

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé

Laboratoire des Sciences de l'Eau et de l'Environnement

THESE N° 2005-53

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline/Spécialité : Chimie et Microbiologie de l'Eau

Présentée et soutenue publiquement par

Sophie COMTE

Le 19 octobre 2005

**INTERACTIONS ENTRE DES EXOPOLYMERES EXTRAITS DE
BIOMASSES EPURATOIRES ET LES METAUX**

Directeurs de Thèse : Pr Michel Baudu et Dr Gilles Guibaud

JURY:

Rapporteurs

Mr BLOCK J.C.

Professeur, Université de Nancy, Faculté de Pharmacie

Mr ANDRES Y.

Maître de conférences HDR, Ecole des Mines de Nantes

Membres du jury :

Mr BAUDUM.

Professeur, Faculté des Sciences et Techniques de Limoges

Mr GUIBAUD G.

Maître de conférences HDR, Faculté des Sciences et Techniques de Limoges

Mme TUSSEAU-VILLEMIN M-H.

Chargé de recherche, Cemagref d'Antony

Mr VERNEUIL B.

Professeur, IUT du Limousin, Limoges

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire des Sciences de l'Eau et de l'Environnement (LSEE), il a pu être mené à bien grâce au support financier de la région Limousin. Il a été dirigé par le Professeur Michel Baudu et par le docteur Gilles Guibaud.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Michel Baudu, Directeur du LSEE, pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier Monsieur Gilles Guibaud pour sa disponibilité, la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel du laboratoire (étudiants, secrétaires, enseignants, chercheurs) que j'ai pu côtoyer durant ces trois années passées au Laboratoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I: BIBLIOGRAPHIE.....	6
I. Définition et origines des PEC.....	6
I.1 Définition	6
I.2 Contexte des PEC.....	6
I.2 a. Les boues activées	7
I.2 b. Les biofilms.....	7
I.3 Origines.....	8
I.4 Localisation, structure des PEC (solubles/liés)	9
I.5 Composition des PEC.....	12
II. Caractérisation physico-chimique des PEC	17
II.1 Composés élémentaires.....	17
II.2 Poids moléculaires	18
II.3 Constantes d'acidité	19
II.4 Charge de surface.....	20
II.5 Hydrophobicité	21
III. Extraction des PEC.....	22
III.1 Méthodes chimiques	23
III.2 Méthodes physiques	24
III.3 Comparaison des méthodes d'extraction	26
III.4 Critère(s) d'évaluation d'une méthode d'extraction des PEC.....	28
IV. Fonctions des PEC au sein des floes	30
IV.1 Rôle structurel des PEC.....	31
IV.1 a. Rôle de soutien pour les bactéries.....	31
IV.1 b. Rôle dans la floculation	31
IV.2 Rôle protecteur des PEC.....	34
IV.2 a. Rôle de barrière protectrice.....	34
IV.2 b. Rôle dans la rétention de l'eau.....	35
V. Propriétés des PEC vis-à-vis des métaux.....	36
V.1 Généralités sur la biosorption des métaux	36
V.2 Facteurs influençant la biosorption.....	36
V.3 Différents biosorbants.....	40
V.4 Les PEC et la biosorption	41
VI. Conclusion	44

Chapitre II: Extraction des PEC, conséquences sur leurs caractéristiques et leurs propriétés de biosorption	46
I. Introduction.....	46
II. Article n°1 :	48
Extraction of extracellular polymers (EPS) from activated sludge. Part I: Comparison of eight EPS extraction methods	Erreur ! Signet non défini.
III. Article n°2:.....	49
Extraction of extracellular polymers (EPS) from activated sludge. Part II: Consequences of EPS extraction methods on Pb and Cd complexation properties	Erreur ! Signet non défini.
IV. Article n°3:.....	50
Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation.	Erreur ! Signet non défini.
V. Conclusions	52
Chapitre III: Paramètres de biosorption des métaux	54
I. Introduction.....	54
II. Article n°4:	55
Metal removal from single and multimetallic equimolar systems by extracellular polymers extracted from activated sludges as evaluated by SMDE polarography,.....	Erreur ! Signet non défini.
III. Article n°5:	56
Complexation properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards four metals (Pb, Cd, Ni, Cu) for different pH values (4, 6, 8).....	56
IV. Conclusions.....	77
Chapitre IV: Structure des PEC, conséquences sur leurs propriétés de biosorption	78
I. Introduction.....	78
II. Article n°6:	79
Comparison of the complexation potential of Extracellular Polymeric Substances (EPS),extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel,....	Erreur ! Signet non défini.
III. Article n°7:.....	80
Biosorption properties of Extracellular Polymeric Substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or Bound	Erreur ! Signet non défini.
IV. Conclusion	82
DISCUSSION	83
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	88
REFERENCES BILIOGRAPHIQUES	91

INTRODUCTION GENERALE

Les boues biologiques sont des sous produits des stations d'épuration à boue activée dont est équipée la plupart des communes de France afin de traiter les eaux usées. Elles sont constituées d'un mélange d'eau et de matières sèches dans des proportions variables. En France, la production totale de boues urbaines est de 850 000 tonnes de matière sèche par an et devrait passer à 1,3 millions de tonnes d'ici fin 2005 du fait de l'application de la Directive européenne du 21 mai 1991 sur l'assainissement (Miquel, 2001).

Les trois principaux modes d'élimination des boues en France sont :

- la mise en décharge, dans 20 à 30% des cas. Cette voie sera bientôt totalement exclue, conformément à la loi du 13 juillet 1992 ;
- l'incinération, soit spécifique (il existe une quinzaine d'installations spécialisées d'incinération des boues en France), soit avec d'autres déchets. L'incinération représente 15 à 20% du tonnage ;
- l'épandage agricole, c'est-à-dire l'apport de boues sur des terres agricoles, soit 50 à 60% du tonnage. Cette filière est à pérenniser dans les années à venir dans la plupart des pays européens en raison de son moindre coût.

La présence de métaux lourds a été mise en évidence dans les boues. Leur importance est surtout liée aux effectifs (taille de la population raccordée au réseau assainissement), au type d'activités (les deux secteurs déterminants sont l'activité artisanale et l'activité industrielle) et aux eaux pluviales. Les métaux ou éléments traces métalliques (ETM) évoluent sous trois états physiques (Miquel, 2001) :

- l'état particulaire – matières solides décantables,
- l'état colloïdal – matières solides non décantables,
- l'état dissous.

A l'issu du traitement des eaux, les ETM se retrouvent dans leur grande majorité (70 à 90%) dans les boues produites. La rétention dans les boues dépend de la spéciation des métaux. Au total, les concentrations moyennes en éléments traces métalliques résiduaire domestiques françaises s'établissent comme présentées dans le

Tableau 1 (Miquel, 2001).

Tableau 1 : Teneur en éléments traces métalliques de boues (en mg/kg)

Eléments	Concentration limite en EMT définie par l'arrêté du 08/01/1998	Concentration moyenne dosée en EMT
Cadmium	20	5,3
Chrome	1000	80
Cuivre	1000	334
Mercurure	10	2,7
Nickel	200	39
Plomb	800	133
Sélénium	100	7,4
Zinc	3000	921

Source : Miquel, 2001

Aujourd'hui, pour garantir une innocuité de l'utilisation des boues pour l'environnement et la santé humaine, les réglementations sur l'épandage fixent des teneurs limites en métaux lourds ou plutôt certains métaux lourds. Mais il y a évidemment toujours une part d'inconnu, la pérennité de la filière « épandage agricole » impose une démarche qualité avec un travail important de recherche, de contrôle, et de suivi.

Les polymères extracellulaires (PEC) constituent une fraction massique importante de la biomasse épuratoire (Frolund *et al.* 1996) et de nombreuses études ont montré leur implication dans la sorption des métaux lourds. Ainsi, ils représentent quantitativement la partie la plus réactive des boues vis-à-vis des métaux en solution. Il nous a paru important de travailler sur des PEC isolés de leur milieu naturel afin d'avoir une approche des mécanismes qui gouvernent la fixation des métaux sur cette fraction de la biomasse. Si de nombreuses études sont disponibles sur les capacités des boues ou des micro-organismes à fixer des métaux lourds, les travaux concernant spécifiquement les propriétés de biosorption des PEC sont peu nombreuses. Plusieurs raisons peuvent être mises en avant : le manque de protocoles expérimentaux de référence pour leur extraction ; des méthodes empiriques de caractérisation ; la difficulté de mettre en œuvre des expérimentations de biosorption avec des composés difficiles à séparer simplement du milieu réactionnel... A travers une quantification des capacités de biosorption des PEC en lien avec leur caractérisation, cette étude doit permettre d'identifier la nature des fonctions chimiques principalement mises en cause lors de la biosorption des métaux. L'importance de certains facteurs sur les propriétés des polymères extracellulaires est également évaluée afin de mieux appréhender les mécanismes d'interaction métaux-PEC.

Les objectifs de cette étude sont poursuivis par d'une part une caractérisation des polymères extracellulaires extraits et d'autre part l'étude de la biosorption.

Dans un premier temps, des fonctions réactives présentes dans les PEC sont qualitativement caractérisées par des méthodes analytiques simples et largement employées dans la littérature. Des méthodes plus novatrices telles que le dosage des acidités de surface et la chromatographie d'exclusion stérique à haute pression (HPSEC) ont été envisagées. Dans le même temps, cette caractérisation doit donner lieu à l'évaluation de l'influence de la méthode d'extraction des polymères extracellulaires dans un souci de pouvoir par la suite comparer nos résultats avec ceux de la littérature et retenir une méthode adaptée à nos objectifs concernant l'étude des propriétés de biosorption des PEC.

Dans un second temps, une étude approfondie des capacités de biosorption des PEC doit nous permettre d'envisager le degré d'implication des fonctions réactives identifiées au sein des PEC et d'apporter des hypothèses de mécanisme de fixation des métaux dans les boues. La variation du pH du milieu et des métaux en présence sera utilisée pour mieux comprendre les interactions entre la surface des polymères et le métal en solution. La définition de polymères d'origines différentes en fonction de leur positionnement dans la structure floculée, est également utilisée pour mieux approcher les réactivités des familles chimiques présentes.

Le manuscrit est découpé en quatre chapitres.

Un premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle sont précisées tout d'abord la définition et les origines des PEC. Un point sur les caractéristiques physico-chimiques des PEC est ensuite présenté, suivi d'un état des lieux des méthodes d'extraction utilisées pour les PEC. Les fonctions des PEC au sein des flocs bactériens sont ensuite présentées et pour finir une synthèse sur les propriétés de biosorption des PEC vis-à-vis des métaux est proposée.

Les trois chapitres suivants présentent les résultats expérimentaux.

Les méthodes d'extraction présentées dans la littérature sont très variables rendant les comparaisons entre études difficiles. Ainsi, pour pouvoir se replacer dans la littérature, cette étude comporte un deuxième chapitre consacré à la comparaison de différents protocoles d'extraction et à la mise en évidence de leurs influences sur les caractéristiques physico-chimiques et les

propriétés de biosorption des composés extraits. Plusieurs méthodes d'extraction des PEC déjà existantes dans la littérature ont été sélectionnées pour cette étude à partir de critères tels que la fréquence d'utilisation de la méthode ou son aspect récent et novateur. Une caractérisation biochimique (à partir de dosages colorimétriques) utilisant des protocoles couramment employés dans la littérature a tout d'abord été utilisée. Par la suite, une titration acide-base pour obtenir des valeurs de pKa apparents des PEC est réalisée pour une caractérisation physico-chimique utile à la compréhension de la réactivité des PEC. Une étude par polarographie a permis de quantifier les capacités des polymères à la biosorption de métaux et d'observer l'impact de la méthode d'extraction des PEC utilisée. Le choix d'une méthode électrochimique de dosage des métaux libres en solution pour l'étude des capacités de biosorption des PEC semble être plus adaptée par rapport aux autres méthodes utilisant une séparation de phases (par centrifugation ou filtration sur 0.45 μm). Notre étude de biosorption s'est portée sur le plomb, le cadmium, le nickel et le cuivre sous forme dissoute car ils sont des polluants largement observés dans les eaux usées et aisément quantifiables par polarographie. De nombreux auteurs ont également étudiés ces éléments. La réactivité des PEC envers les métaux a été estimée à l'équilibre.

Dans un souci de mieux appréhender la réactivité des métaux envers les PEC, un troisième chapitre est consacré aux paramètres de biosorption des métaux. En effet, en fonction de certaines caractéristiques du milieu tels que la présence d'autres cations métalliques ou le pH, les propriétés de biosorption des PEC envers les métaux évoluent. Quatre métaux (Pb, Cd, Cu, Ni) susceptibles d'être retrouvés dans les boues activées ont été mis en solution en présence de PEC et par une étude polarographique, les propriétés de biosorption des PEC pour chaque métal ont été évaluées.

Des compositions différentes en polymères extracellulaires ont été recherchées et ont été reliées à leur capacité à fixer les métaux. Cette approche présentée dans un quatrième chapitre, doit mettre en lumière les conséquences de la structure chimique des PEC sur les propriétés de biosorption. Une première approche s'appuie sur la structure des PEC induite par les deux origines connues des PEC : une origine bactérienne et une origine due aux effluents. A travers des PEC issus de boues activées ou issus de souches pures bactériennes présentes dans les boues, une caractérisation physico-chimique et une comparaison des propriétés de biosorption des PEC ont été menées. Une seconde approche s'appuie sur une théorie développée par plusieurs auteurs sur la structure dite « soluble » ou « liée » des PEC. La définition des PEC « solubles » et des PEC « liés » étant souvent controversée, cette étude a défini les deux types de PEC à partir de leur protocole d'extraction. Une caractérisation physico-chimique et une comparaison des propriétés de biosorption de ces deux types de PEC ont été réalisées.

Les trois chapitres de résultats intègrent les publications réalisées sur les différents points. Une introduction à chacun des chapitres précède les articles et ensuite une synthèse est proposée. Une discussion sur les trois chapitres de résultats permet de mettre en lien tous les résultats de cette étude.

Une conclusion générale reprend les principales conclusions de cette étude en insistant sur les avancés concernant la connaissance des PEC et leurs propriétés à fixer les métaux. Des perspectives à ce travail sont avancées.

Chapitre I: BIBLIOGRAPHIE

I. Définition et origines des PEC

I.1 Définition

Les polymères sont définis par l'International Union of Pure and Applied Chemistry comme étant des macromolécules formées par la répétition d'un ou plusieurs atomes ou groupes d'atomes liés les uns aux autres en nombre suffisant pour entraîner une série de propriétés qui ne varient pas d'une façon significative par addition ou suppression de plusieurs unités constitutives. Leur arrangement dans l'espace peut être linéaire, bi ou tridimensionnel. Ils peuvent porter des groupements organiques ou inorganiques sur leur structure principale.

Cette étude porte sur les polymères extracellulaires (PEC) extraits de flocs bactériens constituant les boues activées. Ils ont la particularité d'être issus principalement de la matière vivante, ce sont des biopolymères. De plus par définition, les PEC sont situés à l'extérieur des cellules bactériennes. Ils constituent une matrice dans laquelle les micro-organismes sont plus ou moins immobilisés (Liu et Fang, 2003). Des analyses faites par microscopie électronique révèlent une distribution hétérogène des PEC autour des cellules bactériennes (Jorand *et al.* 1995). La composition des PEC est le résultat de différents processus et de ce fait, elle varie énormément dans la littérature en quantité et en qualité. L'abréviation anglaise EPS pour « Extracellular Polymeric Substances » est la plus communément utilisée dans la littérature. Parfois, EPS peut aussi désigner « Extracellular Polysaccharide », dans ce cas les polysaccharides sont les composants les plus abondants des EPS. Dans la suite de ce manuscrit, les deux termes PEC et EPS (pour « Extracellular Polymeric Substances ») désignent la même entité et seront utilisés sans distinction.

I.2 Contexte des PEC

Une grande majorité de micro-organismes vivent et évoluent sous forme d'agrégats à la base des biofilms, des flocs de boue activée ou des granules. On trouve donc des PEC issus de boues activées, de granules mais aussi issus de biofilms ou directement produits par une souche pure bactérienne cultivée en laboratoire.

I.2 a. Les boues activées

Le traitement des eaux usées par boue activée repose en grande partie sur l'aptitude à la séparation entre la biomasse floculée et l'eau épurée. Toutefois, dans ce système biphasique, la phase solide présente une forte complexité que ce soit du point de vue physique ou biologique et sa caractérisation fait l'objet de nombreuses études. Cette phase solide est organisée en floccs dans le cas d'un traitement par boues activées, c'est-à-dire en une structure peu dense et hétérogène.

Les floccs résultent de l'agrégation de différents constituants présents dans la liqueur mixte (= mélange boues activées et eaux usées) : des microorganismes (bactéries essentiellement, protozoaires, virus), des particules inorganiques (silicates, oxydes ferriques, phosphate de calcium...), des cations multivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) et des PEC qui assurent la cohésion de l'ensemble (Urbain *et al.* 1993). Les microorganismes d'un type spécifique forment des microcolonies individuelles cimentées par des PEC. A pH neutre, les floccs présentent une charge globale négative et résultent d'interactions complexes entre les différents composants. L'aptitude à la séparation entre la biomasse et l'effluent traité dépend fortement des propriétés physiques des floccs.

Les PEC forment une grande part de la fraction organique composant les floccs (Frolund *et al.* 1996). Ces mêmes auteurs considèrent que les PEC peuvent représenter jusqu'à 60% de la fraction organique d'une boue, alors que la biomasse cellulaire ne représente que jusqu'à 20% de cette même fraction. En terme de pourcentage massique par rapport à la teneur en matières solides, Urbain *et al.* (1993) estiment que les PEC représentent environ 15% de la masse en suspension alors que Frolund *et al.* (1996) situent ce pourcentage entre 20 et 25%.

I.2 b. Les biofilms

La littérature a permis de faire beaucoup de rapprochements entre les PEC issus de boues activées et les PEC issus de biofilms (Wingender *et al.* 1999). Aussi dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux PEC issus de boues activées et nous ne ferons pas de distinctions entre les PEC issus de boues activées et les PEC issus de biofilms.

Une large majorité de microorganismes vivent et se développent en formant des agrégats tels que les biofilms et les floccs (que l'on peut aussi appeler « biofilms planctoniques ») (Wingender *et al.*, 1999). Dans ces systèmes, les microorganismes sont inclus dans une matrice de PEC. La production des PEC est généralement propre aux microorganismes présents dans les milieux naturels tels que les procaryotes (bactéries) et les eucaryotes (algues, champignons...).

Les biofilms du milieu naturel contiennent une population mixte de microorganismes procaryotes et eucaryotes. Un biofilm est une couche de microorganismes contenus sur une matrice solide, se formant au niveau des interfaces telles que les interfaces solide-eau, eau-huile, eau-air, solide-eau et solide-air. Les PEC sont des composants déterminants pour les propriétés physicochimiques et biologiques des biofilms. En général, la proportion de PEC dans les biofilms peut varier entre 50 et 90% de la matière organique totale (Nielsen *et al.* 1997).

I.3 Origines

Les PEC peuvent avoir deux origines : une origine bactérienne, avec soit des molécules issues du matériel bactérien soit des molécules issues de la sécrétion bactérienne ou une origine liée à l'adsorption de molécules présentes dans l'environnement proche des biofilms ou floes (Wingender *et al.* 1999).

En ce qui concerne l'origine bactérienne des PEC, ces derniers peuvent résulter d'une sécrétion active des bactéries ou de molécules issues de la lyse bactérienne (molécules intracellulaires ou molécules impliquées dans la construction des membranes cellulaires bactériennes). Quelque soit la voie de formation des PEC ayant une origine bactérienne, la composition des PEC est directement liée à/aux espèce(s) bactérienne(s) présente(s). La production de PEC par les cellules bactériennes commence dans leur phase endogène (mitose) et varie selon leur phase de croissance (Pavoni *et al.* 1972). Les PEC produits par des bactéries isolées à partir de boues activées et cultivées sur un substrat simple peuvent se trouver sous deux formes : soit sous forme de matériel visqueux (ou mucilage) qui se répartit autour des cellules sans leur être attaché ou soit sous forme de capsules (ou micro-capsules) qui adhèrent à la cellule bactérienne.

En ce qui concerne l'origine autre des PEC, elle est principalement liée à la biosorption de molécules organiques issues des effluents traités. Ces derniers ont une composition fluctuante liée aux types d'eaux usées, aux charges des stations d'épuration et peuvent contenir en plus de la matière organique, des micropolluants, des nitrates et des phosphates (Sponza 2002).

Plusieurs auteurs (Robinson *et al.* 1984 ; Evans *et al.* 1994 ; Woolfaardt *et al.* 1999) se sont intéressés à la relation que l'on pourrait établir entre le taux de PEC produits et la consommation bactérienne de substrats. Cette production de PEC varie en fonction des espèces bactériennes considérées. Sheintuch *et al.* (1986) proposent un modèle pour l'adsorption du substrat et la production des PEC qui rend compte des différentes étapes de la croissance

bactérienne. Characklis et Marshall (1990) ont présenté une analyse du taux de formation des PEC par *Pseudomonas aeruginosa* quand la cinétique de formation des PEC obéit à l'équation de Leudeking-Piret. Pour Laspidou et Rittman (2002), l'utilisation de ce modèle n'est pas apparue satisfaisante car pour une même espèce bactérienne, on note différentes valeurs de production des PEC. D'autres auteurs (Hsieh *et al.* 1994a, b) ont étudiés la cinétique de formation des PEC et ont mis au point un modèle mécanistique afin d'exprimer la production de PEC. Ce modèle tient compte de l'origine et de la structure des PEC.

D'après Liu et Fang (2002b), les facteurs environnementaux qui peuvent généralement influencer la production et la composition des PEC sont classés en deux catégories : d'une part, les changements de conditions environnementales engendrant une adaptation de la communauté microbienne. Ainsi le nombre de bactéries produisant des PEC augmenterait ou diminuerait en fonction de l'adaptation des bactéries à leur nouvel environnement. D'autre part, les changements de conditions environnementales engendrant une adaptation des bactéries à travers une modification de leur métabolisme de production des PEC. Cependant, il n'a pas été démontré si les gènes portant sur la production des PEC s'expriment avant ou après l'agglomération des bactéries en granules ou colonies c'est-à-dire si les bactéries produisent les PEC en premier lieu puis adhèrent les unes aux autres ou si elles s'associent d'abord puis produisent des PEC.

I.4 Localisation, structure des PEC (solubles/liés)

De part leur définition, les PEC sont situés à l'extérieur des cellules bactériennes. Cependant, certains auteurs (Hsieh *et al.* 1994 ; Higgins et Novak, 1997a, b ; Nielsen *et al.* 1997 ; Laspidou et Rittmann, 2002 ; Wilen *et al.* 2003...) apportent une nuance dans la localisation des PEC. Les PEC sont la plupart du temps associés à une phase solide donc ils sont insolubles. Cependant, l'association des PEC avec une phase solide n'est pas toujours totale. Certains auteurs subdivisent alors les PEC en deux catégories : les PEC liés et les PEC solubles. Les PEC liés seraient au plus près des cellules bactériennes, parfois même attachés aux cellules, ils les entoureraient et dans leur composition, on trouverait des éléments constitutifs de la paroi des bactéries. Les PEC solubles seraient les PEC libres. Mais en fait plusieurs théories ont été avancées dans la littérature avec des définitions contradictoires des PEC solubles et des PEC liés ainsi que sur leurs origines.

La différence de composition chimique des PEC pourrait expliquer que certains PEC soient liés et d'autres solubles (Zevenhuizen and Faleschini, 1991 ; Breedveld *et al.* 1990).

