et 18:1n-9 sont majoritaires tous les échantillons analysés et l'acide gras 20:3 est aussi présent en proportion importante dans les matières en suspension.

Ces deux classes de lipides n'ont fait à notre connaissance l'objet d'aucune étude dans les sédiments et les matières en suspension de rivière.

4.3.5. Séparation des agrégats biologiques de boues activées, de sédiments et des matières en suspension de rivière par l'analyse en composantes principales (ACP)

L'ensemble des analyses des acides gras des PL des différents types d'échantillons (boues activées, sédiments et matières en suspension de rivière) obtenus précédemment a été traité par une analyse statistique multivariée de type ACP. La Figure 4.9 confirme le pouvoir discriminant dans la séparation des différents échantillons par l'analyse des acides gras des PL, mais la mise en évidence d'un ou plusieurs facteurs discriminatoires des agrégats biologiques de station d'épuration de ceux de la rivière est difficile. La composante principale PC1 permet de séparer clairement tous les échantillons (Boues et EPS de Maxéville et de Toul et sédiments et des matières en suspension de Liverdun) alors que la composante PC2 permet de séparer plus particulièrement les EPS M1 et M2 et la composante PC3 permet la séparation des échantillons EPS M2 et boues M2.

L'analyse des acides gras des phospholipides couplée à une analyse statistique multivariée peut certainement permettre la mise en évidence de la contribution de la station d'épuration dans l'apport en rivière de matière organique.

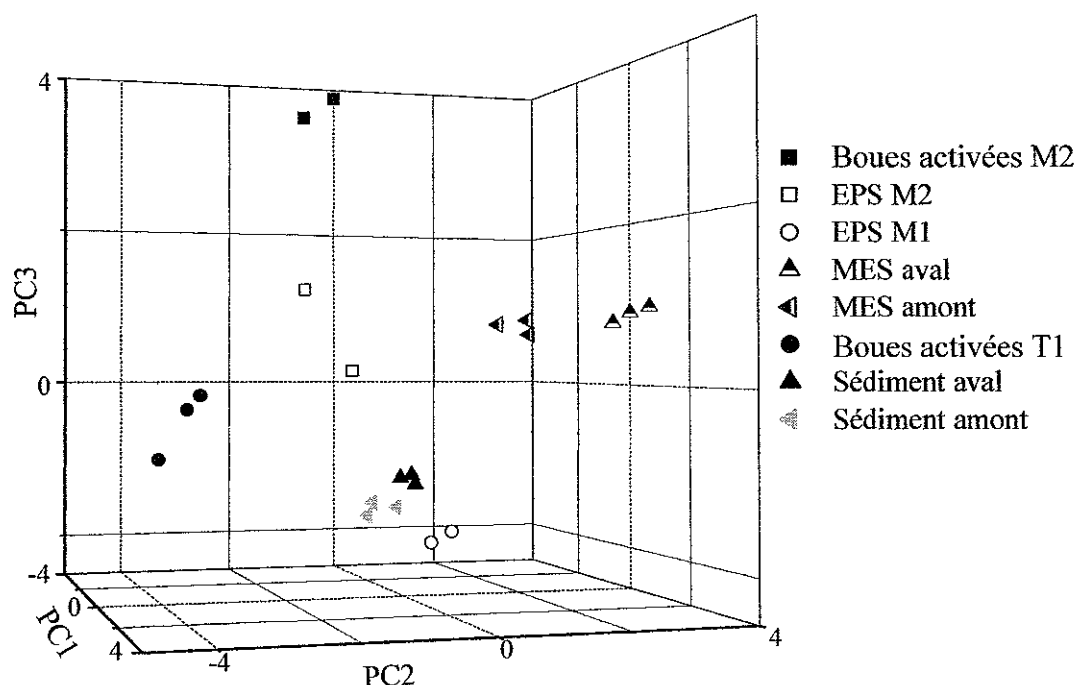


Figure 4.9 : Représentation tridimensionnelle selon les trois composantes principales (PC 1 : 39,2 % ; PC 2 : 24,4 % et PC 3 : 16,4 %) des valeurs des scores de chacun des échantillons, obtenues par une analyse ACP à partir de la composition des acides gras des phospholipides. Echantillons : EPS (M1 et M2), boues activées (M2 et T1) (cf. § 4.2.2.), sédiments et matières en suspension de rivière (cf. § 4.3.3). (M : Maxéville, T : Toul).

4.3.6. Conclusion

La contribution de la station d'épuration à la composition des matières en suspension et des sédiments peut être envisagée car les matières en suspension prélevées en aval de la zone de rejet de la station d'épuration contiennent plus de métaux lourds et une quantité supérieure de lipides que la zone de prélèvement amont, renforcé par la présence de l'acide tuberculostéarique dans les MES aval et absent des MES amont. L'apport des acides gras caractéristiques a montré que les échantillons sont composés d'une grande diversité de micro-organismes incluant des bactéries à gram-négatif et positif, des champignons et des levures.

Les sédiments et les matières en suspension prélevées en amont et en aval de la zone de rejet d'une station d'épuration sont parfaitement séparés par une analyse des composantes principales sur les acides gras des phospholipides, des glycolipides et des lipides neutres, alors que la comparaison des spectres infra-rouge et rayons X ne laissait présumer que d'une très faible différence entre les MES amont et aval. Curieusement, les 4 échantillons ne contiennent pas de lipopolysaccharides qui sont des marqueurs des bactéries à gram-négatifs généralement mis en évidence dans les sédiments.

4.4. Conclusion générale

Nos études ont montré que les acides gras représentent une très faible proportion du domaine extracellulaire des agrégats biologiques de boues activées. Néanmoins, leur faible proportion ne les dispense pas de contribuer aux caractéristiques physico-chimiques des agrégats biologiques de boues activées.

Les acides gras des phospholipides sont généralement utilisés pour caractériser la communauté microbienne des échantillons environnementaux comme les sols, les sédiments marins ou fluviaux, les composts et les tourbes. Cette méthode repose sur la présence ou l'absence de certains acides gras, reconnus comme biomarqueur, dans les échantillons. De fait, il a pu être montré que les échantillons analysés dans nos études sont composés d'une communauté microbienne très diversifiée comportant des bactéries à gram positif, des bactéries à gram négatif, des bactéries sulfato-réductrices, des levures et des champignons.

De plus, certains changements dans le profil des acides gras des phospholipides sont utilisés comme indicateur du changement physiologique de la communauté microbienne. Ainsi a été montré que les micro-organismes des agrégats biologiques de boues activées sont dans un état plus stressé en hiver qu'en fin d'été, certainement à cause du changement de température. En complément à cette étude, il serait intéressant d'analyser l'efficacité du décanteur primaire (dégraisseur) sur la séparation des graisses. Son efficacité pourrait être influencée par les conditions environnementales comme la température.

L'hypothèse formulée au début de notre travail de recherche était de tenter d'identifier des marqueurs qui pourraient permettre de "suivre" des agrégats biologiques issus de station d'épuration en rivière. Certes, les acides gras des PL permettent après un traitement statistique multivarié de séparer distinctement l'ensemble de tous les échantillons (agrégats biologiques de boues activées et de rivière, mais la mise en évidence d'un ou plusieurs facteurs discriminatoires des agrégats biologiques de station d'épuration de ceux de la rivière est difficile. Toutefois, il semblerait que l'acide tuberculostéarique (TBSA) puisse être utilisé comme biomarqueur des agrégats biologiques de station d'épuration. Sa faible présence dans les sédiments et dans les matières en suspension amont et sa plus forte proportion dans les MES aval suggère qu'il peut être originaire des eaux usées rejetées de la station d'épuration car nos études ont montré que cet acide gras était présent dans les boues activées (Conrad *et al.*, 2003).

5. EFFET D'UN STRESS OXYGENE SUR L'HYDROPHOBICITE ET LES LIPIDES DES AGREGATS BIOLOGIQUES

5.1. Introduction et objectifs

L'oxygène influence de nombreuses fonctions cellulaires, car celui-ci est toxique à forte concentration même pour les bactéries aérobies (Hengge-Aronis, 2000; Storz *et al.*, 1990; Storz et Zheng, 2000). A des concentrations supérieures à 10 mg L⁻¹, l'oxygène devient un inhibiteur et affecte négativement le rendement d'épuration (Roques *et al.*, 1984). Aussi, l'oxygène est généralement maintenu à une concentration inférieure à 4 mg L⁻¹ dans les bassins d'aération des stations d'épuration. Cette concentration est variable obligeant les micro-organismes à s'adapter rapidement en activant des fonctions cellulaires intracellulaires et extracellulaires.

Pour faire face à l'oxygène, molécule capable de diffuser rapidement à travers la membrane bactérienne (Neidhardt *et al.*, 1994), les bactéries possèdent plusieurs systèmes de protection intracellulaire (Hengge-Aronis, 2000; Storz *et al.*, 1990; Storz et Zheng, 2000). À titre d'exemple, la synthèse par *Escherichia coli* d'un anti-oxydant comme le glutathion est augmentée en présence d'oxygène (Saby *et al.*, 1999; Storz *et al.*, 1990) et permet ainsi d'augmenter la résistance au chlore de culture de souche pure d'*E. coli* (Saby *et al.*, 1999). Les travaux de Yamamoto *et al.* (2000) confirment la présence d'un gène dit "antioxydant" produit lors de stress oxydant par *Streptococcus mutans*. Le traitement d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* par des doses de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), conduit à l'expression du gène oxyR qui induit la synthèse de protéines et ainsi la résistance des bactéries vis-à-vis de H₂O₂ (Storz et Zheng, 2000). D'autres moyens de protection constitutifs comme les enzymes superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases existent chez les bactéries aérotolérantes (Smith et Neidhardt, 1983). Dans les agrégats biologiques de boues activées, le glutathion a été récemment mis en évidence (Dziurla *et al.*, 2004) et pourrait être impliqué dans la protection des micro-organismes des boues vis-à-vis de stress oxydants.

Les membranes des mycobactéries, soumises à un stress oxydant, possèdent une proportion plus importante d'acides gras ramifiés (Smith, 1988). Les phospholipides des membranes cellulaires d'*Escherichia coli* sont également composés d'une proportion plus importante d'acides gras cycliques lors d'un stress oxydant. Cette composition particulière résulterait de la conversion des acides gras insaturés en acides gras cycliques (Gorgan et Cronan, 1997; Patschkowski *et al.*, 2000).

En réponse à une forte concentration en oxygène (concentration en oxygène dissous de 8,0 ± 0,5 mg L⁻¹ de O₂), l'hydrophobicité de la surface de certaines bactéries isolées des boues activées (*Acinetobacter johnsonii*, *Klebsiella oxytoca* et *Leclercia adecarboxylata*) augmente (Palmgren *et al.*, 1998).

En présence d'oxygène, *Pseudomonas aeruginosa* et *Azotobacter vinelandii* produisent une quantité plus importante d'alginate extracellulaire (Bayer *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 2000). Sous des conditions de stress oxygène (350 % de la saturation en air), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, cultivé en chemostat, exprime un type distinct de lipopolysaccharides (LPS) à sa surface, qui est absent à un taux de saturation en air inférieur à 3 %, et l'examen en microscopie électronique montre la formation de vésicules membranaires sous des conditions de stress oxygène (Sabra *et al.*, 2003). De même, lors de la variation de la quantité d'oxygène de 0,5 à 5 % de la saturation en air, la structure et la

composition des alginates extracellulaires chez *Azotobacter vinelandii* sont modifiées (Peña *et al.*, 2000). L'oxygène contrôlerait les enzymes clefs de la biosynthèse des alginates (phosphomannose isomerase, gdp mannose pyrophosphorylase).

La distribution de taille, la structure et la capacité d'adsorption des agrégats biologiques de boues activées semblent être influencées par des concentrations en oxygène supérieures à 2 mg L⁻¹. La distribution de taille des boues placées sous des concentrations en oxygène inférieure à 2 mg L⁻¹ est légèrement inférieure à celle des boues placées sous des concentrations en oxygène de 5 mg L⁻¹ (Wilén et Balmer, 1998, 1999).

Ce paramètre oxygène étant facile à contrôler sur un système industriel et aussi très variable dans l'environnement, nous avons décidé d'explorer l'effet de l'oxygène sur les agrégats biologiques prélevés en station d'épuration. Le but général de cette étude était de tenter de modifier par application discontinue d'oxygène les propriétés physico-chimiques des agrégats biologiques avec l'espoir de régler les propriétés des agrégats biologiques pour des essais en laboratoire. Nous formulons l'hypothèse que des discontinuités courtes et rapides en oxygène (nommées dans notre étude stress oxygène) appliquées aux agrégats biologiques pourraient modifier, d'une manière sensible, les propriétés hydrophobes des agrégats biologiques et de leurs exopolymères (EPS), la composition des EPS et des lipides des agrégats biologiques.

Par conséquent, la démarche expérimentale a consisté à :

- (a) optimiser les conditions dans lesquelles sont réalisées les mesures de l'hydrophobicité des agrégats biologiques par le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH) et des exopolymères par précipitation par le sulfate d'ammonium (SA) suivi de la séparation par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH). Ainsi, l'effet de la composition ionique et du pH ont été testés sur la mesure de l'hydrophobicité des agrégats biologiques par le test TAMH et la quantité de sulfate d'ammonium et le pH sur la mesure de l'hydrophobicité des exopolymères par le test SA.
- (b) évaluer l'effet de discontinuités en oxygène (stress oxygène) courtes et rapides sur les paramètres physico-chimiques des boues, fraîchement collectées (issues de stations d'épuration, et placées dans des réacteurs à 25 °C) et sur la composition des exopolymères (EPS) et sur la composition des acides gras des boues.

5.2. Optimisation du test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures : effet de la composition ionique et du pH

Deux raisons majeures nous ont amené à évaluer et optimiser le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH) :

D'une part, le test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures, initialement développé pour apprécier l'hydrophobicité des surfaces cellulaires (Busscher *et al.*, 1995; van der Mei *et al.*, 1995), traduit l'ensemble des interactions hydrophobes et électrostatiques entre la surface des cellules bactériennes et des gouttelettes d'hydrocarbures. Les gouttelettes d'hydrocarbure portent une

charge négative qui proviendrait de l'adsorption d'ions à leurs surfaces (Busscher *et al.*, 1995; van der Mei *et al.*, 1995; van Loosdrecht *et al.*, 1987) et de l'organisation des molécules d'eau autour de celles-ci. Par conséquent, la mesure de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires par le test TAMH est directement influencée par le pH et par la composition ionique du milieu dans lequel les cellules bactériennes sont mises en suspension. A de faibles valeurs de pH, les répulsions électrostatiques entre les constituants des membranes cellulaires et les gouttelettes d'hydrocarbure, négativement chargées, sont minimisées car la charge des cellules bactériennes est partiellement neutralisée par protonation des groupements présents à la surface des membranes cellulaires (Busscher *et al.*, 1995; van der Mei *et al.*, 1995; van Loosdrecht *et al.*, 1987).

D'autre part, le test TAMH a été adapté aux systèmes biologiques agrégés par Guellil *et al.* (1998) afin de limiter le piégeage mécanique de particules dans l'émulsion qui se forme lors du mélange boues activées et hydrocarbure. Toutefois, l'effet de la composition ionique et du pH des solutions de lavage utilisées pour réaliser ce test n'ont pas été testées.

Aussi, l'effet la composition ionique et du pH de différentes solutions de lavage (PUM, PBS, NaCl, et eau déminéralisée) a été testé sur la mesure de l'hydrophobicité des agrégats dispersés par les termes A % et Ke.

Protocole

Des échantillons de boues activées sont prélevés dans les bassins d'aération de la station d'épuration de Nancy-Maxéville. Le test d'adhésion est réalisé avec l'octane après dispersion des boues par des ultrasons (*cf.* § 3.5.1.). Dans tous les cas, les mesures de l'hydrophobicité des boues dispersées sont réalisées après leur lavage avec des solutions de travail de composition ionique différente (Tableau 5.1). Les boues lavées sont ensuite diluées à une absorbance de 0,3 à 600 nm. Des triplicata sont réalisés avec le même échantillon de boues. Les mesures de Ke sont réalisées en utilisant les différentes solutions de travail précédemment utilisées pour laver les boues dispersées (*cf.* § 3.5.1). Les valeurs du pH du mélange boues dispersées-solution de lavage sont vérifiées et (i) ajustées à une valeur de $7,0 \pm 0,2$ avant la réalisation du test TAMH pour estimer l'effet de la composition ionique des solutions de lavage sur les mesures de A % et de Ke et (ii) ajustées à différentes valeurs de pH entre 3,0 et 9,0 pour estimer l'influence du pH sur les valeurs d'hydrophobicité (A % et Ke) des boues dispersées mesurées par le test TAMH. De plus, le potentiel zéta des boues dispersées lavées avec différentes solutions (PUM, PBS et eau déminéralisée) a été estimé (*cf.* § 3.5.3). Le potentiel zéta a été déterminé à partir de la mobilité électrophorétique des boues dispersées. Les températures de mesure s'échelonnent entre 18,9 et 21,4 °C.

Tableau 5.1 : Composition des solutions de travail ajustées à une valeur de pH de 7,0 avec de l'acide chlorhydrique (1 M) ou de l'hydroxyde de potassium (1 M).

	KH_2PO_4 (g L ⁻¹)	K_2HPO_4 (g L ⁻¹)	Urée (g L ⁻¹)	$\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g L ⁻¹)	NaCl (g L ⁻¹)	Conductivité (mS cm ⁻¹)
PUM	7,26	19,7	1,8	0,2	-	16,76
PBS	0,68	0,87	-	-	8,77	15,29
NaCl	-	-	-	-	8,77	14,25
Kpi	0,68	0,87	-	-	-	1,46
Eau déionisée	-	-	-	-	-	$1,3 \times 10^{-3}$

Résultats

Premièrement, nous avons testé l'effet de la composition ionique sur les mesures de l'hydrophobicité de boues activées (A % et Ke). La valeur de l'hydrophobicité des boues par le terme A % est inférieure lorsque les boues sont mises en suspension dans la solution Kpi (49,4 %) et cette valeur se détache de celles obtenues avec les boues mises en suspension dans les 4 autres solutions de travail (Tableau 5.2). Curieusement, les valeurs de A % obtenues dans l'eau déminéralisée sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec les solutions PUM, PBS et NaCl et devraient plutôt s'approcher de celles obtenues avec Kpi de force ionique intermédiaire. Ces résultats, obtenus avec de l'eau déionisée, sont certainement biaisés car la mise en suspension des boues dans un milieu de faible force ionique provoque une sortie d'ions et de macromolécules vers la phase eau conduisant à la désagrégation des boues (Keiding et Nielsen, 1997) et à la modification des caractéristiques du milieu dans lequel les boues sont en suspension. Pour les boues mises en suspension dans les solutions PUM, PBS et NaCl, les valeurs de Ke augmentent avec l'accroissement de la force ionique des solutions et une valeur minimale de Ke est obtenue lorsque les boues sont mises en suspension dans la solution Kpi (0,87) (Tableau 5.2). Les solutions de travail PUM, PBS, NaCl, dans lesquelles les boues sont mises en suspension, apportent des cations qui neutralisent, en partie, les interactions électrostatiques et renforcent les interactions hydrophobes entre les boues et les gouttelettes d'hydrocarbures, ce qui peut expliquer que les valeurs de A % et Ke soient inférieures avec les boues mises en suspension dans la solution Kpi qui présente une plus faible force ionique. A l'opposé du terme A %, les valeurs de Ke obtenues dans les différentes solutions de travail marquent des différences plus nettes.

La comparaison des valeurs de A % et de Ke obtenues avec les différentes solutions de travail par un test t de Student montre que seules les valeurs d'hydrophobicité par le terme A % des boues mises en suspension dans la solution Kpi sont significativement inférieures à celles obtenues les 4 autres solutions de travail ($p < 0,05$). Par contre, toutes les valeurs de Ke obtenues avec les différentes solutions de travail sont significativement différentes pour l'eau désionisée et PBS, Kpi et NaCl, Kpi et PBS ($p < 0,01$) et NaCl et Kpi ($p < 0,05$).

Ainsi, les résultats montrent que la composition ionique de la solution dans laquelle les boues sont mises en suspension influence plus fortement la mesure de l'hydrophobicité des boues par le terme K_e que le terme $A \%$.

Tableau 5.2 : Valeurs des mesures de l'hydrophobicité par le test TAMH des boues dispersées et lavées avec différentes solutions de lavage ($n = 3$ mesures sur un échantillon de boues) ($pH = 7,0 \pm 0,2$).

	Hydrophobicité ($A \%$)			Hydrophobicité (K_e)		
	Moy.	Ec.	Cv (%)	Moy.	Ec.	Cv (%)
PUM	59,4	3,3	5,6	1,442	0,633	16,8
PBS	59,1	3,9	6,6	1,265	0,035	15,3
NaCl	61,2	3,8	6,2	1,029	0,116	14,3
Kpi	49,4	5,6	11,3	0,867	0,093	1,5
Eau désionisée	61,0	2,2	3,6	1,833	0,085	0,1

Moy. : Moyenne ; Ec. : Ecart-type ; Cv : Coefficient de variation; PUM, PBS, Kpi, NaCl : dénomination cf. Tableau 5.1.

Deuxièmement, nous avons testé l'effet du pH de 2 solutions (PBS et PUM) dans lesquelles les boues sont mises en suspension sur les mesures de l'hydrophobicité des boues par les termes $A \%$ et K_e . Les pH des boues activées lavées par les solutions PUM et PBS sont vérifiés et ajustés aux valeurs désirées après mélange des boues dispersées avec les différentes solutions de lavage.

Nous avons observé que les valeurs de $A \%$, pour les deux solutions de travail, varient de 52 à 89 % lorsque la valeur de pH des solutions augmente de 3,0 à 9,0 (résultats non rapportés). De même, les valeurs de K_e diminuent respectivement de 6,0 à 1,1 et de 4,0 à 1,5 pour les solutions de travail PUM et PBS (Figure 5.1). De plus, le pH affecte les valeurs du potentiel zéta des boues mises en suspension dans les deux solutions de travail. Le potentiel zéta des boues à $pH = 3,0$ lavées dans le tampon PUM ou PBS est moins négatif que celui des particules lavées dans le tampon PUM ou PBS à une valeur de pH de 9,0 (Figure 5.1).

Comme l'ont déjà montré différents auteurs pour des cultures de souches pures (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1996; van der Mei *et al.*, 1995; van der Wal, 1997; van Loosdrecht *et al.*, 1987), le pH influence les valeurs de l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Toutefois, cet effet n'avait jamais été montré pour des systèmes agrégés comme les agrégats biologiques. Ainsi, les plus faibles valeurs de K_e sont associées aux particules montrant les potentiels zéta les plus négatifs renforçant l'idée que les interactions électrostatiques sont impliquées dans la mesure de l'hydrophobicité des agrégats et qu'en minimisant les répulsions électrostatiques à de faibles valeurs de pH, les valeurs de l'hydrophobicité des agrégats sont exacerbées.

La comparaison des termes $A \%$ et K_e montre que la diminution de K_e est 15 fois plus importante lorsque le pH augmente de 3,0 à 9,0, alors qu'elle n'est que de 1,8 fois pour le terme $A \%$ (Figure 5.2). Les valeurs de K_e et de $A \%$ pour PUM et PBS sont significativement corrélées ($p < 0,05$).

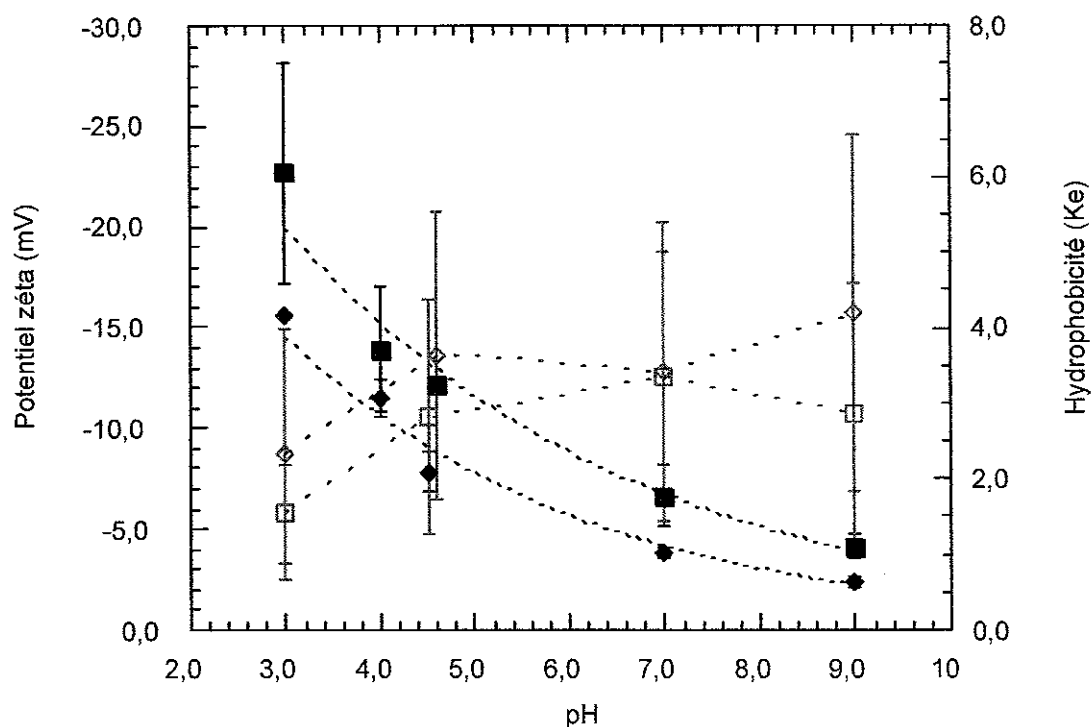


Figure 5.1 : Variation de la valeur de Ke (■ : PUM et ◆ : PBS) et du potentiel zéta (□ : PUM et ◇ : PBS) en fonction du pH des solutions de lavage. Les points sont liés simplement à titre indicatif pour montrer les tendances.

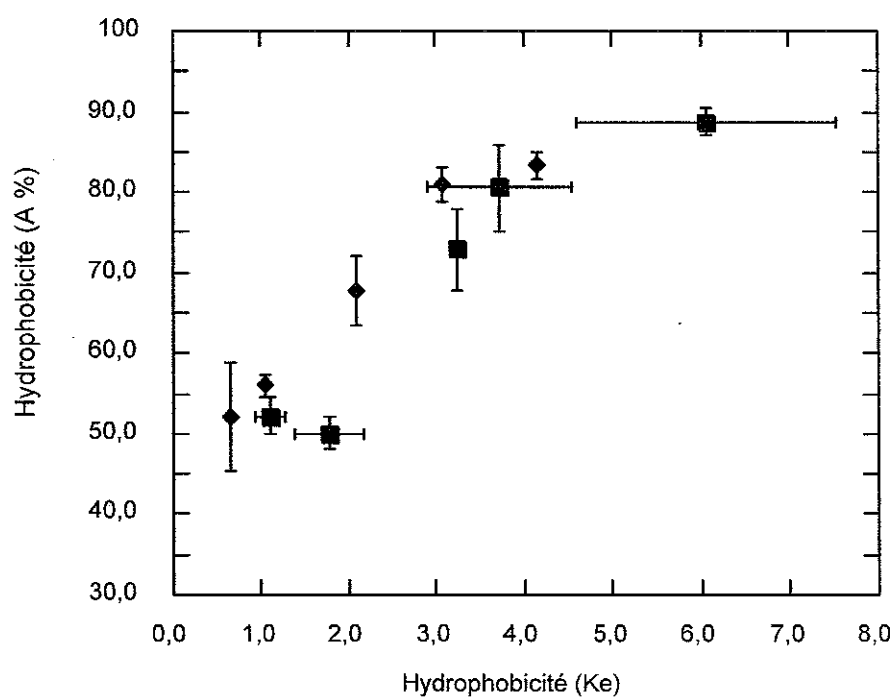


Figure 5.2 : Relation non linéaire entre les valeurs de A % et de Ke obtenues avec les différentes valeurs de pH des solutions de lavage (PUM : ■ ; PBS : ◆).

En conclusion, l'effet de la composition ionique et du pH de la solution dans laquelle l'hydrophobicité des agrégats biologiques est déterminée sont importants. Toutefois, le paramètre pH semble nettement plus influent. Aussi, les conditions de mesures de l'hydrophobicité des agrégats biologiques sont contrôlées afin que les variations des valeurs d'hydrophobicité de boues différentes ne puissent pas être attribuées à la variation du mode opératoire.

5.3. Précipitation des exopolymères (EPS) par le sulfate d'ammonium (SA)

Certains auteurs ont mesuré l'hydrophobicité des EPS, après leur extraction des agrégats biologiques. La méthode, généralement utilisée, repose sur la précipitation des EPS par le sulfate d'ammonium (SA) (Jorand, 2000; Martín-Cereceda *et al.*, 2001) suivie par une séparation des EPS non précipités selon leur affinité pour un ligand hydrophobe par chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) (Jorand, 2000). Le mode opératoire est présenté dans la Figure 5.3. La première étape, reposant sur la précipitation des EPS par le SA, permet "d'éliminer" une partie des EPS qui auraient une affinité trop forte avec le ligand hydrophobe et/ou qui précipiteraient en présence de sels lors de la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH). Seule l'optimisation de l'étape de séparation des EPS par le SA est développée ici.

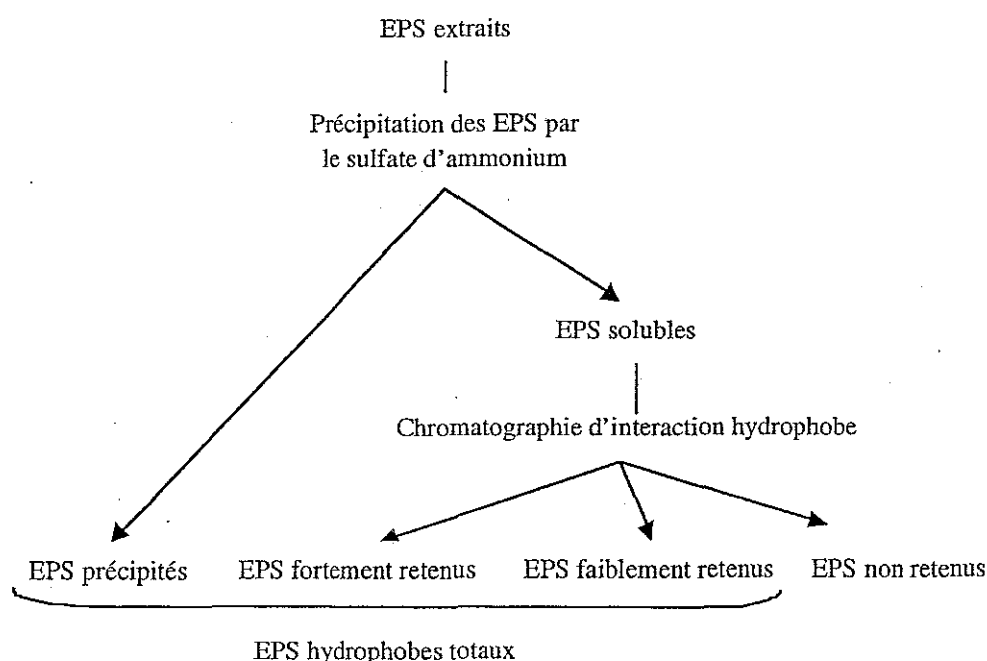


Figure 5.3 : Séparation des EPS extraits des boues par le sulfate d'ammonium et une chromatographie d'interaction hydrophobe (Jorand, 2000).

La standardisation des conditions opératoires de la première étape (précipitation des EPS par le SA) est essentielle. En effet, les paramètres quantité de sel et la valeur de pH du mélange, influencent l'agrégation des cellules bactériennes (Lindahl *et al.*, 1981) en affectant à la fois les répulsions et

attractions électrostatiques. Aussi, nous avons testé l'effet de la concentration en SA et le pH du mélange sur la précipitation des EPS à 4 °C.

Protocole

Les EPS ont été extraits de boues activées prélevées à la station d'épuration de Toul (cf. § 3.4.1). Les EPS ont été mélangés à 4 °C soit (i) avec des concentrations croissantes de SA telles que les concentrations en SA du mélange varient de 0 à 5,4 M (correspondant à la limite de solubilité du SA à 4 °C) à une valeur initiale de pH ajustée à $7,5 \pm 0,5$ avec KOH (0,1 M) ou HCl (0,1 N), soit (ii) avec une concentration initiale en sulfate d'ammonium constante de 0,5 M et des valeurs de pH initiales variant de 2 à 12 ajustées avec KOH (0,1 M) ou HCl (0,1 N). Dans tous les cas, les EPS précipités, dits hydrophobes, ont été récupérés après 60 min d'homogénéisation, par centrifugation (Figure 5.4). Les EPS ont été caractérisés par les mesures de l'absorbance à 280 nm, des protéines par la méthode de Bradford (cf. § 3.4.2.3), des polysaccharides (cf. § 3.4.2.4) et des acides nucléiques (cf. § 3.4.2.5). Pour étudier la répartition des protéines dans les différentes fractions (solubles et précipités), le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford car le sulfate d'ammonium interfère avec le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

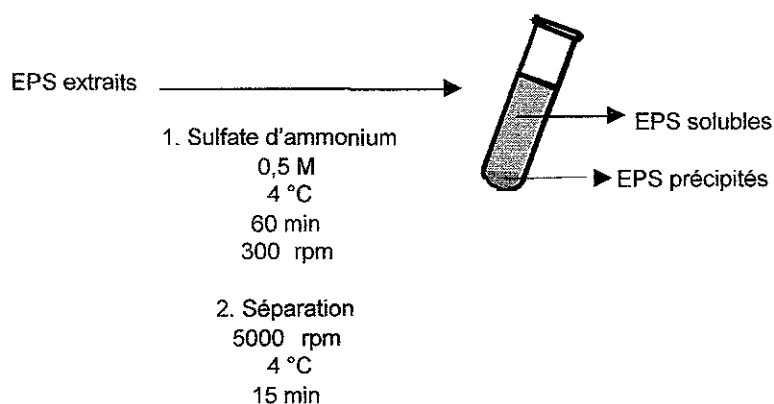


Figure 5.4 : Protocole de précipitation par "salting out" avec le sulfate d'ammonium des exopolymères extraits (EPS).

Résultats

Nous avons testé l'effet de la concentration finale en SA de 0 à 5,4 M sur la précipitation des EPS à 4 °C. L'ajout de SA au mélange d'EPS provoque la précipitation des EPS, qui se traduit par la diminution de l'absorbance à 280 nm (assimilée aux protéines), des acides nucléiques et des polysaccharides présents dans le mélange (Figure 5.5). L'abattement, pour une concentration finale de SA de 5,4 M dans le mélange, est de 37,0 %, 23,4 % et 15,0 % respectivement pour l'absorbance à 280 nm, les acides nucléiques et les polysaccharides. L'objectif de cette étape est d'éliminer seulement les EPS qui précipitent facilement en présence de sels, et non comme dans le cas d'une concentration de récupérer le maximum de polymères. Aussi, la concentration finale de SA dans le mélange d'EPS est standardisée à 0,5 M.

L'effet du pH du mélange initial (EPS + SA) a été testé pour des valeurs de pH comprise entre 2,0 et 12,0. Pour des valeurs de pH supérieures à 6 et pour une concentration en SA de 0,5 M, le pH n'affecte plus la précipitation des EPS (Figure 5.6). Les valeurs de pH inférieures à 6 affectent nettement plus la précipitation des EPS par le SA à 4 °C. Par conséquent, le pH du mélange est ajusté à une valeur de 7,0 et de fait même si le pH du mélange varie légèrement, cette variation aura peu d'influence sur la quantité d'EPS précipitée.

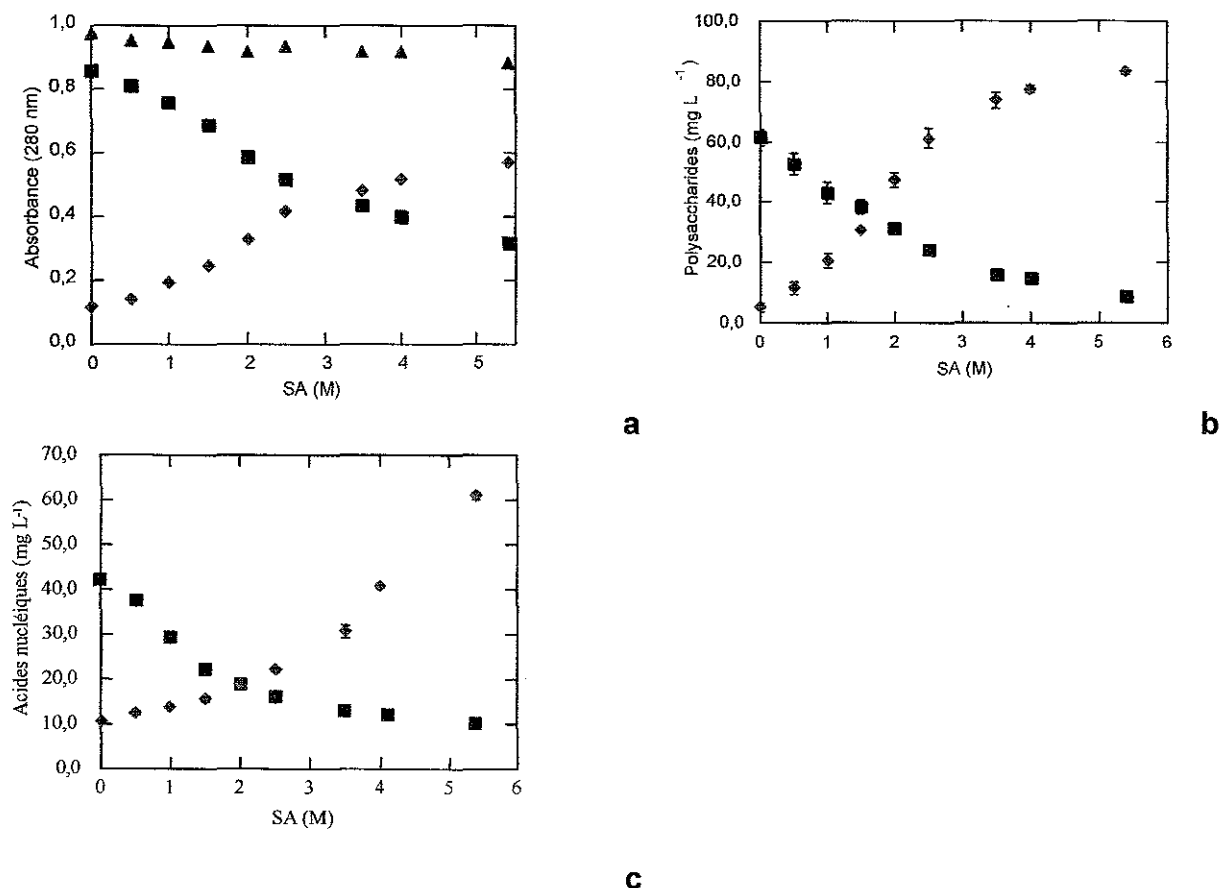


Figure 5.5 : Variations de l'absorbance à 280 nm (a), des polysaccharides (b) et des acides nucléiques (c) des surnageants (■), des culots (◆) et du total (▲) en fonction de la concentration finale en SA à 4 °C.

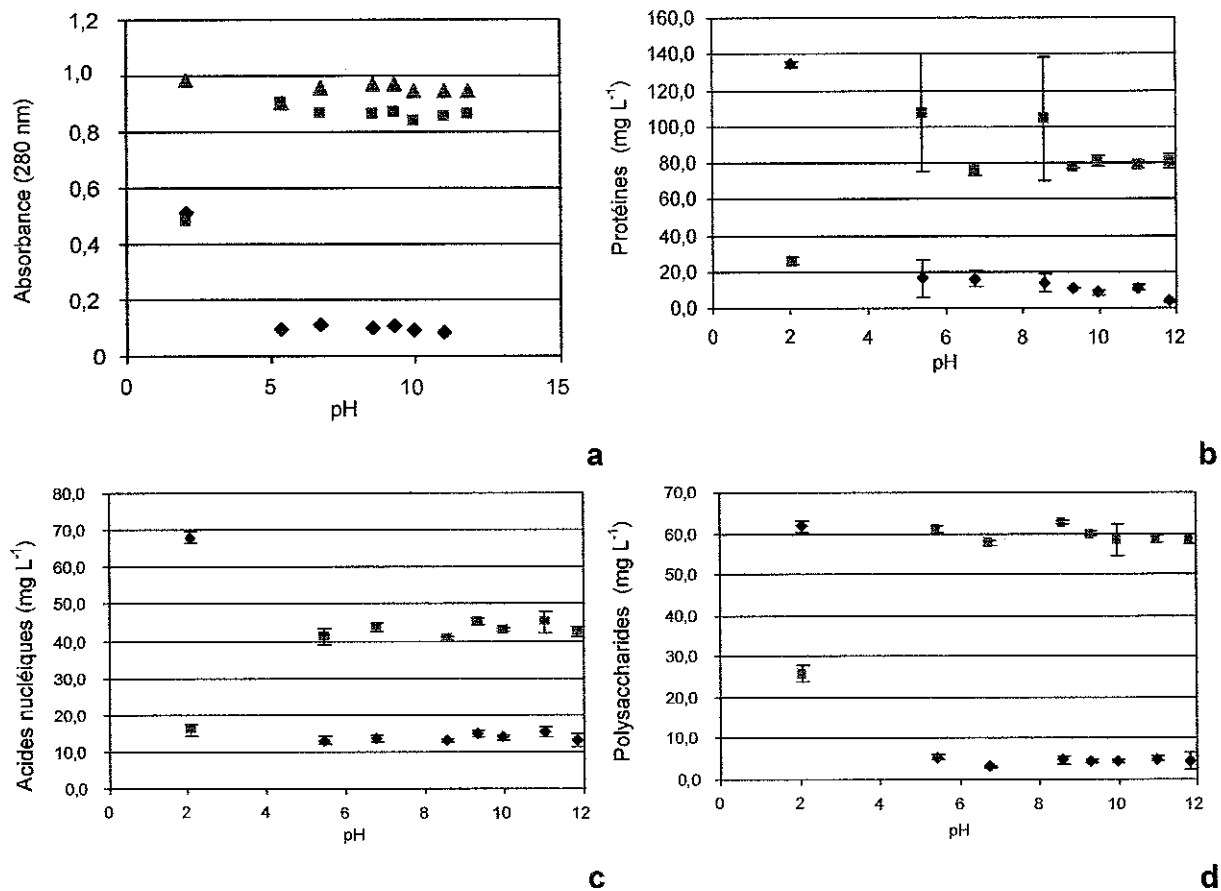


Figure 5.6 : Répartition de l'absorbance à 280 nm (a), des protéines (b), des acides nucléiques (c) et des polysaccharides dans le surnageant (v), le culot (♥) après précipitation des EPS par le SA à 4 °C et à différentes valeurs de pH.

En résumé, la précipitation des exopolymères par le sulfate d'ammonium à 4 °C est influencée par la quantité ajoutée de SA et le pH du mélange. La standardisation repose sur le compromis suivant : cette étape doit éliminer les EPS qui pourraient précipiter lors de la séparation des EPS par CIH et elle ne doit pas provoquer la précipitation de la totalité des EPS. Aussi, les études de précipitation des EPS par le SA à 4 °C sont effectuées avec une concentration finale de SA de 0,5 M et ajustée à une valeur de pH de 7,0.

5.4. Réponse des agrégats biologiques à des stress oxygène

Le but de cette étude était d'évaluer la réponse des agrégats biologiques, soumis à des discontinuités en oxygène, sur différents paramètres :

- des caractéristiques globales des agrégats biologiques,
- de l'analyse qualitative et quantitative des exopolymères (EPS),
- de la composition des lipides des agrégats biologiques.

Protocole général

Les boues activées et les eaux usées brutes ont été prélevées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville (N) et de Toul (T). Les essais ont été réalisés dans deux réacteurs (Applikon, Z61104CT05) placés dans une pièce thermostatée ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Chacun des réacteurs de 5 L a été rempli avec 3,5 L de boues activées et placés sous une agitation de 180 rpm avec une hélice marine. Les entrées de fluides ont été filtrées sur membrane de porosité $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, SLFG05010). La teneur en oxygène dissous a été mesurée (sonde Ingold Mettler-Toledo 5307042) et a été ajustée avec de l'oxygène et de l'azote (AirLiquide, qualité 5). Le pH est mesuré (sonde Mettler-Toledo 104054481). Le contrôle des paramètres, pH, température et taux d'oxygène, a été assuré au cours du temps par le système Biocontroller ADI 1030 (Applikon) et l'acquisition des données s'est effectuée grâce au logiciel Bioxpert (Applikon, version 1.13.078). Les paramètres, température et taux d'oxygénation, ont été contrôlés et ajustés toutes les minutes pour les maintenir à la valeur de référence grâce aux systèmes de contrôle BioController ADI 1030 (Applikon, France) et BioConsole ADI 1035 (Applikon, France). Un schéma du dispositif expérimental est présenté sur la Figure 5.7.

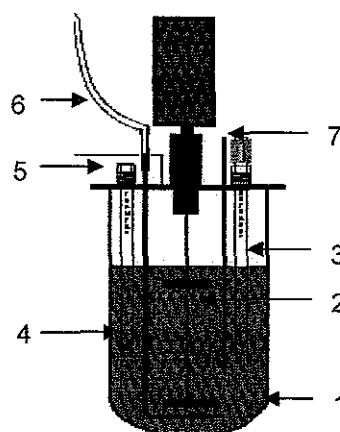


Figure 5.7 : Représentation schématique du dispositif expérimental. 1 : Double paroi en verre permettant la régulation de la température à 25°C ; 2 : hélice marine (agitation à 150 rpm) ; 3 : Sonde pH ; 4 : Sonde oxygène ; 5 : Sortie ; 6 : Entrée d'oxygène (1 bar) et d'azote (1 bar) ; 7 : Sortie de prélèvement.

Le taux d'oxygénation, dans le mélange boues activées et eau, des réacteurs a été régulé pendant 2 heures à 30 % de la saturation avec de l'oxygène et de l'azote. Après 1 h de stabilisation des boues placées dans les réacteurs, 1 L de surnageant des boues décantées (après arrêt de l'agitation et de l'oxygénation pendant 30 minutes) ont été remplacés dans chaque réacteur par 1 L d'eaux usées brutes à 25°C . Les eaux usées ajoutées ont été caractérisées par les mesures de pH, de conductivité, des matières sèches et volatiles et de la turbidité. Le schéma de régulation de la concentration en oxygène était le suivant : le réacteur contrôle est maintenu constamment à 30 % de la saturation en oxygène par des ajouts d'oxygène et d'azote successivement alors que le réacteur stress subi 7 cycles rapides de variation de la concentration en oxygène selon le schéma 1 h à 100 %

suivis de 1 h à 30 % de la saturation (Figure 5.8). Les suivis expérimentaux de la concentration en oxygène sont rassemblés à titre indicatif dans l'Annexe A2.

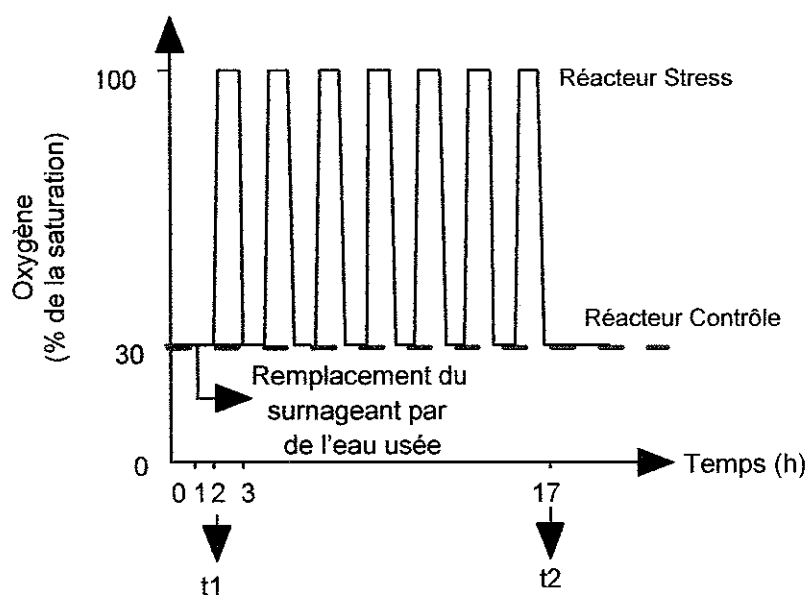


Figure 5.8 : Profils de régulation de la concentration en oxygène dans les réacteurs contrôle et stress.

Deux prélèvements ont été effectués après 2 et 17 h dans chacun des réacteurs (contrôle et stress). Les caractéristiques des boues mesurées sont les matières sèches totales (TS_{Boues}) et volatiles (MV_{Boues}) (cf. § 3.2.1), la capacité des boues à décanter réalisée en diluant des boues avec de l'eau épurée filtrée sur une membrane de 1,2 μm de porosité ($dSVI$) (cf. § 3.2.2), la turbidité (cf. § 3.3.1), la conductivité ($k_{20^\circ\text{C}}$), le pH (cf. § 3.3.2) et l'hydrophobicité des agrégats dispersés par les termes $A\%$ et Ke (cf. § 3.5.1).

Les EPS des boues (boues N_1 , N_2 , N_3 , T_6 , T_7 et T_8) placées dans les deux réacteurs ont été extraits par les ultrasons et une résine échangeuse de cations (cf. § 3.4.1.2) aux deux temps de prélèvements 2 et 17 h. Les EPS ont été caractérisés par les mesures de matières sèches et volatiles (cf. § 3.4.2.1), de protéines et de substances dites humiques (cf. § 3.4.2.2 et cf. § 3.4.2.3), des polysaccharides (cf. § 3.4.2.4) et d'acides nucléiques (cf. § 3.4.2.5).

Sur deux essais, les EPS extraits des boues T_7 et T_8 ont été précipités par le sulfate d'ammonium à 4 $^\circ\text{C}$ (cf. § 3.5.2.1) et les EPS non précipités ont été ensuite séparés en fonction de leur affinité pour un ligand hydrophobe (cf. § 3.5.2.2) selon le schéma de la Figure 5.3.

Dans un essai, les lipides ont été extraits des boues T_8 prélevées dans les deux réacteurs par un mélange de solvants organiques (cf. § 3.8.1), puis les lipides extraits ont été congelés et lyophilisés. Les lipides extraits ont ensuite été fractionnés en fonction de leur affinité pour la silice activée en trois fractions : les phospholipides (PL), les glycolipides (GL) et les lipides neutres (NL) (cf. § 3.8.2). Les acides gras de chacune de ses fractions et les acides gras hydroxylés en position 2 et 3 des

lipopolysaccharides (LPS) contenus dans le résidu non extractible (*cf.* § 3.8.3) ont été séparés et analysés par CPG-SM (*cf.* § 3.8.4).

L'ensemble des résultats a été comparé soit à l'aide d'un test statistique de Student (*cf.* § 3.9.1), soit à l'aide d'une analyse statistique en composantes principales (*cf.* § 3.9.2).

5.4.1. Caractéristiques des boues activées (Toul et Nancy-Maxéville)

Les boues activées des deux systèmes de traitements d'eaux usées urbaines (Toul (T) et Nancy-Maxéville (N)) présentent des caractéristiques physico-chimiques similaires (Tableau 5.3). L'analyse des 8 échantillons de boues activées prélevées sur une période de 5 mois à la station d'épuration de Toul (T_1 à T_8) montre une valeur moyenne de MV_{Boues} de 1,96 avec un rapport $MV_{\text{Boues}}/TS_{\text{Boues}}$ de 54 % pour une période de 5 mois. De même, les MV_{Boues} des boues de Nancy-Maxéville (N_1 à N_3) montrent une valeur moyenne de MV_{Boues} de 1,68 et un rapport $MV_{\text{Boues}}/TS_{\text{Boues}}$ de 62 % sur une période de prélèvement de 3 mois. La variabilité intra-station de ces paramètres reste faible pour un système industriel.

La composition des EPS extraits de ces mêmes boues des deux stations sont similaires et quantitativement du même ordre de grandeur (Tableau 5.3). Les EPS extraits, aussi bien des boues de Toul que de Nancy-Maxéville, sont composés de protéines essentiellement, mais également de substances dites humiques, de polysaccharides et d'acides nucléiques. Le rapport protéines sur les polysaccharides et les acides nucléiques est similaire pour les boues de Toul et de Nancy-Maxéville (en moyenne 1,8).

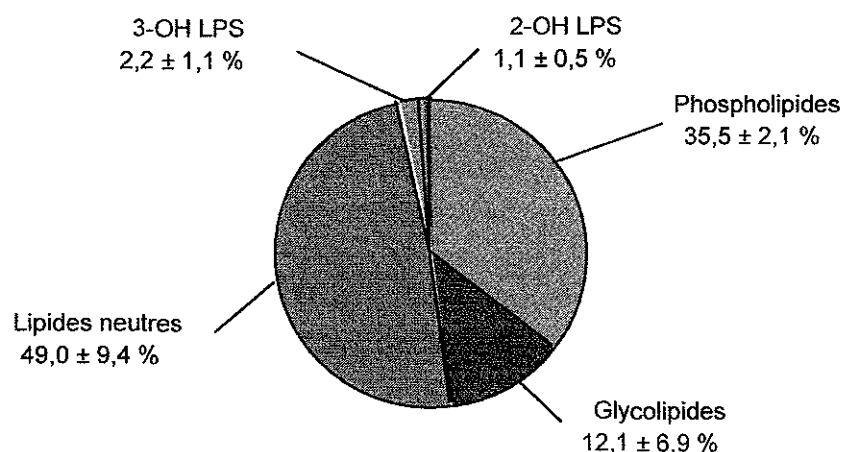
La caractérisation du caractère hydrophobe des EPS par le sulfate d'ammonium (SA) et la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) montre que $38,3 \pm 8,3$ % des EPS extraits des boues de Toul sont dits hydrophobes (Tableau 5.3). Les EPS se répartissent dans les fractions obtenues par SA et CIH (EPS précipités, faiblement, fortement et non retenus par le ligand hydrophobe) de la façon suivante : 73,7 % des EPS extraits sont précipités par le SA, 10,2 % des EPS sont faiblement retenus, seulement 1,8 % des EPS sont fortement retenus par le ligand hydrophobe, et 48,9 % des EPS sont dits hydrophiles c'est-à-dire non précipités par le SA et non retenus pour le ligand hydrophobe. La part d'EPS hydrophobes extraits des boues de Toul sont du même ordre de grandeur que les EPS extraits de boues stockées dans des conditions d'anaérobiose qui représentaient de 10 à 67 % des EPS (Jorand, 2000).

Tableau 5.3 : Caractéristiques initiales des boues activées et des exopolymères (EPS) (Moyenne $\pm$ écart-type).

<i>Boues activées</i>	Toul (T_1 à T_8) (n = 8 boues)	Nancy (N_1 à N_3) (n = 3 boues)
TS_{Boues} (g L ⁻¹)	3,63 $\pm$ 0,37	2,70 $\pm$ 0,14
MV_{Boues} (g L ⁻¹)	1,96 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,14
MV_{Boues}/TS_{Boues} (%)	54 $\pm$ 3	62 $\pm$ 2
pH	7,7 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,1
Conductivité (μS cm ⁻¹)	579 $\pm$ 352	644 $\pm$ 195
SVI (mL g ⁻¹ de TS_{Boues})	227 $\pm$ 27	128 $\pm$ 63
A % (%)	75 $\pm$ 10	66 $\pm$ 15
Ke	2,37 $\pm$ 1,09	2,16 $\pm$ 1,55
<i>Exopolymères</i>	Toul (T_6 à T_8) (n = 3 boues)	Nancy (N_1 à N_3) (n = 3 boues)
TS_{EPS} (g L ⁻¹)	0,93 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,11
MV_{EPS} (g L ⁻¹)	0,35 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,06
MV_{EPS}/TS_{EPS} (%)	37,0 $\pm$ 0,8	23,4 $\pm$ 7,0
MV_{EPS}/MV_{Boues} (%)	17,8 $\pm$ 1,1	16,7 $\pm$ 3,3
Protéines (mg g ⁻¹ MV_{EPS})	274,7 $\pm$ 97,7	337,5 $\pm$ 73,0
Substances dites humiques (mg g ⁻¹ MV_{EPS})	103,8 $\pm$ 17,3	355,2 $\pm$ 336,8
Polysaccharides (mg g ⁻¹ MV_{EPS})	79,3 $\pm$ 25,3	93,2 $\pm$ 22,7
Acides nucléiques (mg g ⁻¹ MV_{EPS})	117,4 $\pm$ 35,7	66,1 $\pm$ 17,3
Protéines/(polysaccharides + acides nucléiques)	1,50 $\pm$ 0,55	2,16 $\pm$ 0,38
EPS hydrophobes totaux (%) *	38,3 $\pm$ 8,3 *	ND

ND : Non Déterminé; * : n = 4 boues.

Les lipides de la boue T_6 (seul échantillon analysé pour son contenu en lipides) sont composés majoritairement de lipides neutres et de phospholipides suivis des glycolipides et en plus faible proportion des lipopolysaccharides dans les deux réacteur (contrôle stress) à $t = 2$ h (Figure 5.9).

Figure 5.9 : Proportions (% de la masse) des phospholipides, des glycolipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharides (LPS) des boues de Toul placées dans les réacteurs contrôle et stress à $t = 2$ h (n = 3 mesures).

Au cours du vieillissement (en 15 h) des boues placées dans les réacteurs maintenus à une concentration en oxygène de 30 % de la saturation en air, seuls les paramètres MV_{Boues} et la turbidité sont apparus significativement différents au seuil de probabilité de 95 % entre les deux prélèvements effectués aux temps 2 et 17 h (Tableau 5.4). Dans tous les cas, les MV_{Boues} diminuent dans les deux réacteurs, alors que la turbidité du surnageant des boues augmente après 17 h d'expérimentation. Ceci peut être attribué au "vieillissement" des boues placées dans les réacteurs. Concernant la variation des lipides dans le réacteur contrôle, les proportions de lipopolysaccharides 2-OH et 3-OH, respectivement, augmentent et diminuent dans le réacteur contrôle. Aucun test de signification n'a pu être réalisé car cette comparaison repose sur un seul essai dont les analyses sont effectuées en duplicat.

Tableau 5.4 : Variations significatives au seuil de probabilité de 95 % par un test de Student des paramètres mesurés entre les deux temps de prélèvements 2 et 17 h pour les réacteurs contrôle.

Probabilités	Toul et Nancy-Maxéville
Boues activées	<i>(n = 12 boues)</i>
MV_{Boues}	0,0090 *
SVI	0,0520 **
pH	0,5394 **
Conductivité	0,2514 **
Turbidité	0,0030 *
A %	0,4798 **
Ke	0,1268 **
Exopolymères	<i>(n = 6 boues)</i>
MV_{EPS}	0,1101 **
$MV_{\text{EPS}}/MV_{\text{Boues}}$	0,0273 *
Protéines	0,0850 **
Substances dites humiques	0,3411 **
Polysaccharides	0,1780 **
Acides nucléiques	0,1206 **
Protéines/(polysaccharides+acides nucléiques)	0,1010 **
EPS hydrophobes totaux	ND

ND : Non Déterminé; * : différence significative au seuil de 95 % ($p < 0,05$) ; ** : différence non significative au seuil de 95 %.

5.4.2. Effet des discontinuités en oxygène sur les agrégats biologiques

Les discontinuités en oxygène appliquées aux agrégats biologiques de boues activées, en réacteur, ont été suivies en analysant les caractéristiques globales des boues activées, la composition, la quantité et les propriétés hydrophobes des exopolymères extraits de ces mêmes boues et la composition des lipides des boues activées. Les discontinuités en oxygène considérées équivalentes à un stress oxygène, dans notre étude, sont comparées à un réacteur constamment régulé à une concentration en oxygène constante de 30 % de la saturation en air.

5.4.2.1. Variation des caractéristiques globales des boues activées.

Les résultats bruts des caractéristiques des boues activées, placées dans les deux réacteurs, sont présentés dans le Tableau 5.5. Quelques paramètres se comportent de la même façon entre les essais et entre les deux réacteurs contrôle et stress. Ainsi, les MV_{Boues} diminuent dans tous les réacteurs après 17 h d'expérimentation. La capacité des boues (DSVI et SVI) s'améliore dans les deux réacteurs contrôle et stress à la fin de l'expérimentation, à l'exception de la boue N_3 placée dans un réacteur contrôle. La turbidité augmente légèrement dans les réacteurs contrôle et stress après 17 h d'expérimentation. La conductivité du surnageant de boues dans les deux réacteurs contrôle et stress ne montre aucune variation significative. Les pH augmentent généralement de 7,4 à 8,4 après 17 heures d'expérimentation (Figure 5.10).

Toutefois, la variation des caractéristiques globales des boues activées n'est pas, d'une façon générale, homogène et systématique d'un essai à l'autre et entre les deux réacteurs contrôle et stress. Les variations peuvent se traduire par une augmentation, une diminution ou pas de variation des caractéristiques mesurées après un temps de 17 h.

Tableau 5. 5 : Caractéristiques des boues activées de Toul placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

Date	N°	Réacteur	Temps (h)	TS _{Boues} (g L ⁻¹)		MV _{Boues} (g L ⁻¹)		MV _{Boues} /TS _{Boues} (%)		dSVI (mL g ⁻¹ TS _{Boues})		SVI (mL g ⁻¹ TS _{Boues})		Turbidité (NTU)		K _{20°C} (μS cm ⁻¹)		pH		A %		Ke	
5/02/02	T ₁	C	2	4,15	± 0,02	2,22	± 0,07	53	249,0	± 25,8	212,7	± 2,8	nd	nd	nd	85,6	± 2,0	3,40	± 0,20				
		C	17	3,41	± 0,10	1,79	± 0,02	52	146,4	± 12,6	220,1	± 12,8	nd	nd	nd	84,3	± 2,3	2,83	± 0,15				
		S	2	4,17	± 0,07	2,15	± 0,06	52	233,2	± 33,5	212,6	± 7,7	nd	nd	nd	81,0	± 4,0	3,01	± 0,28				
		S	17	3,50	± 0,12	1,85	± 0,10	53	152,7	± 8,6	234,1	± 12,4	nd	nd	nd	75,7	± 3,6	3,31	± 0,65				
14/02/02	T ₂	C	2	3,24	± 0,03	1,77	± 0,03	55	290,8	± 23,0	265,3	± 0,0	nd	nd	nd	84,4	± 0,1	2,54	± 0,78				
		C	17	3,24	± 0,02	1,71	± 0,07	53	181,9	± 3,4	263,9	± 16,5	nd	nd	nd	86,8	± 1,3	6,29	± 2,40				
		S	2	3,28	± 0,03	1,83	± 0,01	56	265,9	± 50,9	268,1	± 3,0	nd	nd	nd	82,5	± 1,0	2,77	± 0,55				
		S	17	3,2	± 0,09	1,76	± 0,02	55	213,8	± 34,1	240,1	± 12,4	nd	nd	nd	86,1	± 3,5	4,95	± 1,50				
19/02/02	T ₃	C	2	4,14	± 0,01	2,18	± 0,03	53	231,4	± 14,7	218,1	± 4,4	2,00	153	8,07	83,0	± 4,5	2,18	± 0,40				
		C	17	3,94	± 0,01	2,18	± 0,01	55	194	± 23,2	202,9	± 6,7	2,64	152	8,14	81,1	± 3,3	2,66	± 0,53				
		S	2	4,11	± 0,07	2,22	± 0,01	54	229,9	± 42,2	218,2	± 5,3	8,20	151	8,28	82,5	± 1,9	5,25	± 0,15				
		S	17	3,93	± 0,05	2,19	± 0,05	56	216,2	± 46,2	199,1	± 11,4	4,10	150	8,35	76,7	± 4,5	2,67	± 0,29				
4/03/02	T ₄	C	2	3,54	± 0,01	1,84	± 0,04	52	119,6	± 23,4	nd		4,30	157	7,59	69,3	± 3,8	1,00	± 0,18				
		C	17	3,41	± 0,06	1,70	± 0,03	50	96,8	± 2,3	236,2		6,15	155	7,77	82,3	± 1,0	1,23	± 0,17				
		S	2	3,66	± 0,03	1,91	± 0,03	52	107,0	± 22,3	nd		5,95	148	8,36	69,4	± 1,2	1,17	± 0,07				
		S	17	3,42	± 0,06	1,7	± 0,07	50	99,5	± 4,0	245,6		6,10	148	8,42	80,8	± 3,0	1,29	± 0,06				
14/06/02	T ₅	C	2	3,81	± 0,02	2,02	± 0,04	53	78,9	± 7,4	nd		8,46	972	7,66	76,1	± 0,4	1,59	± 0,16				
		C	17	3,72	± 0,03	2,01	± 0,02	54	57,6	± 6,9	nd		11,10	922	7,74	80,4	± 2,9	1,98	± 0,26				
		S	2	3,70	± 0,03	1,93	± 0,07	52	52,1	± 2,6	nd		8,76	978	7,57	71,8	± 5,1	1,35	± 0,16				
		S	17	3,34	± 0,06	1,79	± 0,07	54	49,1	± 1,4	nd		11,30	938	7,91	70,2	± 7,3	1,69	± 0,23				

C : Réacteurs contrôle ; S : Réacteur stress ; nd : non déterminé.

Tableau 5. 5 (suite) : Caractéristiques des boues activées de Toul et Nancy placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

Date	N°	Réacteur	Temps (h)	TS _{Boues} (g L ⁻¹)			MV _{Boues} (g L ⁻¹)			MV _{Boues} /TS _{Boues} (%)			dSVI (mL g ⁻¹ TS _{Boues})			SVI (mL g ⁻¹ TS _{Boues})			Turbidité (NTU)		K _{20°C} (μS cm ⁻¹)		pH		A %			Ke		
25/06/02	T ₆	C	2	3,33	±	0,04	1,75	±	0,11	53	82,2	±	2,9	nd	8,80	855	7,40	68,9	±	4,6	1,39	±	0,22							
		C	17	3,29	±	0,03	1,65	±	0,14	50	67,9	±	0,0	nd	11,60	852	7,77	71,7	±	2,9	1,55	±	0,31							
		S	2	3,37	±	0,05	1,82	±	0,10	54	85,7	±	1,9	nd	9,70	854	7,54	69,0	±	7,0	1,42	±	0,17							
		S	17	3,24	±	0,05	1,65	±	0,11	51	69,4	±	0,0	nd	11,80	851	7,78	69,7	±	4,3	1,33	±	0,40							
3/07/02	T ₇	C	2	3,25	±	0,05	1,92	±	0,04	59	48,5	±	1,2	nd	8,17	729	7,42	55,5	±	6,2	1,70	±	0,37							
		C	17	3,06	±	0,08	1,73	±	0,08	57	47,7	±	1,3	nd	10,5	726	7,78	59,1	±	3,92	0,49	±	0,43							
		S	2	3,17	±	0,06	1,96	±	0,05	62	51,1	±	1,3	nd	8,01	729	7,43	55,5	±	6,2	1,70	±	0,37							
		S	17	3,1	±	0,12	1,81	±	0,12	58	47,1	±	1,3	nd	10,9	728	7,74	54,9	±	0,4	1,57	±	0,19							
9/09/02	T ₈	C	2	3,60	±	0,09	1,96	±	0,04	54	76,5	±	2,6	222	8,6	609	7,42	81,1	±	6,3	3,10	±	2,74							
		C	17	3,29	±	0,09	1,68	±	0,16	51	77,1	±	0,0	207	10,8	602	7,87	81,1	±	6,3	3,10	±	2,74							
		S	2	3,55	±	0,03	1,92	±	0,07	54	81,3	±	2,7	201	7,15	613	7,42	84,4	±	1,5	4,41	±	0,67							
		S	17	3,29	±	0,04	1,69	±	0,13	51	78,7	±	0,0	220	8,1	608	7,9	90,5	±	1,0	6,92	±	0,64							
10/05/01	N ₁	C	2	2,68	±	0,10	1,57	±	0,116	59	nd			62,8	13	740	7,58			60,3			0,91							
		C	17	2,63	±	0,11	1,54	±	0,08	59	nd			54,7	14	770	7,47			42,9			2,74							
		S	2	2,67	±	0,04	1,61	±	0,01	60	nd			63	10,8	738	7,52			57,2			0,92							
		S	17	2,69	±	0,03	1,60	±	0,01	59	nd			50,5	11	779	7			38,1			3,17							
3/07/01	N ₂	C	2	2,50	±	0,03	1,60	±	0,04	64	nd		202,7 ± 19,7	nd	798	nd		55,5					1,67							
		C	17	2,36	±	0,01	1,48	±	0,03	63	nd		226,7 ± 3,0	nd	731	nd		59,1					0,72							
		S	2	2,50	±	0,03	1,60	±	0,04	64	nd		202,7 ± 19,7	nd	798	nd		55,5					1,67							
		S	17	2,46	±	0,08	1,59	±	0,09	65	nd		142,3 ± 0,0	nd	731	nd		54,9					1,56							
8/10/01	N ₃	C	2	2,91	±	0,03	1,85	±	0,03	63	nd		120,3 ± 11,9	19,6	395	7,39	81,1	±	6,3				3,39							
		C	17	2,92	±	0,02	1,81	±	0,01	62	nd		107,2 ± 7,1	19,53	433	6,99	90,7	±	0,9				4,66							
		S	2	2,93	±	0,054	1,872	±	0,07	64	nd		118,4 ± 11	5,98	395	7,4	84,4	±	1,5				4,41							
		S	17	2,95	±	0,045	1,816	±	0,03	62	nd		110,8 ± 7,8	9,02	430	6,9	90,5	±	1,0				6,92							

C : Réacteurs contrôle ; S : Réacteur stress ; nd : non déterminé

Figure 5.10 : Evolution du pH des boues activées de Toul (T) placées dans les réacteurs contrôle (trait noir) et stress (gris) maintenus à 25 ± 2 °C.

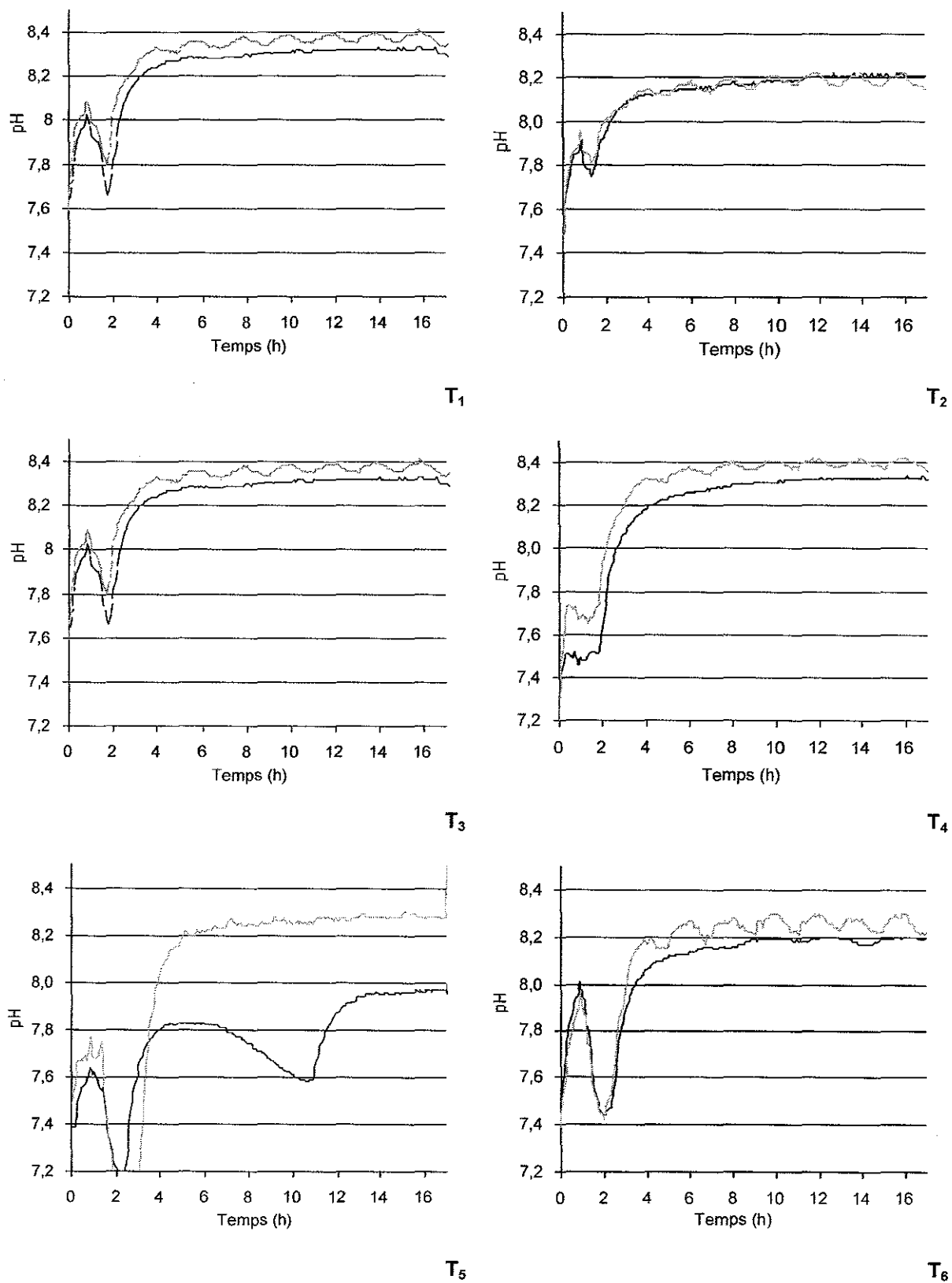
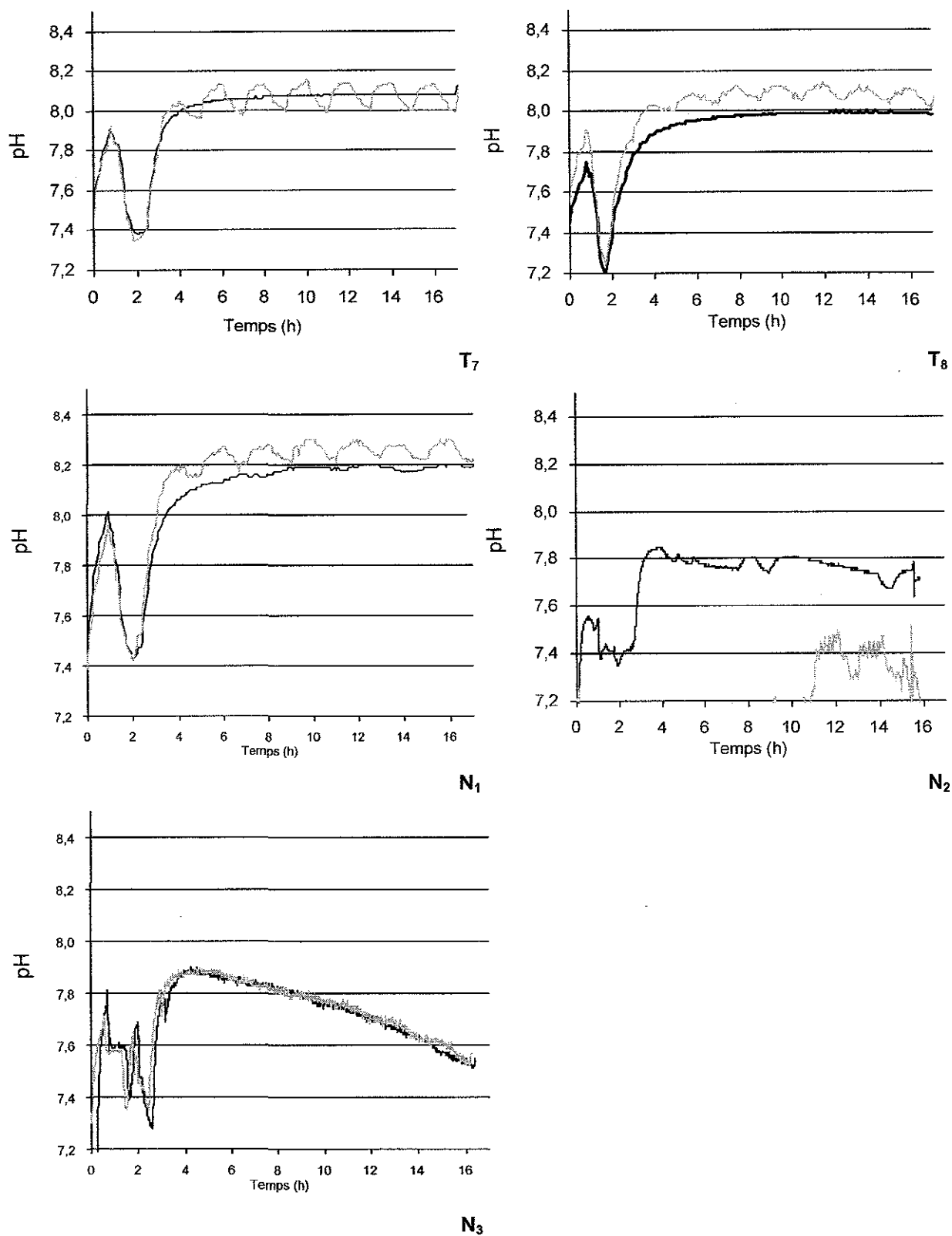


Figure 5.10 : Evolution du pH des boues activées de Toul (T) et de Nancy-Maxéville (N) placées dans les réacteurs contrôle (noir) et stress (gris) maintenus à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.



A titre d'exemple, les valeurs de K_e des boues placées dans les 2 réacteurs contrôle et stress après 17 h d'expérimentation augmentent dans 6 essais sur 11 (boues T_2 , T_4 , T_5 , T_8 , N_1 et N_3) et diminuent dans 2 essais sur 11 (boues T_7 et N_4) (Figure 5.11). Dans 3 essais sur 11, les valeurs de K_e montrent des variations de signes opposés entre le réacteur contrôle et stress.

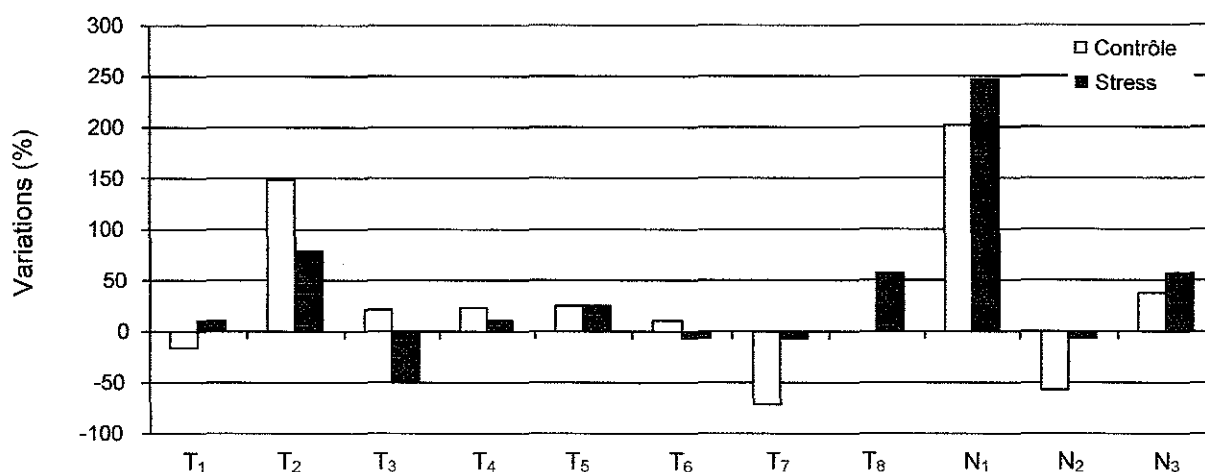


Figure 5.11 : Variations (%) du terme K_e dans les réacteurs contrôle et stress après 17 h d'expérimentation.

Notre hypothèse de travail était que des discontinuités en oxygène, appliquées à des agrégats biologiques, devaient contribuer à augmenter le caractère hydrophobe des agrégats. Or, les résultats montrent que les valeurs de K_e entre le réacteur contrôle et stress varient généralement d'une façon similaire (Boues T_2 , T_4 , T_5 , T_7 , T_8 , N_1 , N_2 et N_3) (Figure 5.11). Ces résultats montrent la prépondérance du paramètre boue plutôt que de l'effet discontinuités en oxygène. Les boues T_1 , T_5 , T_8 , N_1 et N_3 placées dans les réacteurs stress montrent une augmentation de la mesure de l'hydrophobicité mesurée par le terme K_e par rapport aux boues placées dans les réacteurs contrôle (Figure 5.11) et répondent à l'hypothèse que nous avons formulée. Parmi ces 5 essais (boues T_1 , T_5 , T_8 , N_1 et N_3), seules les comparaisons des boues T_5 et T_8 montrent une différence significative, au seuil de 95 %, entre les réacteurs contrôle et stress à la fin de la période de stress oxygène (Tableau 5.6). Malheureusement, la comparaison des essais N_1 , N_2 et N_3 n'a pas pu être réalisée car les mesures n'ont pas été effectuées en triplicat.

Tableau 5.6 : Probabilités de signification au seuil de 95 % le test de Student pour le terme Ke pour les essais réalisés avec les boues de Toul.

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
C ₂ -C ₁₇	0,0179 *	0,0619	0,2794	0,1872	0,1392	0,5050	0,0390 *	-
S ₂ -S ₁₇	0,4941	0,0776	0,0015 *	0,0832	0,0236 *	0,7383	0,6068	0,0092 *
C ₂ -S ₂	0,1214	0,6908	0,0022 *	0,1955	0,1392	0,8174	-	0,7464
C ₁₇ -S ₁₇	0,2793	0,4598	0,9812	0,5838	0,0236 *	0,5106	0,0103 *	0,0374 *

C₂: Réacteur contrôle à 2 h ; C₁₇: Réacteur contrôle à 17 h ; S₂: Réacteur stress à 2 h ; S₁₇: Réacteur stress à 17 h ; T₁ à T₈: Prélèvements de boues ; * : p < 0,05 : différence significative au seuil de 95 % ; - : Non déterminé.

5.4.2.2. Variation de la quantité, de la composition et du caractère hydrophobe des EPS

Comme pour les caractéristiques globales des boues, les variations des EPS extraits ne sont pas systématiques et homogènes entre les essais et entre les réacteurs. Les quantités et la composition des EPS extraits des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress sont présentées dans le Tableau 5.7.

Généralement, les exopolymères entre les deux réacteurs (contrôle et stress) montrent des variations similaires. Les protéines diminuent dans les réacteurs contrôle et stress, excepté pour la boue T₆ placée dans le réacteur stress et la boue T₈ dans les réacteurs contrôle et stress (Figure 5.12). La variation de la concentration en protéines d'un essai à l'autre est généralement similaire pour les deux réacteurs. Aussi, les quantités de protéines semblent varier de façon similaire bien que la concentration en oxygène dans les deux réacteurs soit différente.

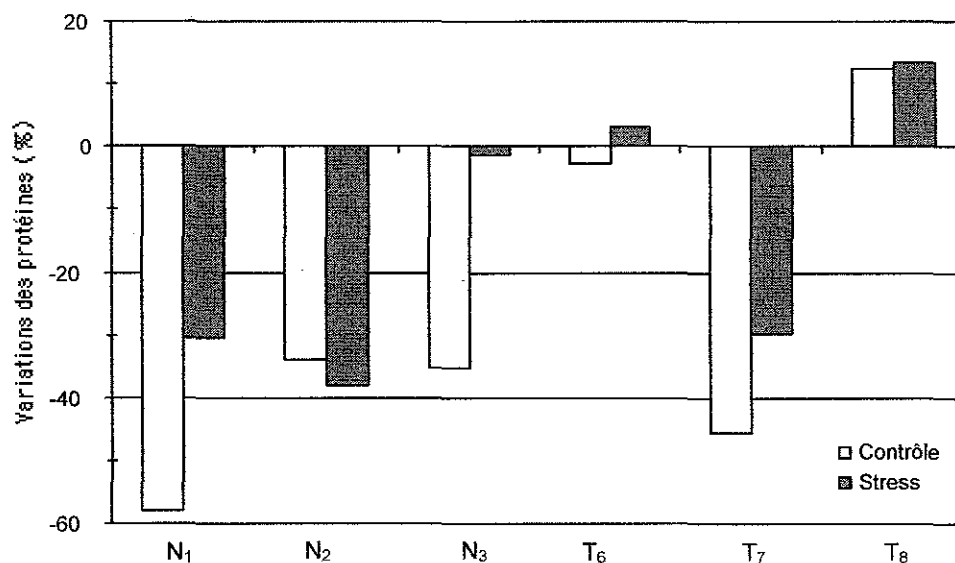


Figure 5.12 : Variations (%) des protéines extraites des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress.

Tableau 5.7 : Caractéristiques des EPS extraits par les ultrasons et une résine échangeuse de cations dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

N °	Réacteur	Temps (h)	TS _{EPS} (g L ⁻¹)		VS _{EPS} (g L ⁻¹)		VS _{EPS} /TS _{EPS} (% EPS)		VS _{EPS} /VS _{Boues} (%)		Protéines (mg g ⁻¹ VS _{EPS})		Subst. dites humiques (mg g ⁻¹ VS _{EPS})		Polysaccharides (mg g ⁻¹ VS _{EPS})		Acides nucléiques (mg g ⁻¹ VS _{EPS})		Protéines / (Ac. Nucléiques + polysaccharides)	
N ₁	C	2	0,86	± 0,03	0,22	± 0,05	26	14	436,30	± 26,50	775,00	± 35,00	130,00	± 4,50	92,20	± 2,60	1,96			
	C	17	0,96	± 0,02	0,35	± 0,00	36	23	183,60	± 14,60	569,70	± 12,00	80,00	± 3,30	58,90	± 1,60	1,32			
	S	2	1,11	± 0,18	0,35	± 0,09	31	22	266,70	± 9,80	480,00	± 0,20	85,50	± 1,20	53,80	± 0,80	1,91			
	S	17	0,98	± 0,01	0,33	± 0,04	33	20	185,40	± 5,10	602,70	± 12,20	85,60	± 1,30	64,00	± 0,90	1,24			
N ₂	C	2	0,94	± 0,03	0,25	± 0,01	27	16	318,10	± 27,70	82,80	± 8,40	95,80	± 2,70	72,00	± 2,00	1,90			
	C	17	0,84	± 0,03	0,29	± 0,03	35	20	210,30	± 1,10	68,20	± 2,60	91,70	± 0,90	65,50	± 1,70	1,34			
	S	2	0,94	± 0,03	0,25	± 0,01	27	16	318,10	± 27,70	82,80	± 8,40	95,80	± 2,70	72,00	± 2,00	1,90			
	S	17	0,85	± 0,02	0,31	± 0,02	37	20	196,80	± 4,50	66,40	± 4,40	82,10	± 1,50	59,10	± 2,40	1,39			
N ₃	C	2	nd		0,22	± 0,05	nd	12	417,47	± 6,12	nd		92,84	± 5,20	64,66	± 2,10	2,65			
	C	17	nd		0,35	± 0,00	nd	19	270,84	± 5,01	nd		60,92	± 2,63	41,51	± 0,77	2,64			
	S	2	nd		0,35	± 0,09	nd	19	268,55	± 3,51	nd		59,45	± 3,29	41,86	± 2,05	2,65			
	S	17	nd		0,33	± 0,04	nd	18	264,86	± 7,54	nd		73,14	± 4,41	46,15	± 1,68	2,22			

C : Réacteurs contrôle ; S : Réacteur stress ; nd : non déterminé.

Tableau 5.7 (suite) : Caractéristiques des EPS extraits par les ultrasons et une résine échangeuse de cations dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

N °	Réacteur	Temps (h)	TS _{EPS} (g L ⁻¹)	VS _{EPS} (g L ⁻¹)	VS _{EPS} /TS _{EPS} (% EPS)	VS _{EPS} /VS _{Boues} (%)	Protéines (mg g ⁻¹ VS _{EPS})	Subst. dites humiques (mg g ⁻¹ VS _{EPS})	Polysaccharides (mg g ⁻¹ VS _{EPS})	Acides nucléiques (mg g ⁻¹ VS _{EPS})	Protéines / (Ac. Nucléiques + polysaccharides)
T ₆	C	2	1,15 ± 0,02	0,46 ± 0,01	40	26	223,85 ± 5,38	87,46 ± 1,54	46,22 ± 5,66	68,99 ± 1,15	1,94
	C	17	1,17 ± 0,03	0,47 ± 0,02	40	28	217,92 ± 5,16	88,87 ± 7,28	37,90 ± 1,28	68,07 ± 7,92	2,06
	S	2	1,28 ± 0,05	0,43 ± 0,01	34	24	252,87 ± 4,99	90,26 ± 0,30	49,95 ± 7,06	77,67 ± 6,41	1,98
	S	17	1,29 ± 0,04	0,42 ± 0,05	34	25	261,31 ± 6,67	93,86 ± 1,02	49,12 ± 7,14	77,88 ± 3,33	2,06
T ₇	C	2	0,91 ± 0,20	0,34 ± 0,04	37,36	17,71	222,32 ± 20,91	105,98 ± 5,13	107,02 ± 0,12	155,30 ± 1,26	0,85
	C	17	1,07 ± 0,06	0,44 ± 0,04	41,12	25,43	121,13 ± 13,63	85,54 ± 8,03	80,81 ± 1,49	114,93 ± 0,54	0,62
	S	2	1,05 ± 0,04	0,38 ± 0,04	36,19	19,39	163,77 ± 6,43	90,84 ± 6,07	87,27 ± 1,94	135,53 ± 1,85	0,74
	S	17	1,06 ± 0,04	0,45 ± 0,01	42,45	24,86	114,84 ± 5,81	83,57 ± 3,56	78,54 ± 2,68	111,22 ± 0,82	0,61
T ₈	C	2	0,90 ± 0,01	0,33 ± 0,02	36,67	16,84	420,2 ± 9,5	128,15 ± 2,94	97,2 ± 2,1	142,6 ± 4,8	1,75
	C	17	0,83 ± 0,02	0,28 ± 0,00	33,7	16,70	471,9 ± 2,6	142,13 ± 2,10	114,4 ± 2,9	153,9 ± 3,8	1,76
	S	2	0,87 ± 0,02	0,33 ± 0,01	37,9	17,20	366,3 ± 8,4	120,34 ± 8,87	88,4 ± 1,3	124,1 ± 3,2	1,72
	S	17	0,81 ± 0,04	0,28 ± 0,01	34,6	16,50	415,5 ± 8,1	140,59 ± 0,97	109,4 ± 1,6	146,3 ± 1,9	1,62

C : Réacteurs contrôle ; S : Réacteur stress ; nd : non déterminé.