Higgins et Nowak (1997a) ont identifié parmi la fraction protéique des PEC une molécule aux propriétés de lectine. D'après ces auteurs, cette « lectine-like » serait liée aux bactéries. Cependant il peut arriver que les PEC liés et les PEC solubles aient une composition chimique similaire (Whitfield, 1988). Les différences entre les PEC liés et les PEC solubles pourraient alors être associées aux mécanismes d'adsorption et de désorption des PEC au niveau de la matrice entourant les bactéries (Nielsen *et al.* 1997). Dans ce cas, l'environnement ionique et particulièrement la présence de cations di- et tri-valents influencerait de manière importante les proportions de PEC solubles et de PEC liés.

Pour plusieurs auteurs tels que Hsieh *et al.* (1994), Higgins et Novak (1997a, b), Wingender *et al.* (1999), Nielsen *et al.* (1999), la définition des PEC liés comprend les composants gainant des bactéries, les polymères capsulaires, « slime », les polymères détachés des bactéries et les composants organiques attachés aux bactéries. La définition des PEC solubles comprend toutes les macromolécules solubles, les colloïdes et les « slimes ». La Figure 1 illustre cette classification selon les caractéristiques des PEC. Wingender *et al.* (1999) ajoutent cependant que les définitions de capsule et de « slime » sont différentes selon que l'on se place dans un système naturel tel que les boues ou dans un système de culture pure de bactéries en laboratoire. Dans un système de culture pure (Decho, 1994): les « slimes » correspondent à un groupement de molécules détachées des bactéries mais elles ne sont pas dissoutes, les polymères solubles sont sous forme colloïdale.

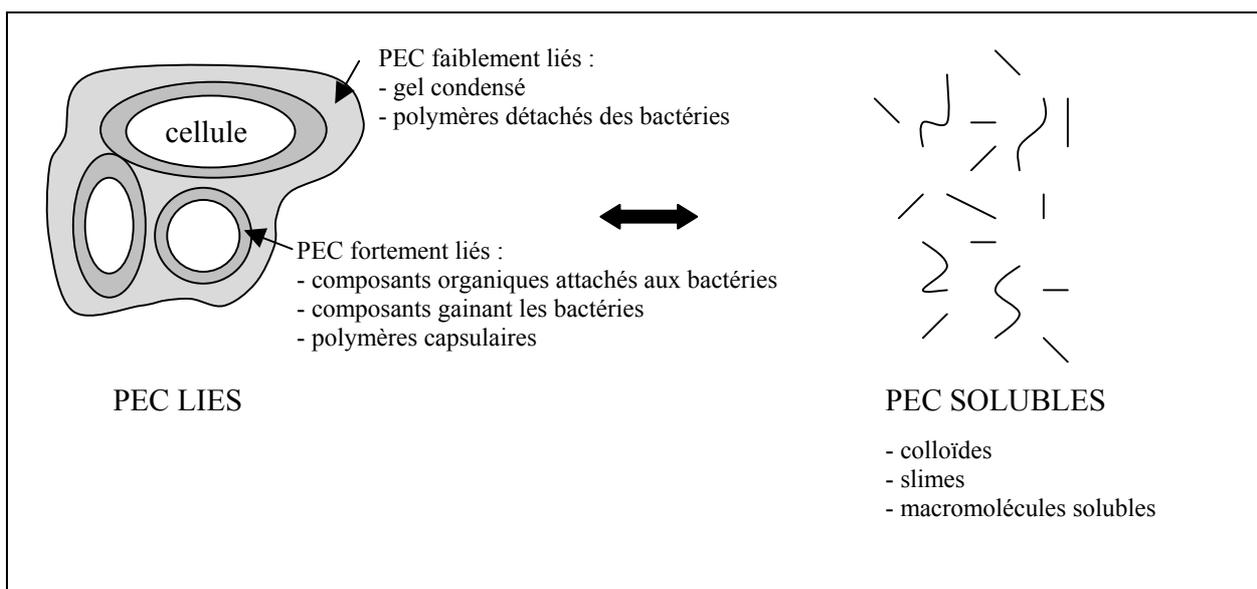


Figure 1: Schéma théorique permettant de localiser les PEC solubles/liés s'appuyant sur la caractérisation des PEC d'après Wingender *et al.* (1999)

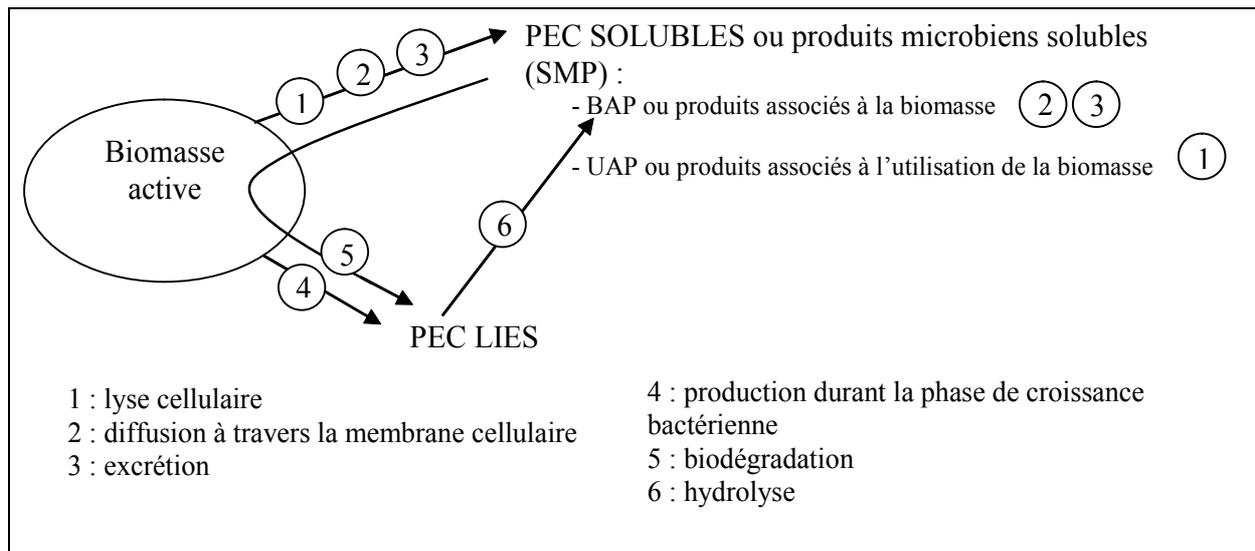


Figure 2 : Schéma théorique permettant de localiser les PEC solubles et liés s'appuyant sur l'origine des PEC d'après Laspidou et Rittmann (2002)

Laspidou et Rittmann (2002) proposent une autre définition des concepts de PEC liés et PEC solubles qui s'appuie sur la théorie des produits microbiens solubles (SMP) et sur l'origine des PEC. Les SMP seraient des composants cellulaires solubles qui sont relargués à la suite de lyse cellulaire, des composés qui diffusent à travers la membrane cellulaire, qui sont perdus durant une synthèse ou des composés excrétés pour différentes raisons (exemple : protection contre un agresseur tels que les métaux lourds) (Namkung et Rittmann, 1986). Ils se divisent en deux catégories : les produits associés à la biomasse (BAP) et les produits associés à l'utilisation de la biomasse (UAP). Les BAP représentent la fraction des SMP issue de la dégradation de la biomasse tandis que les UAP représentent la fraction des SMP issue du métabolisme et du développement de la biomasse.

Laspidou et Rittmann (2002) ont remarqué que les PEC et les SMP sont des produits organiques microbiens qui contiennent des électrons et du carbone, et ils ne constituent pas des cellules actives. Aussi ils ont proposé une théorie qui rassemble ces deux types de produits microbiens en s'appuyant sur différents modèles s'attachant à décrire la cinétique de formation des PEC et des SMP. Dans cette nouvelle théorie, les PEC solubles et les PEC liés sont définis par rapport à leur origine (Figure 2). Les PEC solubles sont en fait les SMP constitués des BAP et UAP. Ils sont biodégradables. Les PEC liés seraient synthétisés par les cellules bactériennes durant leur période de croissance proportionnellement à la quantité de substrat qu'elles utilisent ou seraient le résultat de l'association de différentes molécules telles que les résidus de SMP (ou

PEC solubles) biodégradés. Les PEC liés seraient en partie attachés à la biomasse inerte et en partie en relation avec les cellules bactériennes actives. Les produits de l'hydrolyse des PEC liés formeraient les BAP.

Cependant, Aquino et Stuckey (2004) proposent une variante à la théorie de Lapidou et Rittmann (2002). D'après leurs résultats, les SMP seraient aussi constitués de PEC liés. Pour ces auteurs, les SMP seraient constitués de PEC (solubles et liés), de produits issus de leur hydrolyse, de composés intracellulaires de haut poids moléculaire provenant de la lyse cellulaire, et aussi de composés excrétés par les microorganismes afin de neutraliser des métaux et des toxiques organiques présents dans l'environnement des biofilms. Les BAP seraient issus de PEC liés hydrolysés mais seraient aussi composés de molécules intracellulaires de haut poids moléculaire provenant de la lyse cellulaire.

Il faut ajouter le fait que l'état physique des PEC est dépendant de plusieurs paramètres environnementaux tels que le pH et la présence de cations disponibles (Nielsen *et al.* 1997). Certains auteurs (Wingender *et al.* 1999 ; Liu and Fang, 2003) proposent donc de définir les PEC solubles et les PEC liés à partir de leur protocole d'extraction. Ainsi les PEC solubles sont les PEC qui nécessitent un traitement minimum afin de les séparer des cellules bactériennes tandis que les PEC liés sont les PEC qui pour leur extraction ont nécessité l'emploi de méthodes plus drastiques, tenant ainsi compte du fait que les PEC liés seraient plus difficiles à séparer des cellules bactériennes. Pour cette étude, nous retiendrons cette dernière définition des PEC « solubles » et « liés ».

I.5 Composition des PEC

Les PEC rassemblent plusieurs familles biochimiques de molécules organiques telles que les sucres ou polysaccharides et les protéines (ces deux composants étant le plus souvent majoritaires) puis les substances humiques, les acides uroniques, les (phospho)lipides, les acides nucléiques en plus petites quantités (Frolund *et al.* 1996). L'utilisation du terme « substance humique » est ici un peu abusive puisqu'il ne s'agit pas exclusivement de substances issues du sol mais il est couramment utilisé dans la littérature concernant les PEC. Les auteurs parlent de « humic-like substances » en anglais. Aussi nous précisons ici que l'emploi de la dénomination « substances humiques » des PEC est caractérisé par le protocole utilisé pour les doser décrit par Frolund *et al.* (1995). Il en va de même pour les acides uroniques que l'on peut appeler « uronic-like substances » et dont le dosage est décrit par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973). Le

dosage des acides nucléiques s'appuie sur une complexation des réactifs avec le sucre en C5 porté par les acides nucléiques désoxyribose et ribose. Aussi dans la littérature il est souvent indiqué le taux d'ADN dosé par le protocole de Burton (1956) de manière abusive, car en fait les ARN et ADN sont dosés simultanément avec ce protocole.

Wingender *et al.* (1999) et Liu et Fang (2003) ont rassemblé les principales données de la littérature en ce qui concerne la composition des PEC. Ces données montrent une grande disparité dans la répartition des constituants des PEC. Les PEC peuvent aussi contenir des groupements de faible masse moléculaire tels que des cations divalents. Ces groupements peuvent d'ailleurs altérer ou changer la structure et les propriétés physicochimiques des PEC.

D'une manière générale, la littérature rapporte des compositions de PEC très hétérogènes liées au fait que les PEC étudiés sont issus de floes de boues activées, de granules de boue anaérobie, de biofilms ou de la production de cultures pures de bactéries en laboratoire. Le Tableau 2 illustre le fait que la composition des PEC varie en fonction de l'origine des PEC.

Tableau 2 : Influence de l'origine des PEC extraits avec des résines sur leur composition

Système	Composition des PEC (mg.g ⁻¹ MVS)					Référence
	Protéines	Polysaccharides	ADN	Acides Uroniques	Substances Humiques	
Granules de boue anaérobie	73	11	/	/	/	McSwain <i>et al.</i> 2005
Biofilm de réseau d'assainissement	200	40	22	3	24	Martin-Cereda <i>et al.</i> 2001
Boues activées	162	12,7	11,2	4,5	/	Bura <i>et al.</i> 1998
Boues activées	243	48	/	6,1	126	Frolund <i>et al.</i> 1996
Boues activées	17,6	12,7	0,14	1,2	16,4	Liu et Fang 2002a

Liu *et al.* (2004) ainsi que Sponza (2002) rappellent que la composition des PEC est aussi liée aux caractéristiques des eaux usées servant de substrat aux bactéries. Le Tableau 3 montre une composition des PEC variant en fonction du type d'effluent. Si ces eaux contiennent beaucoup de protéines ou de polysaccharides, les PEC en contiendront aussi beaucoup et dans les mêmes proportions.

Tableau 3 : Influence de la nature des eaux usées sur la composition des PEC issus de boues activées et extraits au glutaraldéhyde associé à une centrifugation (Sponza, 2002)

Types d'effluents traités par traitement biologique dont sont issus les PEC	Composition des PEC en mg.g ⁻¹ MVS de boue		
	Protéines	Polysaccharides	ADN
Industrie chimique	48	17	10
Industrie du cuir	47	27	12
Industrie de la teinture	42	26	13
Industrie du vin	70	17	5,8
Station d'épuration urbaine	71	17	6,6

D'autres auteurs (Bura *et al.* 1998) ont mis en évidence l'influence du temps de stockage des boues sur la composition des PEC. Le Tableau 4 montre qu'après 24h, on observe une dégradation des composants des PEC, particulièrement de l'ADN et des sucres.

Tableau 4 : Effet du temps de stockage des PEC sur leur composition

Composants des PEC	% récupéré dans les PEC		
	1 jour, 4°C	10 jours, 4°C	30 jours, -20°C
Protéines	99,1	72,2	69,1
Polysaccharides	91,1	60,6	49,4
ADN	90,7	44,4	37,7

Plusieurs travaux (Wingender *et al.* 1999) sur les PEC se sont limités à l'étude des sucres qui sont réputés les constituants principaux des PEC de cultures pures ou de biofilms. De récentes études ont mis en avant le fait que les protéines étaient les constituants prédominants des PEC dans les systèmes à cultures bactériennes variées tels que les boues activées (Brown and Lester, 1980 ; Dignac *et al.* 1998 ; Sponza, 2003). Les exopolysaccharides portent souvent des substituants organiques tels que les groupements acétyles, succinyles ou pyruvyles et parfois des substituants inorganiques tels que les groupements sulfates. Les protéines peuvent être glycosylées avec des oligosaccharides et former alors des glycoprotéines, ou peuvent être associés à des lipides et on obtient ainsi des lipoprotéines. Le Tableau 5 et le

Tableau 6 illustrent la composition des PEC en sucres neutres et en acides aminés contenus dans la fraction polysaccharidique et protéique respectivement des PEC (Dignac *et al.* 1998).

Tableau 5 : Exemple de composition en sucres neutres des PEC issus de boues activées (Dignac *et al.* 1998)

Composition en sucres neutres	PEC extraits par sonication	PEC extraits par sonication + résine
	Quantité de sucre neutre/ Quantité total de sucres dans les PEC en %	
Rhamnose	13,7	15,3
Fucose	6,7	6,1
Ribose	13,9	4,8
Arabinose	4,6	4,7
Xylose	2,6	3,3
Mannose	10,8	14,0
Galactose	14,9	16,9
Glucose	32,9	34,9

D'après Dignac *et al.* (1998), la composition en monosaccharide des PEC provient :

- pour les hexoses (mannose, galactose) principalement d'excrétion bactérienne car ils sont spécifiques de la sécrétion bactérienne de culture pure.
- pour les pentoses (rhamnose et ribose) principalement de la lyse cellulaire car le rhamnose est un constituant des lipopolysaccharides contenus dans la paroi des bactéries gram négatif tandis que le ribose est un produit de l'hydrolyse des ARN contenues dans les bactéries.
- pour le glucose principalement de l'effluent qui peut contenir des polymères de glucose tel que la cellulose.

Tableau 6 : Exemple de composition en acides aminés des PEC issus de boues activées (Dignac *et al.* 1998)

Composition en acides aminés	PEC extrait par sonication	PEC extrait par sonication + résine
	Quantité de sucre neutre/ Quantité total de sucres dans les PEC en %	
Acide glutamique	12,4	12,0
Acide aspartique	11,7	12,8
Lysine	6,6	4,6
Thréonine	6,2	6,6
Arginine	6,1	4,8
Sérine	5,1	5,0
Tyrosine	3,8	3,8
Histidine	2,7	2,4
Alanine	8,2	8,8
Leucine	7,5	8,1
Glycine	7,3	7,5
Valine	6,4	7,2
Proline	5,4	4,9
Isoleucine	4,7	5,1
Phénylalanine	3,7	4,5
Méthionine	2,0	2,2

Jorand *et al.* (1998) proposent qu'une grande quantité de PEC issus de boues sont des glycoprotéines. On peut aussi trouver des lipopolysaccharides spécifiques de la sécrétion de bactéries gram-négatives (Cadieux *et al.* 1983). Les polysaccharides et les protéines sont le plus souvent issus de la sécrétion bactérienne.

Les acides nucléiques seraient produits par les bactéries durant leur croissance mais il n'a pas été clairement établi si leur présence au sein des PEC est due à une sécrétion active des bactéries ou à un relargage passif dû à l'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire (Lorentz et Wackernagel, 1994).

Les substances humiques sont supposées être le résultat d'une dégradation enzymatique partielle de plusieurs biopolymères et la condensation (« repolymérisation ») par des procédés abiotiques spontanés et des procédés enzymatiques de petites molécules organiques obtenues après dégradation (Hedges 1988). D'après Riffaldi *et al.* (1982), les acides humiques des boues dont sont issus les PEC apparaissent plus aromatiques et/ou constitués par de plus petites particules que les acides humiques issus des sols.

La présence des acides uroniques et des lipides contenus dans les PEC, si ces derniers sont parfois dosés, est rarement discutée.

II. Caractérisation physico-chimique des PEC

II.1 Composés élémentaires

Les PEC sont des composés organiques et de ce fait quelques auteurs ont déterminé la concentration en carbone organique de leurs PEC, leurs taux d'azote et leurs taux de phosphore. La littérature donne peu ou pas de données concernant le taux de phosphore ou d'azote des PEC même si leur présence est souvent évoquée. La fraction organique se détermine par exemple en utilisant un COTmètre. Goodwin et Forster (1989) présentent des pourcentages de carbone (par rapport au total) pour différentes fractions de PEC caractérisées par leur poids moléculaire. Ils ont ainsi mis en évidence que la fraction la plus riche en carbone (entre 40 et 60%) est la fraction dont les poids moléculaires sont inférieurs à 5.10^2 Da. Or le plus souvent dans la littérature les fractions riches en carbone se trouvent être celles de plus haut poids moléculaire. En effet, Forster (1985) identifie que 60% du carbone est dans la fraction comportant un poids moléculaire de 1.10^5 Da. Ce qui différencie particulièrement l'étude de Goodwin et Forster (1989) de celle de Forster (1985) est la méthode d'extraction des PEC utilisée. La mesure du pourcentage de carbone dans les différentes fractions de poids moléculaire peut alors apporter des informations sur l'impact de la méthode d'extraction des PEC. Guibaud *et al.* (2003) ont mesuré le taux de carbone organique total et en ont déduit que les PEC extraits contenaient 19 à 44% de composés minéraux. Dignac *et al.* (1998) notent que 70 à 80% du carbone organique des PEC issus de boues activées peuvent être attribués aux protéines et aux sucres.

II.2 Poids moléculaires

La structure des PEC est relativement peu connue et particulièrement l'influence du poids moléculaire des PEC sur leurs propriétés. La détermination des poids moléculaires des PEC a tout d'abord été menée en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique à faible pression (SEC). Le nombre de pics détectés était le plus souvent de deux ou trois avec des poids moléculaires compris entre 10^3 et 10^6 Da (Karapanagiotis *et al.* 1989; Goodwin et Forster, 1989). Puis l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique à haute pression (HPSEC) a révélé que les PEC pouvaient être séparés selon un profil chromatographique constitué de sept pics (Frolund *et al.* 1994). Le profil chromatographique en poids moléculaire des PEC peut être considéré comme une « empreinte digitale » des PEC et peut rendre compte dans certains cas de leurs propriétés hydrophobes. Outre une meilleure séparation des molécules, l'utilisation de l'HPSEC présente l'avantage d'offrir un temps de séparation des molécules qui soit court (entre 15 et 20 min) par rapport à la SEC (temps de séparation : plusieurs heures). Ainsi les PEC n'ont pas le temps de s'altérer.

Frolund *et al.* (1996) ont utilisé le profil chromatographique des PEC afin d'optimiser une méthode d'extraction des PEC basée sur l'emploi de résines échangeuses de cations (optimisation du temps d'extraction). Récemment Liu *et al.* (2001) ont caractérisé leurs PEC par SEC (gel Sephadex) et ont ainsi mis en évidence une variation dans la distribution de leurs trois fractions de poids moléculaire ($<10^3$, entre 10^3 et 10^4 , $>10^4$ Da) en fonction du taux d'ozonation de la boue dont sont issus les PEC. Gorner *et al.* (2003) ont combiné l'utilisation de l'HPSEC avec la micro-spectroscopie infra-rouge. Ils ont ainsi conclu que les protéines de leurs PEC (issus de boues activées) avaient un poids moléculaire compris entre $4,5 \cdot 10^4$ et $6,7 \cdot 10^5$ Da, avec une majorité de macromolécules entre $6,7 \cdot 10^4$ et $2,0 \cdot 10^5$ Da. Les polysaccharides étaient de très petite taille ($<10^3$ Da). Garnier *et al.* (in press 2005) ont aussi étudié le poids moléculaire et la composition biochimique de PEC issus de plusieurs boues activées. Les résultats indiquent que le poids moléculaire des protéines contenues dans les différents PEC varie de 10^3 Da à $6,0 \cdot 10^5$ Da tandis que le poids moléculaire de tous les polysaccharides est inférieur à 10^3 Da. L'association de différentes molécules observée par micro-spectroscopie infra-rouge telle que l'association d'une protéine associée à un polysaccharide implique la présence de polymères de poids moléculaire élevé. Horan et Eccles (1986) se sont intéressés aux liens existant entre poids moléculaires des PEC et rôle de ces derniers. Ils ont travaillé entre autre sur la distribution des poids moléculaires de polysaccharides extracellulaires provenant de cinq boues différentes. Les PEC de haut poids moléculaire ont leur masse qui varie de $3 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^6$ Da.