De même, la variation du rapport protéines/(polysaccharides+acides nucléiques) entre les essais est différente (Figure 5.13). Comme pour les protéines, la boue T₆ montre une variation positive du rapport ainsi que la boue T₈ placée dans le réacteur contrôle. Dans 4 essais sur 6, la variation du rapport est négative pour le réacteur contrôle et dans 5 essais sur 6 pour le réacteur stress.

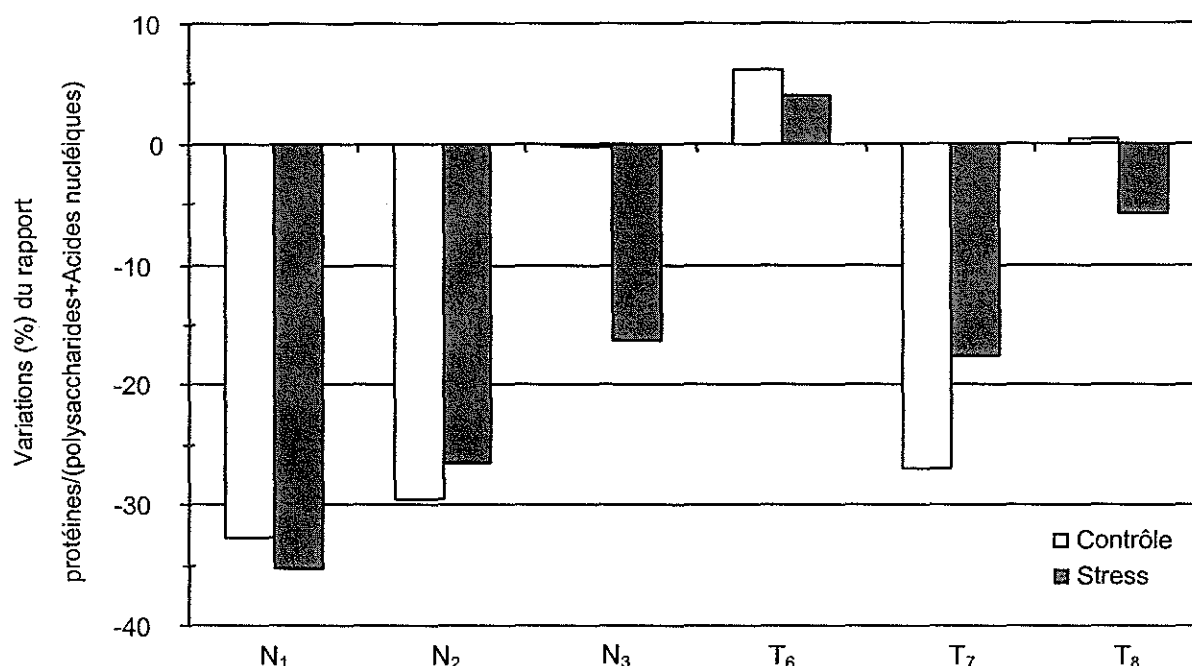


Figure 5.13 : Variations (%) du rapport protéines/(polysaccharides+acides nucléiques) des EPS extraits dans les réacteurs contrôle et stress.

Comme dans le cas des caractéristiques globales des agrégats biologiques, le paramètre boue est prépondérant sur la composition quantitative des EPS plutôt que les discontinuités en oxygène appliquées.

5.4.2.3. Caractère hydrophobe des EPS déterminé par une précipitation par le sulfate d'ammonium (SA) et la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH)

Les EPS extraits de deux boues (Boues T₇ et T₈) ont été séparés en fonction de leur précipitation par le sulfate d'ammonium et de leur affinité pour un ligand hydrophobe. Ainsi, les proportions des EPS retenus dans les fractions EPS solubles (non précipités par le SA) et non retenus par la résine hydrophobe, augmentent dans les réacteurs contrôle et stress des deux essais (Boues T₇ et T₈). Dans ces deux essais, les EPS non retenus par la résine hydrophobe augmentent, alors que la proportion des EPS hydrophobes totaux augmente pour la boue T₇ et diminue pour la boue T₈ quel que soit le réacteur. Les boues placées dans les deux réacteurs (contrôle et stress) semblent évoluer d'une façon similaire au sein d'un même essai, mais n'évoluent pas de la même manière selon la boue utilisée.

Un point important concerne les EPS fortement retenus par la résine hydrophobe (Figure 5.14). La variation des EPS fortement retenus est positive pour les réacteurs stress des deux essais indépendants (Boues T₇ et T₈), à l'opposé de ceux des réacteurs contrôle qui est négative. Les discontinuités en oxygène appliquées aux boues augmentent la proportion des EPS fortement retenus par la résine et en accord avec notre hypothèse de départ.

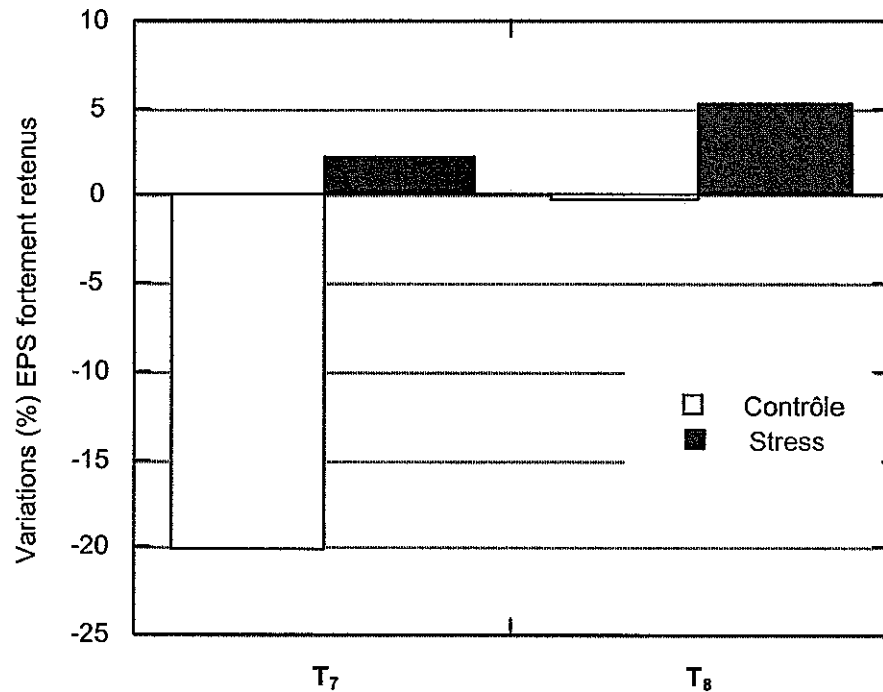
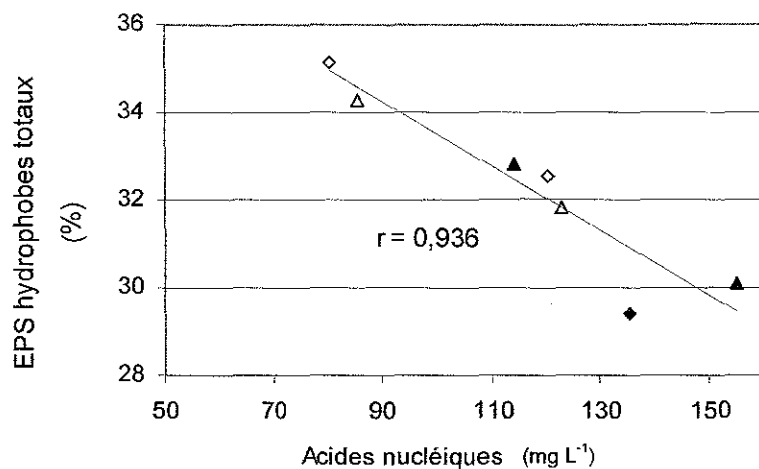
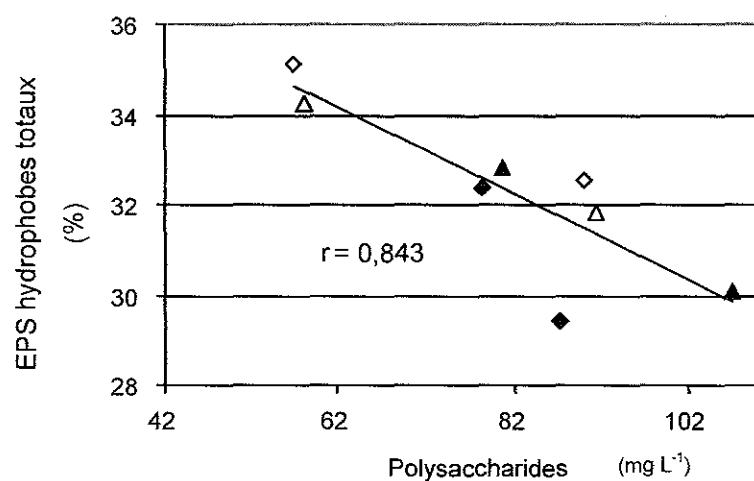


Figure 5.14 : Variations de la fraction EPS fortement en chromatographie d'interaction hydrophobe dans les réacteurs contrôle et stress (n = 2 boues).

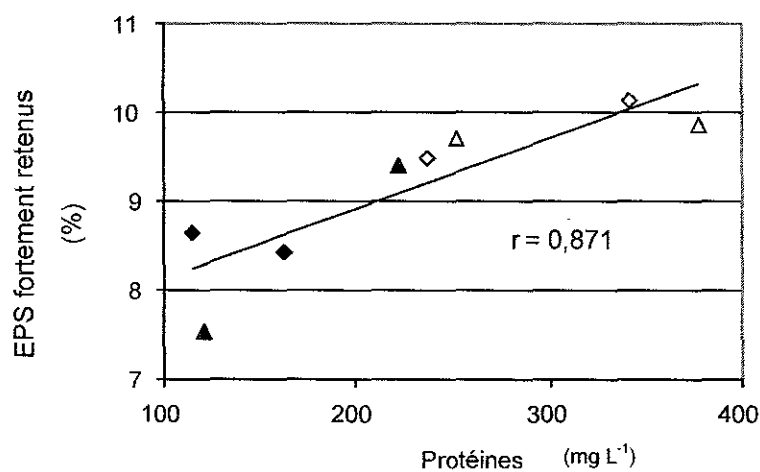
Les acides nucléiques et les polysaccharides des EPS extraits sont négativement corrélés avec la proportion d'EPS hydrophobe totaux (Figure 5.15). Par contre, les protéines des EPS sont positivement corrélées avec l'hydrophobicité des EPS fortement retenus par la résine hydrophobe. Par conséquent, l'augmentation du caractère hydrophobe des EPS, lors du stress oxygène, pourrait être due à l'augmentation de la concentration en protéines.



a



b



c

Figure 5.15 : Corrélations linéaires entre les polysaccharides, les acides nucléiques et les EPS hydrophobes totaux (SA + CIH) et entre les EPS fortement retenus et les protéines des EPS extraits dans les réacteurs contrôle et stress (Boue T₇ : ◇ (contôle), ♦ (stress); Boue T₈ : △ (contôle), ▲ (stress)). (r : coefficient de corrélation).

5.4.2.4. Caractérisation des lipides des boues placés dans les réacteurs contrôle et stress

Seul un essai a été réalisé avec la boue T₆ pour l'analyse des lipides des agrégats biologiques. Les lipides extraits des boues sont séparés en 5 fractions : phospholipides (PL), glycolipides (GL), lipides neutres (NL), 3-OH et 2-OH lipopolysaccharides (2-OH et 3-OH LPS). Les acides gras de chacune de ces fractions et les acides gras hydroxylés en position 2 et 3 des lipopolysaccharides (LPS) contenus dans le résidu non extractible de l'extraction des lipides ont été analysés. La composition des acides gras de chacune de ces fractions est rassemblée dans les Tableaux 5.8 – 5.12.

Au cours du stress oxygène, les GL, les NL, les 3-OH LPS et les 2-OH LPS diminuent de 12,1 %, 16,9 %, 9,1 % et de 9,3 % respectivement, alors que les PL augmentent de 30,5 % (Figure 5.16). La signification de la différence n'a pas pu être testée car les résultats obtenus proviennent d'un seul essai dont les analyses ont été réalisées en duplicat. Dans les deux réacteurs, les variations sont similaires pour les PL, NL et les 3-OH LPS et opposé pour les GL et les 2-OH LPS.

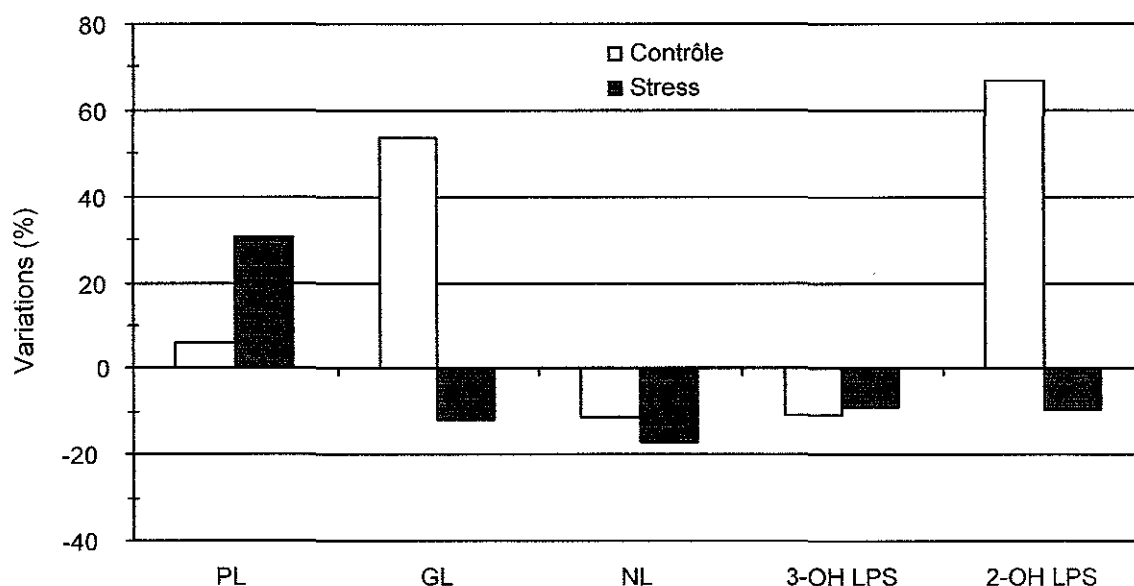


Figure 5.16 : Variations (%) entre les deux prélèvements des phospholipides (PL), des glycolipides (GL), des lipides neutres et des lipopolysaccharides 2-OH et 3- OH (LPS 2-OH et LPS 3-OH).

Tableau 5.8 : Proportions (% en masse) des différents acides gras des PL obtenus à partir des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

Acides gras	Réacteur contrôle				Réacteur stress			
	2		17		2		17	
14:0	2,41	± 0,33	2,53	± 0,02	2,88	2,42	± 0,12	
15:0	0,55	± 0,16	0,71	± 0,10	0,65	0,75	± 0,01	
16:0	16,49	± 0,68	15,53	± 0,16	15,57	16,18	± 0,90	
17:0	nd		nd		nd	6,84	± 0,25	
18:0	1,49	± 0,51	1,99	± 0,00	2,17	1,58	± 0,03	
20:0	0,05	± 0,02	0,08	± 0,00	0,13	0,09	± 0,02	
14:1	0,16	± 0,03	0,24	± 0,03	0,23	0,24	± 0,00	
15:1	0,08	± 0,02	0,11	± 0,01	0,12	0,11	± 0,01	
16:1	2,17	± 0,11	2,49	± 0,11	2,37	2,65	± 0,20	
16:1n-7	37,37	± 4,07	32,8	± 0,4	31,66	34,63	± 0,71	
16:1n-9	1,34	± 0,69	2,31	± 0,36	2,49	2,03	± 0,54	
br-17:1	0,15	± 0,03	0,28	± 0,00	0,22	0,20	± 0,01	
br-19:1	0,35	± 0,05	0,50	± 0,00	0,58	0,45	± 0,03	
18:1	nd		tr		0,14	0,07	± 0,01	
18:1n-7	9,85	± 0,16	9,43	± 0,13	9,93	9,16	± 0,15	
18:1n-9	8,45	± 0,88	8,62	± 0,33	9,09	7,98	± 0,34	
18:2n-6	6,98	± 0,58	7,49	± 0,32	7,35		nd	
20:2	0,10	± 0,03	0,21	± 0,01	0,12	0,20	± 0,03	
20:3	0,08	± 0,02	0,12	± 0,01	0,11	0,11	± 0,01	
20:4	1,09	± 0,09	1,50	± 0,01	1,12	1,28	± 0,09	
i-14:0 ^a	0,67	± 0,13	0,90	± 0,01	0,85	0,87	± 0,01	
i-15:0	5,10	± 0,42	5,95	± 0,07	5,64	5,92	± 0,18	
i-17:0	0,41	± 0,09	0,58	± 0,1	0,60	0,66	± 0,03	
a-15:0 ^b	2,16	± 0,27	2,22	± 0,02	2,58	2,13	± 0,06	
a-17:0	0,21	± 0,07	0,32	± 0,02	0,31	0,33	± 0,03	
br-C15 ^d	1,52	± 0,19	1,99	± 0,01	1,96	2,06	± 0,04	
br-17:1	0,15	± 0,03	0,28	± 0,00	0,22	0,20	± 0,01	
br-19:1	0,35	± 0,05	0,50	± 0,00	0,58	0,45	± 0,03	
10-Me-16:0	0,04	± 0,01	0,06	± 0,01	0,07	0,06	± 0,01	
TBSA	0,05	± 0,02	0,06	± 0,01	0,08	0,06	± 0,01	
cy-17:0 ^c	0,53	± 0,10	0,72	± 0,06	0,78	0,73	± 0,03	
cy-19:0	0,16	± 0,04	0,24	± 0,01	0,23	0,21	± 0,02	
Saturés totaux	21,0	0,3	20,9	0,2	21,4	27,9	0,7	
Insaturés totaux	68,2	1,7	66,1	0,5	65,5	59,1	1,0	
i-totaux	6,2	0,6	7,4	0,2	7,1	7,4	0,2	
a- totaux	2,4	0,3	2,5	0	2,9	2,5	0,1	
Ramifiés totaux	10,7	1,3	12,9	0,2	12,9	12,7	0,4	
Cyclopropane totaux	0,7	0,1	1,0	0,1	1,0	0,9	0,1	
Insaturés/saturés	3,224		3,133		3,025	3,107		
i/a-	2,608		2,937		2,457	3,028		
cy-17:0/16:1n-7c	0,014		0,022		0,025	0,021		
cy-19:0/18:1n-7c	0,016		0,025		0,023	0,023		
C18/C16	0,467		0,518		0,551	0,462		

C18/C16 = (18:1+18:0/16:1+16:0) ; Moyenne ± écart-type, n=3 excepté pour le réacteur stress à 2 h, n=1; ^a i-. iso-; ^b a-. anteiso-; ^c cy-: cyclopropane ; ^d br-: ramifiés; nd: non déterminé; tr: trace; TBSA: acide tuberculostéarique.

Tableau 5.9 : Proportions (% en masse) des différents acides gras des GL obtenus à partir des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

Acides gras	Réacteur contrôle			Réacteur stress		
	2	17		2	17	
14:0	4,76 ± 0,48	5,01 ± 0,03		5,16	6,41 ± 0,16	
15:0	1,23 ± 0,20	1,18 ± 0,05		1,20	1,48 ± 0,13	
16:0	27,66 ± 3,99	26,32 ± 0,53		26,71	28,61 ± 0,19	
17:0	0,74 ± 0,14	0,7 ± 0,02		0,69	0,69 ± 0,05	
18:0	9,72 ± 0,68	10,23 ± 0,30		10,63	11,03 ± 0,23	
14:1	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,00		0,21	0,24 ± 0,02	
15:1	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,03		0,07	0,08 ± 0,00	
16:1	1,51 ± 0,23	1,72 ± 0,14		1,24	1,67 ± 0,12	
16:1n-7	9,13 ± 1,01	8,48 ± 0,49		10,29	7,95 ± 0,06	
16:1n-9	1,13 ± 0,15	0,98 ± 0,01		0,80	0,75 ± 0,03	
br-17:1	0,28 ± 0,11	0,23 ± 0,00		0,22	0,22 ± 0,02	
br-19:1	0,28 ± 0,14	0,22 ± 0,05		0,16	0,17 ± 0,01	
18:1	2,60 ± 0,48	2,86 ± 0,01		2,97	3,13 ± 0,07	
18:1n-7	5,37 ± 0,25	4,85 ± 0,02		5,17	5,68 ± 0,11	
18:1n-9	13,91 ± 0,16	15,56 ± 0,05		14,87	14,23 ± 0,36	
18:2n-6	7,99 ± 0,36	8,35 ± 0,01		9,27	7,16 ± 0,15	
20:2	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,08		0,10	0,16 ± 0,02	
20:3	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,00		0,04	0,06 ± 0,01	
20:4	0,35 ± 0,04	0,44 ± 0,01		0,43	0,47 ± 0,01	
i-14:0 ^a	0,63 ± 0,15	0,60 ± 0,05		0,56	0,5 ± 0,05	
i-15:0	4,91 ± 1,45	4,88 ± 0,37		3,76	3,82 ± 0,34	
i-16:0	0,82 ± 0,19	0,70 ± 0,01		0,35	0,48 ± 0,08	
i-17:0	0,70 ± 0,19	0,9 ± 0,17		0,55	0,69 ± 0,02	
a-15:0 ^b	2,61 ± 0,68	2,27 ± 0,15		2,00	1,80 ± 0,15	
a-17:0	0,57 ± 0,12	0,53 ± 0,05		0,36	0,48 ± 0,00	
br-C15 ^d	1,20 ± 0,32	1,04 ± 0,16		0,94	0,9 ± 0,07	
br-17:1	0,28 ± 0,11	0,23 ± 0,00		0,22	0,22 ± 0,02	
br-19:1	0,28 ± 0,14	0,22 ± 0,05		0,16	0,17 ± 0,01	
10-Me-16:0	0,35 ± 0,11	0,32 ± 0,01		0,29	0,23 ± 0,05	
TBSA	0,44 ± 0,01	0,54 ± 0,09		0,52	0,45 ± 0,03	
cy-17:0 ^c	0,49 ± 0,05	0,48 ± 0,02		0,39	0,42 ± 0,02	
cy-19:0	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,02		0,07	0,06 ± 0,00	
Saturés totaux	44,1 ± 4,8	43,4 ± 0,9		44,4	48,2 ± 0,3	
Insaturés totaux	43,1 ± 1,5	44,2 ± 0,2		45,8	42 ± 0,5	
i- totaux	7,1 ± 2,0	7,1 ± 0,6		5,2	5,5 ± 0,5	
a-totaux	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,2		2,4	2,3 ± 0,1	
Ramifiés totaux	12,8 ± 3,5	12,2 ± 1,1		9,7	9,7 ± 0,8	
Cyclopropane totaux	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0		0,5	0,5 ± 0,0	

Moyenne ± écart-type, n=3 excepté pour le réacteur stress à 2 h, n=1; ^a i-. iso-; ^b a-. anteiso-; ^c cy-: cyclopropane ; ^d br-: ramifiés; nd: non déterminé; tr: trace; TBSA: acide tuberculostéarique.

Tableau 5.10 : Proportions (% en masse) des différents acides gras des NL obtenus à partir des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

	Réacteur contrôle		Réacteur stress	
	2	17	2	17
14:0	5,06 ± 0,66	5,70 ± 0,31	5,53	7,49 ± 0,42
15:0	0,68 ± 0,18	1,00 ± 0,00	1,00	1,19 ± 0,02
16:0	37,70 ± 5,26	28,24 ± 0,77	24,90	28,88 ± 0,45
17:0	0,45 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,48	0,42 ± 0,03
18:0	10,14 ± 0,73	7,83 ± 0,18	9,36	8,15 ± 0,52
20:0	0,73 ± 0,24	1,13 ± 0,10	1,24	1,43 ± 0,16
14:1	0,24 ± 0,16	0,47 ± 0,05	0,45	0,47 ± 0,02
15:1	0,14 ± 0,06	0,17 ± 0,00	0,24	0,18 ± 0,00
16:1	0,91 ± 0,05	1,50 ± 0,03	1,22	1,90 ± 0,16
16:1n-7	8,73 ± 1,49	11,92 ± 0,19	12,12	11,90 ± 0,25
16:1n-9	0,38 ± 0,54	0,48 ± 0,06	0,38	0,70 ± 0,14
18:1	1,19 ± 1,42	1,81 ± 0,15	2,67	0,30 ± 0,00
18:1n-7	5,45 ± 0,03	4,30 ± 0,27	5,43	5,24 ± 0,14
18:1n-9	14,37 ± 0,89	16,08 ± 0,27	13,45	14,81 ± 0,06
18:2n-6	8,91 ± 2,19	11,56 ± 0,64	13,63	8,65 ± 0,11
br-17:1	tr	0,08 ± 0,01	0,09	0,10 ± 0,02
br-19:1	nd	tr	0,04	tr
20:2	0,29 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,32	0,72 ± 0,04
20:3	0,03 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06	0,06 ± 0,03
20:4	0,47 ± 0,08	0,78 ± 0,01	0,74	0,80 ± 0,05
i-14:0 ^a	0,19 ± 0,13	0,28 ± 0,01	0,44	0,28 ± 0,01
i-15:0	1,53 ± 0,25	2,27 ± 0,17	2,50	2,30 ± 0,05
i-17:0	0,25 ± 0,00	0,35 ± 0,03	0,44	0,31 ± 0,03
a-15:0 ^b	0,86 ± 0,18	1,17 ± 0,04	1,56	1,24 ± 0,05
a-17:0	0,32 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,40	0,80 ± 0,04
br-C15 ^d	0,32 ± 0,34	0,28 ± 0,12	0,32	0,35 ± 0,00
br-17:1	tr	0,08 ± 0,01	0,09	0,10 ± 0,02
br-19:1	nd	tr	0,04	tr
10-Me-16:0	0,01 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,06	0,05 ± 0,01
TBSA	0,32 ± 0,04	0,48 ± 0,09	0,45	0,40 ± 0,06
cy-17:0 ^c	0,28 ± 0,06	0,38 ± 0,01	0,43	0,41 ± 0,00
cy-19:0	nd	nd	0,04	0,44 ± 0,57
Saturés totaux	54,8 ± 4,9	44,3 ± 1,0	42,5	47,6 ± 0,1
Insaturés totaux	61,2 ± 5,3	73,5 ± 1,4	75,3	65,2 ± 0,6
i- totaux	2,0 ± 0,4	2,9 ± 0,2	3,4	2,9 ± 0,0
a- totaux	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,0	2,0 ± 0,1
Ramifiés totaux	3,8 ± 0,5	5,6 ± 0,2	3,1	5,8 ± 0,1
Cyclopropane totaux	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5	0,9 ± 0,6

Moyenne ± écart-type, n=3 excepté pour le réacteur stress à 2 h, n=1; ^a i-. iso-; ^b a-. anteiso-; ^c cy-: cyclopropane ; ^d br-: ramifiés; nd: non déterminé; tr: trace; TBSA: acide tuberculostéarique.

Tableau 5.11 : Proportions (% en masse) des différents acides gras des LPS 2-OH obtenus à partir des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

Acides gras	Réacteur contrôle				Réacteur stress			
	2		17		2		17	
10:0	0,54	± 0,21	0,29	± 0,06	0,28	± 0,01	1,07	± 0,92
11:0	0,66	± 0,01	0,72	± 0,04	0,51	± 0,05	0,72	± 0,29
12:0	3,7	± 0,04	2,58	± 0,24	2,75	± 0,20	3,46	± 0,13
14:0	7,96	± 0,31	6,71	± 0,77	6,69	± 0,57	7,71	± 0,75
15:0	0,79	± 0,09	0,68	± 0,03	0,66	± 0,05	0,81	± 0,18
16:0	15,86	± 1,20	13,82	± 1,30	14,56	± 1,17	14,9	± 0,20
17:0	0,45	± 0,02	0,45	± 0,05	0,41	± 0,05	0,55	± 0,08
19:0	0,26	± 0,10	0,17	± 0,01	0,18	± 0,01	0,21	± 0,05
20:0	2,57	± 0,28	2,84	± 0,04	2,54	± 0,04	2,42	± 0,06
21:0	0,38	± 0,03	0,48	± 0,08	0,43	± 0,02	0,40	± 0,01
22:0	11,61	± 1,43	14,4	± 0,37	12,61	± 0,35	11,69	± 0,42
23:0	6,20	± 0,37	7,81	± 0,54	7,11	± 0,06	6,53	± 0,23
24:0	21,1	± 1,06	25,69	± 3,15	24,96	± 2,07	21,6	± 0,15
25:0	2,2	± 0,01	2,57	± 0,32	2,44	± 0,01	2,15	± 0,05
26:0	2,47	± 0,17	2,88	± 0,42	2,82	± 0,16	2,33	± 0,19
i-15:0	17,24	± 3,52	12,74	± 1,43	15,73	± 0,01	18,09	± 0,02
i-16:0	0,81	± 0,03	0,67	± 0,08	0,68	± 0,06	0,91	± 0,01
i-17:0	1,85	± 0,30	1,28	± 0,16	1,4	± 0,05	1,46	± 0,04
a-15:0	2,47	± 0,97	2,57	± 0,65	1,98	± 0,65	2,22	± 1,22
a-17:0	0,87	± 0,38	0,67	± 0,1	1,26	± 0,87	0,75	± 1,06
Saturés totaux	76,8	± 2,2	82,1	± 3,6	79,0	± 2,5	76,6	± 1,4
iso-branched	19,9	± 3,5	14,7	± 1,4	17,8	± 0,1	20,5	± 0,1
anteiso-branched	3,3	± 1,0	3,2	± 0,7	3,2	± 1,1	3,0	± 1,6
Ramifiés totaux	23,2	± 3,7	17,9	± 1,6	21,1	± 1,1	23,4	± 1,6

Moyenne ± Écart-type coefficient de variation; n=3 ; ^a i- iso- ; ^b a- anteiso-.

Tableau 5.12 : Proportions (% en masse) des différents acides gras des LPS 3-OH obtenus à partir des boues placées dans les réacteurs contrôle et stress à 2 et 17 h.

	Réacteur contrôle		Réacteur stress	
	2	17	2	17
8:0	1,15 ± 0,03	1,26 ± 0,01	1,11 ± 0,09	1,21 ± 0,01
10:0	13,96 ± 0,33	14,47 ± 0,41	13,23 ± 0,15	14,62 ± 0,87
11:0	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,02
12:0	12,18 ± 0,14	10,76 ± 0,42	11,73 ± 0,02	11,69 ± 0,14
14:0	17,26 ± 0,22	14,45 ± 0,46	16,80 ± 0,28	15,79 ± 0,16
15:0	1,46 ± 0,03	1,28 ± 0,06	1,39 ± 0,08	1,38 ± 0,07
16:0	16,0 ± 0,24	17,3 ± 0,99	16,47 ± 0,14	16,09 ± 0,24
17:0	1,30 ± 0,01	1,30 ± 0,03	1,26 ± 0,06	1,35 ± 0,12
18:0	2,01 ± 0,04	2,10 ± 0,07	1,96 ± 0,04	1,90 ± 0,02
20:0	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01
i-12:0 ^a	1,04 ± 0,08	0,98 ± 0,02	1,00 ± 0,04	1,01 ± 0,01
i-13:0	0,75 ± 0,05	0,77 ± 0,03	0,72 ± 0,05	0,77 ± 0,03
i-14:0	0,58 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,57 ± 0,03
i-15:0	10,28 ± 0,52	11,94 ± 0,09	10,65 ± 0,20	10,00 ± 0,53
i-16:0	1,80 ± 0,02	1,75 ± 0,02	1,74 ± 0,08	1,78 ± 0,07
i-17:0	13,49 ± 1,11	13,77 ± 0,4	14,29 ± 0,17	14,67 ± 0,49
i-18:0	0,40 ± 0,01	0,87 ± 0,09	0,46 ± 0,03	0,50 ± 0,09
a-13:0 ^b	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02
a-15:0	1,92 ± 0,36	2,10 ± 0,13	1,99 ± 0,08	1,95 ± 0,04
a-17:0	3,30 ± 0,11	3,16 ± 0,19	3,27 ± 0,12	3,42 ± 0,35
14:1	0,28 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,35 ± 0,02
18:1	0,30 ± 0,16	0,22 ± 0,05	0,54 ± 0,05	0,40 ± 0,07
Saturés totaux	65,7 ± 0,5	63,3 ± 1,2	64,3 ± 0,4	64,4 ± 0,9
Insaturés totaux	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,75 ± 0,1
i- totaux	27,9 ± 1,2	29,7 ± 0,4	28,9 ± 0,3	28,8 ± 0,7
a-totaux	5,4 ± 0,4	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,56 ± 0,4
Ramifiés totaux	33,8 ± 1,3	36,1 ± 0,5	34,8 ± 0,3	34,9 ± 0,8

Moyenne ± Écart-type coefficient de variation; n=3 ; ^a i-. iso- ; ^b a-. anteiso-.

Les profils chromatographiques des données GC-MS révèlent une importante diversité d'acides gras : 32 acides gras différents avec un nombre d'atomes de carbones entre 14 et 20 ont été analysés dans les PL, GL et NL, 22 acides gras différents dans les 3-OH LPS et 20 acides gras dans les 2-OH. Les acides gras sont constitués d'acides gras saturés, insaturés, cycliques et ramifiés en position *iso*-, *antéiso*- ou centrale (Tableaux 5.8 - 5.12). Les conformations *cis*- et *trans*- des acides gras insaturés n'ont pas pu être séparées correctement et la désignation des acides gras n:m rassemblent les deux isomères de position.

Les acides gras des phospholipides sont composés de plus d'acides gras insaturés (environ 66,5 %) (Tableaux 5.4). Les acides gras ramifiés sont essentiellement des acides gras ramifiés en position *iso*- (57,4 % des acides gras ramifiés totaux). Une faible proportion d'acides gras cyclopropane est détectée (environ 0,9 %). Les phospholipides sont essentiellement composés des acides gras 16:1n-7, 16:0, 18:2n-6, 18:1n-7, 18:1n-9 et *i*-15:0 et représentent plus de 79 % des acides gras des PL (Tableau 5.8) sont essentiellement composés d'acides gras avec un nombre pair d'atomes de carbone. Les GL et les NL contiennent essentiellement des acides gras saturés et insaturés dans des proportions proches (environ 47,5 %) (Tableaux 5.9 et 5.10). Les acides gras des GL sont surtout ramifiés en position *iso*-, alors que les proportions entre les acides gras ramifiés en position *iso*- et *antéiso*- sont similaires pour les acides gras des NL. Les acides gras br-15:0, *i*-15:0, 16:1n-7, 16:0, 18:2n-6, 18:1n-7, 18:1n-9 et 18:0 représentent, pour les GL et les L plus de 58 % et les acides gras 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-9 et 18:2n-6 représentent plus de 85 % pour les NL. Les acides gras des 2-OH et 3-OH LPS sont composés essentiellement d'acides gras saturés à longues chaînes (Tableaux 5.11 et 5.12). Les acides gras sont essentiellement ramifiés en position *iso*-. Les 2-OH LPS sont dominés par les acides gras saturés 2-OH-14:0, 2-OH-16:0, 2-OH-22:0, 2-OH-23:0 et 2-OH-24:0 et ramifiés 2-OH-*i*-15:0, alors que les 3-OH LPS sont dominés par les acides gras saturés 3-OH-10:0, 3-OH-12:0, 3-OH-14:0, et 3-OH-16:0 et ramifiés en position *iso*- 3-OH-*i*-15:0 et 3-OH-*i*-17:0.

L'effet des discontinuités en oxygène a été appréhendé par une analyse statistique multivariée de type analyse en composantes principales (ACP) afin de simplifier la présentation de l'importante quantité de données. L'ensemble des acides gras des PL, GL, NL et LPS ont été utilisés. Ainsi, les 4 échantillons sont parfaitement séparés par une analyse ACP, mais l'analyse ACP ne permet pas de montrer l'effet des discontinuités en oxygène sur les agrégats biologiques. Aussi, les résultats de l'ACP ne sont volontairement pas montrés. Les duplicata réalisés sur un même échantillon ne sont pas suffisamment homogènes pour déterminer s'il y a une variation ou non. Par conséquent, les résultats bruts ont été traités ligne par ligne pour les phospholipides qui sont considérés être des marqueurs taxonomique et de stress des micro-organismes (White *et al.*, 1996b). La comparaison des profils des acides gras des réacteurs contrôle et stress à 17 h montre quelques différences. L'acide gras 18:2n-6 des PL augmente dans le réacteur contrôle et par contre n'est plus détectable après 17 h dans le réacteur stress. De même, les acides gras 17:0 et 18:1 des PL, absents à 2 h, sont détectés dans le réacteur stress à 17 h.

La Figure 5.16 montre la variation, pour les phospholipides, des rapports acides gras insaturés sur les saturés, des ramifiés *iso-antéiso-* (*i/a-*), des *cy-17:0* sur *16:1n-7c* et *cy-19:0* sur *18:1n-7c*, et les *C18/C16*. Ces rapports sont des marqueurs de changements de la communauté microbienne et de l'état physiologique des micro-organismes (White *et al.*, 1996b). Dans le réacteur contrôle, ces rapports augmentent excepté pour le rapport U/S qui diminue légèrement. Par contre, les variations de ces rapports sont différentes pour le réacteur stress. Les rapports *cy-17:0* sur *16:1n-7c*, *cy-19:0* sur *18:1n-7c*, augmentent pour le réacteur contrôle alors qu'ils diminuent pour les réacteurs stress. Ces variations sont associées avec la variation des proportions des acides gras *cy-17:0* et *cy-19:0* car les variations des proportions des acides gras *16:1n-7c* et *18:1n-7c* sont très faibles. De même, le rapport *C18/C16* diminue dans le réacteur stress alors qu'il augmente dans le réacteur contrôle (Figure 5.16).

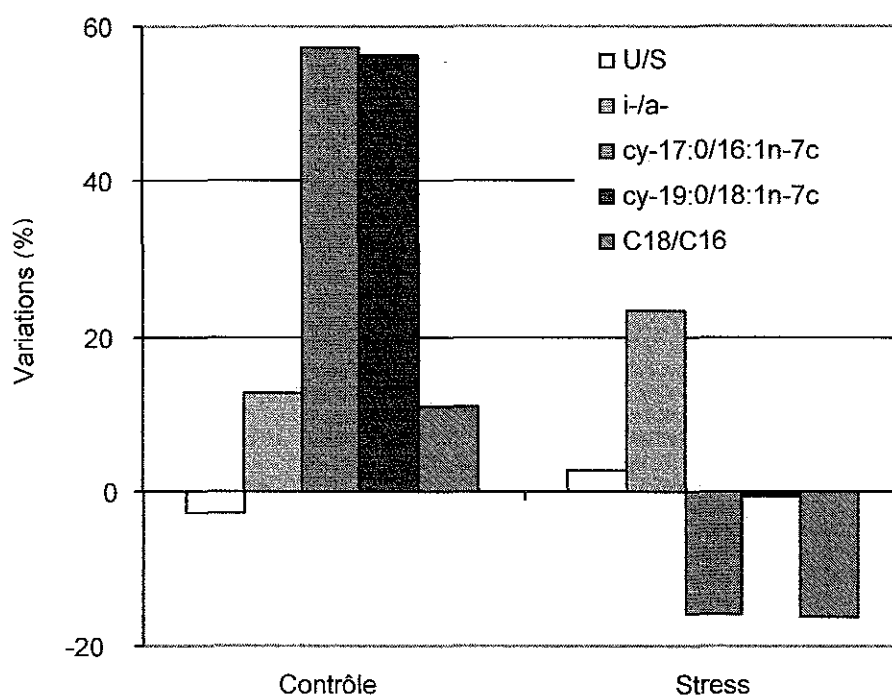


Figure 5.16 : Variation des rapports des acides gras insaturés sur les saturés (U/S), des acides gras ramifiés en position *iso-* sur les *antéiso-*, *cy-17:0/16:1n-7c*, *cy-19:0/18:1n-7c* et *C18/C16* des phospholipides dans les deux réacteurs (contrôle et stress) aux deux temps de prélèvements (2 et 17 h). Les valeurs moyennes des rapports de chacun des 4 prélèvements sont présentées dans le Tableau 5.8.

Ces résultats montrent que l'effet "discontinuités en oxygène" est difficilement visualisable pour des agrégats biologiques de boues activées. L'effet boues serait plus important. Néanmoins, notre étude a permis de distinguer certains paramètres qui seraient influencés par les discontinuités en oxygène. La capacité des boues à décanter est améliorée, alors que la turbidité augmente quelle que soit l'aération appliquée. La caractérisation quantitative et qualitative de certains constituants du domaine

extracellulaire ne montre pas de différence pour les boues auxquelles des discontinuités en oxygène sont appliquées. Par contre, les discontinuités en oxygène provoquent une forte augmentation des EPS fortement retenus par la résine hydrophobe et cette augmentation est positivement corrélée avec les protéines extraites. De plus, la proportion de phospholipides semble augmenter plus fortement avec les discontinuités en oxygène. Certaines signatures acides gras des PL varient différemment. Les rapports iso-/antéiso-, *cy-17:0/16:1n-7c*, *cy-19:0/18:1n-7c* et C18/C16 augmentent pour des boues placées dans des conditions où la concentration en oxygène est maintenue à une valeur constante, alors que les variations de ces rapports ne sont homogènes dans le cas des discontinuités en oxygène.

5.4. Discussion

Cette partie expérimentale avait pour objectif la modification, par application discontinue d'oxygène, des propriétés physico-chimiques des agrégats biologiques. Nous avons ainsi cherché à vérifier l'hypothèse que des discontinuités courtes et rapides en oxygène permettraient de modifier, d'une manière sensible, (i) les propriétés hydrophobes des EPS et des agrégats biologiques, (ii) la composition et la quantité d'EPS et (iii) la composition des lipides des agrégats biologiques. Cette étude a nécessité, préalablement, l'optimisation des conditions dans lesquelles sont réalisées les mesures de l'hydrophobicité des agrégats biologiques par le test d'adhésion aux hydrocarbures.

Optimisation du test d'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures (TAMH).

Notre étude montre que la mesure de l'adhésion aux hydrocarbures des agrégats biologiques est influencée par la composition ionique et les valeurs de pH du milieu dans lequel les boues sont mises en suspension, ce qui est en accord avec les observations de van der Mei *et al.* (1995). L'adhésion des micro-organismes aux hydrocarbures représente un jeu compliqué d'interactions hydrophobes et électrostatiques (*i.e.* attractives et répulsives) influencées par les conditions de mesure comme le pH, la température et la composition ionique du milieu. Par conséquent, certains auteurs soulignent l'importance de réaliser le test TAMH à la valeur nulle du potentiel zéta des cellules bactériennes ou des gouttelettes d'hydrocarbures afin de minimiser les interactions électrostatiques (Busscher *et al.*, 1995; van der Mei *et al.*, 1995). Les résultats obtenus montrent clairement que la diminution du pH des solutions de lavage permet d'augmenter les valeurs d'hydrophobicité du fait de la diminution des interactions électrostatiques. Toutefois, il n'a jamais été possible d'atteindre la valeur nulle de potentiel zéta des boues : à une valeur de pH inférieure à 3, les boues dispersées s'agrègent ce qui rend réellement difficile et extrêmement biaisée la mesure de l'hydrophobicité.