II.3 Constantes d'acidité

Les constantes d'acidité pour les PEC ont peu été étudiées dans la littérature. Liu et Fang (2002a) ont cependant déterminé des valeurs de pKa pour deux sortes de PEC en se basant sur les méthodes développées pour les solides et en ajustant les valeurs avec une méthode de programmation linéaire FITEQL (Brassard *et al.* 1990). En effet, les techniques concernant l'analyse des sites composés de groupements ionisables ont le plus souvent été développées pour la caractérisation des solides et s'appuient sur une titration acide-base (Kramer *et al.* 1991 ; Schindler and Stumm, 1987). Les analyses de Liu et Fang (2002a) ont permis d'identifier cinq ou six types de groupement ionisable avec des valeurs de pKa comprises entre 3 et 11 pour des PEC issus de deux écosystèmes bactériens différents : une boue produisant du dihydrogène (HPS) et un biofilm réduisant les sulfates (SRB). Les valeurs de pKa de ces sites, leur identification à des groupes fonctionnels et leur concentration sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Valeur de pKa et concentration des sites de groupement ionisable dans les PEC (Liu et Fang 2002a)

Fonctions ionisables	PEC issus du procédé HPS		PEC issus du procédé SRB	
	pKa	Concentration (mmol.g ⁻¹ -PEC)	pKa	Concentration (mmol.g ⁻¹ -PEC)
Carboxylique	4,8	2,81	4,4	6,49
Carboxylique/phosphorique	6,0	0,76	6,0	2,35
Phosphorique	7,0	0,26	7,4	0,79
Sulphydyle	/	/	8,2	0,55
Amine/phénolique	9,8	2,00	9,4	1,38
Hydroxyle	11,0	5,05	11,0	4,88

Ces valeurs apportent des précisions quant à la capacité des PEC à se lier à d'autres composés en fonction du pH du milieu. On remarque que les sites hydroxyles et carboxyliques sont présents en quantité majoritaire.

II.4 Charge de surface

Au pH proche de la neutralité, les PEC portent des charges négatives dues à l'ionisation de certains groupes fonctionnels anioniques tels que les groupements carboxyliques et phosphoriques. Les PEC peuvent donc être caractérisés par un potentiel zeta ou une charge de surface.

Les méthodes existantes pour l'estimation de la charge de surface des PEC sont au nombre de trois. On peut utiliser la détermination du potentiel zeta (ou la mobilité électrophorétique), la titration acide-base ou la titration par des colloïdes (Tiravanti *et al.* 1985 ; Morgan *et al.* 1990). La mesure du potentiel zeta est basée sur la mobilité électrophorétique des PEC soumis à un champ électrique (Forster, 1968). Les mesures du potentiel zeta ne peuvent être pratiquées que sur un petit nombre de particules et peuvent ne pas être représentatives de tous les PEC.

On peut aussi noter que le potentiel zeta mesure le potentiel au plan de cisaillement, au niveau de la couche diffuse à la surface des particules. Ce potentiel mesuré est fonction mais non identique au potentiel de surface.

La détermination de la charge de surface par titration acide-base donne une mesure du nombre total des groupements ionisables présents à la surface d'une suspension c'est-à-dire pour une titration acide des groupements ionisés, des groupements acides faibles (qui contribuent faiblement à la charge de surface) et des groupements basiques faibles (qui ne contribuent pas à la charge de surface). Les charges de surface relatives aux groupements fortement acides sont sous-estimées dans cette méthode mais dans le cas de l'utilisation de la titration pH pour des particules perméables (cas des PEC), la titration ne se limite pas à la surface. La méthode par titration acide-base donne le plus souvent une estimation des charges de surface au pH proche de la neutralité plus élevée que par titration colloïdale.

La détermination de la charge de surface par titration colloïdale s'appuie sur une réaction stochiométrique entre les charges de surface de la suspension et des réactifs polymériques standard. La suspension contenant des groupements de surface négatifs et positifs est titrée avec des polymères anioniques et des polymères cationiques. Les charges avec des contre-ions fortement associés ne peuvent pas être titrées et peuvent ainsi induire une sous-estimation de la charge de surface.

Dans la littérature peu de données concernent le potentiel zeta ou la charge de surface des PEC. Cependant Morgan *et al.* (1990) ont mesuré par titration colloïdale la charge de surface des PEC (à un pH proche de la neutralité) issus de plusieurs boues et ont obtenu des valeurs comprises

entre $-0,203$ et $-0,930\text{meq.g}^{-1}$ de PEC. Mikkelsen (2003) confirme ces résultats et obtient une charge de surface des PEC issus de boues avec la même méthode que précédemment de $-0,51\text{meq.g}^{-1}$.

En conclusion, il n'existe pas une méthode de référence dans la détermination des charges de surface des PEC (à un pH proche de la neutralité) aussi les résultats rapportés par plusieurs auteurs varient de par leur ordre de grandeur. Cependant Mikkelsen (2003) a comparé l'utilisation des trois méthodes et en a conclu que la titration colloïdale était la plus appropriée pour la détermination de la charge de surface des PEC.

II.5 Hydrophobicité

Il n'existe pas de mesure absolue pour l'hydrophobicité. Cette dernière est mesurée de manière relative à partir de méthode telles que la détermination d'un angle de contact (Liao *et al.* 2001), ou à partir de la mesure de l'adhésion bactérienne sur des hydrocarbures (BATH) (Boyette *et al.* 2001), la mesure de l'agrégation de sels (Lindahl *et al.* 1981 ; Martin-Cereda *et al.* 2001) ou à partir de la mesure de précipitation du composé sous forme acide suivi de l'adsorption par une résine hydrophobe (Jorand *et al.* 1998). L'hydrophobicité des PEC a peu été étudiée dans la littérature par rapport à celle des boues activées, cependant quelques études sont disponibles.

Higgins et Nowak (1997a) ont caractérisé la fraction protéique de leurs PEC issus de trois origines différentes (boues industrielles, biomasses issues d'un réacteur ou excrétées par des bactéries *E. coli K12 Fimbriae*) en analysant les proportions d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes. Les résultats montrent que les PEC issus des trois origines ont la même distribution d'acides aminés et que l'on trouve une large proportion d'acides aminés hydrophobes tels que la glycine et l'alanine. Dignac *et al.* (1998) identifient la fraction hydrophobe des PEC comme étant la fraction protéique des PEC (en particulier certains amino-acides tels que l'alanine, la leucine et la glycine) tandis que la fraction polysaccharidique serait hydrophile.

Jorand *et al.* (1998) ont utilisé deux résines (XAD-4 et XAD-8) afin de fractionner les PEC extraits à partir de trois boues en différentes fractions caractérisées par leur caractère hydrophobe ou hydrophile puis ils ont caractérisé ces fractions en quantité de protéines, de sucres et de carbones organiques. Ils se sont inspirés du protocole décrit par Croué *et al.* (1993) afin d'obtenir une fraction de substances hydrophobes (fraction adsorbée par la résine XAD-8), une fraction d'acides hydrophiles (fraction adsorbée par la résine XAD-4) et une de substances hydrophiles non adsorbées. Les résultats obtenus montrent qu'une faible proportion des PEC (7%

du carbone organique dissous) est hydrophobe. Cette fraction hydrophobe serait exclusivement composée de protéines.

Martin-Cereda *et al.* (2001) ont aussi étudié le caractère hydrophobe des PEC à partir d'une méthode par agrégation de sels. Dans cette étude, l'hydrophobicité des PEC issus de boues activées représentent entre 10 et 20% de réduction d'absorbance à 280nm en présence de sulfate d'ammonium alors que les PEC issus de biofilm ont une hydrophobicité entre 30 et 40%. Pour ces deux types de PEC, les protéines sont les constituants majoritaires suivis des sucres puis des substances humiques. Mais ce sont les PEC issus de biofilms qui ont des quantités plus importantes de ces divers constituants par rapport aux PEC issus de boues. Ces auteurs montrent là encore que les protéines apportent le caractère hydrophobe aux PEC.

III.Extraction des PEC

Afin d'étudier leur composition et leurs propriétés, les PEC sont le plus souvent extraits de leur milieu naturel par de multiples protocoles. L'extraction des PEC comprend cependant trois étapes :

- le lavage des boues. Il est le plus souvent réalisé par décantation (Busch et Stumm, 1968) ou par centrifugation à une vitesse allant de 2000g (Brown et Lester, 1980) à 10000g (Forster, 1971) ou enfin par l'association de la décantation et de la centrifugation.

- l'extraction. En ce qui concerne l'étape d'extraction proprement dite, parmi plusieurs méthodes d'extraction des PEC répertoriées dans la littérature, on distingue les méthodes basées sur un traitement chimique et les méthodes nécessitant un traitement physique. L'extraction des PEC consiste à disperser les floes en détruisant les liens entre les micro-organismes et la matrice de polymères qui les réunit, grâce à une action qui peut être chimique ou physique. Il n'existe pas une méthode de référence pour l'extraction des PEC ce qui rend parfois les résultats de la littérature difficilement comparable.

- et la séparation/purification des PEC. Elle peut consister en une centrifugation ou ultracentrifugation. Certains auteurs effectuent des étapes de purification des PEC par précipitation à basse température (4°C) dans l'éthanol ou l'acétone, dans un mélange éthanol/acétone de composition variable (Forster, 1976 ; Morgan *et al.* 1990) ou par dialyse (Liu et Fang, 2002b). Pour finir d'autres auteurs utilisent une filtration à 0.22µm (Brown et Lester, 1980 ; Li *et al.* 2002).

III.1 Méthodes chimiques

Pour une extraction chimique des PEC, les boues sont mises en contact avec un extractant chimique qui favorise la libération des PEC, récupérés par ultra-centrifugation. Les produits chimiques utilisés sont :

- des bases : hydroxyde de sodium (Sato et Ose, 1980 ; Higgins et Novak, 1997a) ou hydroxyde d'ammonium (Chao et Keinath, 1979 ; Sheintuch *et al.* 1986), elles permettent de solubiliser les PEC car ces derniers se retrouvent complètement dissociés à pH basique, ceci rendant ainsi l'extraction de la matrice des floccs (PEC) plus facile.
- des alcools tels que l'éthanol (Forster et Clarke, 1983) ou l'isopropanol (Horan et Eccles, 1986), ils permettent aussi la précipitation des PEC, ces derniers sont réduits sous forme neutre grâce aux diverses réactions d'oxydo-réduction engendrées par la présence d'alcool.
- l'association NaOH et éthanol (Sato et Ose, 1980).
- le biphosphate de potassium (Farrah et Unz, 1976).
- le benzène (Wallen et Davis, 1972).
- des acides : acide trichloroacétique ou acide sulfurique (Chen *et al.* 2001) permettent de précipiter les PEC.
- des agents chélatants tels que l'EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) (Brown et Lester, 1980 ; Li *et al.* 2002), leur rôle est d'éliminer les cations multivalents qui forment des ponts entre les sites négativement chargés des PEC et d'ainsi dissoudre les floccs bactériens.
- de l'acétone (Chen *et al.* 1995).
- des aldéhydes tels que le glutaraldéhyde (Azeredo *et al.* 1998) ou le formaldéhyde associé à NaCl (Jia *et al.* 1996), le formaldéhyde associé à NaOH (Liu et Fang, 2002b). Les aldéhydes fixent les cellules bactériennes limitant la lyse cellulaire (Azeredo *et al.* 2003), libérant ainsi les PEC de toutes liaisons avec ces dernières et facilitant ainsi l'extraction des PEC.
- un éther couronne (Wuertz *et al.* 2001), il agit en complexant les ions calciums responsables des ponts entre les PEC, déstabilisant les liaisons supposées des PEC et des bactéries.

Il existe donc une grande variété de réactifs utilisés. De plus pour une même méthode chimique, plusieurs protocoles peuvent être utilisés fonction de la concentration des réactifs mais aussi du temps de contact ou de la température comme l'illustre le Tableau 8 pour l'extraction avec NaOH par exemple.

Tableau 8 : Plusieurs variantes possibles en utilisant NaOH comme réactif d'extraction des PEC issus de boues activées

Méthode d'extraction avec NaOH	Références
NaOH 1,5 N, 15min	Gehr et Henry 1983
NaOH 2N, 2-3h	Sato et Ose 1980
NaOH 2N, 5h	Brown et Lester 1980

Pour une meilleure efficacité, l'utilisation de ces réactifs chimiques peut être combinée à un traitement physique.

III.2 Méthodes physiques

Différentes actions physiques sont utilisées pour l'extraction des PEC :

- le chauffage à différentes températures, le plus souvent à 80°C (Horan et Eccles, 1986 ; Liu *et al.* 2001), le chauffage sous pression dans un autoclave (Brown et Lester, 1980 ; Shin *et al.* 2001). Le chauffage permet d'hydrolyser certaines liaisons fragiles et ainsi libérer les PEC des floes.
- la sonication ou ultrasonication à différentes puissances, le plus souvent 40W (Jorand *et al.* 1995 ; Guibaud *et al.* 1999 ; Boyette *et al.* 2001), elle est basée sur la destruction mécanique des floes libérant ainsi les PEC.
- la centrifugation ou ultracentrifugation à différentes vitesses (Brown et Lester, 1980 ; Liu et Fang, 2002),
- l'homogénéisation (Eriksson et Alm, 1993 ; Wuertz *et al.* 2001).

Le plus souvent ces traitements physiques sont associés à l'utilisation d'un réactif chimique afin d'optimiser l'extraction : utilisation d'un tampon phosphate (pH 7) et de l'ultrasonication par exemple (Matias *et al.* 2003).

Les résines cationiques (Frolund *et al.* 1995 ; Liao *et al.* 2001) sont souvent utilisées, cette méthode est basée à la fois sur une action chimique (elle élimine les cations multivalents qui permettent la cohésion des floes) et sur une action physique donc mécanique. On trouve aussi parfois l'association résine et ultrasonication pour l'extraction des PEC (Dignac *et al.* 1998 ; Martin-Cereceda *et al.* 2001 ; Guibaud *et al.* 2003).

A partir des différentes méthodes d'extraction des PEC exposées précédemment, beaucoup de variantes existent aussi dans la littérature pour une même méthode d'extraction physique comme l'illustre le Tableau 9 avec l'exemple d'une extraction par sonication.

Tableau 9 : Variation du protocole d'extraction des PEC issus de boues activées avec l'exemple de la sonication

Méthode d'extraction par sonication	Référence
Sonication 18W, 120V, 10min	Brown et Lester 1980
Sonication 37W, 60s + centrifugation 20000G	Jorand <i>et al.</i> 1995
Sonication 50W, 2X 15s + centrifugation 33000G	Urbain <i>et al.</i> 1993
Sonication 40W, 2min	Liu et Fang 2002b, Guibaud <i>et al.</i> 1999

Cependant aucune méthode ne fait l'unanimité des auteurs, on peut remarquer que certaines méthodes sont plus employées que d'autres pour des raisons parfois de simplicité et non d'efficacité. Liu et Fang (2003) et Wingender *et al.* (1999) ont répertorié les principales méthodes utilisées dans la littérature et ont ainsi montré la grande dispersion des résultats en matière de rendements d'extraction (Tableau 10) mais aussi de composition des PEC (Tableau 11) en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

Tableau 10 : Rendement d'extraction des PEC en fonction de la méthode d'extraction (Wingender *et al.* 1999)

Méthode d'extraction	Rendement d'extraction (% de Carbone organique/ Carbone organique total)	Référence
Sonication/centrifugation	10	Urbain <i>et al.</i> 1993
Chauffage 80°C	9	Frolund <i>et al.</i> 1996
Autoclave, 10min	10	Brown et Lester 1980
NaOH pH 11	8	Frolund <i>et al.</i> 1996
Résine Dowex	27	Frolund <i>et al.</i> 1996

Tableau 11 : Influence de la méthode d'extraction sur la composition des PEC issus de boues activées d'une station traitant des eaux résiduaires urbaines (Liu et Fang, 2002b)

Méthode d'extraction	Composition des PEC en mg.g ⁻¹ MVS				
	Polysaccharides	Protéines	Substances Humiques	Acides Uroniques	ADN
Centrifugation 20000G	7,7	7,9	6,4	0,5	0,06
Résine Dowex	12,7	17,6	16,4	1,2	0,14
EDTA	12,4	22,9	59,2	2,1	0,47
NaOH	40,5	54,6	50,4	4,2	0,35

En conclusion, les résultats de la littérature sont difficilement comparables et mettent en lumière un manque de méthodes de référence en ce qui concerne l'extraction des PEC.

III.3 Comparaison des méthodes d'extraction

Il existe plusieurs études comparatives des PEC dans la littérature mais elles aboutissent parfois à des conclusions contradictoires. Le Tableau 12 présente plusieurs références et conclusions d'études comparatives récemment publiées dans la littérature concernant les méthodes d'extraction des PEC issus de boues activées ou de biofilms.

Tableau 12 : Présentation synthétique de plusieurs études comparatives des méthodes d'extraction des PEC

Références	Méthodes d'extraction	Conclusions
Matias <i>et al.</i> 2003	EDTA + ultrasonication (40W,30s) Urée+ ultrasonication Triton+ ultrasonication Tampon phosphate+ ultrasonication	Méthode compromis rendement d'extraction/lyse bactérienne : tampon phosphate + ultrasonication
Azeredo <i>et al.</i> 2003	Glutaraldéhyde + sonication Glutaraldéhyde + résines dowex Tampon phosphate + sonication Tampon phosphate + résines dowex	Meilleur rendement d'extraction avec la sonication, rôle protecteur du glutaraldéhyde vis-à-vis des cellules bactériennes (peu de contamination des PEC par le matériel intracellulaire)
Li <i>et al.</i> 2002	EDTA NaOH 0,1M	EDTA n'endommage pas les cellules, tandis que NaOH donne le meilleur rendement
Liu et Fang, 2002b	EDTA Résines dowex Formaldéhyde Formaldéhyde + NaOH 1N Formaldéhyde + ultrasonication	Meilleure rendement et pas de lyse cellulaire avec Formaldéhyde + NaOH
Wuertz <i>et al.</i> 2001	Homogénéisation Résines dowex EDTA Ether couronne (TRIS-crown ether)	Meilleur rendement avec les deux méthodes : - 50mM TRIS, pH8, 30mM éther couronne - résines dowex
Zhang <i>et al.</i> 1999	Centrifugation EDTA Ultracentrifugation Autoclave Centrifugation + Formaldéhyde (RCF)	Pas de contamination intracellulaire durant toutes les extractions La méthode RCF extrait le plus de carbohydrate La méthode autoclave extrait le plus de protéines
Frolund <i>et al.</i> 1996	NaOH 1M Autoclave Résines dowex	Méthode la plus satisfaisante : Résines dowex avec un minimum de lyse cellulaire et un maximum de rendement
Jorand <i>et al.</i> 1995	Sonication de 15 à 420 s	La méthode de sonication à 60s est le meilleur compromis

Au bilan, on notera que les méthodes chimiques permettent d'extraire de grandes quantités de PEC mais elles sont aussi très destructrices pour les cellules bactériennes (Wingender *et al.* 1999). Tandis qu'une extraction à l'EDTA de PEC issus de boue activée (station d'épuration urbaine) permet d'obtenir entre de 146,8 à 200,2 mg d'EPS.g⁻¹ de MVS de boue, une extraction de ces mêmes PEC par un procédé physique tel que la sonication permet d'obtenir de 5,9 à 77,9 mg d'EPS.g⁻¹ de MVS de boue soit 3 à 15 fois moins (Liu et Fang 2003). L'ajout d'EDTA risque d'altérer les cellules (Brown et Lester, 1980) car l'EDTA est connu pour fragiliser les membranes cellulaires aux concentrations employées lors des extractions. Sato et Ose (1980) ont montré que la concentration de NaOH a une grande influence sur la composition des PEC extraits et la destruction des cellules semble augmenter avec la concentration de NaOH. L'emploi d'aldéhyde permet de limiter la destruction des cellules. Azeredo *et al.* (2003) ont montré que le glutaraldéhyde avait un effet protecteur des cellules bactériennes durant l'extraction. Malgré ces inconvénients relatés dans la littérature, les méthodes chimiques sont encore souvent utilisées.

Concernant les méthodes physiques, l'autoclave est aussi une méthode fréquemment rencontrée dans la littérature parce que cette méthode est facile à mettre en œuvre. Mais le chauffage risque de dégrader certaines macromolécules des PEC comme les protéines qui peuvent être dénaturées. La centrifugation sans traitement préalable n'extrait pas les PEC fortement liés aux floccs bactériens. La sonication et les résines sont aussi fréquemment utilisées. De ce fait, les études citées dans le Tableau 12, même si elles proposent parfois des conclusions différentes, permettent de sélectionner les méthodes d'extraction a priori les plus efficaces. On peut ainsi connaître pour chaque méthode les conditions optimales de concentration en réactif, de temps d'exposition, de pH ou encore de température.

III.4 Critère(s) d'évaluation d'une méthode d'extraction des PEC

L'étape d'extraction des PEC issus des boues est difficile à maîtriser. L'absence de méthode d'extraction de référence ainsi que l'absence de critères bien définis décrivant une extraction optimisée entraînent parfois des conclusions différentes (Tableau 12). L'extraction doit satisfaire cependant plusieurs exigences (Gehr et Henry, 1983) :

- avoir un bon rendement, c'est-à-dire extraire le plus possible de substances extracellulaires,
- ne pas causer de rupture des cellules, qui entraînerait une contamination du matériel extrait par du matériel cellulaire (contenu du cytoplasme ou enveloppe cellulaire),

- ne pas détruire ou modifier la structure ou les composants des PEC extraits.

En ce qui concerne le rendement d'extraction, il varie en fonction de la technique choisie ou de l'unité choisie pour l'exprimer. Le rendement d'extraction doit rendre compte de la quantité de PEC extraite par rapport à la quantité réellement présente dans la boue. Or pour estimer la quantité de PEC réellement présente dans la boue, aucune méthode n'est satisfaisante. La mesure de la quantité d'acides uroniques dans la boue sans extraction a été proposée (Fazio *et al.* 1982). Mais si les acides uroniques ne sont pas contenus dans les cellules bactériennes, on peut les trouver dans les membranes cellulaires. La mesure de la quantité d'acide uroniques dans la boue n'est donc pas spécifique des PEC. Figueroa et Silverstein (1989) ont proposé de marquer les PEC contenus dans la boue par une coloration au rouge de ruthénium. Mais cette méthode n'a pas été jugée satisfaisante car la diffusion du colorant à travers les floes est mal connue. Le rendement d'extraction des PEC le plus utilisé est l'évaluation de la quantité de PEC extraite par la mesure du poids sec extrait rapportée aux poids secs de la boue exprimé en g de PEC.g⁻¹ de MVS de boue (Liu et Fang, 2003). On trouve aussi le rendement d'extraction des PEC établi à partir de la mesure au COT-mètre de la masse de carbone organique des PEC ramenée à la masse de carbone organique de la boue, exprimé en pourcentage de carbone organique extrait sur le carbone organique total (Wingender *et al.* 1999).

L'évaluation de la contamination des PEC extraits par du matériel cellulaire ou intracellulaire pose problème. Dans les boues activées, la lyse des cellules se produit naturellement et le matériel cellulaire ou intracellulaire fait partie de la composition des PEC. Pour cette raison, les différentes méthodes proposées dans la littérature ont toutes leur limite :

- la mesure des concentrations en acides nucléiques ou ADN. Les PEC doivent en contenir en faible concentration, de fortes concentrations d'ADN indiquent une contamination des PEC par du matériel intracellulaire donc une lyse des cellules durant l'extraction. Une extraction témoin ne s'attachant pas au rendement d'extraction mais juste à la préservation de l'intégrité des PEC peut rendre compte d'une concentration témoin en acides nucléiques contenue dans les PEC (Liu et Fang, 2002b). Cependant les PEC extraits par cette extraction témoin ne seront pas représentatifs des PEC fortement liés aux floes, ces derniers contenant peut-être une concentration plus élevée d'acides nucléiques libérés par les bactéries.
- le rapport protéines/polysaccharides. Ce dernier, s'il est trop élevé pourrait rendre compte d'une lyse des cellules durant l'extraction. En effet si ce rapport est élevé, cela signifie que les PEC sont principalement composés de protéines. Rudd *et al.* (1983) pensent que

les protéines pourraient alors être issues d'une libération après une lyse cellulaire. Mais ce rapport d'après Dignac *et al.* (1998) varie davantage avec l'origine des PEC qu'avec la méthode d'extraction.

- le comptage des cellules vivantes par épifluorescence avant et après extraction est applicable sur une culture pure de bactéries mais difficile dans les boues où les cellules sont agrégées dans une structure complexe (Urbain 1992).
- le dosage dans les PEC d'une activité enzymatique spécifiquement intracellulaire telle que l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Platt *et al.* 1985) ou de la succinate déshydrogénase (Falla *et al.* 1988) a été repris par Frolund *et al.* (1996) pour estimer la contamination des PEC extraits par du matériel cellulaire.
- le dosage de l'ATP (Azeredo *et al.* 2003).

L'évaluation de la destruction ou de la modification de la structure ou des composants des PEC extraits est difficile à mettre en œuvre. Certains auteurs tels que Frolund *et al.* (1996) se sont attachés à suivre les profils de poids moléculaires des PEC durant l'optimisation d'une méthode d'extraction.

IV.Fonctions des PEC au sein des floes

La littérature attribue de nombreuses fonctions aux PEC issus de boues activées ou de biofilms. Les PEC permettent la rétention de nutriments et de molécules organiques nécessaires au développement des bactéries, ils sont utiles à l'agrégation des cellules bactériennes en floes, ils jouent un rôle de barrière protectrice aux bactéries contre différents dangers extérieurs tels que la présence de biocides ou le changement de pH du milieu (Wingender *et al.* 1999). Les PEC jouent un rôle crucial dans la floculation, l'organisation et l'hydratation des boues activées (Morgan *et al.* 1990 ; Urbain *et al.* 1993 ; Frolund *et al.* 1996 ; Higgins et Novak. 1997a,b ; Jorand *et al.* 1998 ; Liao *et al.* 2001). Nous retiendrons dans cette étude deux grands rôles rassemblant la plupart des fonctions des PEC déjà identifiées : un rôle structurel et un rôle protecteur des PEC au sein des floes bactériens.

IV.1 Rôle structurel des PEC

Des observations au microscope électronique à transmission ont montré que, à l'intérieur des floccs, les PEC forment une matrice dans laquelle sont arrangées les cellules bactériennes (Jorand *et al.* 1995). Les PEC forment alors un réseau polymérique constitué de pores et de chaînes, ce réseau possède une grande surface de contact capable d'adsorber des polluants, des nutriments et des minéraux (Liu *et al.* 2001). Ce réseau constitué par les PEC possède des zones hydrophiles et des zones hydrophobes possédant ainsi de multiples propriétés d'adsorption (Flemming et Wingender 2001).

IV.1 a. Rôle de soutien pour les bactéries

Parmi les PEC, il se trouve des protéines extracellulaires jouant un rôle particulier. Elles ont une activité enzymatique permettant d'améliorer l'hydrolyse de macromolécules exogènes et de molécules spécifiques du microenvironnement des bactéries immobilisées dans la matrice des PEC. Ces protéines suppléent donc les bactéries à l'hydrolyse des macromolécules et ainsi elles fournissent des substrats de faibles poids moléculaires qui sont immédiatement prêts à être adsorbés et métabolisés par les bactéries. Certaines enzymes contenues dans la matrice des biofilms peuvent également intervenir dans la dégradation de polysaccharides extracellulaires de manière à dégager les bactéries contenues dans la matrice pour qu'elles puissent coloniser de nouveaux environnements (Wingender *et al.* 1999). Certains auteurs (Liu *et al.* 2004) avancent l'hypothèse que les PEC ou certains composants des PEC ne pourraient pas servir de messenger dans la communication de cellule à cellule.

IV.1 b. Rôle dans la floculation

Le rôle précis des PEC dans la formation des floccs est encore mal compris cependant de nombreuses études (Higgins et Novak 1997 ; Dignac *et al.* 1998 ; Sobeck et Higgins 2002 ; Wilen *et al.* 2003) ont montré que la présence des PEC est une condition importante pour qu'ait lieu la floculation. Les PEC sont des polymères fortement chargés qui interagissent avec l'eau de façon à former un gel (Keiding *et al.* 2001).

Peu de choses sont connues à propos des mécanismes et des cinétiques de floculation des boues activées ainsi que les facteurs clefs qui déterminent les propriétés des floccs telles que leur taille, leur densité ou leur structure. Plusieurs mécanismes ont été suggérés concernant la

formation des floccs. Tous les modèles de floculation mettent le plus souvent en avant l'importance des propriétés de surface dans la formation d'interactions au niveau des floccs. Il existe trois modèles principaux (Sobeck et Higgins, 2002) :

- un modèle basé sur l'existence de ponts polymériques avec interventions de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ou modèle « divalent cation bridging (DCB) » (McKinney 1952 ; Tezuka 1969),

- un modèle basé sur le rôle d'un polysaccharide ou modèle « alginate » dérivé du précédent (Bruus *et al.* 1992),

- et un modèle basé sur une interaction colloïdale ou autrement appelé modèle Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) (Adamson 1990).

Il est probable que divers types d'interactions soient impliqués simultanément mais ils sont d'importance différente en fonction du composant considéré et impliqué dans la floculation.

Dans le modèle « DCB » impliquant l'existence de ponts polymériques, les PEC qui contiennent des groupements chargés négativement (au pH proche de la neutralité) sont liés ensemble par des cations divalents ou trivalents (Erikson *et al.* 1992 ; Bruus *et al.* 1992 ; Nielsen et Keiding, 1998) afin de former un large réseau dans lequel les différents constituants des floccs tels que les bactéries ou les colonies de bactéries sont intégrées (Figure 3). Cette théorie est supportée par différents travaux dans lesquels le déplacement de cations divalents ou trivalents à l'intérieur des floccs conduit à la défloculation et à la désorption des PEC (Higgins et Nowak, 1997b). Le rôle d'une « lectine-like » (protéine extracellulaire) a aussi été mis en avant dans la constitution de ces réseaux polymériques par Higgins et Nowak (1997b).

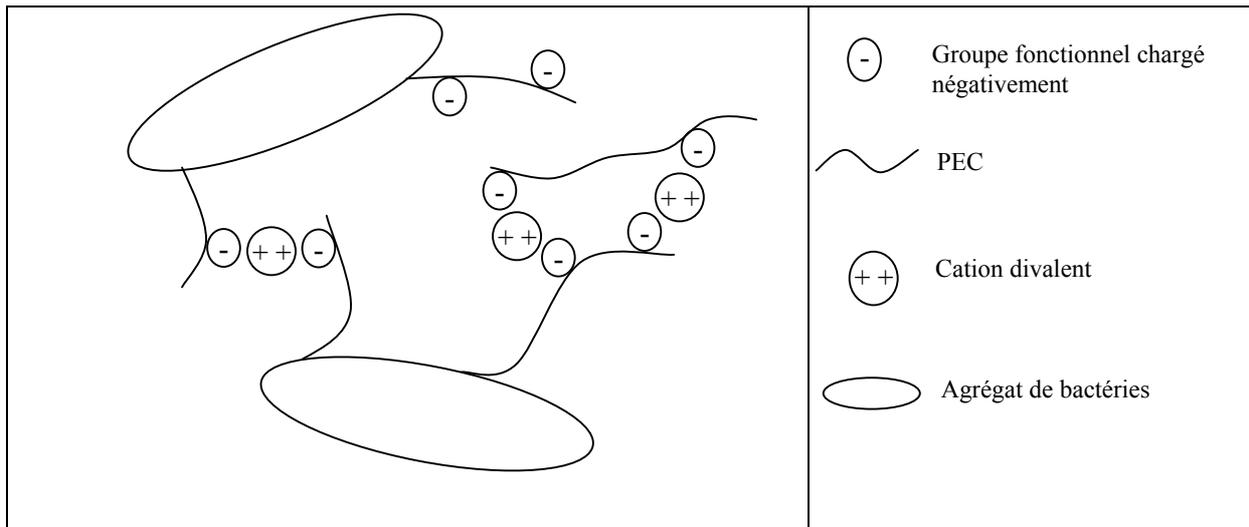


Figure 3 : Schéma du modèle de floculation « DCB » d'après Sobeck et Higgins (2002)

L'alginate est un polysaccharide construit à partir de la répétition d'acide mannuronique et d'acide guluronique, il a pour origine la sécrétion bactérienne (c'est un PEC). Ce polysaccharide a la particularité de former un gel en présence d'ions calcium désigné par l'expression anglaise « egg-box model ». Le modèle « alginate » est basé sur une interaction spécifique soit la formation d'un gel entre les ions calcium et l'alginate tandis que le modèle « DCB » s'appuie sur la formation de liaisons non-spécifiques avec des cations divalents. Le modèle « alginate » est donc une variante du modèle DCB.

Dans le troisième modèle, les interactions entre les constituants des flocons peuvent être décrites par la théorie DLVO utilisée pour définir la stabilité des colloïdes (Deryaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948). Cette théorie s'appuie sur le fait que les forces de Van Der Waals et les forces répulsives électrostatiques engendrées par l'interpénétration des doubles couches électrostatiques s'additionnent et le résultat décrit les interactions entre les constituants des flocons.

D'autres interactions non prises en compte par la théorie DLVO telles que les interactions hydrophobes, les contraintes stériques et les interactions dues à l'enchevêtrement des PEC ont aussi été mises en avant dans la floculation des boues activées et d'autres agrégats bactériens (Gregory, 1989 ; Hermansson, 1999 ; Mikkelsen et Keiding, 2002). Quelques études indiquent que les interactions hydrophobes jouent un rôle important dans la formation des flocons, en particulier au niveau des contacts avec la surface des cellules (Jorand *et al.* 1994; Higgins et Novak, 1997a, b; Zita et Hermansson, 1997). Mais les difficultés engendrées par l'analyse des boues

activées qui sont des agrégats hétérogènes sont telles que l'on ne peut identifier précisément les mécanismes impliqués dans la floculation des boues.

Les PEC sont les principaux composants des floccs et ils possèdent de nombreux groupements fonctionnels pouvant être chargés en fonction du pH du milieu, ils contribuent donc à la détermination des propriétés de surface des floccs et de ce fait aux propriétés de floculation. Peu d'informations sont disponibles sur le rôle des PEC dans la floculation et encore moins d'informations sont connues sur les relations existantes entre les constituants des PEC et les propriétés de surface des floccs des boues activées. Il a été montré par certains auteurs qu'à un pH proche de la neutralité, les PEC contribuent à la charge de surface globale négative des floccs (Jia *et al.* 1996 ; Liao *et al.* 2001 ; Mikkelsen et Keiding 2002).

Higgins et Nowak (1997a) ont suggéré que les PEC prennent part à la floculation à travers leur capacité à former des interactions hydrophobes mais aussi à travers les interactions existantes entre les protéines et les polysaccharides des PEC ou encore la possibilité de création de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques. Wilen *et al.* (2003) ont étudié la distribution des constituants chimiques des PEC et l'on relié aux propriétés de surface, à l'hydrophobicité, à la charge de surface, à la capacité de floculation des floccs de boue activée. Ils ont conclu que parmi les constituants des SMP (autrement dit des PEC), les protéines semblent influencer le plus largement les propriétés de surface et la capacité de floculation des floccs de boue activée.

IV.2 Rôle protecteur des PEC

On attribue généralement aux PEC un effet protecteur des micro-organismes contre les influences biotiques et abiotiques provenant de l'environnement extérieur des floccs de boue activée.

IV.2 a. Rôle de barrière protectrice

Il a été fréquemment observé que les bactéries de biofilms peuvent tolérer de plus hautes concentrations de biocide (comme les désinfectants ou antibiotiques) que les populations planctoniques (LeChevallier *et al.* 1988 ; Foley et Gilbert 1996). Ceci est principalement dû aux changements physiologiques des bactéries mais aussi à la fonction de barrière protectrice tenue par les PEC (Brown et Gibert 1993 ; Morton *et al.* 1998). Wingender *et al.* (1999) indiquent que la contribution des PEC à une réponse défensive des bactéries envers un biocide, varie en fonction

des propriétés du biocide. Par exemple, la toxicité engendrée par la présence de certains métaux lourds peut être réduite grâce à la présence des PEC. Ces derniers ont la possibilité d'adsorber les métaux présents dans leur environnement (Brown et Lester, 1982). D'après Flemming et Wingender (2001), les PEC représentent un site de sorption pour les polluants tels que les métaux lourds sous forme ionisée et certaines molécules organiques. Spath *et al.* (1998) ont montré que les PEC représentent des sites de sorption pour les polluants organiques tels que le BTX (Benzène, Toluène, Xylène). Aquino et Stuckey (2004) ont montré que la présence de chloroforme et de chrome a engendré une augmentation de la production de PEC par la biomasse. La biomasse utilise donc les PEC pour se défendre du stress que représentent certains composants organiques tels que le chloroforme ou certains métaux lourds tels que le chrome.

IV.2 b. Rôle dans la rétention de l'eau

Les flocs de boues activées et les biofilms sont composés majoritairement d'eau et à ce titre, l'eau joue un rôle important dans ces systèmes. Bien qu'une partie de l'eau dans les boues activées soit intracellulaire et donc emprisonnée par une membrane cellulaire, la plupart de l'eau est en fait liée aux PEC (Erikson *et al.* 1992 ; Keiding *et al.* 2001). Keiding *et al.* (2001) notent que comme le réseau constitué par les PEC contient, à un pH proche de la neutralité, de grandes concentrations en charges négatives entourées de contre-ions, le gradient osmotique dû aux PEC peut conduire à une concentration en eau élevée au sein des PEC. Les PEC représentent donc une matrice fortement hydratée avec une proportion en eau qui peut atteindre 98% (Christensen et Characklis 1990). Plusieurs études ont montré que la concentration en PEC a une influence sur le taux d'hydratation des flocs de boues activées (Houghton *et al.* 2000 ; Mikkelsen et Keiding 2002). Jin *et al.* (2004) ont montré que les protéines et les polysaccharides des PEC contribuent de manière significative à lier l'eau à l'intérieur des flocs de boue mais ils n'ont pas observé d'influence de la concentration en substances humiques des PEC sur l'hydratation des flocs.

V. Propriétés des PEC vis-à-vis des métaux

V.1 Généralités sur la biosorption des métaux

La biosorption est une propriété de certains types de biomasse microbienne, vivante inactive ou morte, à lier et concentrer les métaux lourds contenus dans une solution aqueuse en faible concentration. Les recherches menées sur la biosorption ont révélé qu'elle était parfois un phénomène complexe où les espèces métalliques pouvaient être déposées sur le biosorbant au moyen de différents mécanismes de sorption tels que l'échange d'ions, la complexation, la chélation, la (micro)précipitation, les interactions électrostatiques etc... En effet, les ions métalliques peuvent se fixer à la biomasse par différents mécanismes physicochimiques, dépendant de la nature de la biomasse et des conditions environnementales. Ces mécanismes par lesquels les ions métalliques se fixent à la biomasse font intervenir le plus souvent des interactions électrostatiques, les forces de Van Der Waals, des liaisons covalentes, des réactions d'oxydo-réduction, de la précipitation ou une combinaison de ces différents procédés. Les groupements de la biomasse chargés négativement tels que les groupements carboxyliques, hydroxyles et phosphoriques sont connus pour adsorber les cations métalliques (Liu et Fang 2002a).

Dans la littérature, on trouve de nombreux articles impliquant les PEC dans la fixation de certains métaux lourds (Brown et Lester 1979; Loaec *et al.* 1997 ; Guibaud *et al.* 2003). Les polysaccharides et les protéines des PEC sont les plus souvent évoqués pour leur capacité de biosorption (Brown et Lester 1982 ; Fukushi *et al.* 1996).

V.2 Facteurs influençant la biosorption

De nombreux travaux font état de la capacité des PEC mais aussi des bactéries à fixer des ions métalliques, parmi lesquels Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , etc... Il se forme alors des complexes cations/groupements anioniques issus d'un constituant des PEC ou de la membrane des bactéries. L'importance de l'affinité d'une liaison au niveau de ces complexes peut dépendre (Decho, 2000):

- des propriétés physico-chimiques du milieu : pH, température, force ionique, concentration en oxygène dissous, présence d'autres cations métalliques ou d'autres ligands
- du métal considéré : ratio taille/charge du métal, spéciation du métal, concentration du métal

- du biosorbant considéré : la composition des PEC ou de la membrane bactérienne, concentration du biosorbant.

Concernant les propriétés du milieu, différentes études ont été menées mettant en avant l'influence d'une des caractéristiques du milieu sur la qualité de la biosorption.

- Influence du pH :

Plusieurs études dans la littérature font état de l'influence du pH sur la biosorption des métaux. Cependant, elles n'aboutissent pas à la même conclusion en fonction du biosorbant ou du métal étudié. Mittelman et Geesey (1985) ont étudié l'influence du pH sur les capacités de fixation du cuivre avec des PEC issus de bactéries. Ils ont ainsi mis en évidence que plus le pH augmente et plus la capacité maximale à lier le cuivre des PEC diminue. Lopez *et al.* (2000) ont étudié l'influence du pH sur la capacité des *Pseudomonas fluorescens* 4F39 à adsorber différents métaux ou métalloïdes (Ni, Cu, Pb, Cd, Co, Cr, As, U, Hg). Ils ont montré que plus le pH augmente, plus la capacité des bactéries à lier un métal augmente ceci jusqu'à précipitation du métal dans certains cas (Ni, Cu, Pb, Cd et Co). Une hypothèse avancée par ces auteurs est que l'augmentation du pH augmente la charge négative à la surface des cellules jusqu'à la totale déprotonation des groupements fonctionnels présents à la surface, favorisant l'attraction électrochimique et l'adsorption des cations métalliques. Le pH est le facteur le plus important dans le procédé de biosorption des métaux car il affecte la chimie de la solution, l'activité des groupes fonctionnels de la biomasse ainsi que la compétition entre les ions métalliques à travers la modification de l'état de spéciation des métaux. Par exemple, à des pH élevés, il se passe une formation d'hydroxydes métalliques avec une réactivité différente du cation issu du même métal tandis qu'à des pH faibles, les interactions entre les métaux et les molécules organiques sont favorisées (Cheng *et al.* 1975).

- Influence de la force ionique du milieu :

Ledin *et al.* (1995) ont étudié l'influence de la force ionique sur les capacités d'adsorption du Cs, Sr, Eu, Zn, Cd et Hg par les bactéries *Pseudomonas putida*. Ils ont montré que l'augmentation de la force ionique diminuait la capacité d'adsorption des bactéries quelque soit le métal considéré et le pH du milieu. Le pH et la force ionique du milieu sont étroitement liés. L'introduction dans le milieu d'espèces ioniques ayant pour but de modifier le pH engendre une

modification de la force ionique. L'influence de la force ionique est donc à considérer là encore en fonction du pH, du biosorbant et du métal.

- Influence du métal :

La concentration de l'ion métallique, sa solubilité, sa valence et son rayon ionique sont autant de paramètres qui conditionnent la capacité d'un métal à se fixer. La littérature donne plusieurs exemples de comparaison de biosorption de métaux dans des conditions de milieu identique. Les résultats montrent que l'ordre d'affinité de biosorption des métaux varie en fonction du biosorbant considéré. Brown et Lester (1982) ont établi que pour les PEC issus de boues activées l'ordre d'affinité des métaux est le suivant : $Cd \approx Co > Ni > Mn$, tandis que pour les bactéries *Klebsiella aerogenes* l'ordre diffère du cas précédent : $Cd, Mn > Co > Ni$. Le Tableau 13 présente plusieurs exemples d'ordre d'affinité des métaux pour différents biosorbants. Ce tableau met en évidence la difficulté de comparer les résultats entre les différentes études car ces derniers sont fonction de l'origine et de la nature du biosorbant, des métaux étudiés, des conditions du milieu.

Tableau 13 : Quelques exemples d'études sur l'ordre d'affinité des métaux pour différents biosorbants

Origines	Biosorbants	Conditions expérimentales	Ordre d'affinité	Références
Boues activées	PEC	60ml de solution (36,3 à 55,3 mg de PEC)	Cr(III)<Ni<Co<Cd<Cr<Cu<Zn	Liu <i>et al.</i> 2001
	<i>Pseudomonas</i>	T=293K	Cr(III)<Co<Cu (Pseudomonas)	Zykova <i>et al.</i> 2002
	<i>Micrococcus</i>	pH 6-7	Cr(III)<Cu<Co (Micrococcus)	
	Exopolysaccharide de <i>Ochrobactrum</i>	pH2 (CrIV) pH8 (Cd) pH3 (Cu)	Cu<Cd<Cr(isotherme Langmuir) Cr<Cu<Cd(isotherme Freundlich)	Ozdemir <i>et al.</i> 2003
	<i>Nocardia amarae</i>	20ml de suspension cellulaire	Ni<Cd<Cu	Kim <i>et al.</i> 2001
Biofilm	PEC		Ni<Pb<Cu	Jang <i>et al.</i> 2001
Source hydrothermale	Exopolysaccharides de <i>Alteromonas macleodii subsp fijensis</i>	10ml de solution métallique, 40ml d'eau milliQ, pH 8,3	Zn<Cd<Pb	Loaec <i>et al.</i> 1998
Milieu hospitalier	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21	pH 6 (Cd), pH 5 (Cu)	Cu<Cd<Pb	Chang <i>et al.</i> 1996
Déchet agricole	Polysaccharide naturel issu de la pulpe de betterave	pH de 2 à 5,5 force ionique de 0,01 à 0,1M	Ni<Cd<Zn<Cu	Reddad <i>et al.</i> 2002
Champignon	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (ATTC 24725)	pH 6 100ml de solution métallique 100mg de champignons	Zn<Cu<Pb	Iqbal et Edyvean 2003

V.3 Différents biosorbants

Les chapitres précédents ont permis de montrer que les PEC sont un système complexe difficile à isoler de son milieu naturel, ce qui présente donc des difficultés pour l'étude de leurs propriétés de biosorption. Dans la littérature, de nombreuses données sur la biosorption de certains systèmes biologiques tels que les algues, les bactéries, les boues et les biofilms sont disponibles. Ces systèmes biologiques sont proches des PEC et permettent de mesurer la difficulté à considérer tous les facteurs influençant la biosorption.

Davis *et al.* (2003) ont étudié la biosorption des algues brunes et ont rassemblé plusieurs facteurs influençant les mécanismes de biosorption impliqués. Ainsi l'existence de groupements fonctionnels tels que les groupements carboxyliques (qui représentent 70% des groupements fonctionnels des algues brunes), les groupements sulfoniques et hydroxyles à la surface des algues est déterminante. Le pH est aussi important car il influence la capacité des algues à échanger des ions ainsi que la force du complexe formé entre les algues et les métaux. Plusieurs auteurs (Ledin *et al.* 1997 ; Cox *et al.* 1999 ; Martinez *et al.* 2002 ; Yee *et al.* 2004 ; Borrok et Fein 2005) ont étudié l'influence de la force ionique sur l'adsorption de certains métaux lourds sur différentes espèces bactériennes. Ils ont ainsi mis en évidence que le lien existant entre la force ionique et les réactions d'adsorption à la surface bactérienne est fortement dépendant du composé adsorbé (par exemple, différents comportements existent en fonction du métal considéré) et que l'importance des effets électrostatiques en surface des bactéries peut être dépendante de l'espèce bactérienne considéré.