La variation de l'hydrophobicité est nettement plus marquée lorsque l'on s'intéresse aux valeurs de K_e qu'à celles de $A\%$ (50 % contre 20 %) et le paramètre K_e serait ainsi plus discriminant pour observer des variations plus faibles. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Guellil *et al.* (1998) qui montrent une variation de 1,4 fois de la valeur de $A\%$ associée à une variation de 2,5 fois de la valeur de K_e .

Caractérisation globale des boues activées.

Les valeurs des paramètres physico-chimiques (MV_{Boues} , pH, conductivité et turbidité) des boues collectées dans les bassins aérés sont du même ordre de grandeur pour les deux stations, mais les boues de Toul possèdent une capacité à décanter inférieure à celle de Nancy-Maxéville. Ces paramètres physico-chimiques varient peu pour des systèmes industriels. De même, les valeurs de mesure de l'hydrophobicité (A % et K_e) sont en accord avec celles déjà présentées dans la littérature (Guellil *et al.*, 1998) et sont du même ordre de grandeur pour les boues issues des deux stations d'épuration, bien que l'âge des boues entre les deux stations soit différent (T: 13 j; N: 3,5 j). Bura (2000) montrent que l'hydrophobicité des agrégats biologiques est nettement plus importante pour des boues d'âge supérieur à 19 j que des boues âgées de 4 j.

Les exopolymères (protéines, substances dites humiques, polysaccharides et acides nucléiques) issus des boues activées présentent une variabilité quantitative importante (de 17 à 100 % suivant les exopolymères) comme cela a déjà été montré par Cadoret (2003). Ces variations sont indépendantes les unes des autres pour le groupe de boues testées. Les protéines sont les composés majoritairement trouvés dans les EPS extraits des boues activées par les ultrasons et une résine échangeuse de cations en accord avec les données de la littérature (Bura *et al.*, 1998; Cadoret, 2003; Cadoret *et al.*, 2002; Jahn et Nielsen, 1995; Jorand *et al.*, 1995b; Liu et Fang, 2002; Nielsen et Jahn, 1999; Urbain *et al.*, 1993b; Wilén *et al.*, 2003) avec des techniques d'extraction proches.

Vieillessement des agrégats biologiques placés dans les réacteurs contrôle.

Les différentes expérimentations ont été volontairement effectuées sur un temps court (17 h) afin de limiter le "vieillessement" du système. Cette dérive est classiquement observée en conditions de type batch. Dans notre étude, cet effet multiple (vieillessement, famine et oxygène) se traduit par la diminution des MV_{Boues} , l'amélioration de la capacité des boues à décanter et la légère augmentation de la turbidité du surnageant. La structure des agrégats biologiques ne semble pas être perturbée dans le réacteur contrôle, car le paramètre global, conductivité, du milieu ne varie pas pendant les 17 h d'expérimentation. La dispersion des agrégats biologiques est associée à l'augmentation de la conductivité et de la turbidité du milieu (Hermansson, 1999; Keiding et Nielsen, 1997). D'une façon générale, les quantités de polymères extraits ne montrent pas de variation importante, pour l'ensemble des essais, comme cela a été observé par Urbain *et al.* (1993b). Urbain *et al.* (1993b) montrent que les matières sèches, les protéines extraites et les polysaccharides extraits de boues placées en condition de famine diminuent dès le premier jour.

Effet des discontinuités en oxygène sur les agrégats biologiques.

Certaines bactéries, soumises à des stress oxygène, possèdent une surface cellulaire plus hydrophobe (Palmgren *et al.*, 1998), ce qui contribue à augmenter la décantabilité des agrégats (Urbain *et al.*, 1993b). Une observation similaire a été rapportée par Sponza (2002b). L'ajout d'oxygène, aux concentrations étudiées, ne semble pas affecter drastiquement la turbidité du milieu comme cela a déjà été montré par les travaux de Wilén et Balmer (1999). Wilén et Balmer (1999)

montrent que pour de faibles concentrations en oxygène ($< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), la capacité des boues à décanter se détériore et est associée à une augmentation de la turbidité, une augmentation de la porosité des boues et une diminution de la distribution de taille des agrégats. Néanmoins, cet effet s'inverse pour des concentrations en oxygène supérieures ($\leq 5,0 \text{ mg L}^{-1}$) (Wilén et Balmer, 1998).

Notre hypothèse de travail repose sur le fait que des agrégats biologiques avec un caractère hydrophobe plus marqué sédimentent mieux. Ainsi, un stress oxygène devait permettre de rendre des agrégats biologiques de boues activées plus hydrophobes et une meilleure sédimentation des agrégats doit être observée.

L'augmentation des valeurs de pH du surnageant des boues placées dans les deux réacteurs suit le cycle de l'oxygène surtout dans le réacteur stress. Cette augmentation des valeurs de pH est supposée être due (i) à la réduction de la production du CO_2 ou l'élimination de celui-ci par l'agitation des réacteurs et les ajouts successifs de O_2 et de N_2 , (ii) à la diminution de la dénitrification et/ou à la diminution de l'activité biologique (Wilén et Balmer, 1998) qui n'ont cependant pas fait l'objet de cette étude. Hedrick *et al.* (1991) ont montré que l'addition d'oxygène à une biomasse anaérobie augmente la production de CO_2 et des concentrations en oxygène supérieures à $2,15$ et $4,05 \text{ mg L}^{-1}$ inhibent respectivement les activités nitrite et nitrate réductases (Bonin *et al.*, 1989).

Dans notre étude, la réponse des agrégats biologiques soumis à des discontinuités en oxygène n'est pas facilement décelable du fait des réponses différentes d'un essai à l'autre, ce qui est attribué à l'effet boue (variabilité du système naturel et genèse des agrégats biologiques différente d'un essai à l'autre).

Dans pratiquement tous les essais, une amélioration de la capacité des boues à décanter (SVI et dSVI) est observée, bien que le caractère hydrophobe mesuré ($A\%$ et K_e) ne soit pas systématiquement augmenté pour les agrégats biologiques soumis aux discontinuités en oxygène. L'hypothèse formulée est que le caractère hydrophobe ne peut être pas mesuré par cette technique car l'excrétion de nouveaux EPS, en réponse au stress, peut masquer une partie des domaines hydrophobes des agrégats biologiques. Par contre, la part des EPS fortement retenus (*i.e.* ceux retenus par une résine hydrophobe) augmente pour les boues soumises à des discontinuités en oxygène. Ce résultat, essentiel dans notre étude, renforce (i) l'idée que des discontinuités en oxygène accentuent le caractère hydrophobe du domaine extracellulaire et (ii) les résultats de Palmgren *et al.* (1998) qui montrent que certaines bactéries isolées des boues activées s'adaptent en augmentant l'hydrophobicité de leur surface cellulaire face à de fortes concentrations en oxygène.

Dans notre étude, l'effet de l'oxygène est apparemment sans conséquence majeure sur l'analyse qualitative et quantitative des EPS. Pourtant, la production d'alginate est influencée par la concentration en oxygène et la vitesse d'agitation des cultures d'*Azotobacter vinelandii* (Peña *et al.*, 2000). De même, la variation de la concentration en oxygène représente un des mécanismes clefs de la régulation de la production des exopolysaccharides chez *Pseudomonas aeruginosa* (Bayer *et al.*, 1990). Toutefois, la difficulté de mesurer l'effet des discontinuités en oxygène sur les exopolymères des agrégats biologiques de boues activées est dû au fait que (i) certaines bactéries dans les boues activées gardent leur propriété de surface constante (balance hydrophile/hydrophobe), alors que

d'autres bactéries répondent plus facilement au stress (Jorand *et al.*, 1994) et (ii) les propriétés de surface des cellules bactériennes sont spécifiques des souches bactériennes (Jana *et al.*, 2000) et qu'elles varient également en fonction des conditions environnementales (Palmgren *et al.*, 1998) et des conditions physiologiques (Jorand *et al.*, 1994). De plus, des protéines différentes ou modifiées peuvent être synthétisées, non distinguables par nos méthodes analytiques, en réponse des agrégats soumis à des discontinuités en oxygène et influencées directement le caractère hydrophobe des EPS surtout que nous avons montré que les protéines sont positivement corrélées avec les EPS fortement retenus (*i.e.* ceux retenus par une résine hydrophobe) alors que les acides nucléiques et les polysaccharides sont négativement corrélés aux EPS hydrophobes. Ces résultats concordent avec des travaux antérieurs (Higgins et Novak, 1997; Jia *et al.*, 1996; Jorand *et al.*, 1998). Néanmoins, certains auteurs estiment qu'il est essentiel de prendre en considération l'ensemble des polymères plutôt que chacune des familles de polymères d'une façon indépendante (Liao *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 1990) car l'ensemble des exopolymères est impliqué dans les propriétés de l'agrégat biologique. Aussi, les auteurs déterminent les rapports protéines/polysaccharides ou protéines/polysaccharides+acides nucléiques. Les rapports (protéines/polysaccharides+acides nucléiques) ne varient pas dans les deux réacteurs de façon significative et sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature et toujours inférieurs à 5 quel que soit le temps de résidence des boues (Liao *et al.*, 2001). Pourtant Shin *et al.* (2001) montrent que le rapport polysaccharides/protéines extraits des boues augmentent fortement lorsque le flux d'oxygène est supérieur à 2 L min^{-1} ; cette augmentation est due à l'augmentation des polysaccharides.

Les phospholipides des boues, soumises aux discontinuités en oxygène, augmentent sensiblement et quelques signatures acides gras montrent des variations avec les discontinuités en oxygène (18:2n-6 et 18:1). Toutefois, cette augmentation des PL pourrait être un indicateur de la différence des statuts physiologiques des micro-organismes dans les échantillons. Roques *et al.* (1984) montrent que l'oxygène peut être un facteur inhibiteur de l'activité bactérienne. Aussi, l'augmentation supérieure des PL dans le réacteur stress peut venir du fait que les micro-organismes du réacteur stress ont un métabolisme plus important.

L'utilisation des acides gras pour la quantification de la biomasse microbienne, généralement calculée à partir des quantités de PL dans les sédiments, les sols, et les biofilms (Keinänen *et al.*, 2002; Rajendran *et al.*, 1997; White *et al.*, 1979) n'a pas été envisagé dans notre étude du fait de la présence d'une communauté très diversifiée de micro-organismes : bactéries à gram-positif et à gram-négatif, bactéries anaérobies sulfato-réductrices des genres *Desulfobacter* et *Desulfovibrio*, mycobactéries, actinomycètes, champignons et levures. L'analyse des acides gras des boues a été réalisée pour un seul échantillon de boue noté T₁ dans la partie § 4.2. Les différents micro-organismes présents dans les boues possèdent respectivement des quantités différentes de lipides influencées par les conditions de culture (Brinch-Iversen et King, 1990).

Les rapports cy-17:0/16:1n-7c, cy-19:0/18:1n-7c et C18/C16 augmentent de façon importante dans le réacteur constamment maintenu à 30 % de la saturation en oxygène. Or, ces rapports sont considérés

comme des témoins de stress pour les micro-organismes (White *et al.*, 1996b). Les acides gras insaturés du type 16:1n-7c et 18:1n-7c des bactéries à gram négatives seraient convertis en acides gras cyclopropanes cy-17:0 et cy-19:0 suite au contact avec l'hypochlorite de sodium (Smith *et al.*, 2000). Aucune augmentation des acides gras cyclopropanes n'a été observée dans le réacteur stress par rapport au réacteur contrôle. Des études antérieures ont montré que les oxydants exercent des effets contradictoires sur la composition des acides gras des PL. Des cultures de *Bacillus acidocaldarius* réalisées dans des conditions très oxygénées montrent que la proportion des acides cyclopropanes diminuent par rapport à des conditions moins oxygénées (de Rosa *et al.*, 1974), alors qu'une augmentation brutale du taux d'oxygène de 11 à 100 % dans le milieu de culture de *P. jessenii* provoque une augmentation de la proportion des acides gras cy-17:0 d'un facteur 5 (Mazumder *et al.*, 2000). De même, les rapports acides gras insaturés/saturés sont du même ordre de grandeur dans les deux réacteurs et au cours du temps et il a été montré que ces rapports sont généralement compris entre 1,5 à 6,0 et augmente lors de stress température (Oliver et Colwell, 1973). Les rapports C18/C16 sont également du même ordre de grandeur. Les plus faibles rapports ont été trouvés chez les bactéries libres par rapport aux bactéries adhérentes (Valeur *et al.*, 1988).

5.5. Conclusion

Les agrégats biologiques de boues activées dans l'environnement sont soumis à des discontinuités en oxygène du fait de l'ajustement continu de la concentration en oxygène à environ 3 mg L⁻¹ d'O₂. Dans nos études, l'effet boue semble primordial dans le contrôle des caractéristiques globales des agrégats biologiques (TS_{Boues}, VS_{Boues}, k_{20°C}, SVI, dSVI, pH, A% et Ke) plutôt que l'effet oxygène. L'effet du stress oxygène sur l'hydrophobicité des agrégats biologiques n'a pas été clairement observé, bien que les méthodes de mesure de l'hydrophobicité des agrégats biologiques aient été standardisées. De plus, le stress oxygène appliqué ne permet pas un changement majeur et facilement mesurable de la composition des EPS des boues activées. Pourtant, une augmentation des EPS dits très hydrophobes (*i.e.* ceux retenus par une résine hydrophobe) est observée et renforce de façon importante l'idée que face à des discontinuités en oxygène, certains micro-organismes augmentent l'hydrophobicité de leur surface cellulaire et ainsi certainement l'hydrophobicité du domaine extracellulaire. De même, une augmentation des PL des agrégats biologiques a été observée et de certaines signatures acides gras. Les variations des témoins de stress montrent préférentiellement une réponse pour les boues soumises à une concentration constante en oxygène dans le milieu. L'effet oxygène pour des agrégats composés d'une diversité importante de micro-organismes se traduit par une réponse multi-paramétrique rendant son observation difficilement mesurable sur des périodes de temps courts de quelques heures.

6. ADSORPTION ET DESORPTION DE MOLECULES ORGANIQUES MODELES PAR DES AGREGATS BIOLOGIQUES

6.1. Introduction

L'élimination d'une partie de la matière organique des eaux usées en station d'épuration est attribuée à son adsorption ou biosorption par des agrégats biologiques, son hydrolyse par les enzymes extracellulaires associées aux agrégats biologiques et son assimilation par les micro-organismes. Le terme adsorption, utilisé dans cette partie, désigne les phénomènes de transfert des composés organiques ayant lieu de la phase aqueuse vers les agrégats biologiques, pouvant être aussi bien de l'adsorption par des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes que de la dissolution dans la matrice d'exopolymères des agrégats biologiques.

Les 4 points développés dans cette introduction présentent brièvement les éléments qui participent aux phénomènes d'adsorption et de désorption de molécules organiques biodégradables par des agrégats biologiques. Ces points décrivent (a) la capacité d'adsorption des agrégats biologiques, (b) l'accumulation sans biodégradation de molécules organiques, (c) la biodégradation de molécules organiques amphiphiles et (d) la désorption de la matière organique des agrégats biologiques vers la phase aqueuse.

(a) Les agrégats biologiques de boues activées sont des adsorbants capables de piéger rapidement en quelques dizaines de minutes la matière organique véhiculée par les eaux usées brutes (Guellil *et al.*, 2001; Jorand *et al.*, 1995a; Pujol et Canler, 1992; Tan et Chua, 1997), mais également :

- des protéines (Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983),
- des polysaccharides (Carlson et Silverstein, 1998),
- des acides gras à longues chaînes (Hwu *et al.*, 1998),
- des molécules organiques hydrophobes comme le pyrène et le phénanthrène (Ganaye *et al.*, 1997; Späth *et al.*, 1998; Steen et Karickhoff, 1981),
- des molécules organiques amphiphiles comme les sulfonates d'alkylbenzène linéaires (LAS) (Garcia *et al.*, 2002; Matthijs et de Henau, 1985, 1987; Pratz *et al.*, 1993; Struijs *et al.*, 1991; Urano et Saito, 1984) et
- des particules hydrophobes et/ou chargées (Chaignon *et al.*, 2002; Soda *et al.*, 1999; Zita et Hermansson, 1997a).

La capacité d'adsorption des agrégats biologiques est due à (i) la charge nette globale négative des agrégats biologiques (Jia *et al.*, 1996; Mikkelsen, 2003), laquelle confère des sites d'adsorption au sein des agrégats pour les molécules chargées, et (ii) des domaines hydrophobes qui seraient à l'origine de l'accumulation des composés hydrophobes. Cette capacité d'adsorption est renforcée par la structure dynamique (Chaignon *et al.*, 2002; Jorand *et al.*, 1995b) et poreuse des agrégats biologiques permettant un flux de matière dans la structure (Li et Logan, 2001). De plus, la structure des molécules joue un rôle considérable. Ainsi, les macromolécules chargées négativement sont moins bien adsorbées par des biofilms que les macromolécules non chargées et l'adsorption des macromolécules diminue avec l'augmentation de leur masse moléculaire (Carlson et Silverstein, 1998). Garcia *et al.* (2002) ont montré que l'adsorption des LAS par les agrégats biologiques de boues

activées augmentait avec l'allongement de la chaîne aliphatique ce qui peut être attribué à une liaison par des interactions hydrophobes. Enfin, l'adsorption est affectée par les paramètres environnementaux. A titre d'exemple, l'adsorption des LAS par les sédiments de rivière est influencée par le pH du milieu (Westall *et al.*, 1999), ce qui permet aux auteurs de conclure que des interactions électrostatiques sont impliquées dans l'adsorption des LAS par les sédiments. De plus, la dureté de l'eau influence la concentration micellaire critique (cmc) des LAS et par conséquent l'adsorption des différents homologues de LAS par les boues activées (Garcia *et al.*, 2002). De même, Carlson et Silverstein (1998) montrent que la charge et le poids moléculaire de macromolécules organiques affectent leur adsorption par des agrégats biologiques.

(b) Une partie des composés organiques adsorbés peut s'accumuler sans biodégradation au sein des agrégats biologiques. A titre d'exemple, Struijs *et al.* (1991) calculent que les agrégats biologiques sont capables d'immobiliser des LAS sans qu'ils ne subissent de dégradation (2 %), bien que les LAS soient parfaitement biodégradables par des bactéries dans des conditions aérobies (Jiménez *et al.*, 1991; Lemmer et Baumann, 1988; Sigoillot et Nguyen, 1987) ou anaérobies (Denger et Cook, 1999).

Les pyrochromatogrammes, que nous avons obtenus avec des boues activées, montrent une grande diversité de composés de poids moléculaires différents présents dans les agrégats biologiques bruts (Figure 6.1a) dont les signatures caractéristiques des LAS (Figure 6.2). Cette signature caractéristique est absente dans les EPS extraits de ces mêmes boues activées par les ultrasons et la résine échangeuse de cations (Figure 6.1b), alors qu'elle est trouvée dans les résidus non extraits (Figure 6.1c). Cette étude très préliminaire repose sur l'analyse des composés présents, non extraits après une étape d'extraction liquide/solide (*cf.* § 3.6.1.1), dans les boues par pyCPG-SM (*cf.* § 3.6.1.2 et 3.6.1.3).

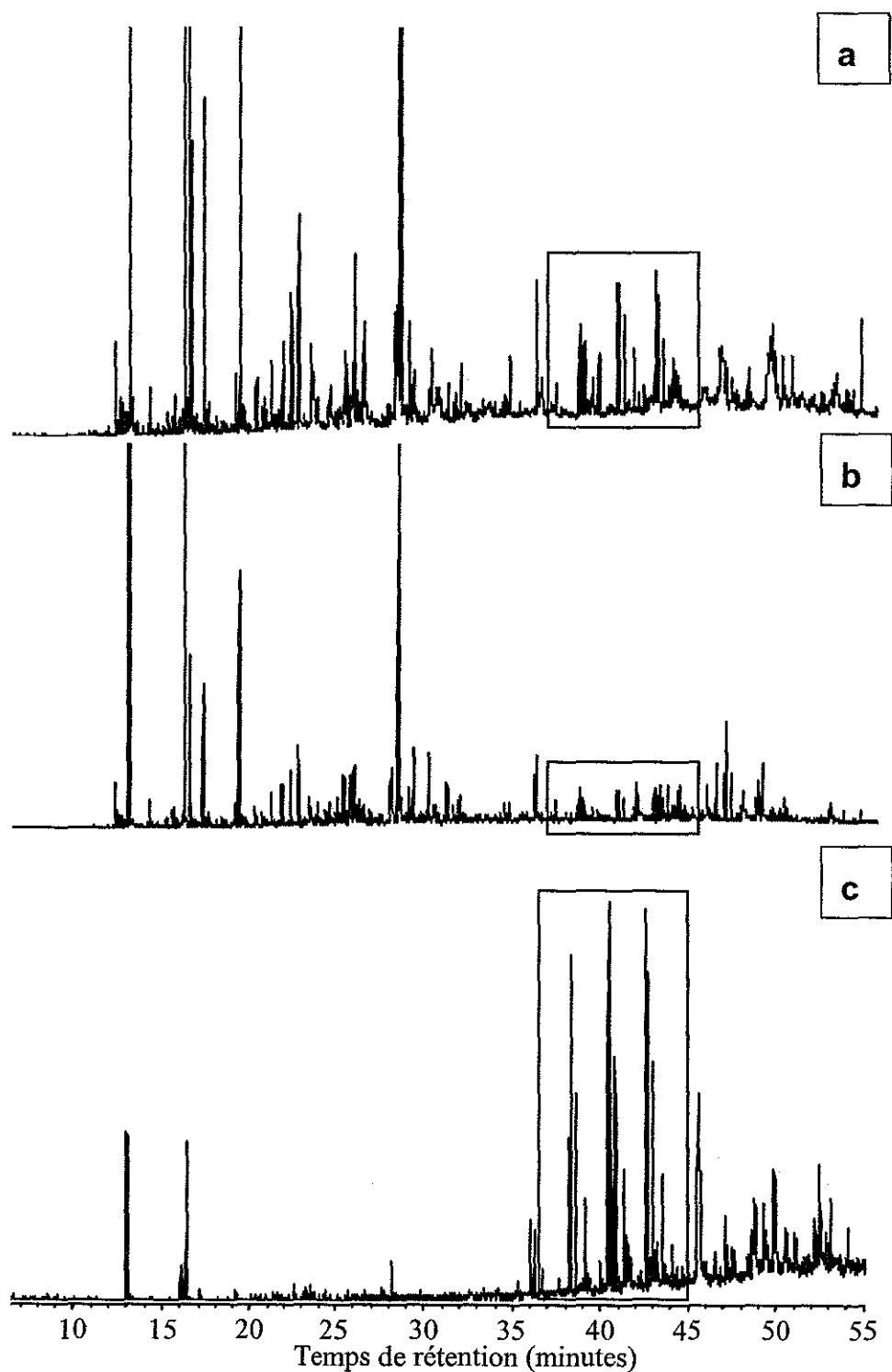


Figure 6.1 : Pyrochromatogrammes obtenus en pyCPG-SM ($m/z = 91$) sur les résidus non extractibles des boues activées (a), sur les résidus non extractibles des exopolymères (b) et sur les résidus non extractibles des résidus d'extraction par US et REC (c) (ordonnée : abondance relative; zone encadrée : signature caractéristique des LAS).

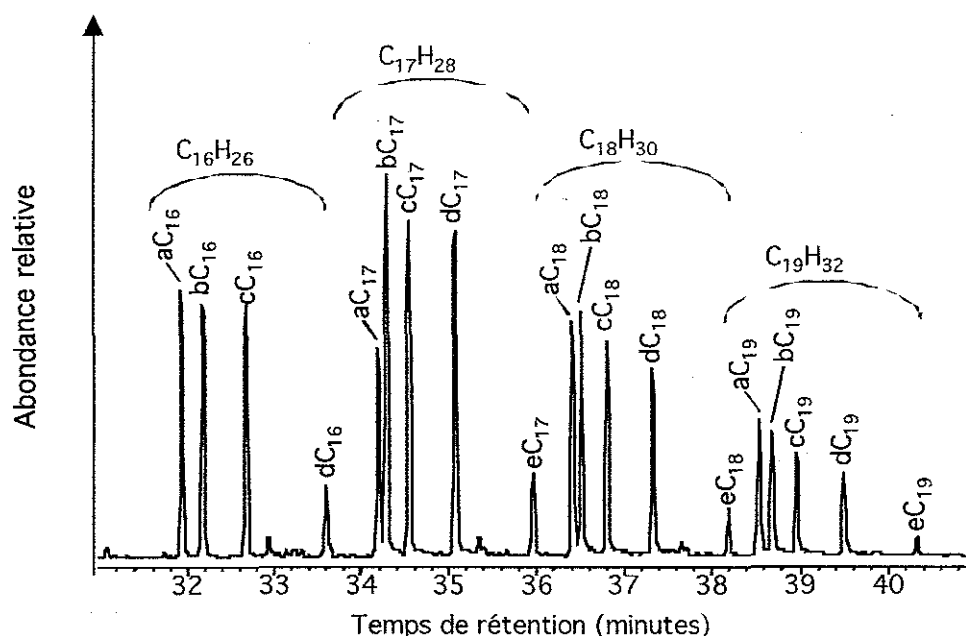


Figure 6.2 : Signature caractéristique d'un sulfonate d'alkylbenzène linéaire (LAS) commercial (Aldrich, 28,995-7, lot 31810-119) obtenue en pyCPG-SM en mode "Fullscan" ($m/z = 91$).

aC₁₆ : 1-butyl, hexyl benzène; bC₁₆ : 1-propyl, heptyl benzène; cC₁₆ : 1-éthyl, octyl benzène; dC₁₆ : 1-méthyl, nonyl benzène; aC₁₇ : 1-pentyl, hexyl benzène; bC₁₇ : 1-butyl, heptyl benzène; cC₁₇ : 1-propyl, octyl benzène; dC₁₇ : 1-éthyl, nonyl benzène; eC₁₇ : 1-méthyl, décyl benzène; aC₁₈ : 1-pentyl, heptyl benzène; bC₁₈ : 1-butyl, octyl benzène; cC₁₈ : 1-propyl, nonyl benzène; dC₁₈ : 1-éthyl, décyl benzène; eC₁₈ : 1-éthyl, undécyl benzène; aC₁₉ : co-élution de 1-hexyl, heptyl benzène et 1-pentyl, octyl benzène; bC₁₉ : 1-butyl, nonyl benzène; cC₁₉ : 1-propyl, décyl benzène; dC₁₉ : 1-éthyl, undécyl benzène; eC₁₉ : 1-méthyl, dodécyl benzène.

(c) Les molécules organiques sont biodégradées au sein des agrégats biologiques (Struijs *et al.*, 1991; Temmink et Klapwijk, 2004). Les LAS avec 14 atomes de carbone dans la chaîne alkyle sont plus facilement dégradés dans les eaux usées que les LAS avec 10 atomes de carbone, aussi l'augmentation des LAS à 10 atomes de carbone est un témoin de biodégradation (Moreno *et al.*, 1998; Perales *et al.*, 1999). De même, les isomères de positions externes du groupement phényle sont plus facilement biodégradés que les positions internes. Ainsi, le rapport de ces deux isomères permet un suivi de la biodégradation des LAS au cours du cheminement des eaux usées (Takada et Ishiwatari, 1987).

(d) La désorption de matière organique des agrégats biologiques vers l'eau usée est parfois observée (Guellil, 1999; Guellil *et al.*, 2001) suggérant que ce transfert de matière organique soit dû aux caractéristiques des eaux usées et des agrégats biologiques de boues activées. Par ailleurs, lorsque des molécules organiques associées aux agrégats biologiques s'échappent de la station d'épuration vers le milieu récepteur, le changement des caractéristiques physico-chimiques des eaux usées diluées avec de l'eau de rivière peut contribuer à la désorption des molécules organiques accumulées

dans les agrégats biologiques. Keiding et Nielsen (1997) ont montré que les agrégats biologiques se désagrègent lorsqu'ils sont placés dans un milieu de faible force ionique, conduisant à une libération de cations et de macromolécules.

Notre hypothèse est que les agrégats biologiques sont capables d'adsorber des molécules organiques amphiphiles et participent à leur dispersion dans le milieu récepteur. Une partie des LAS s'échappent de la station d'épuration sous une forme adsorbée dans les eaux usées épurées (0,02 %) (Fauser *et al.*, 2003). De plus, les LAS sont capables d'être transportés sur de longues distances à partir de leur point de décharge dans les rivières (Di Corcia *et al.*, 1999; González-Mazo et Forja, 1998; Rapaport et Eckhoff, 1990). De fait, les LAS sont largement répandus dans de nombreux environnements naturels comme les eaux usées, les eaux épurées, les boues activées (Alzaga *et al.*, 2003; De Henau *et al.*, 1989; Fauser *et al.*, 2003; McAvoy *et al.*, 1993; McAvoy *et al.*, 1998; McEvoy et Giger, 1986; Rapaport et Eckhoff, 1990), l'eau de rivière, les sédiments fluviaux (Eichhorn *et al.*, 2001; Marchesi *et al.*, 1991; McAvoy *et al.*, 1993; Trehy *et al.*, 1990; Westall *et al.*, 1999), l'eau de mer et les sédiments marins (Alzaga *et al.*, 2003; González-Mazo et Forja, 1998; González-Mazo *et al.*, 1997; Sarrazin *et al.*, 1999a, 1999b; Takada et Ishiwatari, 1987).

A l'heure actuelle, une seule étude a porté sur l'adsorption de protéines par des agrégats biologiques de boues activées (Crombie-Quilty et McLoughlin, 1983) et aucune sur leur désorption en eau de rivière. Quelques études se sont intéressées à l'adsorption des LAS par les agrégats biologiques (Garcia *et al.*, 2002; Urano et Saito, 1984) et à ce jour quelques études concernent la désorption des LAS des agrégats biologiques (Matthijs et de Henau, 1985; Temmink et Klapwijk, 2004). Aussi, les objectifs de cette étude ont été (i) de quantifier l'adsorption de trois molécules organiques biodégradables modèles (C_{11} -LAS $M_r = 318,5$; Azocaséine $M_r = 26000$; Azoalbumine $M_r = 69000$) par des agrégats biologiques de boues activées, (ii) de mesurer la réversibilité de l'adsorption par l'étude de la désorption des trois molécules modèles des boues activées en eau de rivière et en eau usée diluée avec de l'eau déionisée.

Notre démarche expérimentale s'est déroulée en deux étapes : (i) la mise au point des outils analytiques pour l'extraction liquide/solide des sulfonates d'alkylbenzènes de la matrice des eaux usées et des eaux de rivière et leur analyse par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) (*cf.* § 6.2) et (ii) l'étude de l'adsorption de molécules organiques (deux protéines de poids moléculaires différents et un sulfonate d'alkylbenzène comportant 11 atomes de carbone dans la chaîne aliphatique linéaire) et leur désorption des agrégats biologiques en eau de rivière et en eau usée diluée avec de l'eau désionisée (*cf.* § 6.3).

6.2. A simple and robust high performance liquid chromatography method for linear alkylbenzene sulfonate (LAS) analysis in river and waste water: application to sorption studies

Arnaud CONRAD ^A, Laurent DIEZ ^B, Jean-Claude BLOCK ^A and Pierre LEROY ^B

^A L.C.P.M.E., UMR 7564 CNRS-UHP Nancy I, Faculté de Pharmacie, Pôle de l'Eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France and ^B Equipe Thiols et Fonctions cellulaires, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

Projet de publication pour la revue scientifique *Chromatographia*.

Keywords - LAS, solid-phase extraction, adsorption, desorption, activated sludge, river and waste water

6.2.1. Abstract

A simple and fast HPLC method devoted to the measurement of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) with an alkyl chain length of 11 carbons (C₁₁-LAS) in waste and river water, has been developed. The method includes a solid-phase extraction on C₁₈ cartridges, elution on a reversed-phase column in an isocratic mode, and UV detection at 225 nm. Different parameters have been pointed out in the solid-phase extraction procedure, *i.e.* the ionic strength adjustment of sample, the solvent for elution of LAS from the sorbent, the evaporation step, and the use of an internal standard. Their optimization results in a robust method, as demonstrated by the validation pattern. C₁₁-LAS recoveries (83.1 ± 7.7 %; $n = 4$ different waste water samples) were not significantly influenced by physico-chemical characteristics of the tested water samples. This method permits the adsorption/desorption studies of C₁₁-LAS onto/from activated sludge flocs in river water in the range of 1 to 10 mg L⁻¹.

6.2.2. Introduction

Linear alkyl benzenesulfonates (LAS) are the major anionic surfactants used in detergent formulations. They are highly water soluble surface active agents. A LAS molecule contains an aromatic ring sulfonated at the *para*- position and attached to a linear alkyl chain at any position except the terminal carbons (Figure 6.3). The commercial products represent complex mixtures of homologues and isomers with an alkyl chain length from 10 to 14 carbon atoms (Cavalli *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2002; Nakae *et al.*, 1981). LAS are present in wastewater in high concentrations ranging from 3.1 to 16.9 mg L⁻¹ and are highly eliminated by biological wastewater treatment plant (up to 93 %) (Feijtel *et al.*, 1995, 1996; Field *et al.*, 1992; McAvoy *et al.*, 1993, 1998; Rapaport and Eckhoff, 1990; Sánchez Leal *et al.*, 1994; Struijs *et al.*, 1991; Waters and Feijtel, 1995). Low concentrations rejected from wastewater treatment plant in river reached 0.002 to 0.3 mg L⁻¹ (Cavalli *et al.*, 1996; De Ferrer *et al.*, 1997; Feijtel *et al.*, 1995; Pratz *et al.*, 1993; Rapaport and Eckhoff, 1990; Sánchez Leal *et al.*, 1994; Takada and Ishiwatari, 1987; Waters and Feijtel, 1995) and in river sediments, LAS concentrations varied from 0.49 to 1.4 mg g⁻¹ of sediment (Waters et Feijtel, 1995).

The physico-chemical characteristics of water samples such as calcium concentration and pH affect both the adsorption and the desorption of LAS from activated sludge (Garcia *et al.*, 2002; Westall *et al.*, 1999). Thus, the analytical methods devoted to the LAS measurement should not be influenced by the matrix variability of water samples.

Numerous analytical methods devoted to the measurement of LAS have already been reported for both theoretical and normative studies. The methylene blue active substances (MBAS) method (Clesceri *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2002; Urano and Saito, 1984; Urano *et al.*, 1984), an enzyme-linked immunosorbent assay (Fujita *et al.*, 1998) and UV spectrophotometry (Boudenne *et al.*, 2001; Djellal *et al.*, 1997) are generally used for the quantification of anionic detergents but they do not permit the separation of the different homologues and isomers.

Indeed, the MBAS method is subject to interference from other anionic detergents and is not suitable for the specific determination of LAS in wastewater (Matthijs and de Henau, 1987). Thus, separative methods have been developed to analyse the different homologues and isomers of LAS in environmental matrices, such as gas chromatography (GC) with either flame ionisation detection or mass spectrometry (MS) (Alzaga *et al.*, 2003; Ding and Chen, 1999; McEvoy and Giger, 1986; Rapaport and Eckhoff, 1990; Trehly *et al.*, 1990), and high-performance chromatography liquid (HPLC) combined with UV, fluorescence detection or coupled with MS (Cavalli *et al.*, 1996; De Ferrer *et al.*, 1997; De Henau *et al.*, 1989; Eichhorn *et al.*, 2001; Lunar *et al.*, 2004; Matthijs and de Henau, 1987; Nakae *et al.*, 1981; Pratz *et al.*, 1993; Rapaport and Eckhoff, 1990; Ruiz *et al.*, 2004; Sarrazin *et al.*, 1997a). Whereas GC-MS requires the conversion of LAS into volatile derivatives before analysis, HPLC

with UV or fluorescence detection permits the analysis of native molecules, thus it is a more convenient method for LAS analysis. Unlike the MBAS method, GC-MS and HPLC are suitable for specific determination of LAS homologues and isomers.

Preamalytical steps for sample purification and concentration are needed before HPLC analysis; they mainly rely upon (i) liquid/liquid partition such as coacervation process (Ruiz *et al.*, 2004) and (ii) liquid-solid extraction (ion-exchange, partition on C_{18} silica cartridges) (Alzaga *et al.*, 2003; Matthijs and de Henau, 1987; Pratz *et al.*, 1993; Sáez *et al.*, 2000; Sarrazin *et al.*, 1997b, 1999a; Temmink and Klapwijk, 2004; Trehly *et al.*, 1990).

The aim of this study is to optimise and validate an analytical method devoted to the quantification of C_{11} -LAS in river and wastewater. The HPLC method presently described includes a solid-phase extraction and concentration step followed by HPLC with isocratic elution and UV spectrophotometric detection; it was mainly adapted from the method previously described by Sarrazin *et al.* (1997a). Then, it was applied to the studies of C_{11} -LAS adsorption/desorption onto/from activated sludge flocs contained in river water.

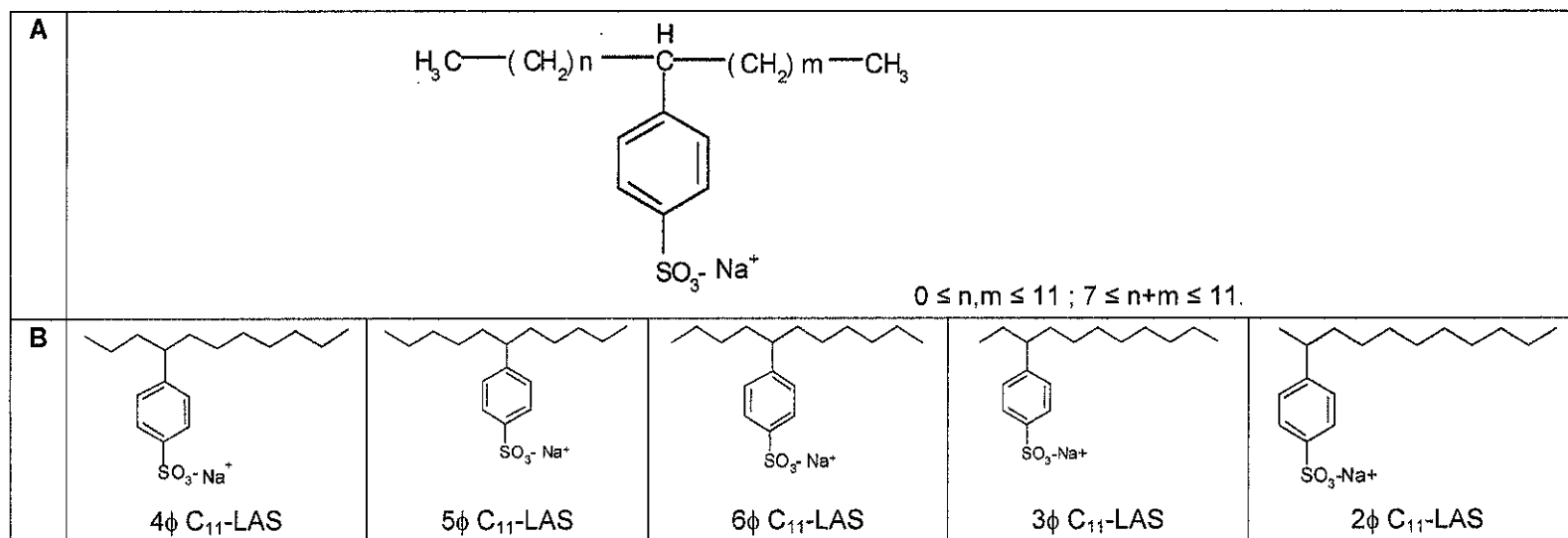


Figure 6.3 : Structures of Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) with various alkyl chain length (A) and of main isomers of C₁₁-LAS (φ: position of sulphophenyl group in alkyl chain) (B).

6.2.3. Experimental procedure

Reagents and standards. All chemicals and solvents were of analytical or HPLC reagent grade and used without further purification. Commercially available standards contain a mixture of LAS homologues with alkyl chain length varying from C₁₀ to C₁₃-LAS and isomers (with different phenyl ring positions on the alkyl chain) (Figures 6.3 and 6.4). They were purchased from Aldrich (28,995-7, batches 1 and 2) and Acros Organic (325910250, batch 3). The stock solution of LAS was prepared at a concentration of 1,000 mg L⁻¹ in deionised water and kept at +4 °C for maximum 9 days. 1-naphthol, naphthalene and anthracene were purchased from Sigma (St Louis, Mo, USA).

Wastewater and river water collection and storage. All the glassware were heated at 550 °C for 3.5 h before use, to avoid any organic contamination. Activated sludge and treated wastewater samples were directly collected in the aerated tank and after clarification from urban wastewater treatment plant of Toul (France), respectively. River water was sampled from the Moselle (Toul, France) upstream the outlet of the wastewater treatment plant. All samples were collected less than 3 h before use. The wastewater and river water were characterised by volatile solids (VS), pH, conductivity (k_{20°C}), alkalinity (TAC), and dissolved organic carbon (DOC) as specified in Standard Methods (Clesceri *et al.*, 1998).

Solid-phase extraction of LAS from water samples. LAS extraction from water samples was performed using C₁₈ cartridges filled with 500 mg of sorbent (Bond Elut, Varian, 12102052, France). The cartridge was successively pre-wetted with 10 mL of acetone and 10 mL of ultrapure water. 10-mL of water sample acidified, gently, to pH = 1.5 with concentrated hydrochloric acid was passed through the conditioned cartridge at a temperature of 23 ± 2 °C. All these operations were realised using a vacuum cartridge manifold (model spe-12 G, J.T.Baker, 7018-00, France) operated under a 200 mbar vacuum corresponding to a flow-rate of 1.7 mL min⁻¹. Then the cartridge was washed with 1 mL of ultrapure water under a vacuum of 400 mbar in order to fully dry the sorbent, and eluted with 6 mL of acetone. The eluting solution was evaporated under a nitrogen stream at 30 °C and the volume of residual solution (between 10 to 100 µL) was exactly measured by weighting. Then, 1 mL of mobile phase was added to the residual volume and the resulting mixture was stored at 4°C for a maximum of 10 h before HPLC analysis. The final measured concentration was corrected from the residual volume.

HPLC analysis. The HPLC system consisted of an isocratic pump (model PU 980, Jasco, Nantes, France), an autosampler (model AS-48, Biorad) equipped with a 20-µL injection loop, a column oven (model Croco-Cil, Cluzeau, Ste Foy la Grande, France), a variable-wavelength UV spectrophotometric detector (model L-4000, Hitachi-Merck,

Nogent-sur-Marne, France) and a spectrofluorimetric detector (model FP-920, Jasco, France). All data were recorded and reprocessed using a software (model AZUR™ V3.0, Datalys, France). A reversed-phase column (Nucleosil C18 100 HD, 5 μm , 250x4 mm I.D., Macherey Nagel, Düren, Germany) was eluted with acetonitrile-0.008 M phosphate buffer pH = 2.2 (60:40, V/V) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and at a temperature of 40 $\pm$ 1 °C; UV detection was operated at 225 nm.

Excitation and emission wavelengths for spectrofluorimetric detection were set at 232 and 290 nm, respectively.

A calibration curve including 5 points was realised daily with further dilutions of the LAS stock solution in the mobile phase at concentrations ranging from 1.0 to 10.0 mg L⁻¹ of LAS. The calibration curve was corrected by the recovery value calculated using a wastewater sample, filtered on 0.45 μm , fortified by LAS standard at 0.75 mg L⁻¹, and analysed as described above.

Adsorption assays of model molecules onto activated sludge. Activated sludge samples were diluted to 990 $\pm$ 9 mg L⁻¹ of VS with treated wastewater filtered through a 1.2 μm filter (Whatman, GF-C, n°1822 047).

5 mL of LAS standard solution in ultrapure water were mixed with 145 mL of activated sludge samples adjusted to 1 g L⁻¹ of VS in 250 mL flasks leading to the following initial concentrations: 0; 1.10; 1.76; 2.42; 3.30 and 4.40 mg L⁻¹ of C₁₁-LAS.

The content of flasks was homogenised by stirring at 300 rpm for 120 min at 4.0 $\pm$ 0.5°C to avoid the biodegradation of LAS, after which the unadsorbed LAS was separated from mixture by centrifugation at 3,000g at 4 °C for 10 min. The resulting supernatant was analysed by HPLC and the measured concentration value was corrected by the initial LAS concentration measured in the sample before fortifying.

The repeatability of adsorption assays was determined for each sludge sample by spiking in triplicate with LAS at an initial concentration of 4.40 mg L⁻¹ for C₁₁-LAS.