Différents modèles mathématiques existants susceptibles de simuler la biosorption sont présents dans la littérature. Davis *et al.* (2003) ont identifié plusieurs modèles pour l'étude de la biosorption des algues brunes. Le modèle le plus couramment utilisé est basé sur l'échange d'ions, il s'appuie sur l'hypothèse que les cations métalliques se fixent au biosorbant uniquement sur des sites initialement occupés (par exemple par un proton, un ion potassium, un ion sodium, un ion magnésium). Cependant, ce modèle ne permet pas de tenir compte de l'influence de certains paramètres importants comme le pH et la force ionique. Le plus souvent lorsque la force ionique de la solution augmente, la fixation du métal considéré diminue. Borrok et Fein (2005) ont étudié l'influence de la force ionique sur l'adsorption du Pb, du Cd et du Sr sur les surfaces des bactéries gram négatif *Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas Putida*. L'adsorption du Cd et du Pb sur ces bactéries diminue légèrement quand la force ionique augmente. Ce phénomène peut être le reflet de réactions de complexation entre composés soumis à des forces électrostatiques ou de la formation de complexes métalliques stables en solution (Davis *et al.* 2003). Borrok et Fein (2005) ont attribué cette diminution d'adsorption aux changements de forme du cation métallique dû à la

variation de la force ionique. Aussi la spéciation des espèces en solution et la stabilité des complexes en solution ont été prises en compte dans d'autres modèles comme le modèle « d'échange d'ions hydrolysés » (HIEM). Schiewer et Volesky (1995 ; 1997) ont établi plusieurs modèles d'équilibre de biosorption qui tiennent compte de la concentration en ions métalliques, du pH et de la force ionique. Dans une approche de la biosorption différente des auteurs précédents, Borrok et Fein (2005) ont comparé trois modèles permettant d'anticiper l'adsorption du Pb, du Cd et du Sr sur les bactéries gram négatif *Pseudomonas mendocina* et *Pseudomonas Putida*. Le premier nommé modèle non-électrostatique s'appuie sur l'échange d'ion et permet de quantifier l'influence de la force ionique. Les paramètres obtenus par ce modèle sont dits « apparents » car ils peuvent changer en réponse à des modifications du champ électrique à la surface des bactéries. Le second nommé « modèle de la couche diffuse » (DLM) tient compte en plus de l'échange d'ions de la concentration en groupements fonctionnels impliqués dans les mécanismes de biosorption donc des propriétés de surface des bactéries. Un troisième modèle appelé « modèle de la triple couche » (TLM) ne tient compte que du champ électrique à la surface bactérienne. Les résultats expérimentaux ont été comparés aux résultats obtenus pour les trois modèles, ils montrent que la capacité d'adsorption du Pb et du Cd sur les bactéries peut être obtenue par les deux premiers modèles qui ne tiennent pas compte du champ électrique à la surface bactérienne. Il peut donc être intéressant d'identifier l'ordre d'importance des différents facteurs influençant la biosorption afin d'en simplifier l'approche.

V.4 Les PEC et la biosorption

Depuis longtemps (Brown et Lester 1979) on sait que les PEC jouent un rôle crucial dans la biosorption des métaux lourds mais peu de données sont disponibles dans la littérature en raison de la complexité à isoler les PEC. Keevil (2004) a rapporté que des biofilms cultivés dans un milieu riche en cuivre ont généralement un ratio cellules/PEC élevé, suggérant que la production des PEC participe de manière importante à une stratégie de défense des cellules contre la toxicité des ions cuivre. La synthèse, mais aussi la chimie et la structure des PEC sont influencées par la présence du cuivre dans l'environnement des bactéries. Les résultats de Geesey et al. (1994) montrent que les groupements carboxyliques des acides uroniques des PEC fixent le cuivre et que les acides uroniques sont plus abondants dans les PEC lorsque ces derniers sont excrétés par des bactéries soumises à un environnement riche en cuivre.

Les PEC sont composées principalement de polysaccharides, de protéines, et dans une moindre mesure de substances humiques, d'acides uroniques, d'acides nucléiques et de lipides (voir paragraphe I.5 composition des PEC). Ces composants des PEC possèdent des groupements fonctionnels ionisables tels que les groupements carboxyliques, phosphoriques, sulfoniques, amines et hydroxyles. La nature des charges portées par ces groupements fonctionnels peut permettre aux PEC de retenir des métaux lourds (Rudd *et al.* 1984). Le Tableau 14 établi par Decho (2000) identifie les principaux ligands associés aux PEC.

Tableau 14 : Principaux ligands associés aux PEC (Decho 2000)

Principaux ligands intervenant dans la fixation des métaux	Composants des PEC dans lesquels on peut trouver les ligands	Références
Hydroxyles	polysaccharides etc...	Sutherland (1990)
Carboxyliques	protéines, amino-polysaccharides, acides uroniques, substances humiques	Wingender <i>et al.</i> (1999)
Phosphates	acides nucléiques phospholipides	Liu et Fang (2002)
Sulfates, sulfonates	polysaccharides issus de cyanobactéries	de Philippis et Vincenzini (1998)
Pyruvates	polysaccharides hexoses	Smith <i>et al.</i> (1990)
Acétyles	polysaccharides neutres	Lindberg (1990) Sutherland (1990)
Phénoliques	protéines, substances humiques, polysaccharides	Liu et Fang (2002a)
Amines	protéines, amino-poyasaccharides	Lindberg (1990) Sutherland (1990)

Aux pH proches de la neutralité, la fixation des cations par des interactions électrostatiques peut se concevoir au sein des PEC avec des groupements fonctionnels chargés négativement.

Certains auteurs ont donc étudié et évalué la capacité des PEC à fixer un métal. Rudd *et al.* (1984) ont étudié la complexation de certains métaux lourds (Cu, Ni, Co, Cd) avec des PEC issus de boues activées. Parmi leurs conclusions, ils ont mis en évidence que la complexation du Cu et du Cd est contrôlée par deux types différents de sites de fixation tandis qu'un seul type de site intervient principalement dans la complexation du Co avec les PEC. Loaec *et al.* (1997) ont

réalisé une étude sur la compétition des métaux (Pb, Zn, Cd) vis-à-vis de leur fixation à des PEC issus de bactéries *Alteromonas macleodii subsp fijiensis*. Leurs résultats mènent à la conclusion que le Zn et Cd sont en compétition pour le même site de fixation. Ces auteurs montrent donc que les PEC ont des spécificités dans la biosorption des métaux en fonction du métal considéré.

Guibaud *et al.* (2004) ont aussi étudié la complexation de certains métaux (Zn, Cu, Ni) avec des PEC issus de boues activées. Leurs études statistiques ont montré que plus les taux de protéines, d'acides humiques et de polysaccharides augmentent et plus les PEC sont capables de fixer le Cu tandis que la fixation du Ni par les PEC s'est révélée dépendante de la concentration en acides uroniques. Loaec *et al.* (1997) ont montré que la composition chimique des exopolysaccharides issus de bactéries *Alteromonas macleodii subsp fijiensis* comprenant des sucres neutres, acides, des amino sucres et autres fonctions telles que des esters sulfate et des pyruvates contribuent à la fixation des métaux. Ces auteurs illustrent par leurs travaux le fait que la spécificité de la biosorption des métaux par les PEC évoquée précédemment est liée à leur composition. Cette composition des PEC est principalement fonction de leur origine.

Cependant, la capacité des PEC à lier les métaux est difficilement comparable (Tableau 15). Chaque capacité est liée aux spécificités des PEC mais aussi à la méthode utilisée pour évaluer cette capacité. Aussi aux vues de la littérature, la capacité de biosorption des PEC en fonction d'un métal semble très variable.

Tableau 15 : Capacités des PEC à lier un métal extraites de la littérature

Biosorbant	Capacité à lier un métal en mmol.g ⁻¹					Références
	Pb	Cd	Zn	Cu	Ni	
PEC issus de boues activées	/	0,250	/	0,188	0,034	Rudd <i>et al.</i> 1984
PEC issus de boues activées	2,54	0,17	/	3,64	/	Guibaud <i>et al.</i> 2003
PEC issus de boues activées	/	/	0,14	3,66	0,70	Guibaud <i>et al.</i> 2004
PEC issus de bactéries <i>Alteromonas macleodii subsp fijiensis</i>	1,52	1,11	1,15	/	/	Loaec <i>et al.</i> 1997
Exopolysaccharides produits par des souches pures de bactéries:						Loaec <i>et al.</i> 1998
ST 716	1,52	1,12	1,15	/	/	
GY 785	1,19	1,37	1,18	/	/	
HYD 1574	0,74	0,69	0,79	/	/	
HE 800	1,0	0,86	0,88	/	/	

La plupart des études sur la fixation des métaux par les PEC donnent des constantes de complexation relatives à la composition des PEC mais aussi à la méthode d'analyse utilisée. Une

grande variété de techniques peut être employée afin de mesurer la capacité de complexation d'un ligand macromoléculaire (Varney *et al.* 1984 ; Batley, 1989). L'utilisation de batchs est le plus souvent employée dans la littérature pour déterminer les capacités de biosorption des PEC (Rudd *et al.* 1984 ; Liu *et al.* 2001 ; Jang *et al.* 2001). Chaque batch contient une solution de PEC dans laquelle on introduit des ions métalliques en concentration croissante. Une centrifugation des batchs permet de récupérer un surnageant qui est ensuite dosé en métal (par spectroscopie d'absorption atomique, par exemple). Par soustraction de la concentration en métal dans le surnageant à la concentration initiale en métal introduite dans les batchs, on obtient la concentration en métal fixée aux PEC. Cette méthode a comme inconvénient de ne pas tenir compte de la capacité de biosorption des PEC en solution. En effet, les PEC en solution sont contenus dans le surnageant et leur capacité à fixer les métaux n'est donc pas prise en compte par cette méthode de détermination de la biosorption. La potentiométrie (titration acido-basique) ou la polarographie sont plus rarement utilisées (Buffle, 1988a,b ; Van Leeuwen *et al.* 1989). Quelque soit la méthode, une fois la courbe de titration ou isotherme d'adsorption représentant la quantité de métal adsorbée par les PEC en fonction de la quantité totale de métal présente obtenue, il reste à choisir une façon d'exploiter ses résultats. Plusieurs choix de modèles mathématiques existent tels que Langmuir, Freundlich (Ozdemir *et al.* 2003), Chau, Ruzic (Guibaud *et al.* 2003) etc... Les résultats sont alors variables d'un modèle à l'autre.

VI. Conclusion

Malgré une littérature assez dense sur les PEC, la composition de ces derniers reste très discutée.

On peut en effet se demander si les PEC extraits sont une représentation fidèle des PEC présents dans le milieu naturel étant donné la difficulté d'en extraire une grande quantité sans les altérer. Certaines méthodes de caractérisation bien qu'utilisées par un grand nombre d'auteurs engendrent parfois des modifications sur les PEC. Ces modifications peuvent ne pas s'exprimer à travers la caractérisation des PEC, mais avoir cependant des impacts sur leurs propriétés. Cette étude bibliographique met en évidence un manque de méthodes d'extraction de référence des PEC mais aussi de caractérisation fiables.

Les PEC tiennent plusieurs rôles au sein des floes de boues activées dont celui essentiel de protecteur des cellules bactériennes. Il apparaît intéressant d'étudier les propriétés de biosorption des PEC en prenant en considération les facteurs pouvant les modifier. Les propriétés de

biosorption des PEC sont fonction de différents critères : les conditions du milieu, le métal considéré mais surtout la composition des PEC. Cette composition est une composition apparente fonction notamment de la méthode d'extraction des PEC et des techniques de caractérisation utilisées.

Aussi, au vu de la littérature et afin d'appréhender les mécanismes de biosorption des métaux par les PEC, il nous est apparu dans un premier temps nécessaire de mieux évaluer les protocoles d'extraction couramment utilisés. L'influence des différents paramètres de la biosorption tels que nous les avons identifiés dans la littérature est analysée afin de mieux appréhender les mécanismes influençant la biosorption des métaux par les PEC. Ainsi l'influence du pH, de la présence de plusieurs ions métalliques ou la composition des PEC liée à leur structure est abordée dans les derniers volets de cette étude. Ces travaux ont été menés en utilisant les outils les plus fréquemment recensés dans la littérature pour la caractérisation des PEC afin de permettre une comparaison de nos résultats avec ceux disponibles.

Chapitre II: Extraction des PEC, conséquences sur leurs caractéristiques et leurs propriétés de biosorption

I. Introduction

Une première partie de ce travail a consisté à extraire notre matériel d'étude : les PEC. Or la littérature met en évidence un manque de méthodes d'extraction de référence. Parmi les différentes méthodes d'extraction à disposition, on distingue les méthodes utilisant un extractant chimique et les méthodes basées sur une action mécanique de séparation des PEC de leur environnement dites « méthodes physiques ». Il nous a semblé important de choisir parmi le panel de ces méthodes, huit des plus représentatives des travaux actuels menés sur les PEC, afin de réaliser une étude comparative de l'influence des protocoles sur la composition des PEC et sur leurs propriétés de biosorption.

Parmi les méthodes chimiques, l'utilisation de l'EDTA revient très régulièrement. Cette méthode mise au point en 1980 par Brown et Lester est toujours utilisée dans des publications récentes telles que les travaux de Li *et al.* (2002). De ce fait, il nous est apparu important de la retenir. Les extractants aldéhydiques sont aussi très prisés pour l'extraction des PEC. Parmi les protocoles rencontrés dans la littérature, l'utilisation du formaldéhyde en condition « drastique » (en présence de NaOH) nous a paru la plus fréquemment employée. Un protocole établi par Azeredo *et al.* (1998) faisant intervenir le glutaraldéhyde a retenu notre attention. En effet, ce protocole a la particularité de diminuer le processus de lyse cellulaire parfois inévitable lors de l'extraction. L'extraction à l'aide de résines cationiques, procédé couramment utilisé depuis 1995 (Frolund *et al.* 1995) permet de déstructurer les boues sans intervention d'agents chimiques. Il nous a donc semblé important de faire apparaître ce protocole dans notre étude comparative ainsi que l'extraction par sonication régulièrement combinée aux résines. Le procédé d'extraction par l'action de la chaleur se rencontre encore dans la littérature actuelle bien qu'il fasse l'objet de certaines controverses sur l'éventuelle dégradation des protéines présentes dans les PEC. Une méthode se limitant à l'action de la centrifugation sert de référence pour la comparaison des PEC extraits par les différentes méthodes sélectionnées. En effet, certains auteurs (Liu *et al.* 2001) estiment qu'elle n'altère en rien les PEC et de ce fait, permet d'extraire des PEC représentatifs.

La littérature évoque à plusieurs reprises le fait que la composition des PEC est influencée par le protocole d'extraction. Notre comparaison des PEC extraits a porté dans un premier article sur le rendement d'extraction, le taux d'acides nucléiques (en tant que traceur de lyse cellulaire), la composition biochimique (protéines, polysaccharides, substances humiques, acides uroniques, lipides) et l'analyse de leurs spectres infra-rouge. Ces critères sont communément pris en considération dans le choix d'une méthode. Cependant, ils ne rendent pas compte d'une possible altération des propriétés des PEC comme on peut l'envisager s'il y a présence de disparités dans les compositions des PEC. Un second article étudie l'influence des protocoles d'extraction sur les valeurs de pKa et les propriétés de biosorption des PEC extraits envers le plomb et le cadmium à pH 7. Un troisième article vient compléter cette étude comparative en prenant en considération l'influence des extractions sur les profils chromatographiques établis par chromatographie d'exclusion stérique à haute pression (HPSEC) des PEC extraits. Ces derniers critères d'évaluation d'une méthode d'extraction n'ont pas ou peu été envisagés dans la littérature.

II. Article n°1 :

Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties

Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods

S. Comte , G. Guibaud , and M. Baudu

Enzyme and Microbial Technology

Volume 38, Issues 1-2 , 3 January 2006, Pages 237-245

[doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.016](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.016)

Abstract

The efficiency of eight extracellular polymeric substances (EPS) extraction methods was compared on two different activated sludges. Three chemical methods (EDTA, formaldehyde + NaOH, glutaraldehyde), four physical methods (sonication, cation exchange resin, sonication + cation exchange resin, heating) and a control method (centrifugation alone) were tested.

EPS quantities extracted were more greater for chemical methods than those for physical methods. For the chemical methods used EPS contamination due to extracting reagents was pointed out by infra-red analysis. The EPS extracted by physical methods can show a different qualitative composition with protein and carbohydrate as predominant compounds. This study therefore underlines that the choice of EPS extraction method should not only be limited to extraction yield and nucleic acid content but should also consider that the EPS solution may be contaminated by extracting reagents and/or be greatly modified by the extraction protocol.

Keywords: Extracellular polymeric substances; Extraction method ; Characterisation

L'article qui suit vient compléter le précédent. Il s'agit, après avoir mis en évidence des différences significatives en ce qui concernent le rendement d'extraction et la composition biochimique entre les PEC issus des huit protocoles d'extraction étudiés, d'étudier l'influence de ces derniers sur les paramètres physico-chimiques et les propriétés de biosorption des PEC.

III. Article n°2:

Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS

Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb²⁺ and Cd²⁺ complexation

S. Comte , G. Guibaud , and M. Baudu

Enzyme and Microbial Technology

Volume 38, Issues 1-2 , 3 January 2006, Pages 246-252

[doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.023](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.023)

Abstract

To study the effect of extraction protocols on extracellular polymeric substances (EPS) metal binding ability, EPS from two activated sludges were extracted by eight extraction protocols: three chemical treatments, four physical treatments and a control. Two pKa, for each EPS, were determined: pKa1 may be specific for carboxyl and phosphoric and pKa2 may be attributed to phenolic and amino functional groups according to EPS composition and IR spectra. EPS pKa values could be affected by the presence of extraction reagents and/or the modifications of EPS by extraction reagents.

Complexation study performed at pH 7 by a polarographic method has always showed a greater affinity of EPS for Pb²⁺ than for Cd²⁺. The complexation properties of EPS extracted by chemical methods were greatly modified. Concerning EPS extracted by physical methods, their complexation properties were close except for EPS obtained by heating. Standardized extraction methods must be established as a function of the aims of the EPS study.

Keywords: Extracellular polymeric substances; Extraction method ; Complexation properties; Cd; Pb; pKa

Les propriétés de biosorption des PEC ainsi que les constantes d'acidité apparentes varient en fonction de la méthode d'extraction utilisée. Ces paramètres permettent d'apprécier différemment l'impact du protocole d'extraction sur la qualité des PEC. L'article qui suit poursuit cette démarche à travers un autre outil : la chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC). Ainsi les profils chromatographiques établis en HPSEC ainsi que la distribution en poids moléculaires des PEC, lorsqu'il est possible de l'établir, sont comparés en fonction du choix de l'extraction.

IV. Article n°3:

Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation

Sophie Comte, Gilles Guibaud , and Michel Baudu

Journal of Hazardous Materials

Article in Press, Corrected Proof, available 21 June 2006

[doi:10.1016/j.jhazmat.2006.06.058](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.058)

Abstract

The extracellular polymeric substances (EPS) contained in activated sludge flocs resulting from two-sewage treatment plants were extracted according to eight methods referred to in the bibliography. Extracted EPS were characterized by their extraction yield, carbon concentration, their biochemical composition, their HPSEC chromatograms and, where possible, molecular weight (MW) distributions. With HPSEC chromatograms, the use of the mobile phase containing methanol allowed a hydrophobic mechanism for EPS, extracted partly by chemical methods, to be identified. An MW distribution (from 0.1 to 600 kDa) was established for EPS extracted by control and physical methods only, from

calibration. Except for the resin and heating extraction methods, the EPS extracted from the two sludges displayed the same trend in their HPSEC fingerprints but not in their MW distribution. Results show that the extraction methods using chemical reagents strongly affected the HPSEC fingerprints of EPS, whereas, the physical methods influenced only MW distribution but not HPSEC fingerprints. The use of heat to extract EPS seems to induce hydrolysis of a part of EPS. The HPSEC fingerprint is a good indicator for the appreciation of the consequences of EPS extraction methods on the EPS extracted and the distribution of EPS with low MW in particular.

Keywords: Activated sludge; EPS; Extraction method ; HPSEC chromatography

V. Conclusions

A l'issue des travaux présentés dans ce chapitre, l'étude comparative des PEC extraits par huit méthodes d'extraction parmi les plus utilisées, a montré que les PEC sont affectés en quantité extraite comme attendu, mais aussi en qualité. Cependant pour tous les protocoles étudiés, les taux d'acide nucléique et le ratio protéine/polysaccharide permettent de conclure que l'intégrité des cellules bactériennes n'est pas affectée significativement. Seule l'extraction au glutaraldéhyde ne permet pas d'arriver à cette conclusion à cause d'interférences au niveau des protocoles de dosage. Une première comparaison à l'aide des outils les plus souvent utilisés lors d'études comparatives permet de montrer de grandes différences entre les PEC extraits par méthodes chimiques et les PEC extraits par méthodes physiques. Par exemple, les résultats donnent des rendements d'extraction des méthodes chimiques très supérieurs aux rendements d'extraction des méthodes physiques.

Les spectres IR des PEC ont mis en évidence une contamination de ces derniers par les extractants chimiques utilisés tels que l'EDTA, le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde. Des difficultés d'analyse de la composition biochimique des PEC par les méthodes chimiques ont été rencontrées du fait d'interférences entre extractants chimiques et réactifs de dosage des protéines ou des polysaccharides par exemple. Or la littérature fait peu état de l'influence de ces contaminants chimiques. Les PEC extraits chimiquement présentent aussi des particularités au niveau de leur profil HPSEC pouvant être dûes soit à la présence des extractants chimiques dans les solutions de PEC soit à la présence de composés issus d'une réaction de l'extractant avec les PEC. L'utilisation d'une phase mobile contenant du méthanol a permis de pointer l'existence de mécanismes de rétention hydrophobes des PEC extraits au glutaraldéhyde et au formaldéhyde en milieu alcalin sur la colonne. De plus, les valeurs de pKa des PEC issus des extractions à l'EDTA ou au glutaraldéhyde sont fortement affectées. Enfin, les PEC extraits par méthodes chimiques (EDTA et glutaraldéhyde) ne permettent pas d'évaluer la capacité de biosorption des PEC car il subsiste une interrogation concernant la participation des extractants chimiques à la fixation des cations métalliques.

La composition biochimique établie pour les PEC extraits par un procédé physique indique que les protéines et les polysaccharides sont les constituants majeurs des PEC. Les profils HPSEC des PEC extraits par un procédé physique sont très proches. L'utilisation d'une phase mobile au méthanol a permis d'écarter le cas de rétention hydrophobe des PEC extraits par un

protocole physique sur la colonne et d'établir une relation entre le temps de rétention et le poids moléculaire à l'aide d'une droite d'étalonnage. Les petits poids moléculaires (PM) (<1kDa) selon la littérature seraient le plus souvent des polysaccharides, ces derniers sont riches en groupements carboxyliques impliqués dans la biosorption à pH 7, tandis que les hauts PM correspondraient aux protéines. La distribution en PM des PEC extraits par un procédé physique ainsi que le taux de carbone organique révèlent des disparités illustrant une différence qualitative des PEC (le taux de carbone organique des PEC extraits par la chaleur est par exemple très anormalement élevé et la présence de nombreuses molécules de petits PM pour ces mêmes PEC laissant envisager une hydrolyse de certaines molécules). Les capacités de biosorption des PEC extraits par procédés physiques sont très proches exceptée celle des PEC extraits par la chaleur. La dénaturation des PEC par la chaleur semble entraîner une diminution des capacités de fixation du Pb et du Cd.

La méthode d'extraction affecte de manière plus ou moins importante la quantité et la qualité des PEC extraits. Elle influe sur les valeurs de pKa des PEC et sur les propriétés de biosorption du Pb et du Cd. Les profils chromatographiques établis par HPSEC peuvent représenter une empreinte identitaire des PEC et permettent de noter des différences significatives en fonction de la méthode d'extraction utilisée. La distribution en poids moléculaire des PEC lorsqu'il est possible de l'établir permet d'apprécier des différences dans la composition chimique des PEC puisque les faibles poids moléculaires sont attribués aux polysaccharides et les hauts poids moléculaires aux protéines.

A travers ces différents travaux, l'importance du choix de la méthode d'extraction des PEC devient évidente. Il convient donc de choisir un protocole d'extraction en tenant compte de la nature de l'étude envisagée sur les PEC. Dans le cas de l'étude des propriétés de biosorption, les méthodes utilisant les résines, la sonication ou l'association résine plus sonication sont préférables.

Chapitre III: Paramètres de biosorption des métaux

I.Introduction

L'étude des propriétés de biosorption des métaux sur les PEC ne peut s'envisager sans celle de l'influence des paramètres susceptibles d'influencer la biosorption des métaux. La littérature évoque parmi ces paramètres : le pH, la force ionique, la présence d'autres cations métalliques, le biosorbant et la température. La deuxième partie de ce travail consiste donc en une étude sur deux paramètres importants que sont la présence de plusieurs cations métalliques et le pH. En effet, dans les conditions d'une station d'épuration, ces deux paramètres peuvent évoluer et conditionner la capacité des PEC présents au niveau des floes bactériens ou dans le surnageant des boues à retenir les métaux lourds. La composition des PEC ainsi que certaines caractéristiques physico-chimiques ont pu être établies afin d'aider à la compréhension des mécanismes de biosorption.

A travers la littérature et la composition des PEC, certains groupements fonctionnels susceptibles de fixer des métaux ont pu être identifiés : groupements carboxyliques, hydroxyles, etc... Afin de caractériser ces sites de biosorption, la capacité des PEC à fixer un métal (Cu, Pb, Cd ou Ni) dans un système simple, bi, tri ou multi métallique a été évaluée dans un premier article.

Un second article s'intéresse à l'influence du pH sur la capacité de biosorption des PEC. Les valeurs de pH étudiées sont 4, 6, 7 et 8. Sachant que les interactions métal/groupements fonctionnels sont basées sur des mécanismes d'adsorption tels que l'échange d'ions, la complexation et la précipitation, une modélisation sur le logiciel MINQL 4.5 a été utilisée afin de connaître les possibles formes métalliques rencontrées pour les valeurs de pH étudiées.

Ces études ont pour objectif d'appréhender certains paramètres de biosorption des PEC. La capacité de biosorption des PEC a été menée par polarographie en utilisant le modèle mathématique établi par Ruzic pour l'exploitation des données.

II. Article n°4:

Metal removal from single and multimetallic equimolar systems by extracellular polymers extracted from activated sludges as evaluated by SMDE polarography

Gilles Guibaud, Sophie Comte, François Bordas and Michel Baudu

Process Biochemistry

Volume 40, Issue 2, February 2005, Pages 661-668

[doi:10.1016/j.procbio.2004.01.059](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.059)

Abstract

This paper provides information on the use of static mode dropping electrode (SMDE) polarography for the measurement of the metal complexation potential of extracellular (ECP), extracted from activated sludges, from aqueous solution containing Pb, Cu, Cd and Ni in single, bi-, tri- and multimetallic equimolar systems. This technique was useful for the evaluation of different free metal species (Pb, Cu, Cd, Ni) existing in the test solution. First, the ability of ECP to complex each metal, studied at pH 7 was carried out using polarography titration and Chau and Ruzic's models. The ECP exhibited the following order of metal complexation (number of sites): Cu > Pb > Ni > Cd. In an equimolar mixture, results indicated that the metal complexation capabilities of ECP in multimetallic systems are not affected for Cd and Pb, weakly affected for Ni. In a multimetallic equimolar mixture, the quantities of metal removed were in accordance with the number of sites present in ECP. It was not possible to quantify Cu removal by ECP due to the distortion of the peak obtained by polarography in SMDE mode. At the study potential for Cu (0.15 to -0.20 V) the high concentration of organic matter (ECP) may have caused interference with the mercury drop. The IR data, supported by the pKa of ECP revealed that the carboxylic group of ECP may play a major role in metal binding onto ECP at pH 7.

Keywords: SMDE polarography ; Activated sludges; Extracellular polymer; Pb; Cu; Cd; Ni; Biosorption; Single and multimetallic system

Parmi les paramètres pouvant influencer la biosorption des PEC, les résultats de l'article précédent permettent de négliger l'influence de la présence de plusieurs cations métalliques sur la quantité de métal fixée sur les PEC et sur l'ordre d'affinité des métaux envers les PEC. L'article qui suit se propose d'étudier l'influence du pH sur la biosorption des PEC. Ce dernier paramètre est connu dans la littérature pour son influence majeure dans la détermination de la spéciation métallique et de l'état de dissociation du biosorbant.

III. Article n°5:

Complexation properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards four metals (Pb, Cd, Ni, Cu) for different pH values (4, 6, 8)

Comte S., Guibaud G., Baudu M. soumis à Bioressource and Technology

**BIOSORPTION PROPERTIES OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES
(EPS) TOWARDS Cd, Cu AND Pb FOR DIFFERENT pH VALUES**

S. COMTE, G. GUIBAUD* and M. BAUDU

Laboratoire des Sciences de l'Eau et de l'Environnement, Université de Limoges.

Faculté des Sciences et Techniques.

123, avenue A. Thomas, 87060 Limoges Cedex-France.

*Corresponding author, gguibaud@unilim.fr,

Tel: 33(0)5 55 74 28, Fax: 33(0)5 55 45 73 67

ABSTRACT

The aim of this work was to assess the influence of the pH on the metal biosorption of EPS extracted from two different activated sludges called A and B. composition and physico-chemical characteristics of EPS such as the apparent pKa have been determined. The biosorption capacities of EPS was examined at pH 4, 6, 7 and 8 successively with three metal Cu, Pb and Cd using differential pulse polarography (DPP) as an investigation mean. Ruzic's model is used to perform polarographic titration curves and allow to obtain a conditional binding constant (K) and a number of binding sites (L) for EPS. Two apparent pKa were obtained, the first were 6.2 for both EPS attributed to carboxylic and phosphoric groups instead of the second were 8.6 and 9.3 for EPS A and B respectively and were attributed to phenolic and amino functional groups. Whatever the EPS (A or B) and the metal considered, the conditional binding constant did not show significant differences in the strength of complex formed between the EPS and metals for the pH range studied. But for all metals, the number of binding sites of EPS was significantly lowered by a decrease of the pH medium. For the most of cases, the number of binding sites of EPS A is higher than the number of EPS B. Simulations of the speciation states of Cu, Pb and Cd at the different pH values in ultra-pure water (25°C, ionic strength 0.045M) have been performed with Mineql 4.5 software and indicated the presence of hydroxylated forms and sometimes solid forms for Pb and Cu. But the polarographic titration curves have only revealed precipitation of Cu at the end of the experiments at pH 8. The results regarding the influence of pH on metal biosorption seem to indicate that the pH would alter the fixation of metal ions to EPS varies with the nature of EPS (such as charge) and also the metal speciation and the characteristics of the ion studied.

Keywords: Activated sludge, biosorption, EPS, heavy metals, pH

INTRODUCTION

When wastewater treatment is performed with the activated sludge process, the quality of the effluent is highly dependent on the efficiency of the solid-liquid separation processes. Poor separation of sludge in secondary clarifier could result of metal removal problem. Moreover, the activated sludge can be reuse in agriculture for land treatment because they are very rich in organic matter and the accumulation of heavy metals in the sludge can counteract metal mobilization in the environment.

The presence of metals in the activated sludge is often attributed to the binding of metals onto the bacterial cell surface (Lawson *et al.*, 1984). However, bacteria may produce macromolecules outside their proper cell wall, commonly calling Extracellular Polymeric Substances (EPS).

Studies (Brown and Lester, 1982 a, b; Guibaud *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001) have shown that EPS also play a crucial role in biosorption of heavy metals. Liu and Fang (2002) demonstrated that EPS are likely to play a more critical role in metal adsorption than bacterial cell surface.

As saying precedently, EPS are metabolic products of bacteria serving as a protective barrier for cells against the harsh external environment but also result from organic matter of the effluent and from microbial lysis or hydrolysis (Wingender *et al.*, 1999; Liu and Fang, 2003). EPS have also a function of sorption of inorganic ions which constitute metabolism elements for bacteria (Andrews *et al.*, 2003; Aquino and Stuckey, 2004). Their composition is complex but EPS are mainly composed of polysaccharide, protein, humic substance, uronic acid, nucleic acid and lipid (Wingender *et al.*, 1999; Liu and Fang, 2003), containing ionisable functional groups such as carboxyl, phosphoric, amine, and hydroxyl groups (Liu and Fang, 2002). These functional groups represent potential binding sites to sequester metal ions (Brown and Lester, 1982a, b; Liu and Fang, 2002).

It assumed that metal biosorption involved a physicochemical interaction between the metal and functional groups on cell surface, based on physical adsorption, ion exchange, complexation and precipitation (Ledin, 2000). Moreover metal biosorption performance depends on external factors, such as pH, other ions in bulk solutions (which maybe in competition), organic material in bulk solution and temperature (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003; Ledin, 2000). Unfortunately, few data concerning pH effect on EPS metal biosorption properties are available.

A wide variety of techniques can be employed to determine the binding capacity of a macromolecular ligand. Among these techniques, electrochemical techniques such as anodic stripping voltammetric and differential pulse polarographic (DPP) methods have been most widely used (Morlay *et al.*, 1999; 2000; Savvaidis *et al.*, 2003). We have chosen to employ a polarographic method as investigation mean because of its ease of use. The polarographic titration curves obtained were exploited with Ruzic's modelization (Ruzic, 1996).

The major objective of this study is to investigate the pH effect on the EPS biosorption of heavy metal ions. So We have studied the biosorption properties of EPS at different pH values (4, 6, 7 and 8) with three metal ions (Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+}).

MATERIALS AND METHODS

Sludge samples and EPS extraction

EPS extraction was carried out on two activated sludges obtained from the aeration tanks of two wastewater treatment plants (WWTP) called A and B in order to obtain two EPS with composition different.

The WWTPs A and B present different characteristics. The treatment capacity in inhabitant equivalent is 285000 and 4000 for WWTP A and B respectively. The organic loads are between 0.24-0.30 and between 0.13-0.16 Kg BOD₅.m⁻³.day⁻¹ for WWTP A and B respectively.

Less than four hours after sampling in WWTP, sludges were concentrated at 4300 xg for ten minutes at 4°C. The residues were recovered and suspended in ultra-pure water. From each sludge (A, B), a 40W sonication treatment for two minutes has been applied and followed by two ultra-centrifugations (20000xg for 20min at 4°C then 10000xg for 15 min at 4°C) in order to obtain EPS samples A and B (Guibaud *et al.*, 2005b). The EPS composition (Dry Weight, Volatil Dry Weight, Total Organic Carbon, nitrogen, phosphorus, protein, polysaccharide and humic acid contents) has been determined according to the protocols described by Guibaud *et al.* 2005a. The main characteristics of both EPS studied are summarized in Table 1.

Table 1: Main characteristics of EPS A and B

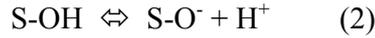
	EPS A	EPS B
General characterization of EPS solution (in g.L⁻¹)		
Dry Weight (DW)	0.497	0.557
Volatil Dry Weight (VDW)	0.434	0.486
General characterization of EPS		
Total Organic Carbon (in mg C.g ⁻¹ VDW)	228	255
Nitrogen (in mg N.g ⁻¹ EPS VDW)	77	73
Phosphorus (mg P.g ⁻¹ EPS DW)	38	26
Biochemical composition of EPS (in mg.g⁻¹ EPS VDW)		
Proteins	350	391
Polysaccharides	143	158
Humic acids	62	206

pKa determination

Theoretical considerations

The determination of the pKa for the EPS solutions was not possible by simple acid-base titration. According to Guibaud *et al.* (2003), a method previously developed for solids chemistry was modified and applied to EPS in order to determine the pKa of the EPS. The acid-base surface reactions are described only by the law of mass action (Kraepiel *et al.* 1998) based on the protonation of the surface functional groups and determined by analogy with amphoteric compounds (Stumm, 1992).





$$\text{with: } K_{a1} = \frac{[\text{H}^+].[\text{S-OH}]}{[\text{S-OH}_2^+]} \quad (3)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{H}^+].[\text{S-O}^-]}{[\text{S-OH}]} \quad (4)$$

$$[\text{S}]_{\text{tot}} = [\text{S-OH}_2^+] + [\text{S-OH}] + [\text{S-O}^-] = \text{PEC} \quad (5)$$

with $[\text{S}]_{\text{tot}}$: total number of surface sites

PEC: Protonic Exchange Capacity

In this study, the determination of both the EPS surface charge (Q) (Kummert and Stumm,1980 ; Sigg and Stumm,1981) and the EPS protonic exchange capacity (PEC) (Nowack, 1996) were carried out by potentiometric titration. Finally, Q and PEC parameters allowed two apparent pKa of EPS solutions to be calculated for the predominant functional groups.

The PEC indicates the total number of sites potentially active for binding fixation (Nowack, 1996).

Apparatus

Titration were carried out with an automatic titrator, Metrohm 716 DMS, coupled to a Metrohm 727 Ti Stand and equipped with a pH electrode (CRISON 5202, pH 0-12/0; 80°C; KCl 3 M).

Analytical procedure

25 mL of EPS solution was placed in a 22±1°C thermostated cell. titration was carried out adding NaOH or HNO₃ (0.01 M) under nitrogen atmosphere.

Biosorption study

Theoretical considerations

The binding capacity of the EPS could be defined as the maximum ability of the polymers to fix a given metal ion. The method commonly used to estimate this capacity consists in the titration (*i.e.* the progressive saturation) of the ligand (EPS) with the metal ion of interest at fixed pH. The theoretical study of the complexation equilibrium associated to the law of mass action can be described as follows, assuming the formation of a 1:1 complex.



$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} \quad (7)$$

with: K: Conditional binding constant

[M]: free metal concentration

[L]: ligand concentration or number of binding sites

[ML]: complex concentration

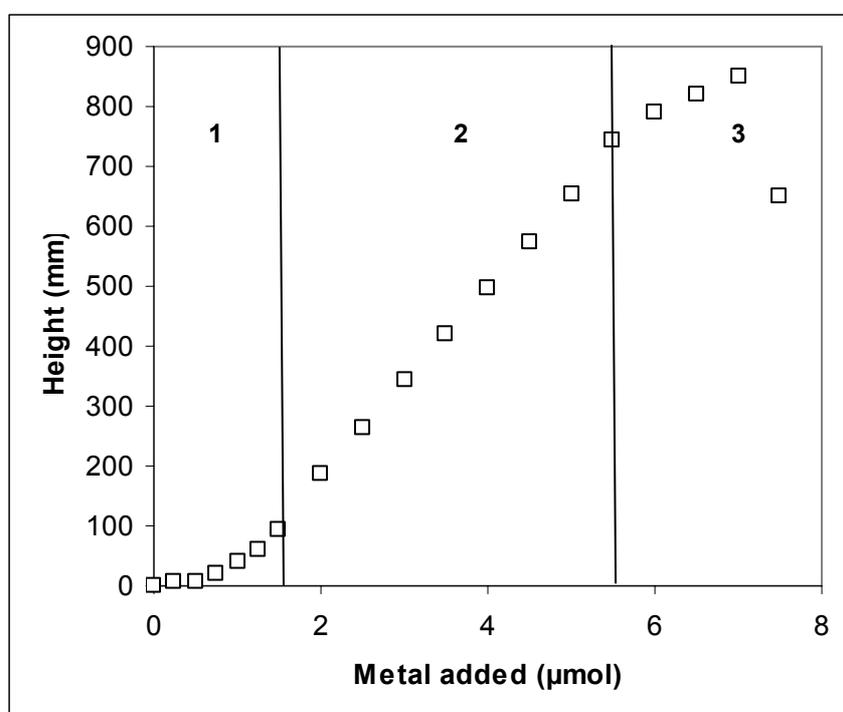
The modelisation of the EPS saturation curves was carried out according to Ruzic's graphic methods and allowed $[L]$ and K to be determined (Ruzic, 1996). During the modelisation, error evaluation on the slopes and the y-intercepts were performed.

Theoretical polarographic titration curve

To obtain saturation curve of EPS by metal, a polarographic method is used (Guibaud *et al.*, 2004). The polarographic titration allows to appreciate easily the concentration of free metal in the solution and to determine with the use of Ruzic's model the EPS biosorption ability (Ruzic, 1996).

Figure 1 : Three parts in theoretical polarographic titration curve

(1: Complexation part, 2: Linear part, 3: Precipitation part)



A theoretical polarographic titration curve (Figure 1) can present three parts: the first called complexation part corresponding to the biosorption of metal by a ligand, the second called linear part corresponding to the saturation of the binding sites of the ligand by the metal (*i.e.* the addition of free metal is proportional to the height of polarographic peak recorded) and a third called precipitation part corresponding to the possible formation of hydroxylated insoluble form or metal solid form (*i.e.* the metal added is free but it can be found soluble or in solid form). Only the complexation and linear part are used to determine the biosorption capacity of a ligand (Ruzic, 1996).

Apparatus

DPP measurements were carried out with Metrohm 663 VA polarograph fitted to a three-electrode arrangement. The working and auxiliary electrodes were a stripping mercury dropping electrode (SMDE) and a platinum wire, respectively. The reference electrode, to which all potentials are referred, was a saturated electrode (Ag/AgCl-KCl). The instrumental parameters are listed in Table 2.

The pH of the different samples in the analysis cell was continuously measured using a CRISON pH meter (Basic 20) equipped with a micro-electrode (CRISON 58.02).

Table 2: Instrumental parameters used for DPP measurements

Parameters	Value
Drop life time	1s
Scan rate	2 mV/s
Cathodic pulse amplitude	50 mV
Pulse duration	60 ms
Potential range scanned	Pb(II): -0.20 to -0.50V Cu(II): +0.10 to -0.20V Cd(II): -0.45 to -0.75V

Analytical procedure to record polarographic titration curve

All the samples were treated in exactly the same way in order to obtain polarographic titration curve. The polarographic measurements were performed at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under a nitrogen atmosphere and with a 20mL total volume of solution containing EPS in the analysis cell. The solution of EPS for biosorption experiments is performed with KNO_3 1M as a supporting electrolyte (10mL), ultra-pure water (200mL) and EPS (10mL). The pH was adjusted at 4.0-6.0-7.0 and 8.0 ± 0.1 by the addition of micro-quantities of dilute solution of sodium hydroxide or nitric acid. Micro-additions (10, 20, 50 or 100 μL) of the metal ion stock solution (10^{-2}M for Cu and Pb, 10^{-3} for Cd, pH 4) were then performed. After each metal addition, the pH was readjusted. The response of the system (*i.e.* determination of free metal concentration in EPS solution) was recorded after the deaeration of the sample by 10min nitrogen bubbling associated to stirring. The titration curve (height of peak (in mm) or *i* vs total added metal) was then recorded.

The number of sites initially occupied by the metals studied on EPS was not taken into account for the determination of the total number of sites in EPS as it was negligible (<1‰ total complexation determined).

Simulation of metal speciation

Speciation states of Cu, Pb and Cd have been studied in ultra pure water with a ionic strength attributed to the presence of KNO₃ at 0.045M by simulation with MINEQL 4.5 computer program. For each pH value (4, 6, 7 and 8), different concentrations in metal have been analysed: initial condition corresponding to the addition of 10µL of metal in the polarographic cell (*i.e.* for Cu and Pb, 4.6.10⁻⁶M and for Cd 4.6.10⁻⁷M), final condition corresponding to the fifth plot on the linear part of polarographic titration curve (Figure 1, part 2) (saturation of EPS in metal). In consequence, for each pH value and the metal studied, the final condition is different. Finally, we have studied the speciation state of the metal in precipitation condition corresponding to the metal concentration which points on the titration curve decreased, if such experimental condition are reached (Figure 1, part 3).

RESULTS AND DISCUSSION

Physico-chemical characterization of EPS

The PEC and the pKa values of EPS A and B have been determined and are displayed in Table 3.

Table 3: Physico-chemical characterization of EPS A and B

	A	B
PEC (µmol.g ⁻¹ EPS DW)	1400±70	1550±80
pKa ₁	6.2±0.1	6.2±0.1
pKa ₂	8.6±0.1	9.3±0.1

The PEC represents an estimation of EPS total binding sites (Nowack, 1996). The PEC values are 1400 and 1550 µmol.g⁻¹ EPS DW for EPS A and B respectively. It indicates that EPS B has the best capacities to bind metallic cations in the case of protonic exchange mechanism sometimes used to explain biosorption properties of EPS.

Two pKa values have been found for each EPS. pKa₁ are 6.2 for both EPS and pKa₂ are 8.6 and 9.3 for EPS A and B respectively. In the literature data, Liu and Fang (2002) and Guibaud *et al.* (2005, a, b) have established that in EPS solution, pKa₁ (about 6) is characteristic of carboxylic and phosphoric functional groups and pKa₂ (about 9.6) is attributed to phenolic and amino functional groups. Moreover, EPS A and B are mainly composed of proteins, carbohydrates and humic substances (Table1). So, our pKa values are in accordance with the literature and the EPS composition.

EPS biosorption results

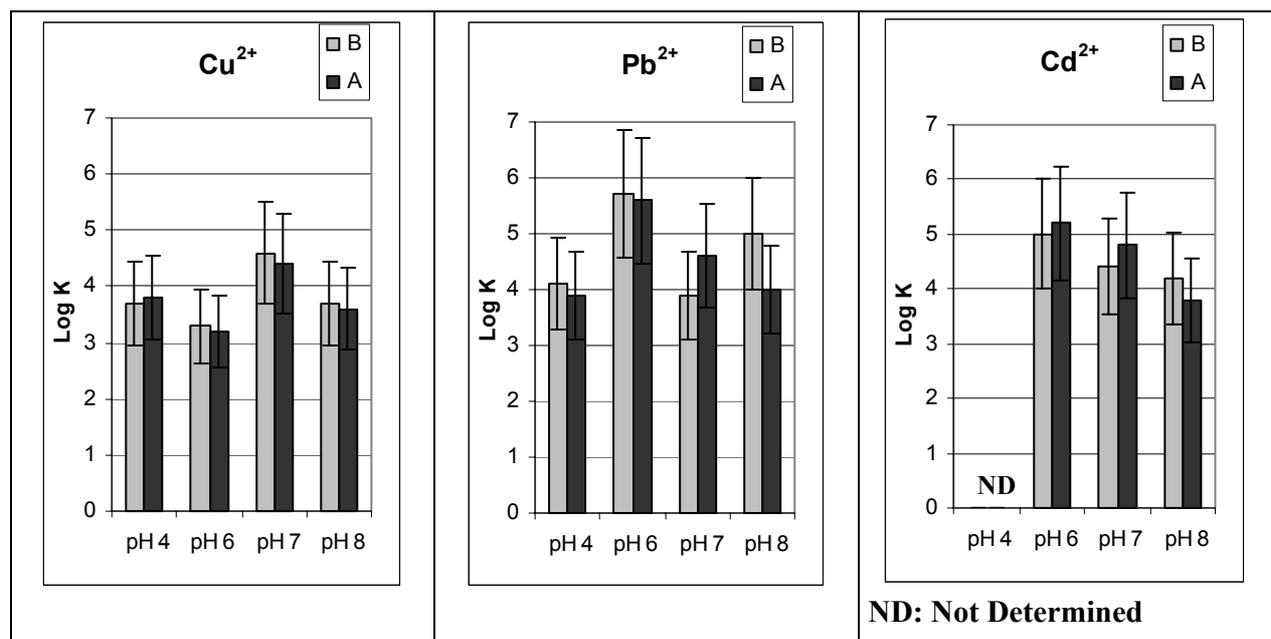
Conditional binding constant

The biosorption capacities of EPS A and B have been studied at the four pH values and in first time the conditional binding constant (expressed in Log K) obtained are presented in Figure 2.