Desorption assays of C₁₁-LAS from activated sludge in river water. Separation of activated sludge from bulk water was performed by centrifugation at 3,000g at 4 °C for 10 min. The supernatant of the adsorption tests was removed from the flask by pipetting and then, the same volume of river water was added. The mixture was allowed to equilibrate for 60 min under stirring at 300 rpm at 4 °C then centrifuged at 3,000g at 4 °C for 10 min. A 50 mL sample of the supernatant was immediately submitted to the analysis of LAS as previously described.

6.2.4 Results and discussion

The basic method used in this study has been described by Sarrazin *et al.* (1997a, 1999a). Some modifications related to the concentration/extraction step and the quantification of LAS by HPLC have been realised in order to improve practicability and robustness of the method.

6.2.4.1. Optimisation of HPLC system.

The different parameters tested to optimise the HPLC system were: (i) elution mode, (ii) choice of a reference product, (iii) detection mode, (iv) use of an internal standard.

Elution mode. Usual elution modes reported in the literature are gradient elution on reversed-phase columns, which permits to obtain full separation of LAS of different alkyl chain length and isomers from their respective polar metabolites, especially their carboxylic derivatives (De Henau *et al.*, 1989; Matthijs and de Henau, 1987; Sarrazin *et al.*, 1997a, 1999a). Moreover, addition of a counter-ion in the mobile phase, such as tetraethylammonium sulfonate (Moreno *et al.*, 1998), has been reported to improve the separation of different homologues and isomers. In these methods, the resulting overall elution time for one sample analysis is close to from 40 to 60 min (Moreno *et al.*, 1998; Sarrazin *et al.*, 1997a, 1999a).

We have presently focused on the measurement of C₁₁-LAS and we found that isocratic elution, using acetonitrile: phosphate buffer pH = 2.2 (60:40, V/V) mixture as the mobile phase on a highly hydrophobic C₁₈ silica based column (20 % carbon content) permits the separation of C₁₁-LAS from LAS with different alkyl chain lengths from 10 to 13 carbon atoms (Figure 6.4) with a complete elution time of *ca.* 15 min. Thus, no re-equilibration is needed between each run as for gradient elution and an analytical throughput of 4 samples per hour could be applied during our sorption studies.

(ii) Reference product : three commercial products tested. Only complex mixtures of LAS homologues and isomers are commercially available and the use of a pure C₁₁-LAS standard needs a specific synthesis, as already reported (Doe *et al.*, 1977). Thus, we have tested three batches obtained from two different manufacturers; they were dissolved in the mobile phase and analysed in the isocratic HPLC system coupled with UV detection at 225 nm (Figure 6.4). All of them present similar chromatographic profiles, also close to those previously presented in the literature (Lunar *et al.*, 2004; Nakae *et al.*, 1981).

A main peak at a retention time of *ca.* 5 min (inside the frame in Figure 6.4) was observed, corresponding to different isomers coeluted. According to previous studies (Lunar *et al.*, 2004; Nakae *et al.*, 1981), it includes 4 isomers with different position of the phenyl ring on the alkyl chain: 3 ϕ C₁₁-LAS, 4 ϕ C₁₁-LAS, 5 ϕ C₁₁-LAS and 6 ϕ C₁₁-LAS. By internal normalisation,

this peak represents 36, 44 and 30 % of the total area of all the components detected for the batch n°s 1, 2 and 3, respectively. Only batch n° 2 and its corresponding main peak were used for quantification in further studies.

The stability of the stock solution prepared in ultrapure water at a concentration of 1,000 mg L⁻¹ and stored at 4 °C in a brown flask, was studied by measuring daily its concentration *versus* a standard curve prepared from a fresh LAS stock solution. The LAS stock solution was stable for at least 9 days.

(iii) Detection mode. The maximum wavelength for UV absorption of C₁₁-LAS is 225 nm, as determined with use of a diode array detector (data not shown). UV and spectrofluorimetric detections of C₁₁-LAS were compared and a response factor 40-fold higher in fluorescence than in UV was observed. The limit of detection (LOD) obtained for the C₁₁-LAS standard presently selected, using UV detection, was 0.3 mg L⁻¹ (signal-to-noise of 3); the limit of quantification (LOQ) was 1.0 mg L⁻¹ (signal-to-noise of 10). These LOD and LOQ values appear sufficient for our sorption studies if a 10-fold concentration step is operated during sample treatment.

The linearity of the HPLC method for the measurement of C₁₁-LAS prepared in the mobile phase was observed between 1 and 10 mg L⁻¹ (linear regression was $y = 7.860 x + 0.333$ and correlation coefficient was 0.998). The repeatability was also calculated: the coefficient of variation was less than 3 % (n = 3) for all the concentrations tested in the linearity range.

(iv) Internal *versus* external standardisation. Three compounds were tested as possible internal standards, *i.e.* 1-naphthol, naphthalene, anthracene. Their retention time in the reported HPLC system were 2.9, 6.4 and 13.2 min, respectively. Only anthracene was eluted without any interference from LAS components and endogenous compounds contained in river and waste water samples. Thus, anthracene was used in further experiments in order to evaluate whether internal standardisation improves the accuracy and precision of the analytical method.

The retained HPLC system operating in an isocratic elution mode and combined to UV detection at 225 nm was used to optimise C₁₁-LAS extraction from water samples.

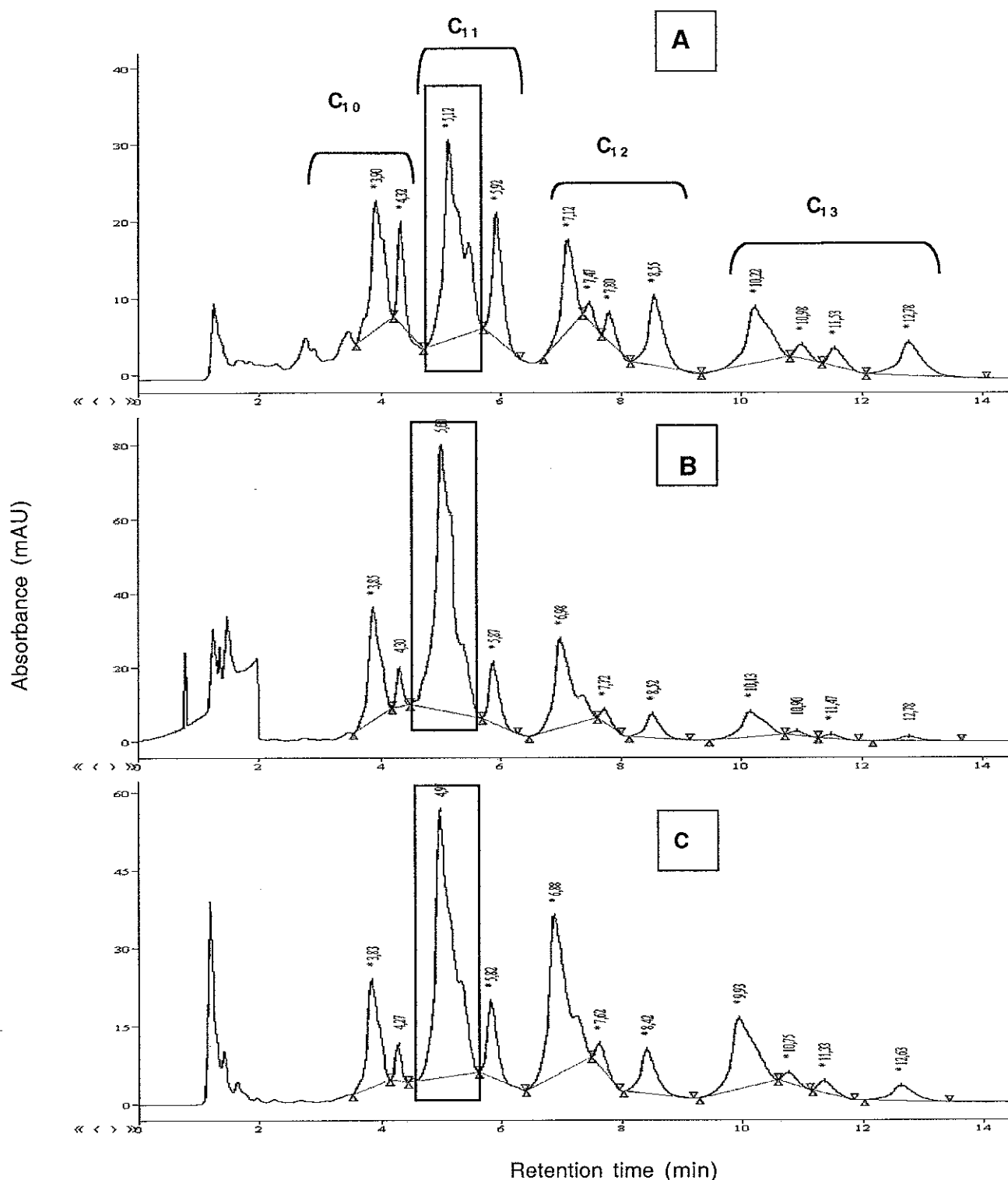


Figure 6.4 : Typical chromatograms corresponding to different commercially available standards containing homologues and isomers of LAS (C₁₀ to C₁₃). The peak inside the frame corresponds to 4 isomers of C₁₁-LAS. (A: Aldrich (batch 1); B: Aldrich (batch 2); C: Acros Organic (batch 3). Column: Nucleosil C18 100 HD, 5 μ m, 250x4 mm; mobile phase: acetonitrile-0.8 mM phosphate buffer pH 2.2 (60:40; V/V); flow rate 0.8 mL min⁻¹ at 35 °C; UV detection at 225 nm.

6.2.4.2. Development of solid-phase extraction

The main points presently tested to optimise the solid-phase extraction procedure using C_{18} cartridges concerned (i) ionic strength of sample, (ii) solvent used for elution of LAS from the sorbent, (iii) evaporation step, and (iv) use of an internal standard.

(i) ionic strength of sample. Sarrazin *et al.* (1999a) have suggested that addition of NaCl (5 M) to the sample before its acidification (pH = 1.5) increases the affinity of both LAS and their metabolites on C_{18} cartridges, by hydrophobic interactions. In our case, the addition of NaCl (5 M) to waste water samples spiked with 10 mg L⁻¹ of LAS decreased the C_{11} -LAS recovery from 93.8 to 47.5 %.

(ii) solvent for LAS elution. Sarrazin *et al.* (1999a) proposed either acetone or methanol to release LAS and their metabolites retained on C_{18} cartridges. We presently obtained a recovery value for C_{11} -LAS (tested in waste water fortified at a LAS concentration of 10 mg L⁻¹) of 94% with use of acetone and only 74 % with methanol.

(iii) evaporation step. This step is of main importance because it realises a theoretical 10-fold concentration factor of samples, which authorises use of UV detection in the HPLC system for the measurement of LAS at usual concentration levels down to 0.1 mg L⁻¹ in river water. In our case, it appeared difficult to obtain a dried residue during the evaporation step realised under a nitrogen stream at 35 °C. The residual volume was variable between the assays (from 10 to 100 µL), contributing to decrease the precision and the accuracy of the method.

Without any correction by the residual volume obtained after the evaporation step, the recoveries varied from 53 to 86 %. Thus, operating the correction of residual volume, the recovery of LAS added to waste water at a concentration of 0.75 mg L⁻¹, was 83.1 ± 7.7 % (n = 4 different waste water samples). No influence of physico-chemical parameters of wastewater samples, which varied as follows: pH = 7.7 ± 0.1 , $k_{20^{\circ}\text{C}} = 757 \pm 110$ µS cm⁻¹, 70 ± 21 mg L⁻¹ of CaCO₃, 71 ± 31 mg L⁻¹ of VS and 6.4 ± 3.2 mg L⁻¹ of DOC (n = 4 wastewater samples), was observed on LAS recovery.

The C_{11} -LAS was detected in the wastewater samples analysed in these studies at concentration levels between LOD and LOQ (< 1.0 mg L⁻¹ of C_{11} -LAS after solid-phase extraction), while the C_{11} -LAS was never detected in the river water samples (< 0.3 mg L⁻¹ of C_{11} -LAS before solid-phase extraction) (Figure 6.5).

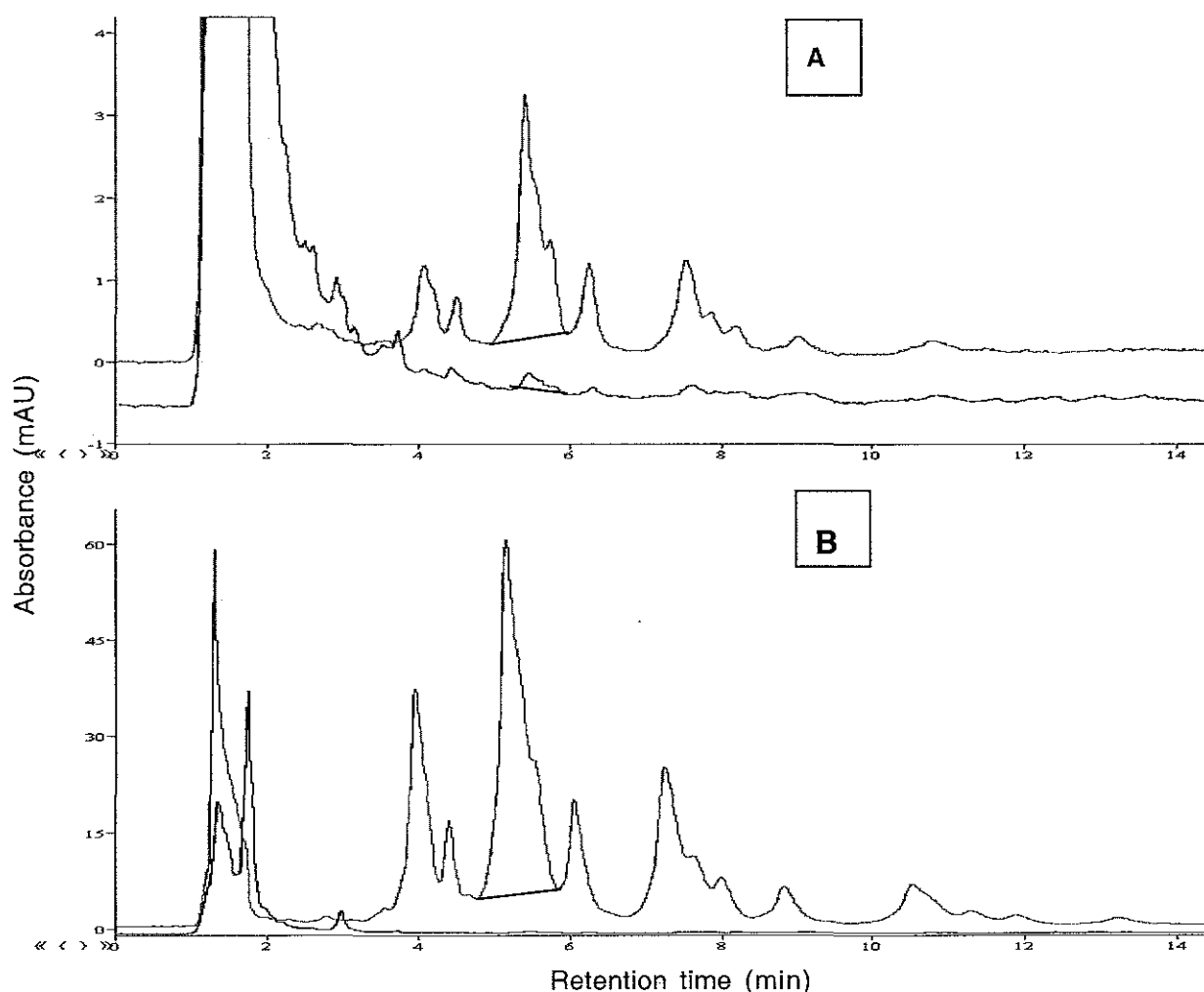


Figure 6.5 : Typical chromatograms corresponding to extracts of waste (A) and river (B) water samples fortified or not by LAS standard at a concentration level of 1 mg L⁻¹ for wastewater and 10 mg L⁻¹ for river water. For chromatographic conditions, see experimental section or Figure 6.3.

The stability of the resulting extracts diluted in the mobile phase was verified for 10 h at 4 °C (Figure 6.6). The measured concentration of C₁₁-LAS was not significantly different between the different assays ($p < 0.05$). Thus, samples were automatically injected into the HPLC system over this period.

Other parameters seem of main importance to obtain a high precision: flow rates used during the loading, washing and eluting steps on the cartridges have to be precisely regulated to minimise variations from one sample to another. Temperature at which all these operations are realised can also induce recovery variations, as already demonstrated for other studies (Chern and Wu, 2001).

(iv) use of an internal standard. The internal standard selected above, *i.e.* anthracene, was added either to the water sample or to the final eluting solvent. Its use slightly improves linearity ($r^2 = 0.967$ vs. 0.946) but not repeatability (values of variation coefficient calculated from three measurements varied from 0.78 to 2.59 % for different wastewater samples ($n = 8$) without internal standard and from 0.54 to 3.71 % with internal standard for a concentration of 1 mg L^{-1} in water sample). Thus, use of an internal standard was not justified.

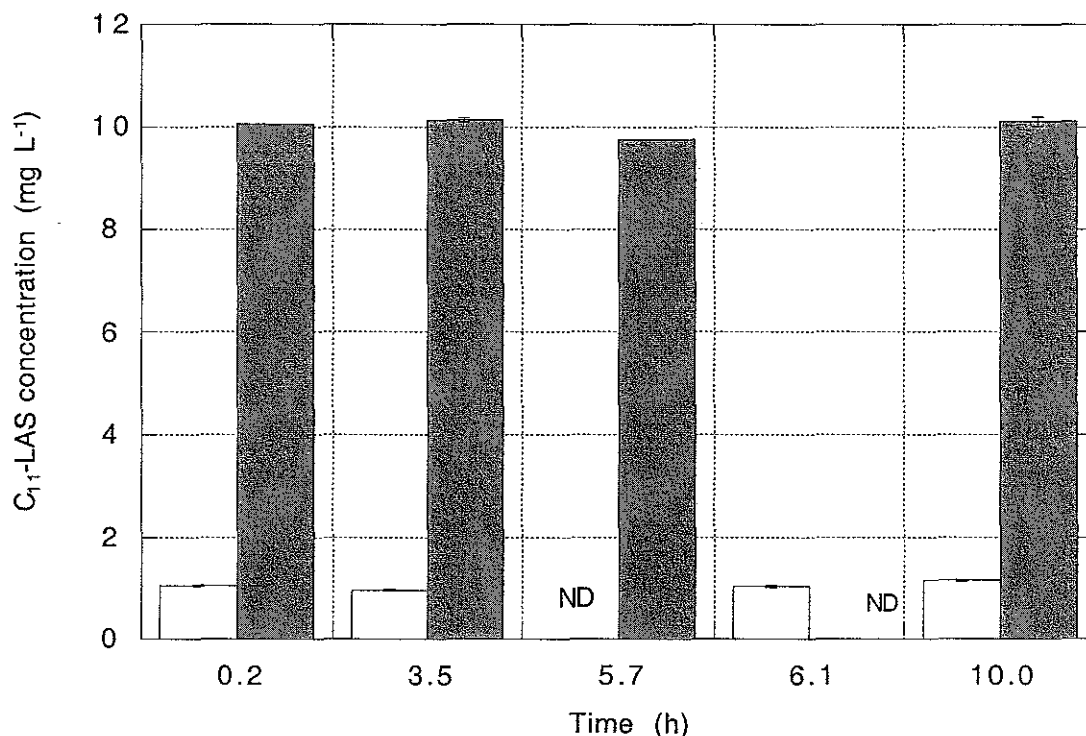


Figure 6.6 : Stability of C_{11} -LAS tested in concentrated extracts in mobile phase stored in the autosampler at 4°C (□ : 0.1 mg L^{-1} ; ■ : 1.0 mg L^{-1}) ($n = 3$ measurements). ND: Not determined.

6.2.4. C_{11} -LAS adsorption and desorption onto/from activated sludge in river water

The adsorption of C_{11} -LAS onto activated sludge and their desorption from activated sludge in river water were not linear process as a function of concentration (one experimental set is represented in Figure 6.7). However, these data could be adjusted to a Freundlich equation : $Q_{\text{ads}} = K_{\text{ads}} C_{\text{ads}}^{1/n}$, as previously mentioned by Urano *et al.* (1984) and Garcia *et al.* (2002). The parameters of Freundlich equation were $1/n = 0.37 \pm 0.08$ and $K_{\text{ads}} = 9.55 \pm 1.38 \text{ L g}^{-1}$ ($n = 4$). A low hysteresis was obtained that signified the exchange of C_{11} -LAS between activated sludge and bulk liquid is reversible according to the values of $1/n = 0.27 \pm 0.03$ and $K_{\text{des}} = 1.13 \pm 0.20 \text{ L g}^{-1}$ ($n = 4$). Freundlich parameters were not significantly affected by the physico-chemical characteristics of both wastewater, which were $\text{pH} = 7.7 \pm 0.1$,

$k_{20^{\circ}\text{C}} = 757 \pm 110 \mu\text{S cm}^{-1}$, $70 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 , $71 \pm 31 \text{ mg L}^{-1}$ of VS and $6.4 \pm 3.2 \text{ mg L}^{-1}$ of DOC and river water, which were $\text{pH} = 7.9 \pm 0.3$, $k_{20^{\circ}\text{C}} = 500 \pm 249 \mu\text{S cm}^{-1}$, $38 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 , $126 \pm 60 \text{ mg L}^{-1}$ of VS and $5.1 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ of DOC ($n = 4$ samples).

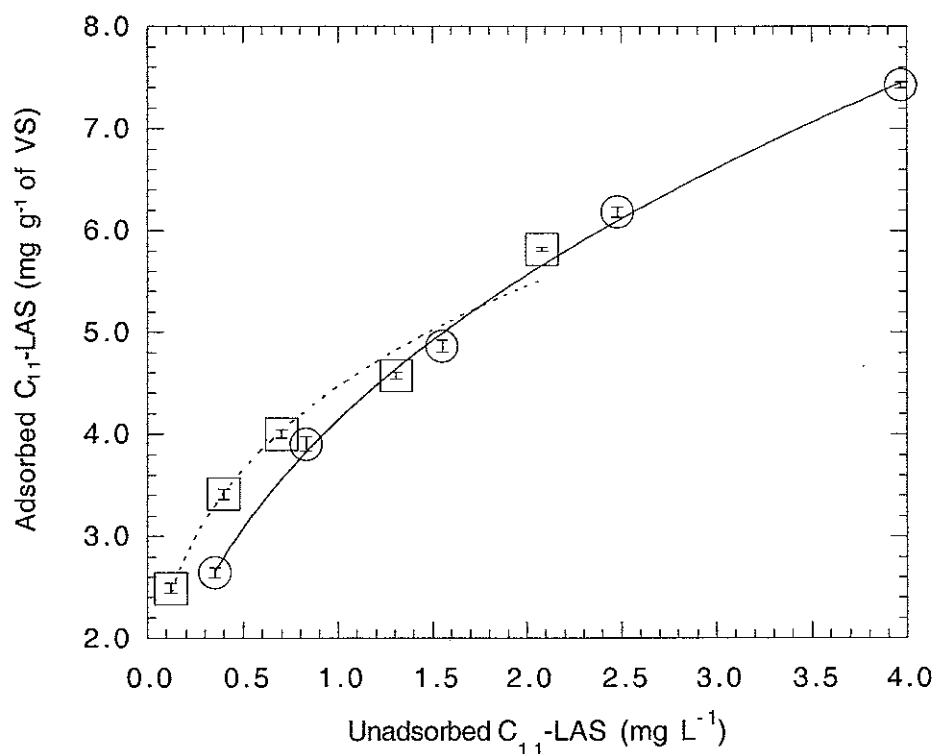


Figure 6.7 : Adsorption of $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ onto activated sludge (at 4°C and for 60 min) ($\circ$) and desorption of $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ from activated sludge in river water (at 4°C and for 60 min) ($\square$) ($n = 3$ measurements). Adjustment of adsorption (plain line) and desorption (dotted line) data to Freundlich equation.

6.2.5. Conclusion

The presently reported HPLC method is suitable for the measurement of LAS in waste and river water samples. Its simplicity of use, fastness and automation allow the analysis of numerous samples and was well adapted to our sorption studies. Their optimization results in a robust method, as demonstrated by the validation pattern. $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ recoveries ($83.1 \pm 7.7\%$; $n = 4$ different waste water samples) were not significantly influenced by physico-chemical characteristics of the tested water samples. The limit of detection obtained for the $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ standard presently selected, using UV detection, was 0.3 mg L^{-1} and the limit of quantification was 1.0 mg L^{-1} (signal-to-noise of 10). The use of spectrofluorimetric detection could permit to realise additional studies in this field using lower LAS concentrations. This analytical method can be easily extend to other homologues and isomers of LAS.

Acknowledgements

This work was carried out in the framework of the "Contrat de Plan État-Région Lorraine" (CPER), and the "Zone Atelier du Bassin de la Moselle" (ZAM), and was funded by the "Fédération de Recherche Eau-Sol-Terre" (Nancy, France) and the "Ministère de l'Éducation Nationale" (Paris, France).

6.3. Adsorption/désorption de sulfonate d'alkylbenzène linéaire et de protéines par des boues activées en eau de rivière

6.3.1. Introduction

Trois molécules organiques modèles (C_{11} -LAS $M_r = 318,5$; Azocaséine $M_r = 26000$; Azoalbumine $M_r = 69000$) ont été choisies pour caractériser (i) la capacité d'accumulation des agrégats biologiques, prélevés directement dans les bassins aérés de la station d'épuration et (ii) leur désorption par des agrégats biologiques dans de l'eau de rivière et de l'eau usée diluée épurée ou non avec de l'eau déionisée.

Les tests d'accumulation ont été réalisés en mélangeant les molécules modèles à des concentrations déterminées avec une concentration standardisée d'agrégats biologiques à 4 °C pendant 120 min. Après 120 min de mélange, les molécules non piégées par les agrégats ont été déterminées par un dosage à 440 nm pour les azoprotéines (cf. § 3.7) et par extraction en phase solide puis une quantification par CLHP à 225 nm pour les C_{11} -LAS (cf. § 3.6.1). Les tests d'accumulation et de désorption ont été réalisés à 4 °C et pendant des périodes de temps courtes afin de limiter les risques de biodégradation des molécules modèles. Les tests de désorption ont été réalisés en remplaçant la phase aqueuse par le même volume d'eau de rivière ou d'eau usée épurée de caractéristiques physico-chimiques déterminées (cf. § 3.3).

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'un article soumis à la revue internationale *Environmental Science and Technology* : A. Conrad, A. Cadoret, P. Corteel, P. Leroy et J-C. Block, Adsorption/désorption of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and azoproteins by/from activated sludge flocs (cf. 6.3.2).

Dans cet article soumis à la revue *Environmental Science and Technology* (cf. § 6.3.2), nous montrons qu'un état de pseudo-équilibre à 4 °C s'est instauré rapidement pour l'accumulation et la désorption des trois molécules modèles (C_{11} -LAS, azoalbumine et azocaséine) par des

agrégats biologiques de boues activées. Cette étape d'accumulation est reproductible (Figure 6.8). Sur l'ensemble des tests d'accumulation réalisés, les coefficients de variations déterminés à partir des quantités de molécules modèles adsorbées par des boues sont inférieurs à 30 %.

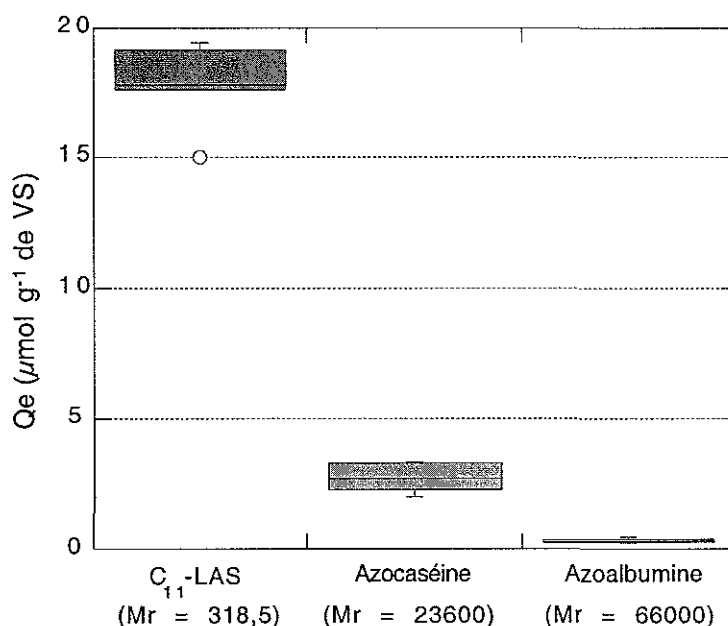


Figure 6.8 : Variabilité de la quantité de molécules modèles adsorbée (Q_e) par différents échantillon d'agrégats biologiques de boues activées pour un ajout de 23,5; 4,2 et 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivement de C₁₁-LAS, d'azocaséine et d'azoalbumine ($n = 8$ boues pour le C₁₁-LAS; $n = 6$ boues pour l'azocaséine ; $n = 5$ boues pour l'azoalbumine). Les points considérés comme hors de la distribution des valeurs (O) ont une valeur supérieure à la valeur correspondant au quartile supérieur + 1,5 x la distance interquartile (DIQ) ou une valeur inférieure à la valeur correspondant au quartile inférieur - 1,5 x la distance interquartile (DIQ).

Les données de l'adsorption des molécules modèles par les agrégats biologiques ont été ajustées à un modèle de Freundlich et les caractéristiques du couple adsorbant-adsorbat sont, pour les valeurs de $1/n$, 0,42 ($n = 5$ boues) pour les C₁₁-LAS, 0,95 ($n = 3$ boues) pour l'azocaséine et 0,38 ($n = 3$ boues) pour l'azoalbumine. La capacité d'adsorption des agrégats biologiques vis-à-vis des trois molécules modèles sont respectivement de 8,59, 1,60 et 0,29 L g^{-1} de VS_{Boues} pour les C₁₁-LAS, l'azocaséine et l'azoalbumine. Ainsi, la quantité de C₁₁-LAS adsorbée par les agrégats biologiques est supérieure à celles de l'azocaséine et de l'azoalbumine adsorbée.

Dans tous les essais, l'adsorption des C₁₁-LAS par les agrégats biologiques n'est pas totalement réversible (hystérésis faiblement marquée) dans l'eau de rivière, alors qu'un

phénomène d'hystérésis très marqué a été observé pour les molécules modèles azocaséine et azoalbumine.

De plus, les caractéristiques physico-chimiques des eaux usées et de l'eau de rivière n'affectent pas l'adsorption des molécules modèles par les agrégats biologiques. De même, la désorption des C₁₁-LAS des agrégats biologiques n'a pas été significativement affectée par la dilution des eaux usées avec l'eau déionisée, alors que la désorption de l'azocaséine des agrégats biologiques est influencée pour des eaux usées très diluées.

6.3.2. Adsorption/desorption of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and azoproteins by/from activated sludge flocs (soumis à la revue *Environmental Science and Technology*, 2004)

A. CONRAD ^A, A. CADORET ^A, P. CORTEEL ^A, P. LEROY ^B, AND J.C. BLOCK ^{a,*}

^A L.C.P.M.E., UMR 7564 CNRS-UHP Nancy I, Faculté de Pharmacie, Pôle de l'Eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France and ^B Equipe Thiols et Fonctions cellulaires, Faculté de Pharmacie, UHP Nancy I, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

Soumis à la revue scientifique *Environmental Science and Technology*

RUNNING TITTLE

Adsorption/desorption of model molecules by/from activated sludge

KEYWORDS

Adsorption, desorption, organic molecules, activated sludge, wastewater, river water

6.3.2.1. Introduction

The removal of organic matter from wastewater in activated sludge treatment plants is controlled by its sorption and diffusion into activated sludge flocs and further biodegradation and assimilation by microorganisms. Many compounds can be sorbed by activated sludge flocs: unidentified organic compounds (Guellil *et al.*, 2001), as well as proteins (Crombie-Quilty and McLoughlin, 1983), polysaccharides (Carlson and Silverstein, 1998), long chain fatty acids (Hwu *et al.*, 1998), pyrene (Ganaye *et al.*, 1997) and linear alkylbenzenesulfonates (LAS) (Urano and Saito, 1984; Garcia *et al.*, 2002). Both electrostatic and hydrophobic interactions govern organic compound sorption, depending on the properties of the adsorbate, which may or may not benefit from negative charges on the flocs (Mikkelsen, 2003) and/or their hydrophobic domains (Ganaye *et al.*, 1997; Späth *et al.*, 1998). For example, negatively charged macromolecules are sorbed onto biofilms less efficiently than neutral macromolecules (Carlson and Silverstein, 1998). LAS with long chains are efficiently sorbed by activated sludge flocs *via* hydrophobic interactions (Urano and Saito, 1984; Garcia *et al.*, 2002).

A fraction of these compounds, even when they are biodegradable, can simply accumulate in the sludge without biodegradation (Struijs *et al.*, 1991; Fauser *et al.*, 2003). Thus, organic matter sorbed onto activated sludge flocs can be released into the bulk water at different stages in wastewater treatment or into the river water when flocs escape from the treatment plant. Such a release has been observed when flocs are mixed with treated wastewater or ultrapure water (Keiding and Nielsen, 1997; Guellil *et al.*, 2001), and in the identical fashion in organic soil aggregates leached with ultrapure water (Reemtsma *et al.*, 1999). In addition, exchanges involving organic matter and waterborne flocs were assumed to occur constantly in rivers (Chaignon *et al.*, 2002).

As desorption has been poorly documented, we investigated the sorption/desorption of three model molecules (C_{11} -LAS $M_w = 318.5$; azocasein $M_w = 26,000$; azoalbumin $M_w = 69,000$) by/from activated sludge flocs dispersed in river water or in diluted wastewater. These molecules are quite biodegradable, however relatively high concentrations of them are measured in wastewater and in river water. As an example, LAS has been found at concentrations of $5.0 \pm 1.9 \text{ mg L}^{-1}$ in raw wastewater, $0.04 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$ in treated wastewater and 0.01 mg L^{-1} in river waters (Rapaport and Eckhoff, 1990; McAvoy *et al.*, 1993; Temmink and Klapwijk, 2004). Proteins account for around 50 to 90 mg L^{-1} in raw wastewater (Henze, 1992; Raunkjær *et al.*, 1994). In our assays, we spiked activated sludge flocs with the model molecules at various concentrations relevant to environmental conditions (from 3.5 to 13.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for C_{11} -LAS, from 0.15 to 1.45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azoalbumin and from 0.38 to 3.85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azocasein). C_{11} -LAS was quantified in the bulk liquid by HPLC combined with UV/visible detection after solid-phase extraction. Azoproteins were quantified in the bulk liquid by spectrophotometry at 440 nm after alkalization. The

desorption assays were carried out with river water and wastewater diluted with deionized water. All adsorption and desorption assays were realized at 4°C for a short time (120 and 60 min respectively) to avoid biodegradation of the three model molecules. The adsorption capacity and the distribution coefficients of the model molecules were calculated from the Freundlich equation.

6.3.2.2. Material and methods

Activated sludge, wastewater and river water characterisation. Activated sludge flocs and treated wastewater samples were directly collected in the aerated tank and, following clarification, from the urban wastewater treatment plant at Toul (France) respectively. River water was sampled from the Moselle (Toul, France) upstream of the wastewater treatment plant outlet. All samples were collected less than 3 h before use. Activated sludge flocs, treated wastewater and river water samples were taken between April 2003 and July 2003. The characteristics of wastewater treatment plants were the following: 25,375 inhabitant-equivalents, a biological oxygen demand/chemical oxygen demand load of 0.30, wastewater flow of 5,610 m³ day⁻¹, hydraulic retention time of 4 h and sludge age of 13 days. The activated sludge, treated wastewater and river water were characterized by volatile solid content (VS), pH, conductivity ($k_{20^{\circ}\text{C}}$), alkalinity (TAC) and dissolved organic carbon (DOC), as specified in *Standard Methods* (Clesceri *et al.*, 1998). The treated wastewater characteristics were pH = 7.67 ± 0.30, $k_{20^{\circ}\text{C}}$ = 737 ± 142 μS cm⁻¹, 70.6 ± 22.0 mg L⁻¹ of CaCO₃, 63.3 ± 35.0 mg L⁻¹ of VS and 7.81 ± 2.03 mg L⁻¹ of DOC (n = 17 samples), and the river water characteristics were pH = 7.91 ± 0.48, $k_{20^{\circ}\text{C}}$ = 513 ± 246 μS cm⁻¹, 50.2 ± 23.7 mg L⁻¹ of CaCO₃, 110.0 ± 47.4 mg L⁻¹ of VS and 4.93 ± 0.85 mg L⁻¹ of DOC (n = 14 samples).

Model molecules. Azoalbumin and azocasein were purchased from Sigma (A2765, lot 101K7023 and A2382, lot 129H7665, respectively). LAS molecules were commercialized by Sigma (28,995-7, lot S05574-032) and represented a complex mixture of LAS isomers and homologous LAS, in which C₁₁-LAS represented 44% of the commercial mix containing a variety of homologous LAS and LAS isomers determined by HPLC according to Nakae *et al.* (1981).

Azoalbumin and azocasein quantification in water samples. Azoproteins were determined according to Sarath *et al.* (1989). 1 mL of water was homogenized with 1 mL of 0.1 M NaOH and absorbance was measured at 440 nm (Spectrophotometer SAFAS, Monaco). A five-point calibration curve was made with azoalbumin or azocasein prepared in filtered, treated wastewater at concentration levels between 3.85 10⁻² and 3.85 μmol L⁻¹ for azocasein, and between 1.45 10⁻² and 1.45 μmol L⁻¹ for azoalbumin, with a stock solution of each

azoprotein at 5,000 mg L⁻¹. The measurements were taken in triplicate for each flask. The detection limits for azoproteins in wastewater were estimated at 6.5 10⁻³ μmol L⁻¹ and 1.6 10⁻² μmol L⁻¹ for azoalbumin and azocasein respectively.

Solid-phase extraction and HPLC analysis of C₁₁-LAS in water samples. LAS extraction from water samples was performed using C₁₈ cartridges filled with 500 mg of sorbent (Bond Elut, Varian, 12102052, France) at 23 ± 2°C. The cartridge was prewetted with 10 mL of acetone and then with 10 mL of ultrapure water. A 10-mL water sample was acidified to pH = 1.5 with concentrated hydrochloric acid and passed through the conditioned cartridge. All these operations were performed using a vacuum cartridge manifold (model spe-12 G, J.T.Baker, 7018-00, France) operating under a 200-mbar vacuum. Then the cartridge was washed with 1 mL of ultrapure water under a vacuum of 400 mbars in order to fully dry the sorbent, and eluted with 6 mL of acetone at a flow-rate of 1.7 mL min⁻¹. The eluting solution was partially evaporated under a nitrogen stream at 30°C and the volume of residue was evaluated by weighing (representing from 10 to 100 μL), in order to correct the main-peak areas. The resulting dried residue was dissolved in 1 mL of mobile phase, which composition was acetonitrile-0.008 M phosphate buffer pH 2.2 (60:40, V/V) and stored at 4°C for a maximum of 10 h before HPLC analysis. When eluted concentrations were greater than the upper limit of the linearity range, extracts were diluted in the mobile phase. This procedure permits a 10-fold concentration of samples.

The HPLC method was adapted from Sarrazin *et al.* (1997a, 1997b). Briefly, the HPLC system consisted of an isocratic pump (model PU 980, Jasco, France), an autosampler (model AS-48, Biorad) equipped with a 20-μL injection loop, a column oven (model Croco-Cil, Cluzeau, France) and a variable-wavelength UV spectrophotometric detector (model L-4000, Hitachi-Merck, France). All data were recorded and reprocessed using software (Azur, Datalys, v 3.0.3.0, France). A reverse-phase column (Nucleosil C18 100 HD, 5 μm, 250x4 mm I.D., Macherey Nagel, Germany) was eluted with an mobile phase (acetonitrile-0.008 M phosphate buffer pH = 2.2 (60:40, V/V)) at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and a temperature of 35 ± 1 °C; UV detection was performed at 225 nm.

A 5-point calibration curve was constructed daily using standard C₁₁-LAS solutions prepared in the mobile phase at concentrations ranging from 1.38 to 13.81 μmol L⁻¹. The commercially available C₁₁-LAS standard is a complex mixture of isomers. Its main component was used in the present study for quantification and corresponds to a peak with a retention time of *ca.* 5 min and an area representing more than 27% of the total area of all the components detected in the HPLC system, for 3 different commercial sources (data not shown).

Limits of detection and quantification for C₁₁-LAS considering its main component were 0.94 and 3.14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (signal-to-noise of 3 and 10) respectively. Repeatability of the measurements was tested: coefficients of variation were less than 5% at any concentration tested in the linearity range ($n = 3$). Recovery of C₁₁-LAS from spiked waste water samples was measured for each different batch and was used to correct concentration values, the mean value of which was $83.9 \pm 5.1\%$ ($n = 10$ water samples).

Adsorption assays of model molecules by activated sludge. The kinetics of adsorption by activated sludge was determined by mixing the model molecules at a concentration of 7.60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for C₁₁-LAS; 0.77 and 3.85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azocasein; and 0.29 and 1.45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azoalbumin with sludge at 4°C and stirring at 300 rpm for 5 to 270 min.

The adsorption of model molecules by activated sludge flocs was studied in batch experiments. Activated sludge samples were diluted to $990 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$ of VS with treated wastewater filtered through a 1.2- μm filter (Whatman, GF-C, no.1822 047).

Five mL of LAS dissolved in ultrapure water were mixed with 145 mL of activated sludge samples adjusted to 1 g L⁻¹ of VS in 250-mL flasks, leading to the initial concentrations of 0; 3.45; 5.53; 7.60; 10.36; and 13.81 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of C₁₁-LAS. Ten mL of each azoprotein solution were added, with 190 mL of 1.0 g L⁻¹ of VS activated sludge samples, to 250-mL glass flasks, leading to the initial concentrations of 0, 0.77, 1.54, 1.92, 3.08 and 3.85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azocasein; and 0.29, 0.58, 0.72, 1.16 and 1.45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for azoalbumin. The content of the flasks was homogenized by stirring at 300 rpm for 120 min at $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ to avoid the biodegradation of model molecules, after which the unadsorbed model molecules were separated from the mixture by centrifugation at 3,000g at 4°C for 10 min. The concentrations of unadsorbed model molecules ($\mu\text{mol L}^{-1}$) were measured, and then corrected by adsorption assays without the model molecules. The adsorbed amount ($\mu\text{mol g}^{-1}$ of VS) was calculated by subtracting the initial concentration of model molecules found before spiking by the unadsorbed model molecule concentrations of the assays.

The repeatability of the adsorption assays was determined for each sludge sample by spiking in triplicate with the model molecules at initial concentrations of 13.81, 3.85 and 1.45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for C₁₁-LAS, azocasein and azoalbumin respectively. The corresponding coefficient of variation was less than 2%, 10% and 26% respectively.

Desorption assays of model molecules (C₁₁-LAS, azoalbumin and azocasein) from activated sludge. The activated sludge was separated from the bulk water by centrifugation at 3,000g at 4°C for 10 min. The supernatant of the adsorption tests was removed from the flask by

pipetting, and then the same volume of either river water or diluted treated wastewater was added. The mixture was allowed to equilibrate for 60 min under stirring at 300 rpm at 4°C, then centrifuged at 3,000g at 4°C for 10 min. A 50-mL sample of the supernatant was immediately submitted to model molecule analysis as previously described.

6.3.2.3. Results and discussion

6.3.2.3.1. Adsorption of model molecules by activated sludge

Adsorption of model molecules (C_{11} -LAS, azocasein and azoalbumin) by activated sludge occurred rapidly, and a pseudo-equilibrium was obtained in 120 min at 4°C (Figure 6.9), in agreement with Matthijs and de Henau (23). Complementary assays realized with other initial concentrations of model molecules showed a similar tendency (data not presented in Figure 6.9). The model molecules spiked in treated wastewater were stable for more than 4 hours at 4°C in the bulk liquid surrounding the activated sludge flocs.

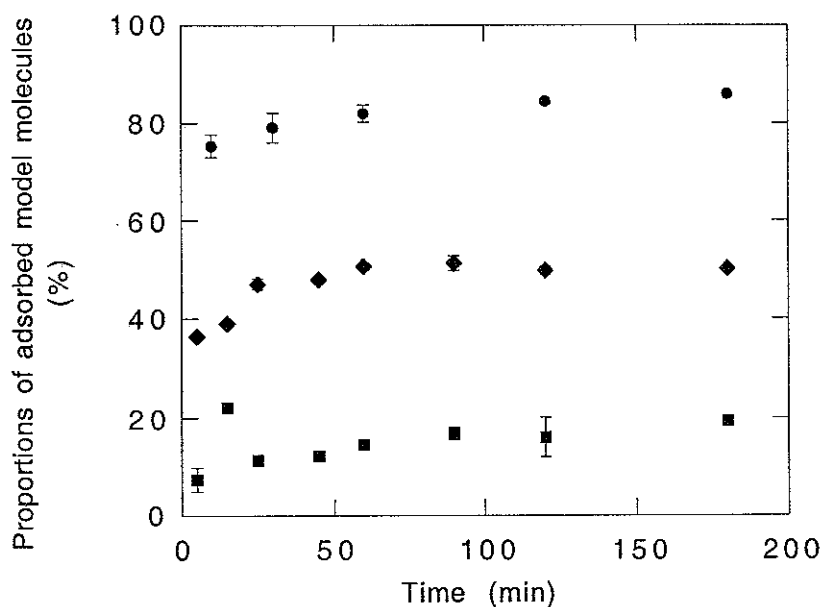


Figure 6.9 : Adsorption kinetic of model molecules by activated sludge (4 °C) mixed with 7.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of C_{11} -LAS (●), 3.85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of azocasein (◆) and 0.29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of azoalbumin (■) ($n = 1$ sludge for each model molecule, three measurements).

The average amount of model molecules adsorbed in the pseudo-equilibrium state by activated sludge (Q_e) was higher for C_{11} -LAS ($8.59 \pm 2.40 \mu\text{mol g}^{-1}$ of VS) than for azocasein ($1.60 \pm 0.40 \mu\text{mol g}^{-1}$ of VS) or azoalbumin ($0.29 \pm 0.08 \mu\text{mol g}^{-1}$ of VS), when the unadsorbed concentration of model molecules at pseudo-equilibrium is 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$

(Figure 6.10). The variability in the number of molecules adsorbed was lower for C_{11} -LAS than for azocasein or azoalbumin. The percentage of adsorbed azocasein was independent of the added concentration, while the percentage of adsorbed azoalbumin (from 58.2 to 15.5 %, $n = 3$ sludges) and C_{11} -LAS (from 96.0 to 60.3 %, $n = 4$ sludges) decreased with an increase in concentration.

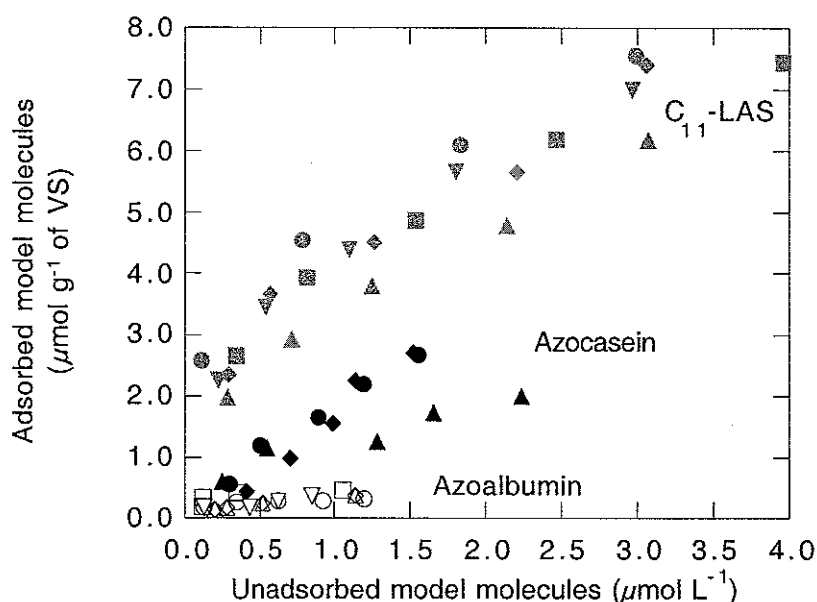


Figure 6.10 : Model molecule adsorption by activated sludge (4 °C, 120 min). C_{11} -LAS (sludges 1: ●, 2: ▲, 3: ◆, 4: ■ and 5: ▼), azocasein (sludges 6: ●, 7: ◆ and 8: ▲) and azoalbumin (sludges 9: ◇, 10: □, 11: ○ and 12: ▽).

The representation of the adsorbed amount (Q_{ad} in $\mu\text{mol L}^{-1}$) *versus* the unadsorbed concentration (C_{unad} in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of VS) of model molecules fitted well with the Freundlich equation (an empirical equation for heterogeneous surfaces): $\log Q_{ad} = \log K_{ads} + 1/n \log C_{unad}$ (Table 6.1). For each sludge, the correlation coefficient of the linear regression expressing the relation between C_{unad} and Q_{ad} was significant ($p < 0.05$), except in the case of two activated sludge samples (sludges 10 and 13) spiked with azoalbumin (Table 6.1). When used for other samples (sludges 2, 6, 7), the Freundlich model fitted quite well with the experimental data for C_{11} -LAS and albumin transfer from wastewater to activated sludge. The Freundlich parameter $1/n$ was equal to 0.42 ± 0.06 ($n = 5$ sludges) for C_{11} -LAS, 0.95 ± 0.47 ($n = 3$ sludges) for azocasein and 0.38 ± 0.15 ($n = 3$ sludges) for azoalbumin, indicating that the adsorption affinity dropped as the adsorption sites gradually filled. The parameter K_{ads} , which indicates the adsorption capacity of the model molecules adsorbed by

activated sludge, was equal to 8.6 ± 1.7 , 1.6 ± 0.3 and 0.3 ± 0.1 L g⁻¹ of adsorbant respectively for C₁₁-LAS, azocasein and azoalbumin.

Table 6.1 : Freundlich (1/n and K) parameters for the adsorption and desorption by activated sludge floc samples of model molecules (C₁₁-LAS, azocasein and azoalbumin).

Model molecules	Sludge samples	Adsorption			Desorption		
		1/n	K _{ads} (L g ⁻¹ VS)	Linearity coefficient (r ²)	1/n	K _{des} (L g ⁻¹ VS)	Linearity coefficient (r ²)
C₁₁-LAS	1	0.319	11.130	0.991 **	0.241	13.871	0.999 *
	2	0.426	7.982	0.998 *	0.289	10.082	0.976 *
	3	0.459	8.936	0.989 *	0.314	12.445	0.696 ***
	4	0.429	8.370	0.997 *	ND	ND	ND
	5	0.462	6.461	0.987 *	0.281	10.160	0.942 *
Azocasein	6	0.902	1.869	0.985 *	1.109	7.861	0.962 *
	7	1.440	1.615	0.957 *	0.951	6.941	0.696 *
	8	0.499	1.301	0.924 *	1.341	17.315	0.983 *
Azoalbumin	9	0.243	0.308	0.911 **	0.457	0.827	0.943 *
	10	0.262	0.286	0.480 ***	0.529	0.923	0.427 ***
	11	0.397	0.221	0.978 **	0.308	0.292	0.414 ***
	12	0.533	0.348	0.998 *	ND	ND	ND
	13	0.293	0.490	0.666 ***	ND	ND	ND

* : p<0.01; **: p<0.05; ***: p>0.05. Data corresponding to *** were not taken into

account in calculating the average values of K and 1/n. ND: Not Determined.

In our experiments, negative cooperative adsorption values for C₁₁-LAS of 1/n were indicated, and differed from those obtained by Garcia *et al.* (2002) which were close to 1.0. Moreover, the sorption density of C₁₁-LAS was far below the theoretical maximum density calculated by Garcia *et al.* (2002). For azocasein only, the values obtained for 1/n were in the order of 1, indicating an availability of sorption sites which was not dependent on solution concentration.

Our K_{ads} values obtained at 4°C were greater (by about threefold) than those obtained at 25°C by Garcia *et al.* (1983) for the C₁₁-LAS. The K_{ads} values were half those of azoalbumin and three times greater for azocasein than those obtained by Crombie-Quilty and McLoughlin (1983) for bovine serum albumin at 25°C. The difference in temperature in the two studies could affect the adsorption of protein by activated sludge, as previously shown for protein adsorption on polypropylene glycol-sepharose (Dias-Cabral *et al.*, 2003). Our experimental data could suggest that the molecular weight of model molecules (C₁₁-LAS M_w = 318.5; azocasein M_w = 26,000; azoalbumin M_w = 69,000) influenced their adsorption by activated sludge. This is in agreement with data reported by Carlson and Silverstein (1998), who showed that the molecular weight of polysaccharides influenced macromolecule adsorption

by biofilms, and with Garcia *et al.* (2002) who showed a higher adsorbed amount of LAS with long alkyl chains. It can then be assumed that the accessibility of high molecular weight compounds at some adsorption sites is limited by diffusion (Tanaka *et al.*, 1984; Carlson and Silverstein, 1998; Cadoret *et al.*, 2002). However, other parameters could affect molecule adsorption by activated sludge, such as the charge of the molecules (Carlson and Silverstein, 1998), their hydrophobic properties (Struijs *et al.*, 1991) and, certainly, their spatial conformation.

In our assays, no correlation was obtained between model molecule adsorption by activated sludge and wastewater characteristics (pH, conductivity, TAC and DOC). However, molecule adsorption by activated sludge may also be controlled by environmental parameters, such as pH (Westall *et al.*, 1999) and the Ca^{2+} concentration that influences the critical micellar concentration of LAS (Westall *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2002). For instance, Garcia *et al.* (2002) showed that an increase in Ca^{2+} concentration from 30 to 1,000 mg L^{-1} changed $1/n$ from 0.93 to 1.34 and doubled K_{ads} for C_{11} -LAS.

The critical micellar concentration (cmc) of C_{11} -LAS, a measure of the hydrophobicity of the detergent, was related to the adsorption data. No linear fits were achieved when the unadsorbed concentrations (C_e) were normalized by the cmc of C_{11} -LAS given by Garcia *et al.* (2002) in deionized water ($\text{cmc} = 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) and in hard water ($\text{cmc} = 2.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) (Figure 6.11), whatever the water hardness, meaning the presence of several adsorption sites of different energies. Sludge 1 showed more energetic adsorption sites than the other sludge samples, as expected from its high K_{ads} value (Table 6.1). In all cases, our sludges had more energetic sites, which $\ln(C_{\text{unadsorbed}}/\text{cmc}) \approx -4$ for $\text{cmc} = 2.9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figure 6.11) than those of Garcia *et al.* (2002), which $\ln(C_{\text{unadsorbed}}/\text{cmc})$ were in the order of -2.

In the range of low concentrations tested (3 to 14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of C_{11} -LAS), we can assume by analogy with Cases and Villieras (Cases and Villieras, 1992) that C_{11} -LAS binding on heterogeneous flocs could correspond to the formation of patches with a single layer, as suggested for the adsorption of alkylammonium chlorides of different chain lengths on hydrophilic solids.

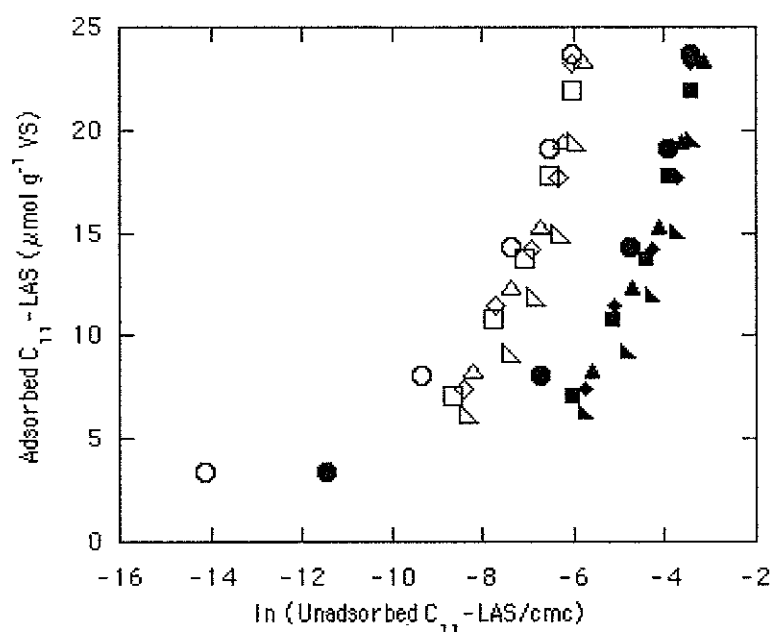


Figure 6.10 : Adsorbed amount of C_{11} -LAS versus unadsorbed concentration normalised by cmc at 4 °C and 300 rpm (Symbols : Open symbols: cmc of C_{11} -LAS in deionised water; Closed symbols: cmc of C_{11} -LAS in hard water (300 mg L⁻¹ of CaCO₃); sludges 1: ●, 2: ▲, 3: ◆, 4: ■ and 5: ▴).

6.3.2.3.2. Model molecule desorption from activated sludge in river water or diluted wastewater

The model molecule desorption step was tested by washing the sludges with river water for 60 min at 4°C. The percentage of desorbed molecules was between 1.9 and 34.5 (adsorbed C_{11} -LAS), 10.4 and 28.0 % and 10.0 and 16.0 % of, azoalbumin and azocasein, respectively. Some of the desorption data fitted well with Freundlich equation (Figure 6.12). The average $1/n$ desorption values were 0.27 ± 0.03 , 1.13 ± 0.20 ($n = 3$ sludges) and 0.46 ($n = 1$ sludge) respectively for C_{11} -LAS, azocasein and azoalbumin (Table 6.1). The average K_{des} values were 11.4 ± 2.2 ($n = 3$ sludges), 10.7 ± 5.7 and 0.8 L g⁻¹ respectively for C_{11} -LAS, azocasein and azoalbumin (Table 6.1).

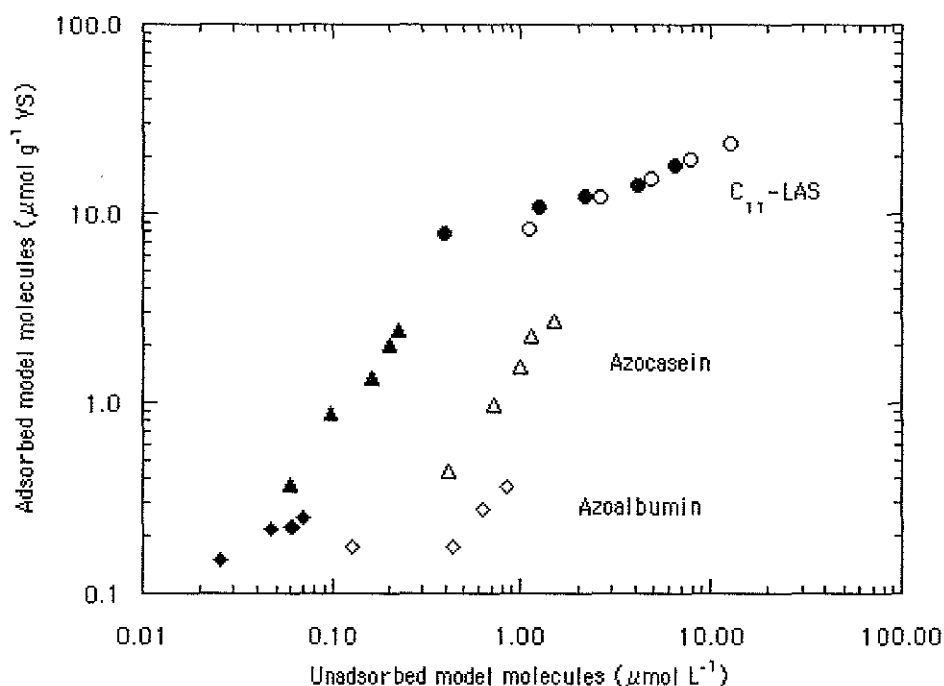


Figure 6.12 : Adsorption (open symbols) and desorption (closed symbols) of C_{11} -LAS (sludge 1), azocasein (sludge 8) and azoalbumin (sludge 9) from activated sludge in river water. Only one example of desorption from sludge for each model molecule was presented ($k_{20^{\circ}\text{C}}$ of river water was $323 \pm 7 \mu\text{S cm}^{-1}$ for the three assays).

C_{11} -LAS desorption suggested a reversible exchange from activated sludge dispersed in river water. The reversibility of LAS desorption was also reported for sludges (Temmink and Klapwijk, 2004) and river sediments (Hand and Williams, 1987). Since the desorption value K_{des} is not very different from the adsorption value K_{ads} , a substantial fraction of the C_{11} -LAS was desorbed, even in the one-step desorption experiments. Additional desorption could be expected in multi-step experiments (Matthijs and de Henau, 1985) or at any downstream point along the river. C_{11} -LAS desorption was only slightly affected by wastewater dilution with deionized water as shown by two independent assays carried out for a conductivity varying from 214 to 720 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and a pH varying from 7.55 to 7.72 (Figure 6.13).

The K_{des} values for azocasein and azoalbumin desorption differed greatly from the K_{ads} value for azocasein and azoalbumin adsorption, which suggests a low level of exchange reversibility from sludges to river water. This adsorption-desorption hysteresis could result from irreversible binding to specific sorption sites or slow rates of desorption. Desorption of proteins was only slightly affected by wastewater dilution, and consequently by the conductivity and the pH values, which varied from 222 to 838 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and from 7.47 to 7.90 for the 3 independent assays respectively (Figure 6.14).

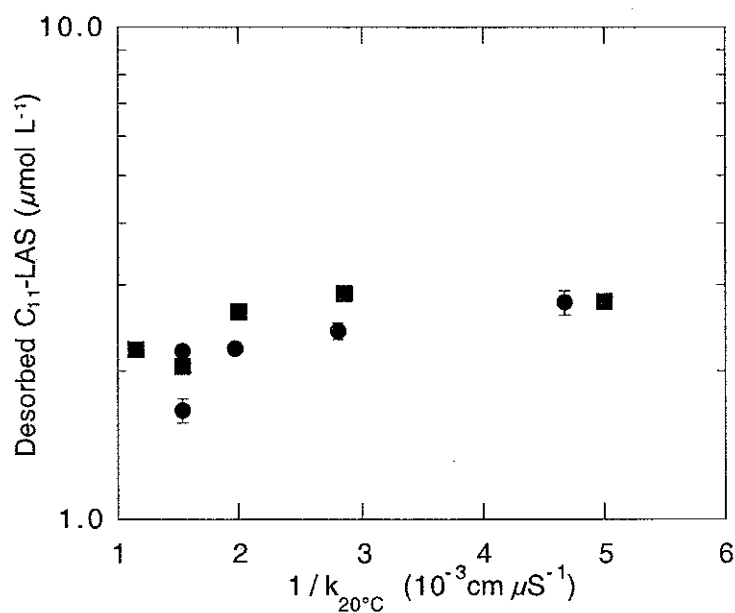


Figure 6.13 : $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ desorption from sludges containing $\text{C}_{11}\text{-LAS} = 17.71 \pm 0.13 \mu\text{mol g}^{-1}$ VS (sludges 14: ● and 15: ■) at 4°C and for 60 min in wastewater diluted with deionised water at 4°C .

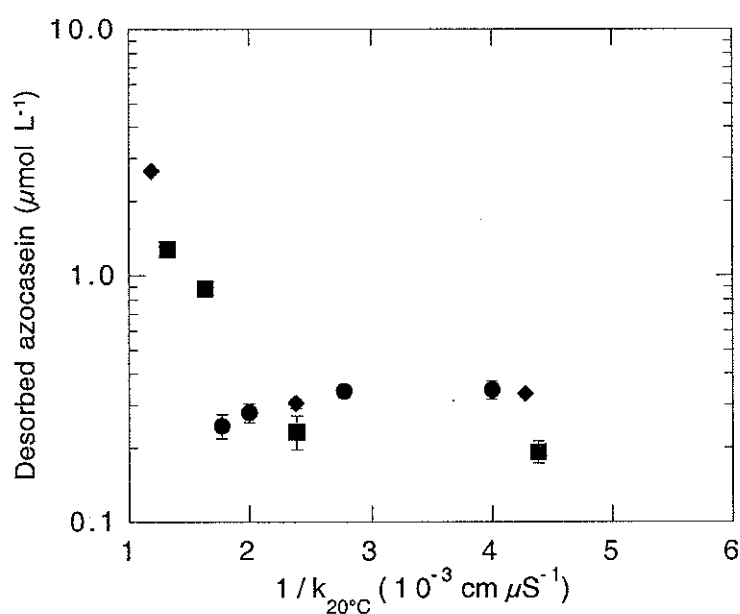


Figure 6.14 : Azocasein desorption from sludges (sludges 16: ◆, 17: ● and 18: ■), containing azocasein = $2.46 \pm 0.40 \mu\text{mol g}^{-1}$ VS of azocasein in wastewater diluted with deionised water at 4°C .

Low ionic strength, which is known to contribute to the release of ions and macromolecules from flocs and the swelling/dispersion of the flocs (Keiding and Nielsen, 1997; Guellil *et al.*, 2001, has little effect on the exchange of C₁₁-LAS and proteins from flocs. It turns out that the release of such molecules, and the exchange of organic matter between flocs and water in general, could be controlled mainly by the concentration of molecules and its changes due to chemical or biological transformation, and not by the macroscopic 3D-organization of the flocs or the ionic strength of the medium.

Acknowledgments

This work was carried out under the framework of the "Contrat de Plan État-Région Lorraine" (CPER) and the "Zone Atelier du Bassin de la Moselle" (ZAM), and was funded by the "Fédération de Recherche Eau-Sol-Terre" (Nancy, France) and the "Ministère de l'Éducation Nationale" (Paris, France). Our thanks are extended to Bruno Lartiges and Laurent Michot (Laboratoire Environnement et Minéralurgie, UMR 7569 CNRS-INPL, Nancy, France) and Jean-Jacques Ehrhardt (LCPME, UMR 7564 CNRS-Université Henri Poincaré, Nancy, France) who helped to improve the manuscript.

6.3.2.4. Abstract

Activated sludge flocs are characterized by a very heterogeneous matrix containing many different "adsorption sites". As a result, the model molecules tested (C₁₁-LAS, azoalbumin and azocasein) were rapidly adsorbed by and desorbed from activated sludge at 4°C. The molecules were adsorbed by the activated sludge in accordance with the Freundlich equation, and it was found that the amount of C₁₁-LAS adsorbed was higher than that of azocasein or azoalbumin, according to their respective K_{ads} values.

C₁₁-LAS adsorption from activated sludge appeared to be highly reversible in river water, while a marked hysteresis phenomenon was observed for azocasein and azoalbumin, meaning the exchange between activated sludge and river water has a low degree of reversibility. In the case of reversible adsorption with C₁₁-LAS, activated sludge could serve as an intermediate compartment for C₁₁-LAS accumulation, while the activated sludge itself could become a sink for the accumulation of proteins. Moreover, the desorption of C₁₁-LAS from activated sludge was not significantly affected by the dilution of wastewater with deionized water.

7. CONCLUSION GENERALE

Les associations entre la matière organique dite naturelle et les polluants organiques ont été largement étudiées dans les milieux hydriques car ces associations "matière organique-polluants" imposent aux polluants organiques un nouveau statut, une réactivité physico-chimique et une mobilité particulière dans l'environnement. Ces associations ont été décrites pour des ligands moléculaires de type substances humiques et des particules minérales, mais beaucoup plus rarement avec des agrégats organo-minéraux de type sédiments de rivière ou agrégats en suspension dans l'eau. Aussi, il est d'un intérêt majeur d'améliorer la compréhension du piégeage des polluants organiques par des assemblages biologiques supra-colloïdaux ou particulaires car ces assemblages sont présents dans la plupart des milieux hydriques et présentent une capacité d'adsorption importante vis-à-vis des polluants organiques.

De nombreux paramètres environnementaux (la température, la force ionique, le pH, la concentration en oxygène, la lumière et les nutriments) contribuent à l'évolution des agrégats au cours de leur transport (Figure 7.1), renforcée par la dynamique d'agrégation et de dispersion des agrégats qui permet des réarrangements avec les agrégats autochtones. L'activité bactérienne endogène est également affectée par les paramètres environnementaux et par voie de conséquence modifie la structure et la composition des agrégats.

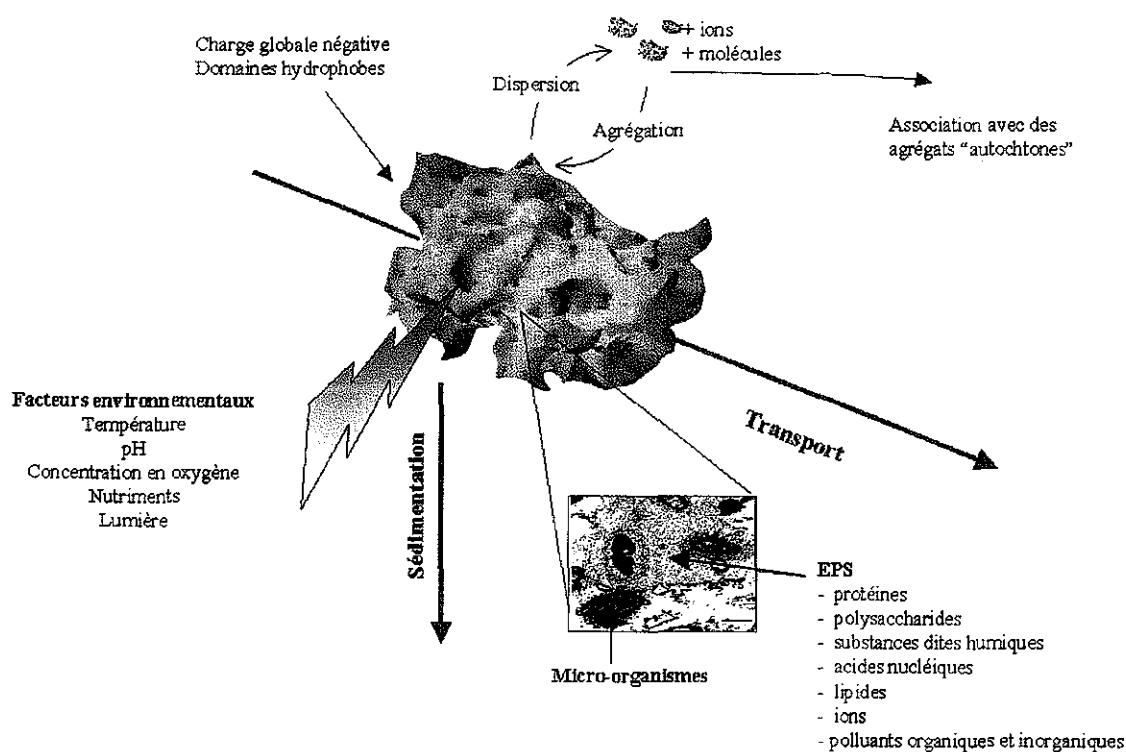


Figure 7.1 : Facteurs environnementaux subis par les agrégats au cours de leur transport en milieu hydrique.

1. AGREGATS BIOLOGIQUES = SYSTEMES HETEROGENES COMPARTIMENTES

Les agrégats dits biologiques (constitués en moyenne de 60 % de matière organique et de 40 % de matière minérale) peuvent accumuler des polluants organiques à 3 niveaux : le domaine intracellulaire, les enveloppes et le domaine extracellulaire (Figure 7.2).

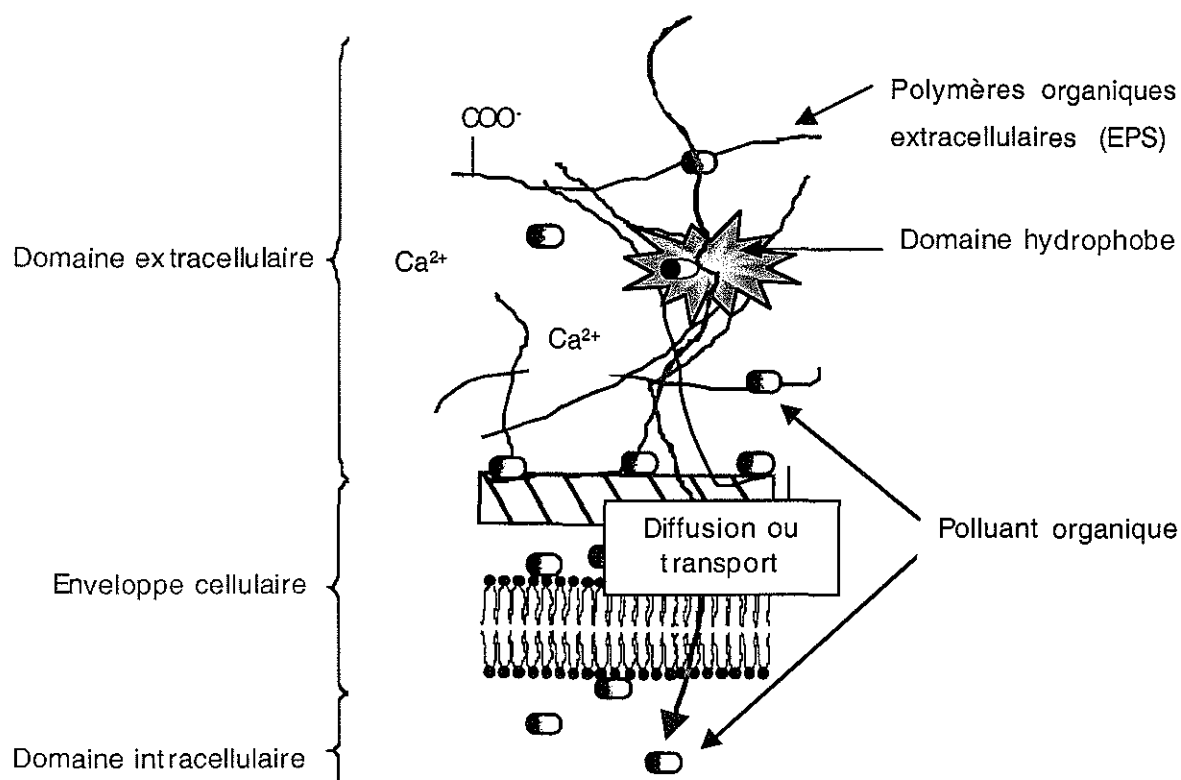


Figure 7.2 : Représentation schématique des différents niveaux d'adsorption et d'accumulation des polluants organiques dans un agrégat biologique (adaptée de Chróst, 1991).

- Le domaine intracellulaire constitue un espace par ses propriétés et sa composition qui peut *a priori* participer à l'accumulation des polluants. Ceci a surtout été étudié pour les métaux dont plusieurs mécanismes de transport et d'accumulation ont été mis en évidence. Par contre, l'accumulation intracellulaire de polluants organiques, à notre connaissance, n'a pas été vérifiée.

- Les enveloppes cellulaires par leur composition riche en molécules amphiphiles comme les phospholipides sont des sites préférentiels pour l'adsorption et l'accumulation de polluants organiques hydrophobes ou amphiphiles. Il est surprenant qu'il existe aussi peu de données bibliographiques concernant l'adsorption et l'accumulation des polluants organiques par les enveloppes des micro-organismes au sein des agrégats biologiques. Ce phénomène

d'adsorption est pourtant plausible et à ce titre Canton *et al.* (1977) ont montré que les enveloppes cellulaires d'algues participent en partie à l'adsorption de lindane.

- Le domaine extracellulaire, enfin, est un domaine très intéressant à étudier car

- (a) il est le premier concerné dans l'accumulation des polluants amphiphiles ou hydrophobes par les agrégats biologiques car seules les molécules organiques de masse moléculaire inférieure à 600 peuvent traverser librement les membranes cellulaires (Egli, 1995),
- (b) il est capable d'accumuler des polluants organiques hydrophobes (Späth *et al.*, 1998; Wolfaard *et al.*, 1998),
- (c) il limite la diffusion des macromolécules organiques jusqu'à leur site d'adsorption (Cadoret *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1984),
- (d) des domaines hydrophobes seraient présents au sein de ce domaine extracellulaire comme le montre le piégeage de bactéries hydrophobes (Olofsson *et al.*, 1998) et de polluants apolaires (Späth *et al.*, 1998).

Le domaine extracellulaire est composé d'une grande diversité de molécules, principalement des protéines dont une partie possède des activités hydrolytiques, des substances dites humiques, des polysaccharides, des acides nucléiques, des acides aminés et des lipides (Nielsen et Jahn, 1999) : les protéines sont les composés majoritaires dans les EPS ($60 \pm 22 \text{ mg g}^{-1}$ de MV) avant les substances dites humiques ($16 \pm 22 \text{ mg g}^{-1}$ de MV), les polysaccharides ($22 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}$ de MV) et les acides nucléiques ($15 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}$ de MV).

Pour des agrégats biologiques prélevés sur une station d'épuration pendant une période de 3 ans, la composition du domaine extracellulaire varie peu (Figure 7.3). En effet, la majorité des résultats pour chacun des EPS est faiblement dispersée (Les boîtes figurées sur la Figure 7.3 regroupent 50 % des valeurs pour chacun des exopolymères). Toutefois, la plus forte variabilité temporelle observée pour les protéines peut être due à l'adsorption par les agrégats de protéines souvent mesurées en grande quantité dans les eaux usées.

2. EXPLORATION DU DOMAINE EXTRACELLULAIRE PAR L'ANALYSE DES ACIDES GRAS

Le domaine extracellulaire est composé de 1,8 % (en masse) d'acides gras. Leur faible proportion ne signifie, en aucun cas, qu'ils ne sont pas impliqués dans la formation des domaines hydrophobes et dans l'accumulation des composés organiques. En effet, ces molécules sont capables de stabiliser des émulsions octane/eau par leurs propriétés amphiphiles. Nous avons montré que le domaine extracellulaire était composé d'au moins 85 acides gras différents répartis dans les phospholipides, les glycolipides, les lipides neutres et les lipopolysaccharides. Notre étude constitue une base de données nouvelle relative aux agrégats biologiques de boues activées dont la composition lipidique des EPS n'était pas décrite à ce jour.

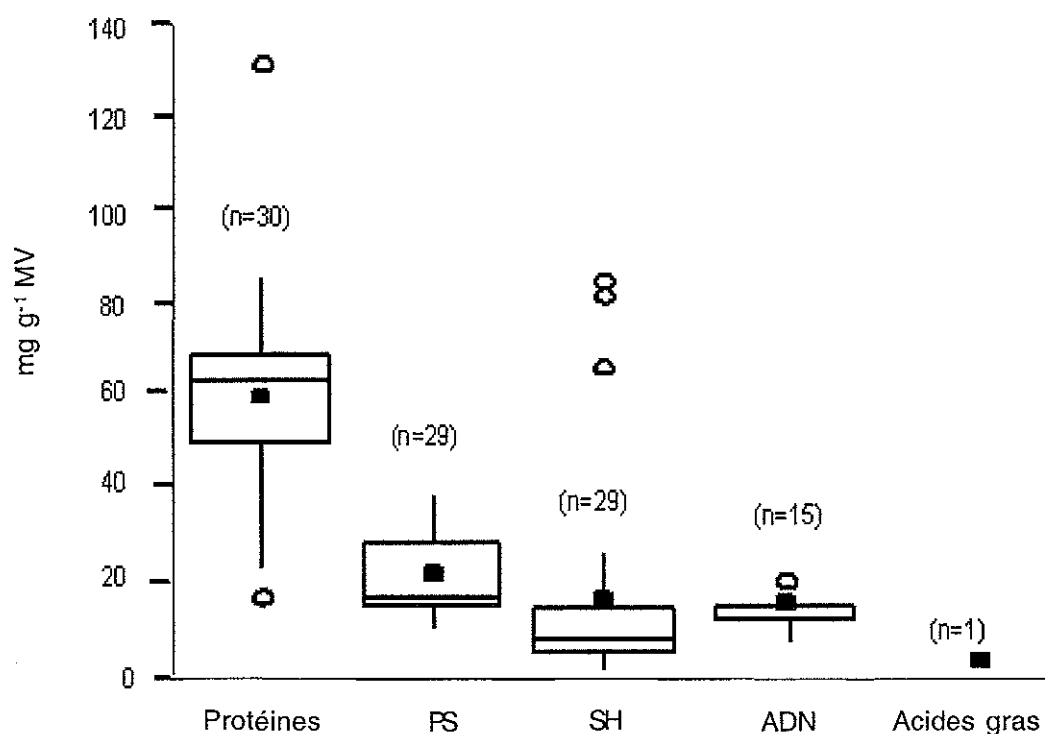


Figure 7.3 : Variabilité de la composition chimique des extraits de polymères extracellulaires issus des floccs de boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville sur une période 3 ans (Cadoret *et al.*, en préparation) : valeurs moyennes (■) de la composition en protéines exprimée en mg équivalent albumine bovine g⁻¹ MV, en substances humiques (SH) exprimée en mg équivalent acide humique g⁻¹ MV, en polysaccharides (PS) exprimée en mg équivalent glucose g⁻¹ MV, en ADN exprimée en mg équivalent ADN de thymus de veau g⁻¹ MV. Chaque boîte contient 50 % des données avec la valeur médiane matérialisée par une ligne horizontale. La barre verticale représente l'intervalle entre la valeur maximale et minimale de la distribution. Les points considérés comme hors de la distribution des valeurs (O) ont une valeur supérieure à la valeur correspondant au quartile supérieur + 1,5 x la distance interquartile (DIQ) ou une valeur inférieure à la valeur correspondant au quartile inférieur - 1,5 x la distance interquartile (DIQ).

L'origine des acides gras des agrégats est difficile à attribuer car ils peuvent provenir de l'excrétion microbienne, de la lyse microbienne mais aussi de l'adsorption par des agrégats de lipides des milieux hydriques. Néanmoins, certains acides gras devraient permettre de caractériser le domaine extracellulaire. En effet, certains acides gras sont majoritairement trouvés dans le monde végétal comme les acides gras à longues chaînes (Wood, 1988) et d'autres dans le monde bactérien comme certains acides gras ramifiés aux positions iso- et antéiso- (O'Leary et Wilkinson, 1988). D'autres acides gras sont trouvés dans l'ensemble du monde vivant comme les acides gras 16:0 et 18:0.

L'analyse des acides gras des phospholipides a permis de séparer des agrégats d'origine différente (boues activées, sédiments et matières en suspension de rivière) (Figure 7.4) et certains de ces acides gras devraient malgré l'effet de la dilution de montrer la présence d'agrégats biologiques de boues activées dans les milieux hydriques comme des

agrégats biologiques des stations d'épuration parmi les agrégats de rivière. A cet effet, l'acide tuberculostéarique (TBSA) pourrait être utilisé comme marqueur des agrégats biologiques de station d'épuration car cet acide gras présent, dans les boues activées et dans les matières en suspension prélevées en aval du rejet de la station d'épuration, est absent des matières en suspension et des sédiments prélevés en amont du rejet de la station d'épuration. Un travail complémentaire est nécessaire afin d'identifier les acides gras, parmi l'ensemble des acides gras analysés, ceux qui auraient le pouvoir le plus discriminant lors de l'analyse par ACP.

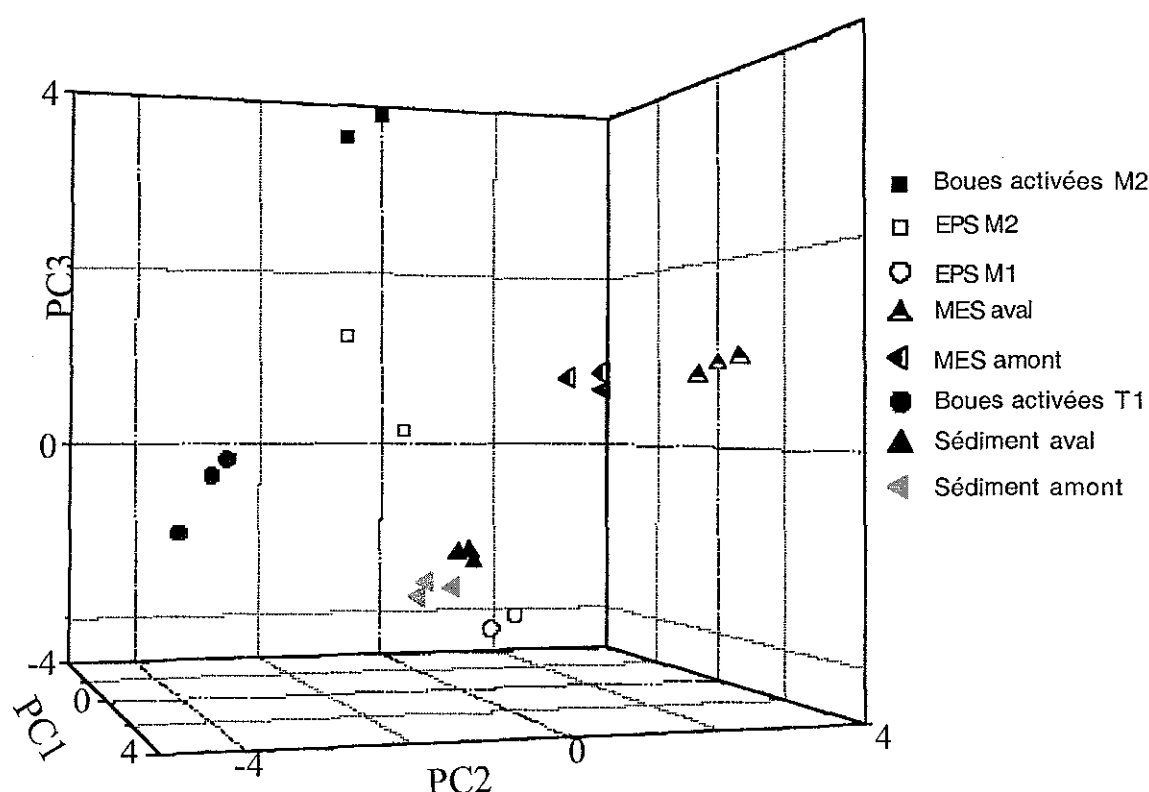


Figure 7.4 : Représentation des valeurs des scores des différents échantillons (Exopolymères (M_1 et M_2), boues activées (M_2 et T_1), sédiments et matières en suspension de rivière) obtenues par une analyse en composantes principales à partir de la composition des acides gras des phospholipides selon les trois premières composantes principales (PC1 : 39,2 % ; PC2 : 24,4 % et PC3 : 16,4 %).

3. AGREGATS BIOLOGIQUES = RESERVOIR DE POLLUANTS ?

Les agrégats biologiques de type boues activées sont capables d'adsorber une grande diversité de molécules organiques : azoprotéines/protéines, acides gras, polysaccharides, pyrène et sulfonates d'alkylbenzène. Cette qualité d'adsorption repose aussi bien sur les propriétés physico-chimiques des agrégats (charge globale négative, domaines hydrophobes, densité, taille des pores, constituants ...) que sur les caractéristiques physico-chimiques des

composés adsorbés (masse moléculaire, charge, hydrophobicité) (Figure 7.5). Aussi, nous avons montré que les trois molécules modèles (azalbumine, azocaséine et C₁₁-LAS) étaient adsorbées par les agrégats biologiques en quantités différentes. Certes de nombreux travaux concernent l'adsorption de composés hydrophobes ou amphiphiles par les agrégats biologiques de boues activées, mais l'hétérogénéité, la complexité et la variabilité des propriétés et de la composition de ces systèmes agrégés sont telles que l'étude de l'adsorption reste incontournable. Le caractère hydrophobe des agrégats biologiques varie pour des agrégats prélevés dans des stations d'épuration différentes (Guellil *et al.*, 1998; Sponza 2002a, 2002b) et pour une même station comme nous l'avons montré. La composition différente des eaux usées peut être à l'origine des caractéristiques physico-chimiques différentes des agrégats biologiques, mais également à la réponse des micro-organismes face aux conditions environnementales comme l'oxygène, même si nos résultats ne le prouvent pas malgré quelques signes encourageants : la part des EPS fortement hydrophobes (*i.e.* ceux retenus par une résine hydrophobe) augmente et la proportion de phospholipides augmentent pour les agrégats biologiques soumis aux discontinuités en oxygène. Ceci renforce les résultats de Palmgren *et al.* (1998) qui ont montré que la surface de cellules bactériennes est plus hydrophobe en présence de fortes concentrations en oxygène dans le milieu de culture.

Le transfert de polluant organique de l'agrégat vers la phase eau peut être partiellement ou fortement réversible (hystérésis plus ou moins marquée) comme le montre nos résultats avec les azoprotéines et le sulfonate d'alkylbenzène. Les hystérésis observées peuvent être dues (a) à une liaison irréversible à des sites d'adsorption de forte affinité, (b) à une diffusion limitée des composés de masse moléculaire importante dans la matrice d'exopolymères, (c) à la biodégradation des polluants, (d) à une désorption trop lente pour être observée dans le temps de l'étude et (e) à des artefacts expérimentaux comme une mauvaise séparation des polluants organiques adsorbés de ceux non adsorbés. Il devient ainsi important d'estimer la désorption des polluants organiques par les agrégats biologiques car leur capacité d'adsorption et de désorption sont très différentes en fonction des caractéristiques des polluants organiques. Cette capacité d'échange des polluants organiques entre les agrégats et la phase eau peut constituer un risque variable pour l'environnement.