For Cu, the results revealed no tendency with the pH, the conditional binding constant varied from 3.2 to 4.5. The same observation can be done for lead, the conditional binding constant varying from 3.9 to 5.7. For cadmium, at pH 4 the biosorption of the metal by EPS was not detectable. Concerning the other pH values, for cadmium, Log K did not show a tendency when the pH decreased and varied from 3.7 to 5.0.

Finally, whatever the EPS (A or B) and the metal considered (Cu, Pb, Cd), the conditional binding constant did not show significant differences in the strength of complex formed between the EPS and the metals for the pH range studied.

Figure 2: Conditional binding constant of EPS (A and B) according to the pH and the metals studied



Number of binding sites

In the second time, The biosorption capacity of EPS toward the three metals at different pH values have been expressed in number of binding sites of EPS and have been summarized in Table 4.

For Cu, the number of binding sites varied from 99 to 5304 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS and from 29 to 3183 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS for EPS A and B respectively according to the pH increase. For lead, this number varied from 69 to 2509 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS for EPS A and from 26 to 1789

$\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS for EPS B when the pH increased. For cadmium, in the pH range 6-8, the number of binding sites of EPS A varied from 11 to 84 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS and the number of binding sites of EPS B varied from 8 to 85 in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS. At pH 4, no complexation has been determined with Cd and both EPS.

Table 4: Number of fixation sites of EPS A and B in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of VDW EPS according to the pH and the metals studied

		pH 4	pH 6	pH 7	pH 8
Cu^{2+}	A	99±7	125±8	4228±166	5304±1350
	B	29±6	135±14	2630±87	3183±460
Pb^{2+}	A	69±9	1841±41	2205±89	2509±89
	B	26±8	1272±24	1468±79	1789±35
Cd^{2+}	A	ND	11±1	23±3	84±10
	B	ND	8±1	21±2	85±4

Finally, for all metals studied, the number of binding sites of EPS was significantly lowered by a decrease of the pH of the medium. For the most of cases, the number of binding sites of EPS A is higher than the number of EPS B. At pH 4, the metal biosorption capacity of both EPS is very weak. At pH 6, the number of binding sites of EPS increased in the following order, depending on the metal ion: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$. But at pH 7 and 8, this metal order has changed and was: $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$.

Discussion about metal affinity order for EPS

Wang *et al.* (2003) have investigated on the uptake of several heavy metal ions by sludge particulates as a function of pH (range 3-9). They have obtained the following metal-sludge affinity order: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$, this order was not affected by the pH in the range studied. But Pardo *et al.* (2003) have studied the biosorption of different metals by inactive biomass of *Pseudomonas putida* and have found different metal order affinities according to the pH. At pH 4.5, the sequence was: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} \approx \text{Zn}$ and if we consider the values of optimum pH (different of 4.5), the order becomes $\text{Pb} > \text{Cu} \approx \text{Zn} < \text{Cd}$. Several authors predict different stability trend for organo-metal complexes depending on the pH and the complexing studied. According to Savvaidis *et al.* (2003) who have worked on biosorption of *Pseudomonas cepacia*, the order in which the metals were removed with the biomass was $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Zn}$. Moreover, it has been established that the preference of several hydrous solids (such as lignite) for metals has been related to the metal electronegativity and the reported effect is a stronger attraction for the higher electronegativity (Allen and Brown, 1995). So the metal order can vary according to the metal electronegativity (*i.e.* metal speciation) and the biosorbent charge involved by the pH medium changes.

Metal speciation

MINEQL simulations

The speciation state of the different metals (Cu, Pb and Cd) at pH 4, 6, 7 and 8 have been carry out in ultrapure water (at 25°C) with ionic strength of 0.045M by the software MINEQL 4.5 and Table 5 summarized the results obtained.

Table 5: Main forms of Cu, Pb and Cd calculated with Mineql 4.5 in ultra-pure water (at 25°C, ionic strength 0.045M)

metal		pH 4	pH 6	pH 7	pH 8
Cu	initial condition	100% Cu ²⁺	98.1% Cu ²⁺ 1.8% CuOH ⁺	19.5% Cu ²⁺ 3.5% CuOH ⁺ 76.9% Tenorite	99.4% Tenorite
	final condition	100% Cu ²⁺	98.1% Cu ²⁺ 1.7% Cu _s	99.5% Tenorite	100% Tenorite
	precipitation condition	\	\	100% Tenorite	100% Tenorite
Pb	initial condition	100% Pb ²⁺	98.6% Pb ²⁺ 1.4% PbOH ⁺	62.5% Pb ²⁺ 8.8% PbOH ⁺ 28.6% Pb(OH) _{2s}	98.5% Pb(OH) _{2s}
	final condition	100% Pb ²⁺	98.6% Pb ²⁺ 1.4% Pb(OH) _{2s}	2.6% Pb ²⁺ 97.1% Pb(OH) _{2s}	99.9% Pb(OH) _{2s}
	precipitation condition	\	\	98% Pb(OH) _{2s}	100% Pb(OH) _{2s}
Cd	initial condition	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺
	final condition	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺	100% Cd ²⁺

Studying the mechanism for metal ion binding to the biomass is complicated by the fact that metal cations are hydrolyzed in aqueous solutions with the pH value of the sorption system studied. Partitioning of the metal species depends on the solution pH, the temperature, the total metal concentration in solution, the ionic strength and the presence of ligand. EPS are very complex so the simulations with MINEQL 4.5 have been realised in ultra-pure water for initial, final and sometimes precipitation conditions of metal without the influence of the presence of ligand (*i.e.* EPS).

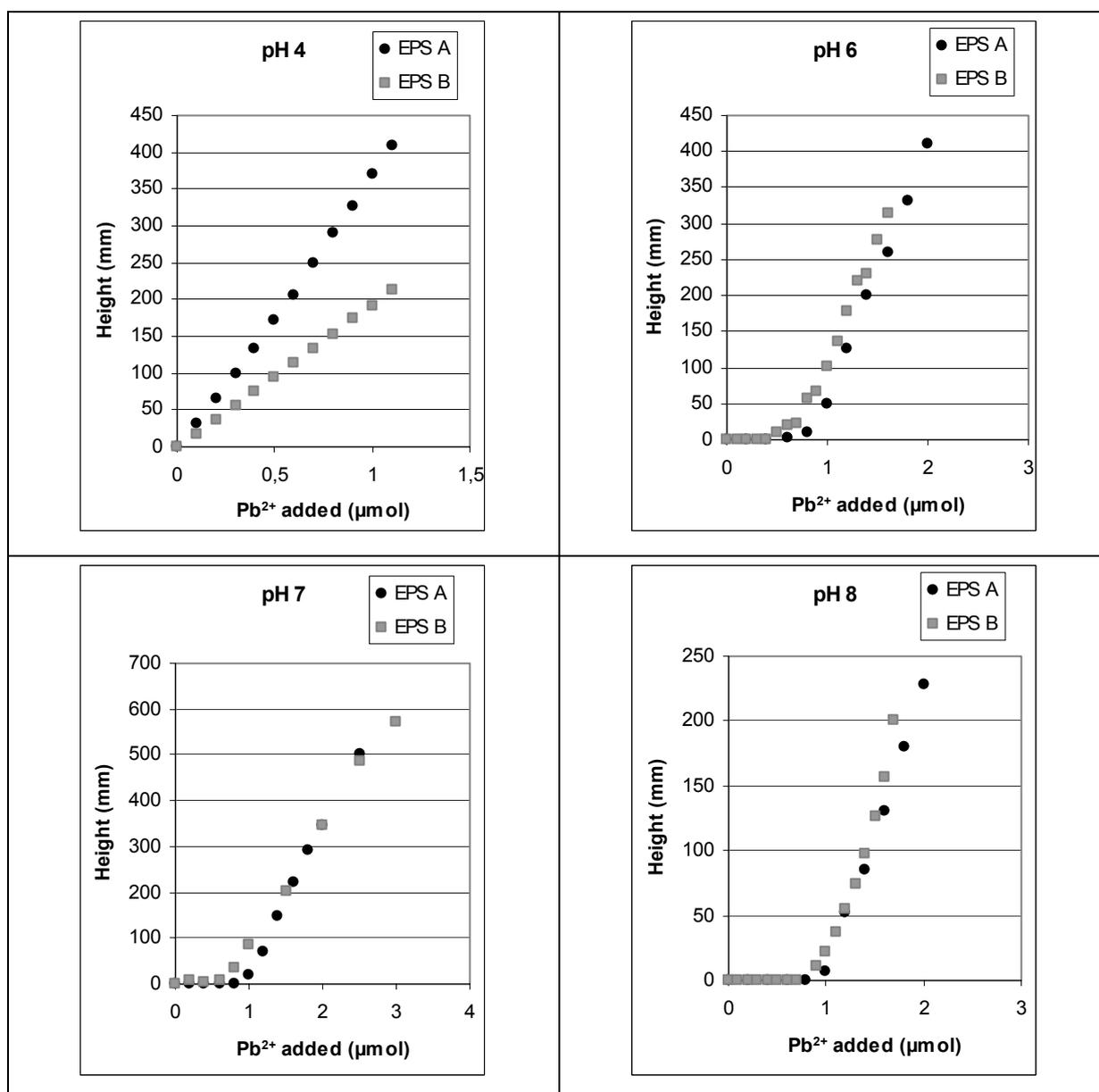
According to the simulations, for the experiments at pH 4, all metallic species only have a divalent cation form. For cadmium, the simulations predicted only the presence of divalent cation form whatever the pH value. At pH 6, for lead and copper, the majority of metal is in divalent cation form but soluble hydroxylated forms can appear as soon as the beginning of the

experiments. And higher the metal concentration and the pH is, more the divalent cation forms disappear, and more soluble or insoluble hydroxylated form percentage increase. For lead and copper, solid form maybe also found. Indeed, At pH 8, for the same metals, simulations only indicated the presence of solid form whatever the conditions of metal concentration studied.

Experimental observations

Polarographic titration curve of lead with EPS A and B at pH 4, 6, 7 and 8 are presented on Figure 3.

Figure 3: Polarographic titration curve of Pb^{2+} with EPS (A and B) at pH 4, 6, 7 and 8



At the four pH values, the titration curves did not show precipitation parts for both EPS at the metal concentrations studied. So no presence of solid form have been detected during our

experiments. MINEQL simulations (Table 5) have predicted the presence of solid forms of lead at pH 7 and 8 for all the time of the experiments.

Figure 4 presents polarographic titration curves of Cu with EPS A and B at the four pH values.

At pH 4, 6 and 7, we noticed that the titration curves only presented complexation and linear parts on all the metal concentration range considered. But at pH 8, at the end of the experiments, for both EPS, some plots (corresponding of free metal in solution) strongly decreased which could indicate precipitation of Cu. So these curves showed that if there was formation of solid copper, our analyses have just observed this phenomenon at the end of the experiments at pH 8.

In conclusion, MINEQL simulations of metallic speciation were not in accordance with the experimental results observed with metal biosorption of EPS. These simulations only underlined the possible presence of different speciation forms for the metals studied. So, It indicated that several biosorption mechanisms are also possible according to the speciation states of the metal studied and the EPS forms involved by the pH medium.

Possible mechanisms for metal biosorption by EPS as function of pH

Implication of electrostatic nature of EPS and metal

To explain the influence of the pH, it should be remembered that it is now widely recognized that the deprotonated form of the reactive sites (*i.e.* carboxylate groups) is primarily responsible of the binding of metal ions onto polymers of a carboxylic nature (Morlay *et al.*, 2000; Van den Hoop *et al.*, 1991). The carboxylic and phosphoric groups identified with pK_{a1} values (6.2) could be mainly implicated in the binding of metal ions by EPS at pH 6, 7 and 8 (Liu and Fang, 2002; Singh *et al.*, 2000). The medium pH affects the ionization state of the functional groups like carboxylate, phosphate and amino groups of EPS. The carboxylate and phosphate groups carry negative charges that allow the EPS components to be potent scavengers of cations (Ozdemir *et al.*, 2003). Rudd *et al.* (1984) assume that the complexation of Cu and Cd with EPS from activated sludge was controlled by two distinct types of binding site.

In fact, different mechanisms have been proposed to explain the biosorption of metals. One is based on ionic exchange equilibrium. According to Lopez *et al.* (2000), as the pH increased, metal biosorption increased since ion exchange is more effective when less proton is available to compete with the metal for negatively-charged metal-binding sites.

In the case of ionic exchange equilibrium, the charge density of the metal ions will be the governing factor (Pardo *et al.*, 2003). For the three metal ions studied, Pb(II) has the lowest radius (450pm), followed by Cd(II) (500pm) and Cu(II) (600pm). Our results showed that the metal order at pH 6 was Pb>Cu>Cd and at pH 7 and 8 was Cu>Pb>>Cd. Moreover, PEC values have showed that PEC of EPS B is higher than PEC of EPS A (Table 3) and the number of binding

sites of EPS A was higher than that of EPS B in the most of cases (Table 4). So the PEC results and the number of binding site results were not in accordance. Therefore ionic attraction and exchange do not fully explain the biosorption ability of EPS as function of pH.

According to Loaec *et al.* (1997) who have studied the biosorption properties of a bacterial exopolysaccharide (*Alteromonas macleodii* subsp *fijiensis*), the formation of a metal-ligand coordination bond is based on the theory of hard and soft acids (*i.e.* electron acceptor) and bases (*i.e.* electron donor). The main electron donor atoms of exopolymers are nitrogen present as amino-sugars, oxygen as hydroxyl and carboxyl and sulphate ester. According to Gadd (1992), Pb has a strong preference for ligands such as O and N, while Cd ions prefer soft ligands such as sulphide. Table 1 showed that EPS are mainly composed of proteins and carbohydrates containing ligands such as O and N. Regarding to the composition of EPS, the order of the biosorption of the metal should be Pb to lesser extent Cd, it was the case in our works (Table 4).

Implication of global electric field

According to Morlay *et al.* (1998), the binding of cations with polyacid cannot be reduced to pure ion exchange. This interaction proved to be specific of the counterion and thus was not only of an electrostatic nature. It has also suggested that the global electric field surrounding the polyacid molecule partially neutralized has a role to play in the resulting metal-polymer complex stability. In our experiments, we have not observed important changes in the binding constant stability with the variation of the pH (Figure 2). But, the pH of the medium will influence the binding of metal ions via the change in the degree of dissociation of the polyacid (Morlay *et al.*, 2000). In our study, the numbers of binding sites (Table 4) obtained at pH 4 were weak, particularly for Cd (the biosorption of the metal by EPS was not significant). The first apparent pKa of EPS was at 6.2 so at low pH, EPS had a very weak degree of dissociation. More The pH increase and more the degree of dissociation of EPS would change and would be high.

Some conformational changes in the polymer structure may also be considered (Morlay *et al.*, 2000). For example, we can assume that at pH 4, owing to the low degree of dissociation of the polymer and consequently, to the low electrostatic repulsion forces existing in its structure, the macromolecules are in rather compact form. Thus steric effects would probably lower the accessibility of some inner potentially complexing sites.

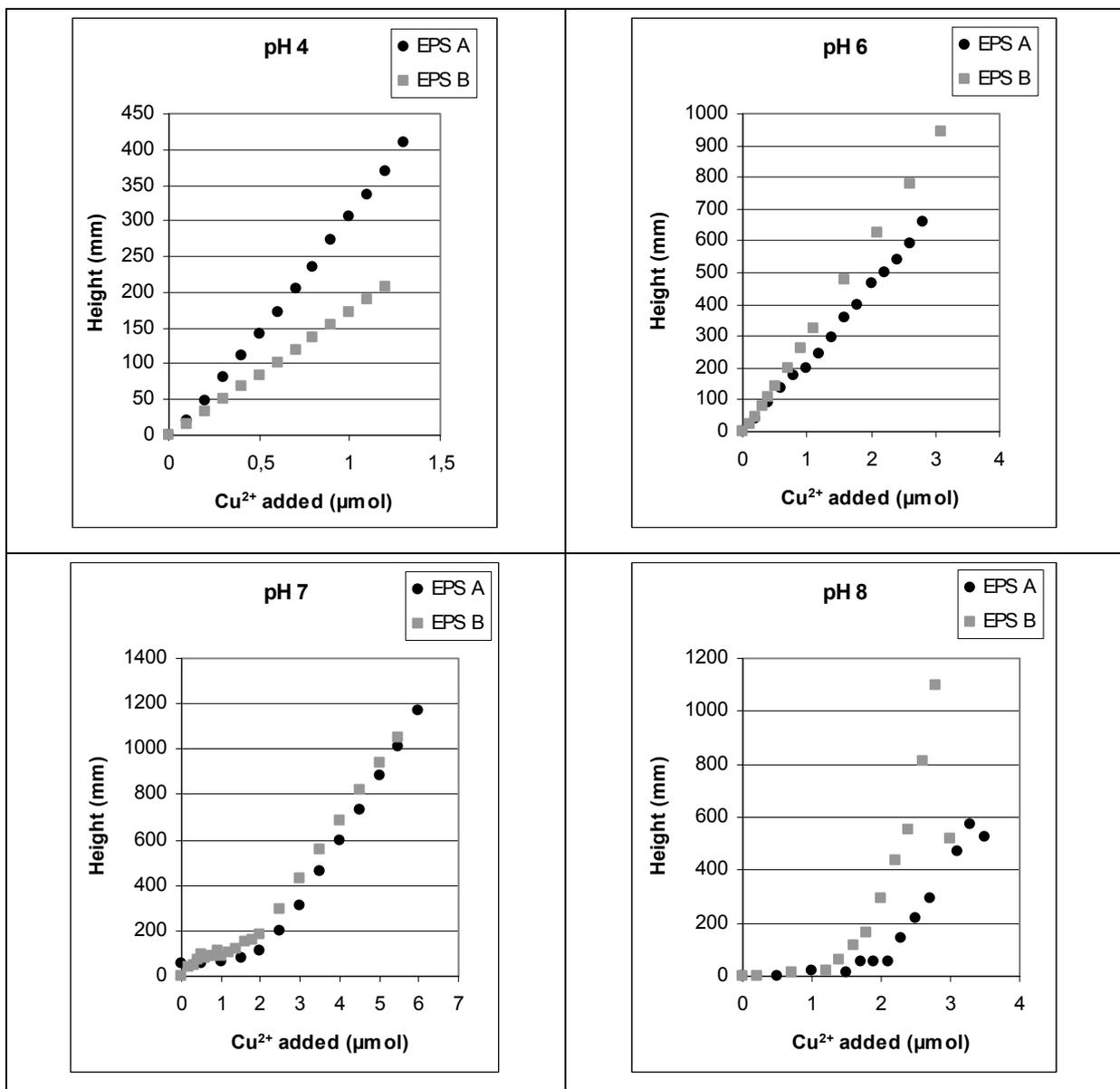
The inconsistency in literature regarding the influence of pH on biosorption seems to indicate that the way pH would alter the adsorption of metal ions to biomass varies with the type of adsorbent (biomass or EPS) and also the type of adsorbates (metal ions) (Ozdemir *et al.*, 2003).

Others possibilities

The medium pH also affects the solubility of metals. Figure 4 has showed that there is precipitation of Cu only at the end of the experiments at pH 8. But, micro-precipitation of metals due to the possibility of small change of the pH at the vicinity of the adsorbent particles could be possible (Juang and Shao, 2002).

Finally, the formation of hydroxylated complexes of the metal would also compete with the active sites and as a consequence, the retention would decrease again (Pardo *et al.*, 2003). In our study, the presence of hydroxylated complexes did not decrease the biosorption capacities of EPS. The kinetic of EPS biosorption could explain this result. The fixation of metallic cations would be more effective than the change of the metal speciation form whatever the pH.

Figure 4: Polarographic titration curve of Cu^{2+} with EPS (A and B) at pH 4, 6, 7 and 8



CONCLUSION

The EPS A and B extracted from activated sludge had two apparent pKa, the first attributed to carboxylic and phosphoric groups and the second attributed to amino and phenolic groups. The study of the biosorption of EPS (A and B) at a pH range 4-8 with Cu, Pb and Cd has been realised. The results showed that the number of binding sites of EPS increased with the increase of pH for Cu, Pb and Cd, instead of the binding constant did not indicate variation according to the pH value for all metals. Simulations realised with metals in ultra-pure water with MINEQL 4.5 software demonstrated the presence of different speciation forms for Cu and Pb divalent cations but also hydroxylated forms and solid forms. The polarographic titration curves indicated that for our conditions of experiments (presence of EPS) only precipitation of Cu at pH 8 at the end of the experiment had been observed. The speciation state of the metals studied has been influenced by the EPS which are a complex solution.

The PEC was higher for EPS B than for EPS A instead of the number of binding sites was lower for EPS B than for EPS A. So to explain the influence of the pH on the metal biosorption, different theories have been developed in the literature. We have summarized that the influence of pH vary according to the nature of EPS (implicated in the degree of dissociation of EPS, in the conformational changes in the polymer), the nature of the metal studied (implicated in the metal ionic attraction mechanisms, in the metallic speciation with presence of hydroxylated forms and possible micro-precipitation of the metal at the vicinity of the EPS) or according to both nature of EPS and nature of metal (implicated in in the protonic exchange mecanisms, in the global electric field concerning the stability of the complex metal-EPS, in the theory of hard and soft acids and bases and in the kinetic of the reaction between metal and EPS).

Acknowledgements: This work was financially supported by le conseil régional du Limousin.

REFERENCES

- Allen, S., Brown, P., 1995. Isotherm analyses for single component and multi-component metal sorption onto lignite. *J. Chem. Technol. Biot.* 62, 17-24
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-37
- Aquino, S.F., Stuckey, D.C., 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Res.* 38, 255-66
- Brown, J., Lester, J.N., 1982a. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge-I. *Water Res.* 16, 1539-48
- Brown, M.J., Lester, J.N., 1982b. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge-II. *Water Res.* 16, 1549-60
- Esparza-Soto, M., Westerhoff, P., 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Res.* 37, 2301-10
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., Baudu, M., 2003. Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 50, 1701-10
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Baudu, M., 2005a. Metal removal from single and multimetallic equimolar systems by extracellular polymers extracted from activated sludges as evaluated by SMDE polarography. *Process Biochem.* 40, 661-68
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Baudu, M., 2005b. Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59, 629-38
- Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 197-204

- Juang, R-S., Shao, H-J., 2002. Effect of pH on competitive adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) from water onto chitosan beads. *Adsorption* 8, 71-8
- Kraepiel, A.M.L., Keller, K., Morel, F.M.M., 1998. On the acid-base chemistry of permanently charged minerals. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2829-38
- Kummert, R., Stumm, W., 1980. The surface complexation of organic acids on hydrous α -Al₂O₃. *J. Colloid. Interf. Sci.* 75, 1170-82
- Lawson, P.S., Sterritt, R.M., Lester, J.N., 1984. Factors affecting the removal of metals during activated sludge wastewater treatment. II. The role of mixed liquor biomass. *Arch Environ. Con. Tox.* 13, 391-402
- Ledin, M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms- processes and importance for soil systems. *Earth-Sci. Rev.* 51,1-31
- Liu, Y., Lam, M.C., Fang, H.H.P., 2001. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Sci. Technol.* 43, 59-66
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 806-11
- Liu, Y., Fang, H.P., 2003. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 33, 237-73
- Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J., 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water. Res.* 31, 1171-79
- Lopez, A., Lazaro, N., Priego, J.M., Marques, A.M., 2000. Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *J. Ind. Microbiol. Biotl.* 24, 146-51
- Morlay, C., Cromer, M., Mougnot, Y., Vittori, O., 1998. Potentiometric study of Cu(II) and Ni(II) complexation with two high molecular weight poly(acrylic acids). *Talanta* 45, 1177-88

Morlay, C., Cromer, M., Mouginot, Y., Vittori, O., 1999. Potentiometric study of Cd(II) and Pb(II) complexation with two high molecular weight poly(acrylic acids); comparison with Cu(II) and Ni(II). *Talanta* 48, 1159-66

Morlay C., Cromer, M., Vittori, O., 2000. The removal of Cu (II) and nickel (II) from dilute aqueous solution by a synthetic flocculant: a polarographic study of the complexation with a high molecular weight poly(acrylic acid) for different pH values. *Water Res.* 34, 455-62

Nowack, B., 1996. Behaviour of EDTA in groundwatee – a study of the surface reactions of Metal-EDTA complexes, dissertation ETH Zurich Nr.11392

Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R., Cosar, T., 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technol.* 90, 71-74

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 26-32

Rudd, T., Sterritt, R.M., Lester, J.N., 1984. Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process. *Journal WPCF* 56, 1260-1268

Ruzic, I., 1996. Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. *Mar. Chem.* 53, 1-15

Savvaiddis, I., Hugues, M., Poole, R., 2003. Differential pulse polarography: a method for the direct study of biosorption of metal ions by live bacteria from mixed metal solutions. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 84, 99-107

Sigg, L., Stumm, W., 1981. The interaction of anion and weak acids with the hydrous goethite (α -FeOOH) surface. *Colloids Surface* 2, 101-7

Singh, S., Pradhan, S., Rai, L.C., 2000. Metal removal from single and multimetallic systems by different biosorbent materials as evaluated by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Process Biochem.* 36, 175–182.