Dans des systèmes aussi complexes que les agrégats biologiques qui comprennent une grande diversité de sites d'adsorption, de domaines et de compartiments différents, les ajustements à des modèles de type Freundlich ou Langmuir permettent de décrire simplement le système adsorbant-adsorbat et de comparer l'adsorption et la désorption entre les différentes études, mais ne permettent pas d'expliquer les interactions intervenant dans les phénomènes d'adsorption et de désorption.

Des échanges de matière organique et de polluants amphiphiles ou hydrophobes entre les agrégats et l'eau usée ont été mis en évidence (Matthijs et de Henau, 1985; Guellil *et al.*, 2001). Cependant, les études de désorption restent relativement rares. Ces échanges peuvent être influencés par la variation des conditions physico-chimiques du milieu hydrique comme la force ionique. La diminution de la force ionique du milieu entraîne un gonflement (Guellil, 1999), la dispersion des agrégats et la libération des macromolécules et d'ions dans la phase eau (Keiding et Nielsen 1999).

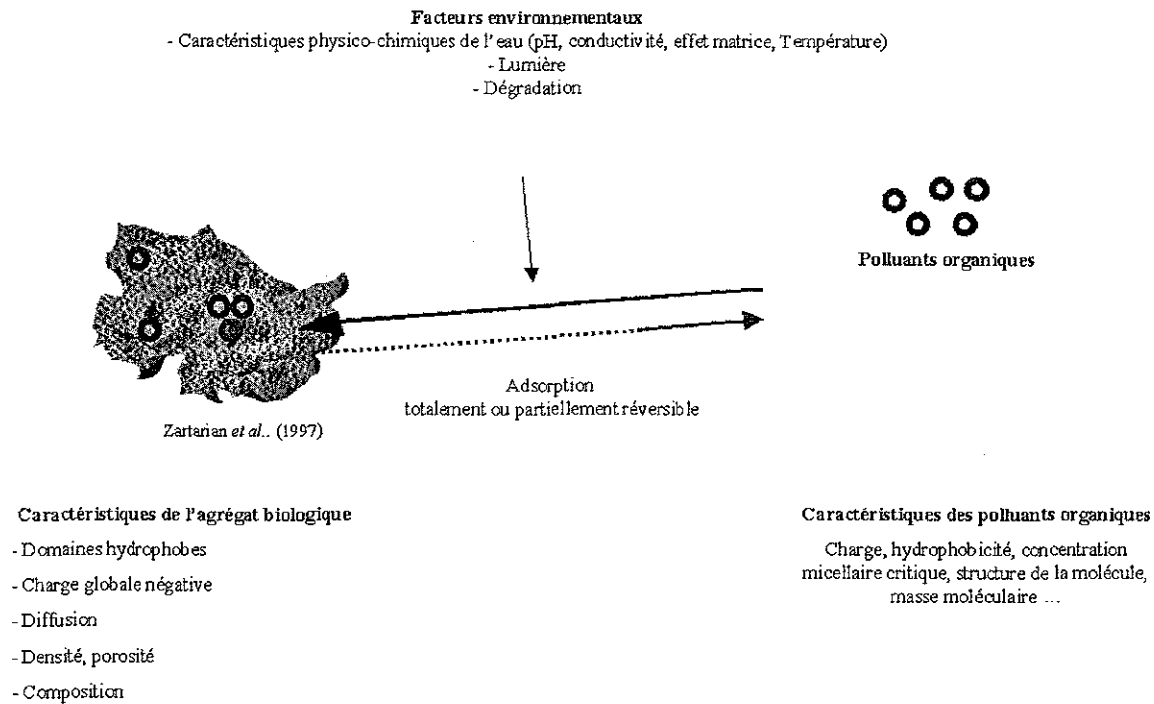


Figure 7.5 : Facteurs affectant la réversibilité de l'adsorption de polluant organique par des agrégats biologiques de boues activées.

En conclusion, les agrégats biologiques de boues activées sont d'excellents adsorbants qui peuvent être considérés comme des vecteurs pour les molécules organiques du fait de leur structure, de leur composition et de leurs propriétés physico-chimiques. Les agrégats biologiques accumulent des polluants organiques et ces associations molécules organiques-agrégats peuvent être transportées sur de longues distances dans le milieu hydrique. Au cours de leur transport, des échanges continuels avec le milieu hydrique se produisent contribuant à la dispersion et à la contamination d'autres systèmes agrégés comme les sédiments.

En perspectives immédiates, quatre actions principales peuvent être choisies en complément direct avec notre étude :

(i) la caractérisation des molécules organiques modèles (azoalbumine, azocaséine et sulfonate d'alkylbenzène) car leur adsorption/désorption par les agrégats biologiques est différente. Il serait également intéressant d'étudier la désorption des différents isomères et homologues des sulfonates d'alkylbenzène par des agrégats biologiques dans l'eau de rivière qui n'a pas été décrite à ce jour. De plus, les détergents commerciaux contiennent un mélange de sulfonates d'alkylbenzène comportant une chaîne aliphatique linéaire avec 10 à 14 atomes de carbone; ce mélange doit affecter l'adsorption de chacun des isomères et homologues de LAS par les agrégats biologiques, car chacun d'entre eux est adsorbé dans des proportions différentes par les agrégats biologiques de boues activées.

(ii) l'étude de l'adsorption de polluants amphiphiles cationiques dont l'utilisation est actuellement en pleine expansion et qui possèdent une activité biocide importante par la présence d'une fonction ammonium quaternaire dans leur structure. Ceci peut affecter leur distribution et leur persistance dans l'environnement.

(iii) l'étude du temps de vie des composés organiques piégés au sein des exopolymères; le temps de vie des polluants organiques est influencé par la présence d'une grande diversité d'enzymes extracellulaires présente au sein des agrégats biologiques, ainsi que par la dilution des agrégats biologiques dans le milieu hydrique.

(iv) la modélisation en rivière de la distribution des polluants dans les différents compartiments comme les agrégats biologiques, la phase eau, les sédiments et les matières en suspension de rivière.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

8. Références bibliographiques

1. **Aksu Z.** (2001), Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modelling, *Biochem. Eng. J.* 7, 79-84.
2. **Albrechtsen H.J., G. Heron and T.H. Christensen** (1995), Limiting factors for microbial Fe(III)-reduction in a landfill leachate polluted aquifer (Vejen, Denmark), *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 233-248.
3. **Alzaga R., A. Peña, L. Ortiz and J.M. Bayona** (2003), Determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 999, 51-60.
4. **Amann R., H. Lemmer and M. Wagner** (1998), Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques, *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 205-215.
5. **Aono R. and H. Kobayashi** (1997), Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3637-3642.
6. **Arican B. and U. Yetis** (2003), Nickel sorption by acclimatized activated sludge culture, *Water Res.* 37, 3508-3516.
7. **Arino S., R. Marchal and J.P. Vandecasteele** (1998), Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community, *J. Appl. Microbiol.* 84, 769-776.
8. **Artola A., M. Martin, M. Balaguer and M. Rigola** (2000), Isotherm model analysis for the adsorption of Cd (II), Cu (II), Ni (II), and Zn (II) on anaerobically digested sludge, *J. Col. Int. Sci.* 232, 64-70.
9. **Azeredo J., R. Oliveira and V. Lazarova** (1998), A new method for extraction of exopolymers from activated sludges, *Water Sci. Technol.* 37, 659-662.
10. **Azeredo J., J. Visser and R. Oliveira** (1999), Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories, *Colloid Surface B.* 14, 141-148.
11. **Bai Q., A. Gattinger and L. Zelles** (2000), Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis, *Microbial. Ecol.* 39, 273-281.
12. **Balagué C., N. Stürtz, R. Duffard and A.M. Evangelista de Duffard** (2001), Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition, and cellular envelope, *Environ. Toxicol.* 16, 43-53.
13. **Baldi F., N. Ivosevic, A. Minacci, M. Pepi, R. Fani, V. Svetlicic and V. Zutic** (1999), Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to diesel fuel droplets studied with *in situ* electrochemical and molecular probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 2041-2048.
14. **Baléo J.N., B. Bourges, P. Courcoux, C. Faur-Brasquet et P. Le Cloirec** (2003), L'analyse en composantes principales (ACP), In *Méthodologie expérimentale: Méthodes et outils pour les expérimentations scientifiques* (Baléo J.N., B. Bourges, P. Courcoux, C. Faur-Brasquet et P. Le Cloirec, Eds.), Tec et Doc, Paris, 94-128.
15. **Barshick S.A., D. A. Wolf and A.A. Vass** (1999), Differentiation of microorganisms based on pyrolysis-ion trap mass spectrometry using chemical ionization, *Anal. Chem.* 71, 633-641.
16. **Basile F., K.J. Voorhees and T.L. Hadfield** (1995), Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acids methyl ester extracts, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1534-1539.
17. **Batten K.M. and K.M. Scow** (2003), Sediment microbial community composition and methylmercury pollution at four mercury mine-impacted-sites, *Microbial. Ecol.* 46, 429-441.
18. **Bayer A.S., F. Eftekhari, C.C. Nast and D.P. Speert** (1990), Oxygen-dependent up-regulation of mucoid exopolysaccharide (alginate) production in *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.* 58, 1344-1349.
19. **Beveridge T.J., Rao S.S., Daniels S.A. and Taylor C.M.** (1993), Suspended particle research: current approaches and future needs. In *Particulate matter and aquatic contaminants* (Rao, S.S., Ed.), Lewis publisher, Canada, 197-205.
20. **Blackburn J. W., W.L. Troxler and G.S. Sayler** (1984), Prediction of the fates of organic chemicals in a biological treatment process - an overview, *Environ. Prog.* 3, 163-175.
21. **Blank G., A. A. Adejumo and J. Zawitowski** (1991), Eugenol induced changes in the fatty acid content of two *Lactobacillus* species, *Lebensm. Wiss. Technol.* 24, 231-235.
22. **Bleich U. und A. Nehr Korn** (1989), Elektronenmikroskopische Darstellung extracellulärer polymere Substanzen in Belebtschlammflocken, *Zbl. Hyg.* 188, 66-83.

23. **Bligh E.G. and W.J. Dyer** (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
24. **Boczar B.A., W.M. Begley and R.J. Larson** (1992), Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases, *Wat. Environ. Res.* 64, 792-797.
25. **Boczar B.A., L. J. Forney, W.M. Begley, R.J. Larson and T.W. Federle** (2001), Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge, *Water Res.* 35, 4208-4216.
26. **Bonin P., M. Gilewicz and J.C. Bertrand** (1989), Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*, *Can. J. Microbiol.* 35, 1061-1064.
27. **Boon J.J., J.W. de Leeuw, G.J.V.D. Hoek and J.H. Vosjan** (1977), Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched β -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*, *J. Bacteriol.* 129, 1183-1191.
28. **Boudenne J.L., B. Coulomb, L. Djellel and F. Théraulaz** (2001), Determination of LAS in wastewater treatment plants: comparative study between conventional biodegradation testing and an alternative photo-oxidation method, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 81, 55-72.
29. **Boulton C.A.** (1988), Extracellular microbial lipids, In *Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 669-694.
30. **Bowman J. P., L.I. Sly, P. D. Nichols and A.C. Hayward** (1993), Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylsinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs, *Int. J. Syst. Bact.* 43, 735-753.
31. **Boyette S.M., J.M. Lovett, W.G. Gaboda and J.A. Soares** (2001), Cell surface and exopolymer characterization of laboratory stabilized activated sludge from a beverage bottling plant, *Wat. Sci. Technol.* 43, 175-184.
32. **Bradford M.M.** (1976), A rapid method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
33. **Brennan P.J.** (1988), Mycobacterium and other actinomycetes, In *Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 203-298.
34. **Brinch-Iversen J. and G.M. King** (1990), Effects of substrate concentration, growth state, and oxygen availability on relationships among bacterial carbon, nitrogen and phospholipid phosphorus content, *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 345-356.
35. **Brontz I., K. Høiland and D. Ekelberg** (2004), Multivariate analysis of fatty acids in spores of higher basidiomycetes: a new method for chemotaxonomical classification of fungi, *J. Chromatogr. B.* 800, 303-307.
36. **Brown M. J. and J.N. Lester** (1980), Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods, *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 179-185.
37. **Bruus J.H., P.H. Nielsen and K. Keiding** (1992), On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering, *Water Res.* 26, 1597-1604.
38. **Bura R., M. Cheung, B. Liao, J. Finlayson, B.C. Lee, I.G. Droppo, G.G. Leppard and S.N. Liss** (1998), Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix, *Water Sci. Technol.* 37, 4-5, 325-333.
39. **Bura R.** (2000), Properties and occurrence of lipids in EPS of activated sludge, Université de Toronto, Canada, Thèse, 150 pages.
40. **Burns R.G.** (1989), Microbial and enzymatic activities in soil biofilms, In *Structure and function of biofilms*, (Characklis, W.G. and Wilderer, P.A., Eds.), J. Wiley, Chichester, 333-349.
41. **Busscher H.J., B. van de Belt-Gritter and H.C. van der Mei** (1995), Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets, *Colloid Surface B.* 5, 111-116.
42. **Cadoret A., A. Conrad and J.C. Block** (2002), Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges, *Enzyme Microbial. Technol.* 31, 179-186.
43. **Cadoret A.** (2003), Activités enzymatiques extracellulaires des agrégats bactériens de stations d'épuration d'eaux usées urbaines, *Mention Biologie Santé Environnement*, Université Henri Poincaré, Nancy, 213 pages.
44. **Cadoret A., C. Ho Tu, A. Conrad and J.C. Block**, Effect of environmental parameters on extracellular hydrolytic enzymatic activities of EPS from activated sludges, *Enzyme Microbial. Technol.*, en préparation.

45. **Canton J.H., G.J. van Esch, P. A. Greve and A.B.A.M. van Hellemond** (1977), Accumulation and elimination of α -hexachlorocyclohexane (α -HCH) by the marine algae *Chlamydomonas* and *Dunaliella*, *Water Res.* 11, 111-115.
46. **Carlson G. and J. Silverstein** (1998), Effect of molecular size and charge on biofilm sorption of organic matter, *Water Res.* 32, 1580-1592.
47. **Carr D.F. and J. Ganczarczyk** (1974), Activated sludge exocellular material extraction methods and problems, *Wat. Poll. Res. Canada*, 250-261.
48. **Carr D.D. and N. Herz** (Eds.) (1989), *Concise encyclopedia of mineral resources*, Pergamon Press, New York.
49. **Casado A.G., E.J.A. Hernández, and J.L. Vilchez** (1998) Determination of fatty acids (C8-C22) in urban wastewater by GC-MS, *Water Res.* 32, 10, 3168-3172.
50. **Cases J.M. and Villieras F.** (1992), Thermodynamic model of ionic and nonionic surfactant adsorption-abstraction on heterogeneous surfaces, *Langmuir*, 8, 1251-1264.
51. **Cavalli L., G. Casani, M. Lazzarin, C. Maraschin, G. Nucci and L. Valtorta** (1996), Iso-branching of linear alkylbenzene sulphonate (LAS), *Tenside Surfact. Det.* 33, 393-398.
52. **Cha D.K., J.J. Fuhrmann, D.W. Kim and C.M. Golt** (1999), Fatty acid methyl ester (FAME) analysis for monitoring *Nocardia* levels in activated sludge, *Water Res.* 33, 1964-1966.
53. **Chaignon V., B.S. Lartiges, A.E. Samrani and C. Mustin** (2002), Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics, *Water Res.* 36, 676-684.
54. **Chen Z., B. Xing, and W.B. McGill** (1999), A unified sorption variable for environmental applications of the Freundlich equation, *J. Environ. Qual.* 28, 1422-1428.
55. **Chen J. and Y. Sun** (2003), Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein, *J. Chromatogr. A* 992, 29-40.
56. **Chern J.M. and C.Y. Wu** (2001), Desorption of dye from activated carbon beds: effects of temperature, pH, and alcohol, *Water Res.* 35, 4159-4165.
57. **Christensen B.E. and W.G. Characklis** (1990), Physical and chemical properties of biofilms, *In Biofilms*, (Characklis, W.G. and Marshall, K.C., Eds.), Wiley, New York, 93-130.
58. **Chróst R.J.** (Ed.) (1991, Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes, *In Microbial enzymes in aquatic environments*, Springer-Verlag, Berlin, 29-59.
59. **Clesceri L.S., A.E. Greenberg and A.D. Eaton** (Eds.) (1998), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18th Edition, American public Health Association, Washington.
60. **Comeau Y., K.J. Hall and W.K. Oldman** (1988), Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2325-2327.
61. **Comte S., G. Guibaud et M. Baudu** (2003), Conséquence de la méthode d'extraction des polymères extracellulaires de boues activées sur la complexation du plomb. *In 5^{ème} Congrès international: Micropolluants et microorganismes dans l'environnement* (Bermond A. et Y. Levi, Eds.), Paris, France.
62. **Confer D.R. and B.E. Logan** (1997a), Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures I. Bovine serum albumin, *Water Res.* 31, 2127-2136.
63. **Confer D.R. and B.E. Logan** (1997b), Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures II. Dextran and dextrin, *Water Res.* 31, 2137-2145.
64. **Conrad A., M.Kontro (Suutari), M.M. Keinänen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault and J-C. Block** (2003), Fatty acid profiles of lipid fractions in extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge flocs, *Lipids*, 38, 10, 1093-1105.
65. **Cornelissen G., P.C.M. Van Noort and H.A.J. Govers** (1997), Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 1351-1357.
66. **Cornelissen G., P.C.M. Van Noort and H.A.J. Govers** (1998), Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents, *Environ. Sci. Technol.* 32, 3214-3131.
67. **Crombie-Quilty M.B. and A.J. McLoughlin** (1983), The adsorption of bovine serum albumin by activated sludge, *Water Res.* 17, 39-45.

68. **Dachs J. and J.M. Bayona** (1997), Langmuir-derived model for diffusion- and reaction-limited adsorption of organic compounds on fractal aggregates, *Environ. Sci. Technol.* 31, 2754-2760.
69. **De Ferrer J., A. Moreno and M.T. Vaquero** (1997), Monitoring of LAS in direct discharge situations, *Tenside Surfact. Det.* 34, 278-282.
70. **De Henau H., E. Matthijs and E. Namkung** (1989), Trace analysis of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) by HPLC detailed results from two municipal sewage treatment plants, *In Organic contaminants in waste water, sludge and sediment: occurrence, fate and disposal* (Quaghebeur D., I. Temmerman and G. Angeletti, Eds.), Elsevier, London, 5-18.
71. **de Rosa M., A. Ganmbacorta and J.D. Bullock** (1974), Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of *Bacillus acidocaladrius*, *J. Bacteriol.* 117, 212-214.
72. **Denger K. and A.M. Cook** (1999), Linear alkylbenzenesulphonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur, *J. Appl. Microbiol.* 86, 165-168.
73. **Denich T.J., L.A. Beaudette, H.J. Lee and J.T. Trevors** (2003), Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes, *J. Microbiol. Meth.* 52, 149-182.
74. **Deriaz R.E., M. Stacey, E.G. Teece and L.F. Wiggins** (1949), Deoxy-sugars. Part I. The dishe reaction for 2-deoxypentoses, *J. Chem. Soc.* 14, 1222-1232.
75. **Di Corcia A., L. Capuani, F. Casassa, A. Marcomini and R. Samperi** (1999), Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters, *Environ. Sci. Technol.* 33, 4119-4125.
76. **Dias-Cabral A.C., Queiroz J.A. and Pinto N.G.** (2003) Effect of salts and temperature on the adsorption of bovine serum albumin on polypropylene glycol-Sepharose under linear and overloaded chromatographic conditions. *J. Chromatogr. A*, 1018, 137-153
77. **Dignac M.F., V. Urbain, D. Rybacki, A. Bruchet, D. Snidaro and P. Scribe** (1998), Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure, *Water Sci. Technol.* 38, 45-53.
78. **Dignac M.F., P. Ginestet, D. Rybacki, A. Bruchet, V. Urbain, and P. Scribe** (2000) Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter, *Water Res.* 34, 17, 4185-4194.
79. **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. Meth.* 6, 13-19.
80. **Ding W.H. and C.T. Chen** (1999), Analysis of linear alkylbenzenesulfonates in water samples by large-volume injection-port derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 857, 359-364.
81. **Dionisi F., P.-A. Golay, M. Elli, and L.B. Fay** (1999), Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acids quantification in lactic acid bacteria, *Lipids*. 34, 10, 1107-1115.
82. **Djellal L., F. Theraulaz and O. Thomas** (1997), Study of LAS behaviour in sewage using advanced UV spectroscopy, *Tenside Surfact. Det.* 34, 326-320.
83. **Doe P.H., M. El-Emary and W.H. Wade** (1977), Surfactants for producing low interfacial tensions I: Linear alkyl benzene sulfonates, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 54, 570-577.
84. **Dohse D.M. and L.W. Lion** (1994), Effect of microbial polymers on the sorption and transport of phenanthrene in a low-carbon sand, *Environ. Sci. Technol.* 28 541-548.
85. **Donlon B. and E. Colleran** (1993), A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria, *J. Microbiol. Meth.* 17, 27-37.
86. **Droppo I.G., D.T. Flannigan, G.G. Leppard, C. Jaskot and S.N. Liss** (1996) Floc stabilization for multiple microscopic techniques, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3508-3515.
87. **Droppo I.G., G.G. Leppard, D.T. Flannigan and S.N. Liss** (1997), The freshwater floc: a functional relationship of water and organic and inorganic floc constituents affecting suspended sediment properties, *Water Air Soil Poll.* 99, 43-54.
88. **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.
89. **Dziurla M.A., P. Leroy, G.W. Strunkmann, M. Salhi, D.U. Lee, P. Camacho, V. Heinz, J.A. Muller, E. Paul and P. Ginestet** (2004), Measurement of glutathione in activated sludges, *Water Res.* 38, 236-244.

90. Edlung A., P.D. Nichols, R. Roffrey and D.C. White (1985), Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxy acid profiles from *Desulfovibrio* species, *J. Lipids Res.* 26, 982-988.
91. Egli T. (1985), The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates, In *Advances in Microbial Ecology*, (Jones, G., Ed.), Plenum Press, New York, 305-386.
92. Eichhorn P., M.E. Flavier, M.L. Paje and T.P. Knepper (2001), Occurrence and fate of linear and branched alkylbenzenesulfonates and their metabolites in surface waters in the Philippines, *Sci. Total Environ.* 269, 75-85.
93. Eikelboom D. H. (1982), Biosorption and prevention of bulking sludge by means of high floc loading, In *Bulking of activated sludge: Preventing and remedial methods*, (B. Chambers and E. J. Tomlinson, Eds.), Horwood, Chichester, 90-105.
94. Eriksson L., I. Steen and M. Tendaj (1992), Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant, *Water Sci. Technol.* 25, 251-265.
95. Eschenhagen M., M. Schuppler and I. Röske (2003), Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents, *Water Res.* 37, 3224-3232.
96. Esparza-Soto M. and P.K. Westerhoff (2001), Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass, *Wat. Sci. Technol.* 43, 87-95.
97. Esparza-Soto M. and P. Westerhoff (2003), Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass, *Water Res.* 37, 2301-2310.
98. Fauser P., J. Vikelsøe, P.B. Sørensen and L. Carlsen (2003), Phthalates, nonylphenols and LAS in an alternately operated wastewater treatment plant-fate modelling based on measured concentrations in wastewater and sludge, *Water Res.*, 37, 1288-1295
99. Feijtel T.C.J., E. Matthijs, A. Rottiers, G.B.J. Rijs, A. Kiewiet and A. de Nijs (1995), AIS/CESIO Environmental Surfactant Monitoring Programme. Part 1: LAS Monitoring study in "de Meern" sewage treatment plant and receiving river "Leidsche Rijn", *Chemosphere.* 30, 1053-1066.
100. Feijtel T., H. Vits, R. Murray-Smith, R. van Wijk, V. Koch, R. Schröder, R. Birch and W. Ten Berge (1996), Fate of LAS in activated sludge wastewater treatment plants: a model verification study, *Chemosphere.* 32, 1413-1426.
101. Ferreirós 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.
102. Field J.A., L.B. Barber, E.M. Thurman, B.L. Moore, D.L. Lawrence and D.A. Peake (1992), Fate of alkylbenzenesulfonates and dialkyltetralinsulfonates in sewage-contaminated groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 26, 1140-1148.
103. Finnerty, W.R. (1988) Microbial lipid metabolism, In *Microbial lipids*, (Ratledge C., and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press Inc., Oxford, Great Britain, 525-566.
104. Flemming H.C., J. Wingender, C. Mayer, V. Körstgens and W. Borchard (2000), Cohesiveness in biofilm matrix polymers, In *SGM symposium 59: Community structure and co-operation in biofilms*, (D. Allison, P. Gilbert, H. Lappin-Scott and M. Wilson, Eds.), Cambridge University Press, London, 87-105.
105. Forster C.F. and A.R. Clarke (1983), The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation, *Wat. Pollut. Control.* 82, 430-433.
106. Frølund B., K. Keiding and P.H. Nielsen (1994), A comparative study of biopolymers from a conventional and advanced activated sludge treatment plant, *Water Sci. Technol.* 29, 137-141.
107. Frølund B., T. Griebe and P.H. Nielsen (1995), Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 755-761.
108. Frølund B., R. Palmgren, K. Keiding and P.H. Nielsen (1996), Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Res.* 30, 1749-1758.
109. Frostegård A., A. Tunlid and E. Bååth (1991), Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content, *J. Microbiol. Meth.* 14, 151-163.
110. Fujii K., S. Kikuchi, M. Satomi, N. Ushio-Sata and N. Morita (2002), Degradation of 17 β -Estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2057-2060.
111. Fujita M., M. Ike, Y. goda, S. Fujimoto, Y. Toyoda and K.I. Miyagawa (1998), An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of linear alkylbenzene sulfonate: development and field studies, *Environ. Sci. Technol.* 57, 1143-1146.

112. **Galdiero F., L. Sommese, C. Capasso, M. Galdiero, M. Capello and M.A. Tufano** (1993), Exchange of phospholipids between *Escherichia coli* cells and environment, *Microb. Pathogenesis* 14, 85-94.
113. **Ganaye V.A., K. Keiding, T.M. Vogel, M. L. Viriot and J.C. Block** (1997), Evaluation of soil organic matter polarity by pyrene fluorescence spectrum variations, *Environ. Sci. Technol.* 31, 2701-2706.
114. **Garcia M.T., E. Campos, M. Dalmau, I. Ribosa and J. Sanchez-Leal** (2002), Structure-activity relationship for association of linear alkylbenzene sulfonates with activated sludge, *Chemosphere*. 49, 279-286.
115. **Geertsema-Doornbusch G.I., H.C. van der Mei and H.J. Busscher** (1993), Microbial cell surface hydrophobicity The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH), *J. Microbiol. Meth.* 18, 61-68.
116. **Geller, S.** (1979), *Abrégé de Statistiques*, 3^{ème} Edition, (Masson, Ed.), Masson, Paris, 222 pages.
117. **Gérin C. and M. Goutx** (1993), Iatroscan-measured particulate and dissolved lipids in the Almeria-Oran frontal system (Almofront-1, May 1991), *J. Mar. Syst.* 5, 343-360.
118. **Gerschel A.** (1995), L'interaction hydrophobe, In *Liaisons intermoléculaires, Les forces en jeu dans la matière condensée*, (Bram G. et A. Fuchs, Eds.), CNRS Edition, Paris, 256-259.
119. **Gharaibeh A.A. and K.J. Voorhees** (1996), Characterization of lipid fatty acids in whole-cell microorganisms using in situ supercritical fluid derivatization/extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2805-2810.
120. **Goldfine H.** (1982), Lipids of prokaryotes - Structure and distribution, In *Current topics in membranes and transport*, (Razin, F. and A. Kleinzeller, Eds.), Academic Press, London, 1-43.
121. **González-Mazo E., M. Honing, D. Barceló and A. Gómez-Parra** (1997), Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzen sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spary mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 31, 504-510.
122. **González-Mazo E. and J.M. Forja** (1998), Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment, *Environ. Sci. Technol.* 32, 1636-1641.
123. **Goodwin J. A. and C. F. Forster** (1985), A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics, *Water Res.* 19, 527-533.
124. **Gorgan D. W., and J. E Cronan** (1997), Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria, *Microbiol. Mol. Rev.* 61, 4, 429-441.
125. **Görner T., P. de Donato, M.-H. Ameil, E. Montarges-Pelletier and B. S. Lartiges** (2003), Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy, *Water Res.* 37, 2388-2393.
126. **Goutx M., M. Acquaviva and J.C. Bertrand** (1990), Cellular and extracellular carbohydrates and lipids from marine bacteria during growth on soluble substrates and hydrocarbons, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61, 291-296.
127. **Goutx M.** (1994), Les classes de lipides: Indices biochimiques des flux de matière dans les fronts Almería-Oran, *Océanis*. 20, 6, 121-138.
128. **Gradowska W. and L. Larsson** (1994), Determination of absolute configurations of 2- and 3-hydroxy fatty acids in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Microbiol. Meth.* 20, 55-67.
129. **Griebe T., G. Schaule and S. Wuertz** (1997), Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 118-122.
130. **Guckert J.B., C.P. Antworth, P.D. Nichols and C. White** (1985) Phospholipid, ester-linked fatty acids profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments, *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 147-158.
131. **Guckert J. B., M. A. Hood and D. C. White** (1986), Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids, *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 794-801.
132. **Guellil A., J. C. Block and V. Urbain** (1998), Adaptation of the microbial adhesion to hydrocarbon test (MATH) for measuring activated sludge hydrophobicity, *Water Sci. Technol.* 37, 359-362.
133. **Guellil A.** (1999), Transfert de matière organique entre phase aqueuse et agrégats biologiques au cours du traitement des eaux usées urbaines par boues activées, Mention Biologie et santé, Université Henri Poincaré, Nancy, Thèse, 201 pages.

134. **Guellil A., F. Thomas, J.C. Block, J.L. Bersillon and Ph. Ginestet** (2001), Transfer of organic matter between wastewater and activated sludge flocs, *Water Res.* 35, 143-150.
135. **Guellil A., M. Boualam, H. Quiquampoix, P. Ginestet, J.M. Audic and J.C. Block** (2001), Hydrolysis of wastewater colloidal organic matter by extracellular enzymes extracted from activated sludge flocs, *Wat. Sci. Technol.* 43, 33-40.
136. **Gustafsson Ö. and P.M. Gschwend** (1999), Phase distributions of hydrophobic chemicals in the aquatic environment, In *Bioavailability of organic xenobiotics in the environment: Practical consequences for the environment*, (Baveye P., J.C. Block and V.V. Goncharuk, Eds), Kluwer Academic Publishers, London, 327-348.
137. **Haack S.K., H. Garchow, D.A. Odelson, L.J. Forney and M.J. Klug** (1994), Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester of model bacterial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2483-2493.
138. **Halverson L.J. and M.K. Firestone** (2000), Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2414-2421.
139. **Hand V.C. and G.K. Williams** (1987) Structure-activity relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 370-373.
140. **Harkes G., J. Feijen and J. Dankert** (1991), Adhesion of *Escherichia coli* on to a series of poly(methacrylates) differing in charge and hydrophobicity, *Biomaterials.* 12, 853-860.
141. **Hedrick D.B., J.B. Guckert and D.C. White** (1991), The effects of oxygen and chloroform on microbial activities in a high-solids, high productivity anaerobic biomass reactor, *Biomass. Bioenerg.* 1, 207-212.
142. **Heipieper H.J., R. Diefenbach and H. Keweloh** (1992), Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity, *Appl. Environm. Microbiol.* 58, 1847-1852.
143. **Heipieper H.J., B. Löffeld, H. Keweloh and J.A.M. de Bont** (1995), The cis/trans isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds, *Chemosphere.* 30, 1041-1051.
144. **Hengge-Aronis R.** (2000), The general stress response in *Escherichia coli*, In *Bacterial stress responses* (Storz G. and R. Hengge-Aronis, Eds.), American Society for Microbiology, Washington, 161-178.
145. **Henze M.** (1992), Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes, *Water Sci. Technol.* 25, 6, 1-15.
146. **Hermansson M.** (1999), The DLVO theory in microbial adhesion, *Colloid Surface B.* 14, 105-119.
147. **Hesselmann R.P.X., T. Fleischmann, R. Hany and A.J.B. Zehnder** (1999), Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods, *J. Microbiol. Meth* 35, 111-119.
148. **Higgins M.J. and J.T. Novak** (1997), Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation, *J. Environ. Eng.* 123, 479-485.
149. **Hjertén S.** (1981), Hydrophobic interaction chromatography of proteins, nucleic acids, viruses, and cells on noncharged amphiphilic gels, *Meth. Biochem. anal.* 27, 89-108.
150. **Hoffman M. and A.W. Decho** (1999), Extracellular enzymes within microbial biofilms and the role of the extracellular polymer matrix, In *Microbial extracellular substances: Characterization, structure and function*, (Wingender, J. Neu, T.R. and Flemming, H.C., Eds.), Springer Verlag, Berlin, 217-230.
151. **Horan N.J. and C.R. Eccles** (1986), Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludge, *Water Res.* 20, 1427-1432.
152. **Huang W., H. Yu and W.J. Weber** (1998), Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments. 1. A comparative analysis of experimental protocols, *J. Contam. Hydrol.* 31, 129-148.
153. **Hwu C.S., S.K. Tseng, C.Y. Yuan, Z. Kulik and G. Lettinga** (1998), Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process, *Water Res.* 32, 1571-1579.
154. **Ingram J.C., W. F. Bauer, R.M. Lehman, S.P. O'Connell and A.D. Shaw** (2003), Detection of fatty acids from intact microorganisms by molecular beam static secondary ion mass spectrometry, *J. Microbiol. Meth.* 1746, 1-13.
155. **Jacobsen B.N., N. Nyholm, B.M. Pedersen, O. Poulsen and P. Østfed** (1993), Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption, *Water Res.* 27, 1505-1510.

156. **Jacques N.A. and A.L. Hunt** (1980), Studies on cyclopropane fatty acid synthesis: Effect of carbon source and oxygen tension on cyclopropane fatty acid synthetase activity in *Pseudomonas denitrificans*, *Biocim. Biophys. Acta* 619, 453-470.
157. **Jahn A. and P.H. Nielsen** (1995), Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin, *Water Sci. Technol.* 32, 157-164.
158. **Jahnke L.L. and P.D. Nichols** (1986), Methyl sterol and cyclopropane fatty acid composition of *Methylococcus capsulatus* grown at low oxygen tensions, *J. Bacteriol.* 167, 1, 238-242.
159. **Jahnke L.L., W. Eder, R. Huber, J.M. Hope, K.U. Hinrichs, J.M. Hayes, D.J. Des Marais, S.L. Cady and R.E. Summons** (2001), Signature lipids and stable carbon isotope analyses of octopus spring hyperthermophilic communities compared with those of *Aquificales* representatives, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5179-5189.
160. **Jana T.K., A.K. Srivastava, K. Csery and D.K. Arora** (2000), Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion, *Can. J. Microbiol.* 46, 28-37.
161. **Jantzen E., T. Tangen. and J. Eng** (1989), Gas chromatography of mycobacterial fatty acids and alcohols: Diagnostic applications, *Apmis.* 97, 1037-1045.
162. **Jia X.S., H.H.P. Fang and H. Furumai** (1996), Surface charge and extracellular polymer of sludge in the anaerobic degradation process, *Water Sci. Technol.* 34, 309-316.
163. **Jiménez L., A. Breen, N. Thomas, T.W. Federle and G.S. Sayler** (1991), Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1566-1569.
164. **Jones D.S., C.G. Adair, W.M. Mawhinney and S.P. Gorman** (1996), Standardisation and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination, *Int. J. Pharm.* 131, 83-89.
165. **Jonsson P. and T. Wadström** (1983), High surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* as revealed by hydrophobic interaction chromatography, *Curr. Microbiol.* 8, 347-353.
166. **Jorand F., P. Guicherd, V. Urbain, J. Manem and J.C. Block** (1994), Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria, *Water Sci. Technol.* 30, 211-218.
167. **Jorand F.** (1995a), Structure et propriétés hydrophobes des agrégats bactériens de boues activées, Mention Biologie et Santé, Université Henry Poincaré, Nancy, Thèse 185 pages.
168. **Jorand F., F. Zartarian, F. Thomas, J. C. Block, J.Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain and J. Manem** (1995b), Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Water Res.* 29, 1639-1647.
169. **Jorand F., R. Palmgren, J.C. Block, P.H. Nielsen, V. Urbain et J. Manem** (1995c) Biosorption of wastewater organics by activated sludge, In *Récents Progres en Génie des Procédés, "Les Procédés d'Épuration des Effluents et Déchets des Industries Biologiques et Alimentaires"*, (Boudrant J., J. Conte et J. Jacquinet, Eds.), *Technique et Documentation - Lavoisier*, Paris, 44, 61-67.
170. **Jorand F., F. Boué-Bigne, J.C. Block and V. Urbain** (1998), Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances, *Water Sci. Technol.* 37, 307-315.
171. **Jorand F.** (2000), Changes in hydrophobic polymers and cation release during anaerobic storage of activated sludges, In *1^{er} congrès mondial de l'association internationale de l'eau*, (Internationale Water Association, Ed.), Aghm, Paris.
172. **Junker F. and J.L. Ramos** (1999), Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E, *J. Bacteriol.* 181, 5693-5700.
173. **Kämpfer P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Böhringer, M. Wagner and R. Amann** (1996), Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probe, *Microbial. Ecol.* 32, 101-121.
174. **Keiding K. and P.H. Nielsen** (1997), Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effect of ionic composition, *Water Res.* 31, 1665-1672.
175. **Keinänen M.M., L.K. Korhonen, M.J. Lehtola, I.T. Miettinen, P.J. Martikainen, T. Vartiainen and M.H. Suutari** (2002), The microbial community structure on drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 434-439.

176. Keinänen M.M., L.K. Korhonen, P.J. Martikainen, T. Vartiainen, I.T. Miettinen, M.J. Lehtola, K. Nenonen, H. Pajunen and M.H. Kontro (2003), Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soils, sediment and biofilm, *J. Chromatogr. B.*, 738, 2, 443-451.
177. Kennedy K.J., J.J. Lu and W.W. Mohn (1992), Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular sludge, *Water Res.* 26, 1085-1092.
178. Kerr K.M., R.J. Larson and D.C. McAvoy (2000), Evaluation of an inactivation procedure for determining the sorption of organic compounds to activated sludge, *Ecotox. Environ. Safe.* 47, 314-322.
179. Kessler B. and B. Witholt (2001), Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism, *J. Biotechnol.* 86, 97-104.
180. Kim I.S., E.V. Stabnikova and V.N. Ivanov (2000), Hydrophobic interactions within biofilms of nitrifying and denitrifying bacteria in biofilters, *Bioprocess. Eng.* 22, 285-290.
181. King J.D., D.C. White and C.M. Taylor (1977), Use of lipid composition and metabolism to examine structure and activity of estuarine detrital microflora, *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1177-1183.
182. King R.O. and C.F. Forster (1990), Effects of sonication on activated sludge, *Enzyme Microb. Technol.* 12, 109-115.
183. Kjelleberg S. and M. Hermansson (1984), Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics, *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 497-503.
184. Klammer M. and E. Bååth (1998), Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis, *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 9-20.
185. Lafrance P., O. Banton, P.G.C. Campbell and J.P. Villeneuve (1990), A complexation-adsorption model describing the influence of dissolved organic matter on the mobility of hydrophobic compounds in groundwater, *Water Sci. Technol.* 22, 15-22.
186. Langworthy T.A. (1982), Lipids of bacteria living in extreme environments, In *Current topic in membranes and transport*, (Razin, F. and Kleinzeller, Eds.), Academic Press, London, 45-77.
187. Lartiges B.S., S. Deneux-Mustin, G. Villemin, C. Mustin, O. Barrès, M. Chamerois, B. Gerard and M. Babut (2001), Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine river, *Water Res.* 35, 3, 808-816.
188. LeBoeuf E.J. and W.J. Weber (1999), Reevaluation of general partitioning for sorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediment organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1617-1626.
189. Lemmer H. and M. Baumann (1988), Scum actinomycetes in sewage treatment plants-Part II: The effect of hydrophobic substrate, *Wat. Res.* 22, 761-763.
190. Leppard G.G. and K. Burnison (1990), Transmission electron microscopy of the natural organic matter of surface waters, *Anal. Chim. Acta.* 232, 107-121.
191. Leppard G.G. (1997), Colloidal organic fibrils of acid polysaccharides in surface waters: electron-optical characteristics, activities and chemical estimates of abundance, *Colloid Surface A.* 120, 1-15.
192. Leppard G.G., D.T. Flannigan, D. Mavrocordatos, C.H. Marvin, D.W. Bryant and B.E. McCarry (1998), Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by size classes of particulate in hamilton harbor water, *Environ. Sci. Technol.* 32, 22, 3633-3639.
193. Li D.H. and J.J. Ganczarczyk (1990), Structure of activated sludge flocs, *Biotechnol. Bioeng.* 35, 57-65.
194. Li J. and L.A. McLandsborough (1999), The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle, *J. Food Microbiol.* 53, 185-193.
195. Li J.H., K.J. Purdy, S. Takii and H. Hayashi (1999), Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment, *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 31-39.
196. Li X.Y. and B.E. Logan (2001), Permeability of fractal aggregates, *Water Res.* 35, 3373-3380.
197. Liao B.Q., D.G. Allen, I.G. Droppo, G.G. Leppard and S.N. Liss (2001), Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability, *Water Res.* 35, 339-350.
198. Lindahl M., A. Faris, T. Wadström and S. Hjertén (1981), A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cell, *Biochim. Biophys. Act.* 677, 471-476.
199. Liss S.N., I.G. Droppo, D.T. Flannigan and G.G. Leppard (1996), Floc architecture in wastewater and natural riverine systems, *Environ. Sci. Technol.* 30, 2, 680-686.

200. **Liss S. N., B.Q. Liao, I.G. Droppo, D.G. Allen and G.G. Leppard** (2001). Effect of solids retention time on floc structure, In *3^{ème} International Specialised Conference on Microorganisms in activated sludge and biofilm process*, (Tandoi V., R. Passino and C.M. Blundo, Eds.), International Water Association, Italie, 328-335.
201. **Liu W.T., A.T. Nielsen, J.H. Wu, C.S. Tsai, Y. Matsuo and S. Molin** (2001), In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process, *Environ. Microbiol.* 3, 110-122.
202. **Liu H. and H.H.P. Fang** (2002), Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges, *J. Biotechnol.* 95, 249-256.
203. **Lösel D.M.** (1988), Fungal lipids, In *Microbial lipids*, (Ratledge C. and S. G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 699-806.
204. **Louisot P.** (1983), Lipides et dérivés isopréniques, In *Biochimie générale et médicale*, (P. Louisot, Ed.), Simep, Paris, 259-321.
205. **Lowry O.H., N.J. Rosebrough A. Farr and R.J. Randall** (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
206. **Lüderitz O., M.A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehman, E.T. Rietschel and D.H. Shaw** (1982), Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria, In *Current topics in membranes and transport*, (Razin F. and A. Kleinzeller, Eds.), Academic Press, London.
207. **Lunar L., S. Rubio and D. Perez-Bendito** (2004), Differentiation and quantification of linear alkyl benzenesulfonate isomers by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1031, 17-25.
208. **Lyklema J., W. Norde, M.C.M. Van Loosdrecht and A.J.B. Zehnder** (1989), Adhesion of bacteria to polystyrene surfaces, *Colloid Surface B.* 39, 175-187.
209. **Macnaughton S.J., T.L. Jenkins, M.H. Wimpee, M.R. Cormier and D.C. White** (1997), Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction, *J. Microbiol. Meth.* 31, 19-27.
210. **Mafu A.A., D. Roy, J. Goulet and L. Savoie** (1991), Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1969-1973.
211. **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.
212. **Marchesi J.R., W.A. House, G.F. White, N.J. Russell and I.S. Farr** (1991), A comparative study of the adsorption of linear alkyl sulphates and alkylbenzene sulphonates on river sediments, *Colloid Surface B.* 53, 63-78.
213. **Martín-Cereceda M., F. Jorand, A. Guinea and J.C. Block** (2001), Characterization of extracellular polymeric substances in rotating biological contactors and activated sludge flocs, *Environ. Technol.* 22, 951-959.
214. **Matthijs E. and H. de Henau** (1985), Adsorption and desorption of LAS, *Tenside Surfact. Det.* 22, 299-304.
215. **Matthijs E. and H. de Henau** (1987), Determination of LAS, *Tenside Surfact. Det.* 4, 193-199.
216. **Mazumder R., H. C.Pinkart, P.S. Akban, T.J. Phelps and R.E. Benoit** (2000), Low-substrate regulated microaerophilic behavior as a stress response of aquatic and soil bacteria, *Curr. Microbiol.* 41, 79-83.
217. **McAvoy D.C., W.S. Eckhoff and R.A. Rapaport** (1993), Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the environment, *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 977-987.
218. **McAvoy D.C., S.D. Dyer, N.J. Fendinger, W.S. Eckhoff, D.L. Lawrence and W.M. Begley** (1998), Removal of alcohol ethoxylates, alkyl ethoxylate sulfates, and linear alkylbenzene sulfonates in wastewater treatment, *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1705-1711.
219. **McEvoy J. and W. Giger** (1986), Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sewage sludge by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 20, 376-383.
220. **McGibbon L. and N.J. Russell** (1985), The turnover of phospholipids in the psychrophilic bacterium *Micrococcus cryophilus* during adaptation to changes in growth temperature, *J. Gen. Microbiol.* 131, 2293-2302.
221. **McNaughton S.J., T.L. Jenkins, M.H. Wimpee, M.R. Cormier and D.C. White** (1997), Rapid extraction of lipid biomarkers from pure culture and environmental samples using pressurized accelerated hot solvent extraction, *J. Microbiol. Meth* 31, 19-27.

222. Means J.C. and R. Wijayarathne (1982), Role of natural colloids in the transport of hydrophobic pollutants, *Science*. 215, 968-970.
223. Meziane T. and M. Tsuchiya (2002), Organic matter in a subtropical mangrove-estuary subjected to wastewater discharge: origin and utilisation by two macrobenthic species, *J. Sea Res.* 47, 1-11.
224. Mian F.A., T.R. Jarman and R.C. Fighelato (1978), Biosynthesis of exopolysaccharides by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 134, 418-422.
225. Mikkelsen L.H. (2003), Applications and limitations of the colloid titration method for measuring activated sludge surface charges, *Water Res.* 37, 2458-2466.
226. Mills G.L., J.V. McArthur and C.P. Wolfe (2003), Lipid composition of suspended particulate matter (SPM) in a southeastern blackwater stream, *Water Res.* 37, 1783-1793.
227. Moreno A., J. Ferrer, J.L. Berna and L. Cavalli (1998), Effect of the alkyl chain and concentration of linear alkylbenzene sulfonate on biodegradation kinetics, *Tenside Surfact. Det.* 35, 375-378.
228. Morgan J.W., C.F. Forster and L. Evison (1990), A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges, *Water Res.* 24, 743-750.
229. Morra M.J. (1997), Assessment of extracellular enzymatic activity in soil, *In Manual of Environmental Microbiology*. (C.J. Husrt, Ed.), ASM Press, Washington, 459-465.
230. Mozes N., A.J. Léonard and P.G. Rouxhet (1988), On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity, *Biochim. Biophysica Acta* 945, 324-334.
231. Mudge S.M., J.A. East, M.J. Bebianno and L.A. Barreira (1998), Fatty acids in the Ria Formosa lagoon, Portugal, *Org. Geochem.* 29, 963-977.
232. Munford R.S., C.L. Hall, and P.D. Rick (1980) Size heterogeneity of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides in outer membranes and culture supernatant membrane fragments, *J. Bacteriol.* 144, 2, 630-640.
233. Nakae A., K. Tsuji and M. Yamanaka (1981), Determination of alkyl chain distribution of alkylbenzenesulfonates by liquid chromatography, *Anal. Chem.* 53, 1818-1821.
234. Neidhardt F.C., J.L. Ingraham and M. Schaechter (1994), La recherche de la nourriture, *In Physiologie de la cellule bactérienne: Une approche moléculaire* (Neidhardt F.C., J.L. Ingraham and M. Schaechter, Eds.), Masson, Paris, 159-180.
235. Neu T.R. and J.R. Lawrence (1999), *In situ* characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems, *In Microbial extracellular substances: Characterization, structure and function*, (J. Wingender, T.R. Neu and H.C. Flemming, Eds.), Springer Verlag, Berlin, 21-47.
236. Nichols D.S., J. Olley, H. Garda, R.R. Brenner and T.A. McMeekin (2000), Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2422-2429.
237. Nichols D.S., K.A. Presser, J. Olley, T. Ross and T.A. McMeekin (2002), Variation of branched-chain fatty acids marks the normal physiological range for growth in *Listeria monocytogenes*, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2809-2813.
238. Nielsen P.H., A. Jahn and R. Palmgren (1997), Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms, *Water Sci. Technol.* 36, 11-19.
239. Nielsen P.H. and A. Jahn (1999), Extraction of EPS, *In Microbial extracellular substances: Characterization, structure and function*, (J. Wingender, T. R. Neu and H. C. Flemming, Eds.), Springer Verlag, Berlin, 49-72.
240. Nielsen L.H., L.H. Mikkelsen and P.H. Nielsen (2001), *In situ* detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge, *Wat. Sci. Technol.* 43, 97-103.
241. North P.F. (1976), Towards an absolute measurement of soil structural stability using ultrasound, *J. Soil. Sci.* 27, 451-419.
242. Novak J.T. and B.-E. Haugan (1981), Polymer extraction from activated sludge, *J. WPCF.* 53, 1240-1244.
243. Novotny C., P. Erbanova, V. Sasek, A. Kubatova, T. Cajthaml, E. Lang, J. Krahel and F. Zadrazil (1999), Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi, *Biodegradation.* 10, 159-168.

244. **Odham G., A. Tunlid, G. Westerdahl and P. Mårdén** (1986), Combined determination of poly- β -hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection, *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 905-910.
245. **O'Leary W.M., and S.G. Wilkinson** (1988), Gram-positive Bacteria, in *Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press Inc., Oxford, Great Britain, 117-201.
246. **Oliver J.D. and R.R. Colwell** (1973), Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: fatty acid composition, *Int. J. System. Bacteriol.* 23, 442-458.
247. **Oliver J.D. and W.F. Stringer** (1984), Lipid composition of a psychrophilic marine vibrio sp. during starvation-induced morphogenesis, *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 461-466.
248. **Olofsson A.C., A. Zita and M. Hermansson** (1998), Floc stability and adhesion of green fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge, *Microbiology*. 144, 519-528.
249. **Palmgren R. and P.H. Nielsen** (1996), Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures, *Water Sci. Technol.* 34, 233-240.
250. **Palmgren R., F. Jorand, P.H. Nielsen and J.C. Block** (1998), Influence of oxygen limitation on the cell surface properties of bacteria from activated sludge, *Water Sci. Technol.* 37, 349-352.
251. **Parker J.H., G.A. Smith, H. L. Fredrickson, J.R. Vestal and D.C. White** (1982), Sensitive assay, based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for gram-negative bacteria in sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1170-1177.
252. **Parrish C.C., G. Bodennec, E.J. Macpherson and R.G. Ackman** (1992), Seawater fatty acids and lipid classes in an urban and a rural nova scotia inlet, *Lipids*. 27, 651-655.
253. **Patschkowski T., D.M. Bates and P.J. Kiley** (2000), Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation, In *Bacterial stress responses* (Storz G. and R. Hengge-Aronis, Eds.), American Society for Microbiology, Washington, 61-77.
254. **Peña C., A. Mauricio, A. Trujillo-Roldán and E. Galindo** (2000), Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azobacter vinelandii*, *Enzyme Microb. Technol.* 27, 390-398.
255. **Perales J.A., M.A. Manzano, D. Sales and J.A. Quiroga** (1999), Biodegradation kinetics of LAS in river water, *Int. Biodeter. Biodegr.* 43, 155-160.
256. **Pratz D., F. Ruiz, B. Vázquez and D. Zarzo** (1993), LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications, *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1599-1608.
257. **PreLOT B.** (2001), Mesure et modélisation de l'hétérogénéité énergétique à l'interface oxyde/électrolyte/métaux, Mention Géosciences – Physico-chimie des interfaces, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, Thèse 247 pages.
258. **Pujol R. and J.P. Canler** (1992), Biosorption and dynamics of bacterial populations in activated sludge, *Water Res.* 26, 209-212.
259. **Quéméneur M., and Y. Marty** (1994), Fatty acids and sterols in domestic wastewaters, *Water Res.* 28, 5, 1217-1226.
260. **Rajendran N., O. Matsuda, R. Rajendran and Y. Urushigawa** (1997), Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays, *Mar. Pol. Bul.* 34, 26-33.
261. **Ramos A., I.C. Boels, W.M. de Vos and H. Santos** (2001a), Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactobacillus lactis*, *Appl. Environ. Microbiology*. 67, 33-41.
262. **Ramos J.L., M.T. Gallegos, S. Marqués, M.I. Ramos-González, M. Espinosa-Urgel and A. Segura** (2001b), Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors, *Microbiology*. 4, 166-171.
263. **Ranneklev S.B. and E. Bååth** (2003), Use of phospholipid fatty acids to detect previous self-heating events in stored peat, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2532-3539.
264. **Rao S.S., B.J. Dutta and C.M. Taylor** (1993), Ecotoxicological implications of fluvial suspended particulates. In *Particulate matter and aquatic contaminants* (Rao SS, Ed.), Lewis Publisher, Canada, 157-167.
265. **Rapaport R.A. and W.S. Eckhoff** (1990), Monitoring linear benzene sulfonate in the environment: 1973-1986, *Environm. Toxicol. Chem.* 9, 1245-1257.
266. **Ratledge C. and S.G. Wilkinson** (1988), Fatty acids, related and derived lipids, In *Microbial lipids*. (C. Ratledge and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, Oxford, 23-53.

267. **Ratray J.B.M.** (1988), Yeasts, In *Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 555-697.
268. **Raunkjær K., T. Hvitved-Jacobsen and P.H. Nielsen** (1994), Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater, *Water Res.*, 28, 251-262.
269. **Reemtsma T., A. Bredow and M. Gehring** (1999) The nature and kinetics of organic matter release from soil by salt solutions, *Eur. J. Soil. Sci.*, 50, 53-64.
270. **Ren S.** (2002), Classifying class I and class II compounds by hydrophobicity and hydrogen bonding descriptors, *Environ. Toxicol.* 17, 415-423.
271. **Riffat R. and R.R. Dague** (1995), Laboratory studies on the anaerobic biosorption process, *Wat. Environ. Res.* 67, 1104-1110.
272. **Rivera M., L.E. Bryan, R.E. Hancock, and E.J. McGroarty** (1988), Heterogeneity of Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length, *J. Bacteriol.* 170, 2, 512-521.
273. **Robert M.** (1996), Organisation des sols : les constituants actifs. In *Le sol : interface dans l'environnement ressource pour le développement* (Masson SA, Ed.), Masson, Paris, 7-20.
274. **Rodier J.** (1996), Acidité-Alcalinité (TA - TAC), In *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*, (Quilbé J-M., Ed.), Dunod, Paris, 111-119.
275. **Roques H., B. Capdeville, J.C. Séropian and H. Grigoropoulou** (1984), Oxygenation by hydrogen peroxide of the fixed biomass used in biological water treatment, *Water Res.* 18, 103-110.
276. **Rosenberg M.** (1984), Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity, *FEMS Microbiol. Let.* 22, 289-295.
277. **Rosenberg M. and S. Kjelleberg** (1986), Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion, In *Microbial ecology*, (K.C. Marshall, Ed.), Plenum Publishing Corporation, New York, 353-393.
278. **Rosenberg M.** (1991), Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon : water interface, *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 159-173.
279. **Ruiz F.J., S. Rubio and D. Perez-Bendito** (2004), Potential of coacervation processes for the extraction of amphiphiles (linear alkyl benzenesulphonates) from sewage sludge samples prior to liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1030, 109-115.
280. **Sabra W., H. Lünsdorf and A.P. Zeng** (2003), Alterations in the formation of lipopolysaccharides and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions, *Microbiology.* 149, 2789-2795.
281. **Saby S., P. Leroy and J.C. Block** (1999), *Escherichia coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to oxygenation and starvation, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5600-5603.
282. **Saddler J.N. and A.C. Wardlaw** (1980), Extraction, distribution and biodegradation of bacterial lipopolysaccharides in estuarine sediments, *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 46, 27-39.
283. **Sáez M., V.M. León, A. Gómez-Parra and E. González-Mazo** (2000), Extraction and isolation of linear alkylbenzene sulfonates and their intermediate metabolites from various marine organisms, *J. Chromatogr. A.* 889, 99-104.
284. **Sánchez Leal J., M.T. Garcíá, R. Tomás, J. Ferrer and C. Bengoechea** (1994), Linear alkylbenzene sulfonate removal, *Tenside Surfact. Det.* 31, 253-256.
285. **Sarath G., R.S. de la Motte and F.W. Wagner** (1989), Protease assay methods. In *Proteolytic enzymes: a practical approach* (Beynon, R.J. and J.S. Bond, Eds.), University Press, Oxford, 25-55.
286. **Sarrazin L., A. Arnoux and P. Rebouillon** (1997a), High-performance liquid chromatographic analysis of a linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites, *J. Chromatogr. A.* 760, 285-291.
287. **Sarrazin L., A. Arnoux, P. Rebouillon and J.L. Monod** (1997b), Biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) in briny water and identification of metabolites using HPLC analysis by direct injection of samples, *Toxicolog. Environ. Chem.* 58, 209-216.
288. **Sarrazin L., W. Wafo and P. Rebouillon** (1999a), Determination of a linear alkylbenzenesulfonate and its biodegradation intermediates in sea water using solid-phase extraction and RP-HPLC with UV detection, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 22, 2511-2524.
289. **Sarrazin L., Y. Limouzin-Maire and P. Rebouillon** (1999b), Evaluation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) biodegradability in sediment by solid-phase extraction and HPLC analysis, *Environ. Toxicol. Chem.* 69, 487-498.

290. **Sasaki G.L., L.M. Cruz, P.A.J. Gorin and M. Lacomini** (2001), Fatty acid composition of lipids present in selected Lichenized fungi: a chemotyping study, *Lipids*. 36, 167-174.
291. **Sato T. and Y. Ose** (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution, *Water Res.* 14, 333-338.
292. **Schmid M., A. Thill, U. Purkhold, M. Walcher, J.Y. Bottero, P. Ginestet, P. H. Nielsen, S. Wuertz and M. Wagner** (2003), Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis, *Water Res.* 37, 2043-2052.
293. **Schwarzenbach R.P., P.M. Gschwend and D.M. Imboden** (1993), Sorption: solid-aqueous solution exchange, In *Environmental organic chemistry*, (R. P. Scharzenbach, P.M. Gschwend and D.M. Imboden, Eds.), J. Wiley, New York, 255-341.
294. **Schweizer, E.** (1989) Biosynthesis of fatty acids and related compounds, in *Microbial Lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press Inc., Oxford, Great Britain, 3-50.
295. **Servais P., J. Garnier, N. Demarteau, N. Brion and G. Billen** (1999), Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. *Water Res.* 33, 3521-3531.
296. **Seviour R.J. and L.L. Blackall** (Eds.) (1999), *The microbiology of activated sludge*, Kluwer academic publishers, Netherlands, 422 pages.
297. **Shin H.S., S.T. Kang and S.Y. Nam** (2001), Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics, *Environ. Sci. Technol.* 43, 193-196.
298. **Sigolilot J.C. and M.H. Nguyen** (1987), Dégradation d'un tensio-actif commercial, en présence d'une source complémentaire de carbone, par une communauté bactérienne sélectionnée en milieu marin, *Can. J. Microbiol.* 33, 929-932.
299. **Smith M.W. and F.C. Neidhardt** (1983), Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 154, 344-350.
300. **Smith P.F.** (1988), Archebacteria and other specialized bacteria, In *Microbial lipids*. (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 489-553.
301. **Smith C.A., C.B. Phiefer, S. J. Macnaughton, A. Peacock, R.S. Burkhalter, R. Kirkegaard and D.C. White** (2000), Quantitative lipid biomarker detection of unculturable microbes exposure in water distribution system biofilms, *Water Res.* 34, 2683-2688.
302. **Smoot J.C. and R.H. Findlay** (2001), Spatial and seasonal variation in a reservoir sedimentary microbial community as determined by phospholipid analysis, *Microbial. Ecol.* 42, 350-358.
303. **Soda S., M. Ike and M. Fujita** (1999), Adsorption of bacterial cells onto activated sludge flocs, *J. Biosci. Bioeng.* 87, 513-518.
304. **Späth R., H.C. Flemming and S. Wuertz** (1998), Sorption properties of biofilms, *Water Sci. Technol.* 37, 207-210.
305. **Sponza D.T.** (2002a), Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems, *Process Biochem.* 37, 983-998.
306. **Sponza D.T.** (2002b), Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions, *Enzyme Microb. Technol.* 6235, 1-11.
307. **Steen W.C. and S.W. Karickhoff** (1981), Biosorption of hydrophobic organic pollutants by mixed microbial populations, *Chemosphere*. 10, 27-32.
308. **Stefanoudaki E., F. Kotsifaki, and A. Koutsafakis** (2000) Sensory and chemical profiles of three european olive varieties (*Olea europea* L): an Approach for the characterization and authentication of the extracted oils, *J. Sci. Food Agric.* 80, 381-389.
309. **Stenström T.A.** (1989), Bacterial hydrophobicity, an overall parameter or the measurement of adhesion potential to soil particles, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 142-147.
310. **Stone M. and B.G. Krishnappan** (2003), Floc morphology and size distributions of cohesive sediment in steady-state flow, *Water Res.* 37, 2739-2747.
311. **Storz G., L.A. Tartaglia, S.B. Farr and B.N. Ames** (1990), Bacterial defenses against oxidative stress, *Trends Genetic.* 6, 363-368.
312. **Storz G. and M. Zheng** (2000), Oxidative stress, In *Bacterial stress response* (Storz G. and R. Hengge-Aronis, Eds.), American Society for Microbiology, Washington, 47-59.

313. **Stratton H.M., P.R. Brooks and R.J. Seviour** (1999), Analysis of the structural diversity of mycolic acids of *Rhodococcus* and *Gordonia* isolates from activated sludge foams by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry, *J. Microbiol. Meth.* 35, 53-56.
314. **Stratton H.M., P.R. Brooks, P.C. Griffiths and R.J. Seviour** (2002), Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 264-267.
315. **Struijs J., J. Stoltenkamp and D. Van de Meent** (1991), A spreadsheet-based box model to predict the fate of xenobiotics in a municipal wastewater treatment plant, *Water Res.* 25, 891-900.
316. **Suutari M., K. Liukkonen and S. Laakso** (1990), Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, *J. Gen. Microbiol.* 136, 1469-1474.
317. **Suutari M. and S. Laakso** (1994), Microbial fatty acids and thermal adaptation, *Crit. Microbiol.* 20, 285-328.
318. **Suutari M. Miettinen I., Korhonen L., Vartiainen T. and Martikainen P.** (1997), Effects of organic compounds in distributed drinkable tap water on microbial growth in pipeline sediments as determined by phospholipid fatty acid analysis, *In 7th Nordic Symposium on Organic Pollutants*, (Vartiainen T. and Komulainen H., Eds.), University Publications C. Natural and Environmental Sciences 68, Kuopio, 100-103.
319. **Sykkema J., J.A.M. de Bont and B. Poolman** (1995), Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. rev.* 59, 201-222.
320. **Szepeszy L. and G. Rippel** (1992), Comparison and evaluation of HIC columns of different hydrophobicity, *Chromatographia* 34, 391-397.
321. **Szymanski A., B. Wyrwas and Z. Lukaszewski** (2003), Determination of non-ionic surfactants and their biotransformation by-products absorbed on alive activated sludge, *Water Res.* 37, 281-288.
322. **Takada H. and R. Ishiwatari** (1987), Linear alkylbenzenes in urban riverine environments in Tokyo: distribution, source, and behaviour, *Environ. Sci. Technol.* 21, 875-883.
323. **Talbot V. and M. Bianchi** (1997a), Bacterial proteolytic activity in sediments of the subantarctic indian ocean sector, *Deep-Sea Res.* 44, 1069-1084.
324. **Talbot V., L. Giuliano, V. Bruni and M. Bianchi** (1997b), Bacterial abundance, production and ectoproteolytic activity in the strait of Magellan, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154, 293-302.
325. **Tan K.N. and H. Chua** (1997), COD adsorption capacity of the activated sludge-its determination and application in the activated sludge process, *Environ. Monit. Assess.* 44, 211-217.
326. **Tanaka H., M. Matsumura and I.A. Velihy** (1984), Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gels beads, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 53-58.
327. **Tanford C.** (1980), The solubility of hydrocarbons in water, *In The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, (C. Tanford, Ed.), J. Wiley, Toronto, 5-13.
328. **Taylor J. and J. Parkes** (1983), The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*, *J. Gen. Microbiol.* 129, 3303-3309.
329. **Taylor J. and J. Parkes** (1985), Identifying different populations of sulphate-reducing bacteria within marine sediment systems, using fatty acid biomarkers, *J. Gen. Microbiol.* 131, 631-642.
330. **Temmink H. and B. Klapwijk** (2004), Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in activated sludge plants, *Water Res.* 38, 903-912.
331. **Torkko P., M. Suutari, S. Suomalainen, L. Paulin, L. Larsson and M.L. Katila** (1998), Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analysis: comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing, *J. Clin. Microbiol.* 36, 499-505.
332. **Torrijos M., R. M. Cerro, B. Capdeville, S. Zeghal, M. Payraudeau and A. Lesouef** (1994), Sequencing batch reactor: a tool for wastewater characterization for the IAWPCR model, *Water Sci. Technol.* 29, 81-90.
333. **Traina S.J., D.C. McAvoy and D.J. Versteeg** (1996), Association of linear alkylbenzenesulfonates with dissolved humic substances and its effect on bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 30, 1300-1309.
334. **Trehy M.L., W.E. Gledhill and R.G. Orth** (1990), Determination of linear alkylbenzenesulfonates and dialkyltetralinsulfonates in water and sediment by gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 62, 2581-2586.
335. **Tsezos M. and J.P. Bell** (1989), Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass, *Water Res.* 23, 561-568.

336. 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.
337. Tunlid A., D. Ringelberg, T.J. Phelps, C. Low and D.C. White (1989), Measurement of phospholipid fatty acid at picomolar concentrations in biofilm and deep subsurface sediments using gas chromatography and chemical ionization mass spectrometry, *J. Microbiol. Meth.* 10, 139-152.
338. Urano K. and M. Saito (1984), Adsorption of surfactants on microbiologies, *Chemosphere.* 13, 285-292.
339. Urano K., M. Saito and C. Murata (1984), Adsorption of surfactants on sediments, *Chemosphere.* 13, 293-300.
340. Urbain V., J.C. Block and J. Manem (1993a), Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach, *Water Res.* 27, 829-838.
341. Urbain V., E. Pys, J.C. Block and J. Manem (1993b), Composition and activity of activated sludge under starvation conditions, *Environ. Tech.* 14, 731-740.
342. Valeur A., A. Tunlid and G. Odham (1988), Differences in lipid composition between free-living and initially adhered cells of a gram-negative bacterium, *Arch. Microbiol.* 149, 521-526.
343. van der Mei H.C., B. van de Belt-Gritter and H.J. Busscher (1995), Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms, *Colloid Surface B.* 5, 117-126.
344. van der Wal A., W. Norde, A.J.B. Zehnder and J. Lyklema (1997), Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria, *Colloid Surface B.* 9, 81-100.
345. van Loosdrecht M.C.M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa and A.J.B. Zehnder (1987), Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion, *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1898-1901.
346. van Noort P.C.M., G. Cornelissen, T.E.M. ten Hulscher, B.A. Vrind, H. Rigterink and A. Belfroid (2003), Slow and very slow desorption of organic compounds from sediment: influence of sorbate planarity, *Water Res.* 37, 2317-2322.
347. Virtue P., P.D. Nichols and P.I. Boon (1996), Simultaneous estimation of microbial phospholipid fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography, *J. Microbiol. Meth.* 25, 177-185.
348. Wang J., C.P. Huang, H.E. Allen, D.K. Cha and D.W. Kim (1998), Adsorption characteristics of dye onto sludge particulates, *J. Col. Int. Sci.* 208, 518-528.
349. Wang W., W. Wang, X. Zhang and D. Wang (2002), Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components, *Water Res.* 36, 551-560.
350. Wase D.A.J. and V. Balasundaram (1980), Separation of polymer from activated sludge, *Biotechnol. Lett.* 2, 537-540.
351. Waters J. and T.C.J. Feijtel (1995), AIS+/CESIO+ environmental surfactant monitoring programme: outcome of five national pilot studies on linear alkylbenzene sulphonate (LAS), *Chemosphere.* 30, 1939-1956.
352. Weber W.J., W. Huang and H. Yu (1998), Hysteresis in the sorption and desorption of hydrophobic organic contaminants by soils and sediments. 2. Effects of soils organic matter heterogeneity, *J. Contam. Hydrol.* 31, 149-165.
353. Werker A.G. and E.R. Hall (1998), Using microbial fatty acids to quantify, characterize and compare biofilm and suspended microbial populations in wastewater treatment systems, *Water Sci. Technol.* 38, 273-280.
354. Werker A.G. and E.R. Hall (2001), Quantifying population dynamics based on community structure fingerprints extracted from biosolids samples, *Microbial. Ecol.* 41, 195-209.
355. Werker A. G., J. Becker and C. Huitema (2003), Assessment of activated sludge microbial community analysis in full-scale biological wastewater treatment plants using patterns of fatty acid isopropyl esters (FAPEs), *Water Res.* 37, 2162-2172.
356. Westall J.C., H. Chen, W. Zhang and B.J. Brownawell (1999), Sorption of linear alkylbenzenesulfonates on sediment materials, *Environ. Sci. Technol.* 33, 3110-3118.
357. White D.C., D.J.S. Nickels, J.D. King and R.J. Bobbie (1979), Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate, *Oecologia.* 40, 51-62.

358. White D.C., D.B. Ringelberg, S.J. Macnaughton, S. Alugupalli and D. Schram (1996a), Signature lipid biomarker analysis for quantitative assessment *in situ* of environmental microbial ecology, *In*. ACS symposium 671: Application of molecular markers in environmental geochemistry (R. Eagenhouse, Eds.), American Chemical Society Washington, 22-26.
359. White D.C., J.O. Stair and D.B. Ringelberg (1996b), Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis, *J. Ind. microbiol.* 17, 185-196.
360. Whittaker P., M.M. Mossoba, S. Al-Khaldi, F.S. Fry, V.C. Dunkel, B.D. Tall and M.P. Yurawecz (2003), Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters, *J. Microbiol. Meth.* 55, 3, 709-716.
361. Wick L.Y., P. Wattiau and H. Harms (2002), Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria, *Environ. Microbiol.* 4, 612-616.
362. Wilén B.M. and P. Balmer (1998), Short term effects of dissolved oxygen concentration on the turbidity of the supernatant of activated sludge, *Wat. Sci. Technol.* 38, 25-33.
363. Wilén B.M. and P. Balmér (1999) The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs, *Water Res.* 33, 391-400.
364. Wilén B.M., B. Jin and P. Lant (2003), The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties, *Water Res.* 37, 2127-2139.
365. Wilkinson S.G. (1988), Gram-negative bacteria, *In Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 299-488.
366. Williams A.G. and J.W.T. Wimpenny (1977), Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in batch culture, *J. Gen. Microbiol.* 102, 13-21.
367. Wolfaardt G.M., J.R. Lawrence, R.D. Robarts and D.E. Caldwell (1998), *In situ* characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics, *Microbial. Ecol.* 35, 213-223.
368. Wollenweber H.W., and E.T. Rietschel (1990), Analysis of lipopolysaccharide (lipid A) fatty acids, *J. Microbiol. Meth.* 11, 195-211.
369. Wood B.J.B. (1988), Lipids of algae and protozoa, *In Microbial lipids*, (Ratledge C. and S.G. Wilkinson, Eds.), Academic Press, London, 807-867.
370. Wuertz S., P. Pfeleiderer, K. Kriebitzsch, R. Späth, T. Griebel, D. Coello-Oviedo, P. A. Wilderer and H.-C. Flemming (1998), Extracellular redox activity in activated sludge, *Water Sci. Technol.* 37, 379-384.
371. Wuertz S., R. Spaeth, A. Hinderberger, T. Griebel, H. C. Flemming and P.A. Wilderer (2001), A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Sci. Technol.* 43 25-31.
372. Yamamoto Y., M. Higuchi, L.B. Poole and Y. Kamio (2000), Identification of a new gene responsible for the oxygen tolerance in aerobic life of *Streptococcus mutans*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1106-1109.
373. Zartarian F., C. Mustin, G. Villemin, T. Ait-Ettager, A. Thill, J. Y. Bottero, J. L. Mallet and D. Snidaro (1997), Three-dimensional modeling of an activated sludge floc, *Langmuir.* 13, 35-40.
374. Zelles L. and Q.Y. Bai (1993), Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS, *Soil Biol. Biochem.* 25, 495-507.
375. Zhang X., P.L. Bishop and B.K. Kinkle (1999), Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms, *Water Sci. Technol.* 39, 211-218.
376. Zita A. and M. Hermansson (1994), Effects of ionic strength on bacteria adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3041-3048.
377. Zita A. and M. Hermansson (1997a), Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*, *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 299-306.
378. Zita A. and M. Hermansson (1997b), Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1168-1170.

8. ANNEXES

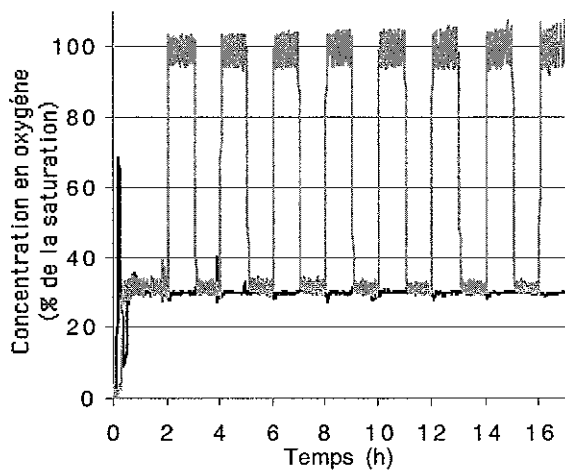
Annexe A1

Mobilités électrophorétique et potentiels zéta des boues dispersées et lavées avec PUM, PBS et de l'eau déminéralisée à différents valeurs de pH.

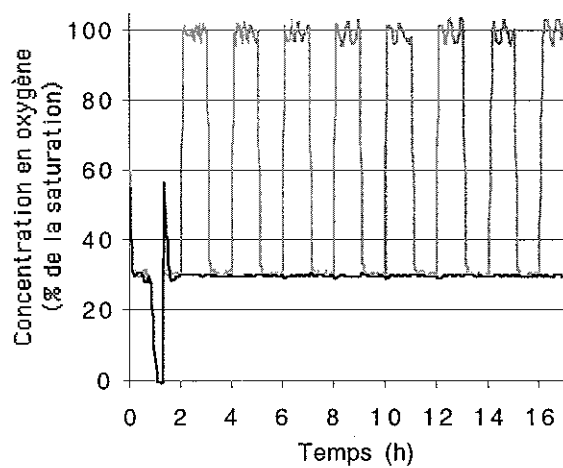
	Nombre de particules comptées	Conductivité (mS cm ⁻¹)	Mobilité ($\mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Potentiel zéta (mV)
Eau déminéralisée	84	0,01	-1,27	-19,32±11,87
PUM pH = 3,0	44	20,7	-0,40	-5,75±2,44
PUM pH = 4,5	60	0,07	-0,74	-10,58±5,86
PUM pH = 7,0	42	19,7	-0,88	-12,49±6,25
PUM pH = 9,0	69	21,4	-0,75	-10,75±6,45
PBS pH = 3,0	104	0,04	-0,61	-8,72±6,15
PBS pH = 4,6	66	13,4	-0,97	-13,58±7,14
PBS pH = 7,0	40	14,1	-0,88	-12,8±7,42
PBS pH = 9,0	77	14,8	-1,09	-15,73±8,8

ANNEXE A2

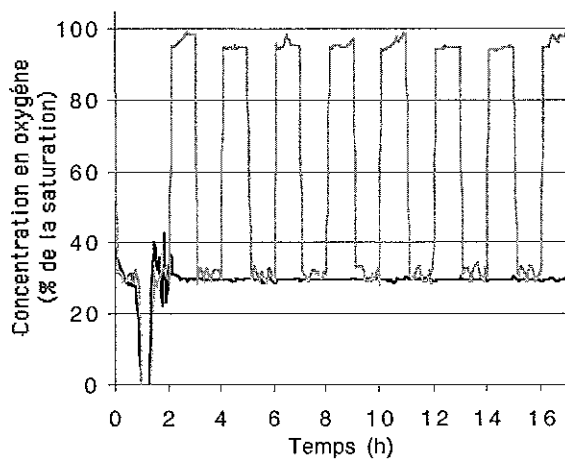
Evolution de la concentration en oxygène des boues activées prélevées à Toul (T) et placées dans les réacteurs contrôle (—) et stress (—) maintenu à 25 ± 2 °C.



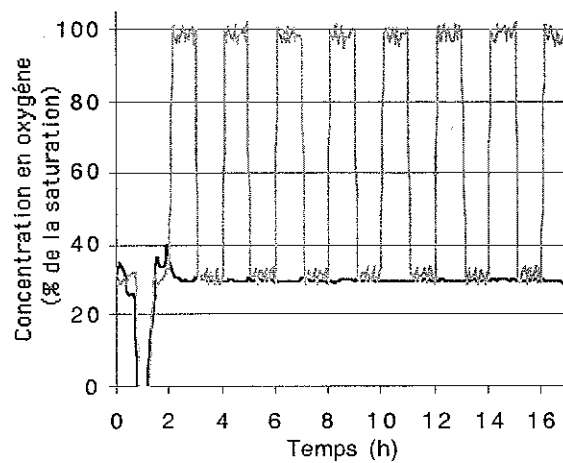
T₁



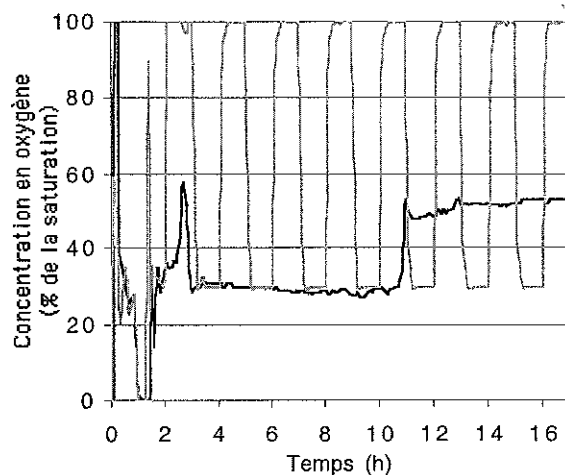
T₂



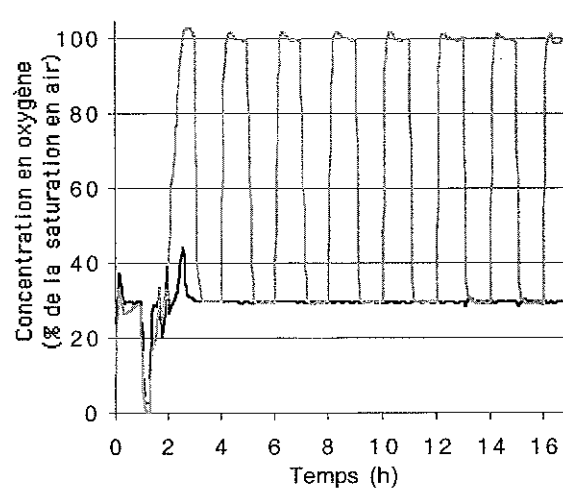
T₃



T₄



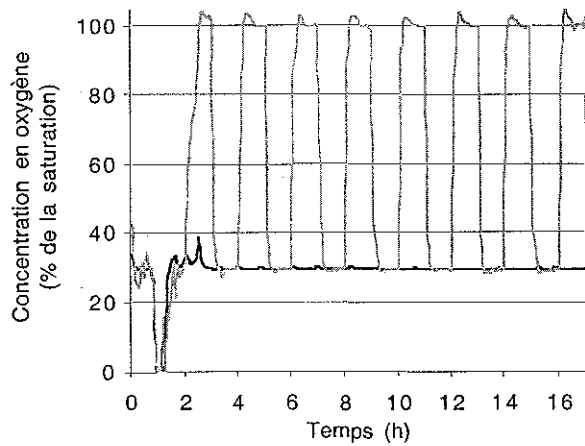
T₅



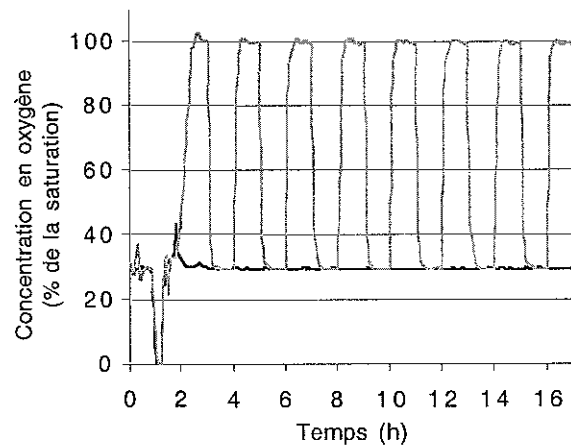
T₆

ANNEXE A2 (suite)

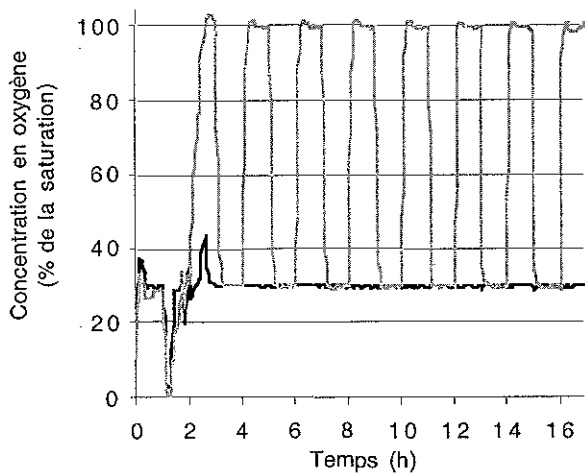
Evolution de la concentration en oxygène des boues activées prélevées à Toul (T) et à Nancy-Maxéville (N) et placées dans les réacteurs contrôle (—) et stress (—) maintenus à 25 ± 2 °C.



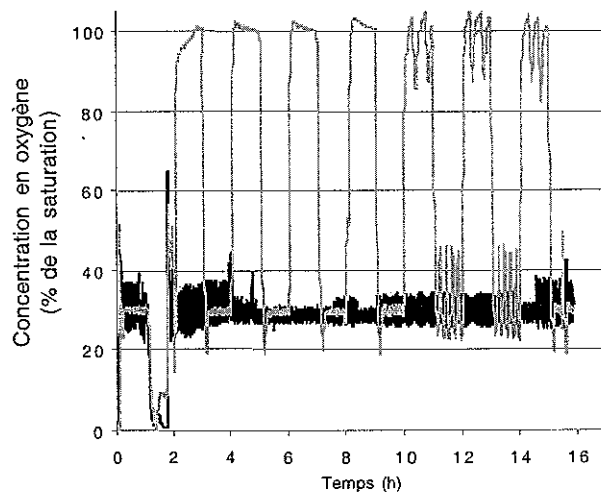
T₇



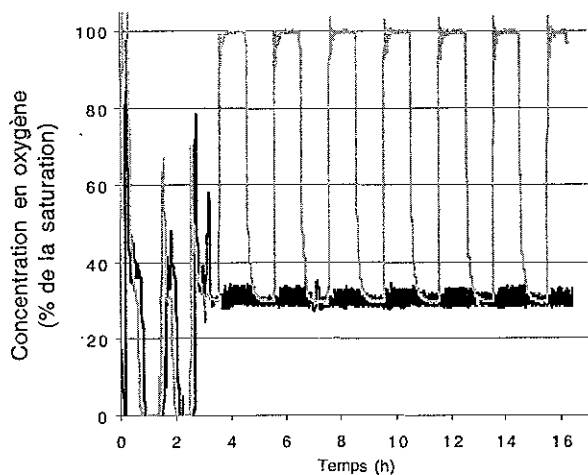
T₈



N₁



N₂



N₃

Prénom, Nom : **Arnaud CONRAD**

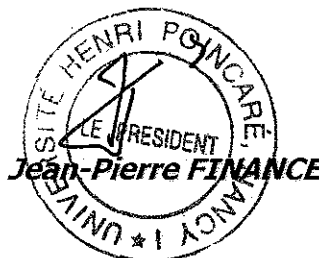
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 937

Nancy, le 14 juin 2004

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



RESUME

Dans les milieux hydriques, la majorité des micro-organismes se trouve sous forme agrégée. Ces agrégats sont des structures complexes constituées d'une communauté très diversifiée de micro-organismes et d'une matrice de substances exopolymériques (EPS). Des protéines, des polysaccharides, des substances dites humiques, des acides nucléiques et des lipides composent les EPS. La charge globale négative, la présence de domaines hydrophobes, la capacité de dispersion/agrégation des agrégats et les enzymes extracellulaires associées aux EPS confèrent aux agrégats des propriétés adsorbantes particulières et influencent la dispersion des polluants dans l'environnement.

Notre étude participe à une réflexion générale sur l'importance du domaine extracellulaire dans l'accumulation des composés organiques par les agrégats biologiques issus des stations d'épuration d'eaux usées urbaines.

Ainsi, nous avons analysé les acides gras des agrégats biologiques et des EPS extraits de ces agrégats afin de constituer un référentiel nouveau et déterminer la composition du domaine extracellulaire des agrégats : au moins 85 acides gras différents composent les phospholipides, les glycolipides, les lipides neutres et les lipopolysaccharides. Malgré la faible proportion d'acides gras mesurée dans les EPS (1,8 %), ces composés jouent certainement un rôle considérable dans les propriétés adsorbantes des agrégats. Par ailleurs, l'analyse des acides gras des phospholipides montre l'existence de micro-organismes comme des eucaryotes, des bactéries à gram-positif ainsi que des bactéries à gram-négatif, des bactéries sulfato-réductrices, des mycobactéries, des levures et des champignons dans un état plus stressé en période hivernale comme le montre la proportion plus importante d'acides gras insaturés. Par ailleurs, l'analyse des acides gras a permis de séparer les sédiments et les matières en suspension de rivière prélevés en amont et en aval de la zone de rejet des eaux épurées d'une station d'épuration.

Notre étude avait aussi pour objectif de créer en laboratoire des agrégats biologiques de propriétés définies par application de discontinuités en oxygène de courte durée. Cette étude a nécessité la standardisation des tests de mesure de l'hydrophobicité des agrégats par le test d'adhésion à l'octane et des EPS par chromatographie d'interaction hydrophobe. L'application de discontinuités en oxygène de courte durée ne semble pas suffisante pour affecter rapidement les caractéristiques physico-chimiques du domaine extracellulaire, même si quelques signaux sont mis en évidence : l'augmentation de la part d'EPS fortement retenus par un ligand hydrophobe, l'augmentation de la quantité de phospholipides des agrégats et l'augmentation de la proportion des acides gras 17:0 et 18:1 augmentent.

Enfin, nous avons quantifié l'adsorption par des boues activées de trois molécules organiques (sulfonate d'alkylbenzène linéaire (C_{11} -LAS), azocaséine et azoalbumine) et la réversibilité de l'adsorption de ces trois molécules. L'adaptation d'outil analytique (extraction en phase solide, chromatographie liquide haute performance) a permis l'analyse des sulfonates d'alkylbenzène dans les échantillons d'eaux usées et de rivière. Les agrégats biologiques sont capables d'adsorber rapidement les molécules organiques modèles du milieu aqueux : $<3 \mu\text{mol}$ d'azoprotéines et $18 \mu\text{mol}$ de C_{11} -LAS g^{-1} de matières organiques des agrégats. Nos résultats montrent que la désorption des C_{11} -LAS en eau de rivière est plus importante que celle de l'azocaséine (hystérésis fortement marquée) et la désorption de ces molécules modèles est faiblement affectée par la force ionique du milieu.

Aussi, les agrégats apparaissent comme des réservoirs et des vecteurs potentiels de polluants. Les polluants organiques associés aux agrégats biologiques peuvent être transportés et dispersés dans les milieux hydriques.

Mots clés : Acides gras, Adsorption, Agrégats biologiques, Azoportéines, Désorption, Exopolymères, Glycolipides, Lipides neutres, Lipopolysaccharides, Phospholipides, Sulfonate d'alkylbenzène, eaux usées, eau de rivière

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1

Ecole doctorale: Biologie, Santé et Environnement

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME)

UMR 7564 CNRS-Université Henri Poincaré, Nancy 1

Extension Pôle de l'Eau, 15 avenue du Charmois, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy (F)