Stumm, W., 1992. *Chemistry of solid-water interface*, Wiley, New York.

Van den Hoop, M., Leus, F., Van Leeuwen, H., 1991. Stripping voltammetry of zinc/polyacrylate complexes: influence of molar mass. *Collect. Czech. Chem. C* 56, 96-103.

Wang, J., Huang, CP., Allen, HE., 2003. Modeling heavy metal uptake by sludge particulates in the presence of dissolved organic matter. *Water Res.* 37, 4835-42.

Wingender, J., Neu, TR., Flemming, HC., 1999. *Microbial extracellular polymeric substances: characterisation, structure and function*. Berlin: Springer; 123 p

IV. Conclusions

Les résultats des travaux présentés dans ce chapitre confirment que les propriétés de biosorption des PEC peuvent être affectées par certains paramètres tels que le pH mais aussi par les caractéristiques physico-chimiques des PEC.

Deux valeurs de pKa apparents ont été obtenues pour les solutions de PEC étudiées, dont une première valeur attribuée aux groupements fonctionnels carboxyliques (identifiés aussi par IR) et phosphoriques et une deuxième attribuée aux groupements amines et phénoliques. A pH 7, le pKa₁ permet de penser que les groupements carboxyliques et phosphoriques sont totalement dissociés, ils jouent donc un rôle important dans la capacité de biosorption des PEC pour cette valeur de pH.

La polarographie s'est révélée une bonne technique afin de mesurer l'influence des paramètres de biosorption du Cu, Pb, Ni et Cd sur les PEC que ce soit en présence de plusieurs métaux (excepté le Cu) ou lors de variations de pH (4-8) (excepté le Ni).

L'étude de la variation du pH permet de conclure qu'une augmentation du pH provoque une augmentation de la biosorption des PEC dans le cas de tous les métaux étudiés. La présence de plusieurs métaux dans des quantités équimolaires n'affecte pas la quantité de plomb et de cadmium fixée par les PEC tandis que la quantité de nickel biosorbée est un peu affectée par la présence d'autres métaux.

L'ordre d'affinité des métaux (Cu>Pb>Ni>Cd) pour les PEC ne semble pas varier en présence de plusieurs espèces métalliques tandis qu'il change en fonction du pH. L'influence du pH peut s'expliquer notamment à travers l'état de dissociation des PEC et la spéciation du métal considéré (elle-même influencée par la présence des PEC).

Ce chapitre montre l'importance des caractéristiques physico-chimiques des PEC afin d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de la biosorption. Dans le cas de la mise au point d'un modèle prédictif concernant la biosorption des PEC, les caractéristiques des PEC (ex : pKa) et le pH devraient être des facteurs à prendre en considération tandis que la présence d'autres cations métalliques dans des concentrations équimolaires (proches des concentrations présentes dans l'environnement) peut être négligée.

Chapitre IV: Structure des PEC, conséquences sur leurs propriétés de biosorption

I. Introduction

La composition des PEC est principalement liée à leur origine : origine bactérienne et molécules issues des effluents. En ce qui concerne les bactéries, certains auteurs ont pu vérifier que les sécrétions de PEC avaient en partie pour but de les protéger contre certains xenobiotiques toxiques tels que les métaux lourds. Ces PEC sécrétés en présence d'un agent chimique potentiellement toxique auraient d'ailleurs une meilleure capacité à fixer les métaux. Les bactéries adapteraient leur sécrétion de PEC en fonction de leur environnement.

Dans le premier article de ce quatrième chapitre, il nous est apparu intéressant d'étudier la composition des PEC issus d'un milieu soumis à une pollution métallique (boues activées d'une station d'épuration urbaine) et de souches pures bactériennes (issues des boues) cultivées en laboratoire ainsi que leurs propriétés de biosorption.

Certains auteurs, à partir de l'origine des PEC ou de leurs différentes structures, ont conçu une théorie visant à distinguer des PEC « solubles » et des PEC « liés ». Cette théorie fait l'objet de beaucoup de controverses, aussi d'autres auteurs ont pris le parti de distinguer ces deux types de PEC à partir d'une définition expérimentale. Les PEC « solubles » sont les PEC facilement extraits par simple centrifugation et les PEC « liés » sont ceux qui demandent une extraction plus poussée. La suite de ce chapitre (second article) s'attache donc à comparer ces deux types de PEC à travers leur caractérisation mais aussi leurs propriétés de biosorption.

II. Article n°6:

Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel

Gilles Guibaud, Sophie Comte, François Bordas, Sèverine Dupuy and Michel Baudu

Chemosphere

Volume 59, Issue 5, April 2005, Pages 629-638

[doi:10.1016/j.chemosphere.2004.10.028](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.028)

Abstract:

This paper provides information on the metal complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and from eight pure cultures of bacteria isolated from the same activated sludge. The EPS extracted from pure bacteria cultures are mainly composed of proteins and low quantities of polysaccharides and uronic acids in comparison with EPS extracted from activated sludges. The EPS studied present two apparent pKa and the IR spectra show the presence of the same functional groups on all the EPS studied. The ability of EPS to complex Cd, Pb and Ni, was studied at pH 7 with Chau and Ruzic's models using polarography titration. All of the EPS exhibited a greater ability to complex Pb than Ni, Cd showing the weakest affinity overall. The EPS extracted from the pure cultures of bacteria were less able to complex the metals than that extracted from activated sludges. Literature data, IR data and EPS phosphorous content, supported by the EPS pKa, revealed that carboxylic and phosphoric groups may play a major role in binding to metals at pH 7. This study underlines the importance of metal exposure in order for bacteria to secrete or modify EPS. After exposure, the EPS then exhibit the greatest capacity to bind metal in order to protect bacteria from harmful effects of heavy metals.

Keywords: Activated sludges; Extracellular polymer substances; Pb; Cd; Ni; Metal binding

L'article précédent a permis de souligner l'importance de l'origine (boue activée ou souches pures bactériennes) des PEC sur leur réactivité envers les métaux lourds. Les résultats

indiquent une meilleure capacité de biosorption des PEC issus de boue activée. Or, au sein du système des floccs de boue activée, la littérature fait état d'une distinction entre deux types de PEC : PEC dits « solubles » et PEC dits « liés ». L'article suivant se propose donc de comparer la réactivité de ces deux types de PEC vis à vis des métaux et d'ainsi approfondir nos connaissances sur les paramètres influençant la biosorption des PEC au niveau des structures biologiques dans lesquelles ils entrent dans la composition (floccs, biofilms...).

III. Article n°7:

Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound

Sophie Comte, Gilles Guibaud, and Michel Baudu

Process Biochemistry

Volume 41, Issue 4, April 2006, Pages 815-823

[doi:10.1016/j.procbio.2005.10.014](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.014)

Abstract

Extracellular polymeric substances (EPS) are one of the main components of activated sludge. EPS can be found in two forms, soluble or bound depending on their localisation and/or their role in microbial metabolism. In this study, soluble and bound EPS are operationally defined: soluble EPS, which can be extracted by centrifugation alone, and bound EPS in floc biomass which require additional treatments for extraction. The two kinds of EPS extracted were characterized by their organic fractions, their carbon, nitrogen and phosphorus contents, their biochemical composition and their pKa and PEC (protonic exchange capacity) values. Organic carbon content of EPS underlined qualitative differences between soluble and bound EPS, which were better established by polysaccharide content. At pH 7, whatever the EPS considered, the analysis of all biosorption results showed an EPS affinity for metals in descending order: $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \gg \text{Cd}^{2+}$. The study of EPS biosorption properties showed different behaviour for soluble and bound EPS depending on the metal studied. For Cu^{2+} (only for EPS A), Pb^{2+} and Ni^{2+} , soluble EPS showed stronger

biosorption properties than bound EPS. For Cd^{2+} and Cu^{2+} (case of EPS B), biosorption properties of the two kinds of EPS studied were close due to the weak affinity of Cd^{2+} for EPS and the different possible binding mechanisms implicated by the speciation of Cu^{2+} at pH studied. At pH 7, due to the PEC value and pKa, the numbers of binding dissociated sites, could be assumed greater for soluble EPS than for bound EPS and could explain in part the biosorption results obtained. We can guess that soluble EPS play the role of a protective barrier against toxic metals for the microorganisms in the activated sludge flocs.

Keywords: Biosorption ; Extracellular polymeric substances; Metal; Sludge

IV. Conclusion

Dans ce chapitre la composition et les propriétés de biosorption des PEC ont été étudiées à partir de deux approches différentes. L'article s'appuyant sur l'origine des PEC (souches pures bactériennes ou boue activée) fait état d'une meilleure capacité de biosorption à pH 7 des PEC issus de boue activée que celle des PEC issus des bactéries. La composition biochimique montre que les PEC issus de la boue contiennent plus de polysaccharides et d'acides uroniques que les PEC issus de souches pures bactériennes. L'implication des groupements carboxyliques et phosphoriques évoquée dans les précédents chapitres est encore confirmée aux vues des valeurs de pKa, du pH de l'étude et de la très bonne corrélation établie entre la concentration en groupements phosphoriques et le nombre de sites de fixation du plomb et du nickel. L'exposition des bactéries aux métaux lourds qui peut se produire dans la liqueur mixte en station d'épuration peut aussi expliquer la plus grande réactivité des PEC issus de boue par rapport aux PEC issus de souches pures bactériennes. Il est aussi possible qu'une grande partie des polysaccharides des PEC issus de la boue proviennent des effluents et non de la sécrétion bactérienne.

Parmi les PEC issus de la boue, on peut distinguer encore deux types de PEC : « solubles » et « liés ». La capacité de biosorption du Pb et du Ni des PEC « solubles » est plus grande que celle des PEC « liés ». La composition biochimique des PEC montre que les protéines et les polysaccharides sont les constituants principaux des PEC, avec cependant une quantité des polysaccharides plus élevée pour les PEC « soluble ». La caractérisation des PEC à travers le taux de carbone organique et le ratio C/N met en lumière une composition qualitative différente entre les deux types de PEC. Les résultats concernant le Cd sont moins évocateurs en raison de la faible affinité de cet ion métallique pour les PEC. Concernant le Cu, les résultats ne permettent pas de conclusions entre les deux types de PEC.

L'ordre d'affinité des PEC à pH 7 pour les métaux est conservé quelque soit leur origine : bactérie, boue (« soluble », « lié »). Les résultats des deux articles donnent l'ordre d'affinité suivant à pH 7 : Cu>Pb>Ni>Cd. La mise en place d'une stratégie de défense des micro-organismes face aux métaux lourds pourrait permettre d'expliquer la meilleure réactivité des PEC issus de la boue envers les métaux lourds. Parmi ces PEC, les PEC « solubles » assumeraient de manière plus importante un rôle indéniable des PEC dans la protection des cellules bactériennes contre les toxiques.

DISCUSSION

Nos travaux nous ont permis d'identifier quelques points clefs de la réactivité des PEC envers les métaux.

La caractérisation biochimique des PEC révèle la prédominance des protéines puis des polysaccharides dans la composition des PEC (ces derniers sont cependant deux fois moins représentés que les protéines, cf article 1). Or ce taux de polysaccharide est souvent identifié comme un paramètre fluctuant pouvant influencer les capacités de biosorption des PEC. Les résultats de l'article 6 ont montré que les PEC extraits à partir de la boue activée contiennent plus de polysaccharides (140 mg.g^{-1} de matière sèche) que les PEC issus de différentes souches pures de bactéries (en moyenne 20 mg.g^{-1} de matière sèche), soit un rapport de sept entre les concentrations. On montre également que le nombre de site de fixation du Pb, Ni et Cd sur les PEC issus de la boue (N_{boue}) est supérieur aux nombres de fixation de ces mêmes métaux sur les PEC issus des bactéries ($N_{\text{bactéries}}$) : pour Cd, N_{boue} est 1,4 fois plus élevé que $N_{\text{bactéries}}$; pour Ni, N_{boue} est 1,5 fois plus élevé que $N_{\text{bactéries}}$; pour Pb, N_{boue} est 1,8 fois plus élevé que $N_{\text{bactéries}}$. Les résultats de l'article 7 indiquent que les PEC dits « solubles » diffèrent des PEC dits « liés » dans leur composition biochimique particulièrement au niveau de leurs concentrations en polysaccharides. Un facteur 1,3 sépare les concentrations. Dans le même temps, cet article montre que les PEC « solubles » ont une capacité de biosorption du Pb et Ni supérieure aux PEC « liés » avec respectivement un facteurs 3,5 pour le Ni et 1,2 pour le Pb

A travers ces résultats, on constate que les polysaccharides doivent jouer un rôle de premier ordre dans la réactivité des PEC. Bridge *et al.* (1999) ont montré que les bactéries sécrètent des polysaccharides pour se défendre de la présence d'ions métalliques toxiques. Brown et Lester (1982b) ont identifié différents mécanismes d'adsorption des métaux par les polysaccharides neutres et anioniques : les sucres neutres fixent le métal préférentiellement par leurs groupements hydroxyles présents au niveau des hexoses et pentoses tandis que les sucres anioniques fixent les métaux à l'aide des groupements carboxyliques.

La détermination de la capacité d'échange protonique et par la suite des valeurs de pKa des solutions de PEC ainsi que l'étude de ces valeurs parallèlement à la capacité de

biosorption des PEC a permis d'identifier plusieurs fonctions réactionnelles impliquées dans la réactivité des PEC.

A partir de titrations acide-base et d'une exploitation selon la théorie de la complexation de surface, des valeurs de pKa apparents sont calculées (cf article 2). Une première valeur, pKa₁ se situe globalement autour de 6 dans les différentes études menées. Cette valeur a été attribuée à la présence de groupements fonctionnels carboxyliques et phosphoriques. Une deuxième valeur de pKa se situe entre 8 et 9, elle a été attribuée à la présence de groupements amines et phénols. Les spectres IR établis à partir des PEC ont pu appuyer la présence de groupements carboxyliques, hydroxyles et amines. En ce qui concerne la présence des autres groupements fonctionnels (comme les groupements phosphoriques) la littérature (Lee et Davis 2001 ; Liu et Fang 2002a) et le dosage d'éléments permettent de conforter nos résultats. L'article 5, à travers l'étude des capacités de biosorption des PEC pour une gamme de pH allant de 4 à 8, a permis d'identifier le rôle prédominant des fonctionnalités carboxyliques et phosphoriques (pKa₁) dans la fixation des métaux. En effet, il a été montré que l'augmentation du pH entraînait une augmentation des capacités de biosorption des PEC : pour une variation de pH de 4 à 8, le nombre de site de fixation des métaux pour les polymères extracellulaires de la boue A (par exemple) évolue de 99 à 5304 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le Cu, de 1841 à 2509 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le Pb et d'une valeur négligeable à 84 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de poids sec en polymères pour le Cd. Plus le pH augmente et plus les groupements fonctionnels des constituants des PEC se trouvent sous forme dissociée. Cette influence du pH a aussi été démontrée dans la littérature pour différents biosorbants : Wang *et al.* (2003) pour des particules de boue, Pardo *et al.* (2003) pour la biomasse inactive issue de *Pseudomonas putida* . Liu and Fang (2002a) et Singh *et al.* (2000) ont considéré les groupements carboxyliques et phosphoriques liés au pKa₁ largement impliqués dans la biosorption des PEC. L'article 6 montre que le pKa₁ (d'une valeur de 6,2) des PEC issus de la boue est inférieur aux pKa₁ (d'une valeur moyenne de 7,4) des PEC issus des bactéries. Tandis que le pKa₁ des PEC issus de la boue peut être attribué aux groupements carboxyliques et phosphoriques, le pKa₁ des PEC issus des bactéries devrait être attribué particulièrement aux groupements phosphoriques. Liu et Fang (2002) ont estimé la valeur du pKa des groupements phosphoriques entre 7 et 7,4. De plus l'étude de capacité de biosorption à pH 7 donne une meilleure capacité de biosorption pour les PEC issus de la boue que les PEC issus des bactéries en relation avec une valeur de pKa₁ plus faible. L'article 6 vient renforcer la mise en évidence du rôle majeur des fonctionnalités carboxyliques et phosphoriques dans la biosorption des métaux aux pH pouvant se rencontrer dans l'environnement. La concentration des groupements carboxyliques peut être liée à la

concentration en polysaccharides et celle-ci est plus importante dans le cas des PEC issus de la boue. Les résultats ont aussi montré que le taux de phosphore était plus important dans le cas des PEC issus de la boue. Une bonne corrélation a d'ailleurs pu être faite entre la concentration en phosphore des PEC et leurs nombres de site de fixation du Pb et du Ni. Toner *et al.* (in press) ont démontré à travers une étude sur la sorption du Zn par un biofilm bactérien le rôle majeur des groupements phosphoriques dans la fixation du Zn à pH 7. Ces groupements phosphoriques proviendraient principalement du côté extérieur de la paroi des bactéries gram négatif qui est constituée d'une bicouche de phospholipides sur laquelle des lipopolysaccharides sont attachés. Le mécanisme de fixation des métaux le plus couramment envisagé dans la littérature est l'échange de protons sur les fonctions carboxyliques et phosphoriques (Davis *et al.* 2003).

A partir des titrations acido-basiques utilisées lors de la détermination des valeurs de pKa, nous avons utilisé la théorie de la complexation de surface afin de calculer une capacité d'échange protonique (CEP) des PEC. L'article 5 fait état d'une différence de CEP des PEC A et B avec respectivement des valeurs de $1400 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et de $1550 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de matière sèche. Cette différence ne permet pas d'expliquer les résultats de capacités de biosorption obtenues pour les PEC A et B aux quatre valeurs de pH étudiées (4, 6, 7 et 8) pour les trois métaux (Cu, Pb et Cd). En effet alors que la capacité d'échange protonique de A est inférieure à celle de B, le nombre de site de fixation (N_A) des trois métaux sur les PEC A est, quelque soit la valeur de pH, supérieur au nombre de site de fixation (N_B) sur les PEC B. Pour Cu, on retrouve un rapport moyen de 2,2 entre N_A et N_B . Pour Pb, le rapport est en moyenne de 1,8 et pour Cd, il est de 1,2. On rappelle que l'augmentation de pH et par la même l'augmentation de l'état de dissociation des PEC entraîne une augmentation de la biosorption. Cependant, on ne peut se satisfaire du seul mécanisme d'échange de protons à travers les résultats de cet article, la cohabitation de plusieurs mécanismes de fixation des métaux sur les PEC est envisageable. L'article 6 vient appuyer les résultats précédents. En effet, la CEP des PEC issus de la boue est inférieure à celle des polymères issus des bactéries, contrairement au nombre de sites de fixation du Pb, Ni et Cd. Par contre, comme le montre l'article 7, la CEP comme le nombre de sites de fixation du Pb et Ni sont supérieurs dans les PEC « solubles ». Il convient peut-être d'envisager de relier la prédominance du mécanisme d'échange de protons à la structure des PEC. Dans la littérature, les auteurs ont avancés différentes hypothèses de mécanisme de fixation des métaux. Lopez *et al.* (2000) envisage des mécanismes d'échange d'ions en fonction de la densité de charge du métal et du complexant. Loaec *et al.* (1997) ont avancé une théorie liée aux échanges d'électrons. Pour ces auteurs, le Pb serait principalement lié aux atomes d'oxygène et d'azote qui sont des donneurs d'électrons forts tandis que le Cd se fixerait sur les groupements thiols, donneurs d'électrons

faibles. Morlay et al. (1998) avancent l'hypothèse de l'importance du champ électrique global autour du complexe polymère/métal qui détermine la stabilité du complexe. D'autres auteurs évoquent la présence d'un mécanisme de micro-précipitation au voisinage de la surface du biosorbant. Ce dernier mécanisme soulève l'importance du métal concerné par la fixation.

Nos travaux ont permis d'identifier une réactivité des PEC en fonction du métal étudié. Les différents articles de cette étude ont permis d'établir un ordre d'affinité des métaux pour les PEC à pH 7 comme suit : Cu>Pb>Ni>Cd. Les résultats de l'article 4 ont aussi montré que le Pb et Cd n'étaient pas affectés par la présence d'autres espèces métalliques dans le milieu tandis que le Ni semble faiblement affecté. On peut penser que comme le Pb et Cd ne sont pas en compétition lors de leur fixation sur les PEC, des sites spécifiques à ces métaux sont présents au niveau des PEC (Loaec *et al.* 1997). La concentration en sites spécifiques à Pb pourrait être supérieure à la concentration en sites spécifiques au Cd, ce qui expliquerait l'ordre d'affinité des métaux.. Des différences entre les capacités de biosorption des PEC A et B ont été montrées alors que la composition biochimique ainsi que les valeurs de pKa ne sont pas significativement différentes. L'article 3 a toutefois permis d'identifier une différence de répartition des poids moléculaires (PM) entre les PEC A et B. Cette différence se situe au niveau de la répartition des petits PM : dans certains cas d'extraction (témoin, sonication et sonication+résine), la fraction de PM compris entre 4,6 et 6 kDa est supérieur à la fraction de PM compris entre 2,7 et 0,7 kDa pour les PEC A. On observe le contraire pour les PEC B. Les résultats de Gorner *et al.* (2005) montrent que les PM inférieurs à 1 kDa concernent les polysaccharides tandis que les hauts PM (entre 10 et 600 kDa) concernent les protéines. Puisque la composition biochimique des PEC A et B est très proche, ces différences dans la répartition en PM pourraient s'expliquer par une différence dans les unités composants les macromolécules des PEC tels que les acides aminés dans le cas des protéines et les oses dans le cas des polysaccharides.

Des différences dans les chromatogrammes établis par HPSEC ou dans la distribution en PM des PEC issus de plusieurs méthodes d'extraction montre l'influence du protocole d'extraction sur les propriétés de sorption des PEC (article 3). Les articles 1 et 2 montrent qu'à partir d'une caractérisation biochimique et physico-chimique (pKa), l'influence des protocoles d'extraction des PEC peut parfois ne pas être mise en évidence dans le cas notamment d'une extraction à la chaleur. Cependant l'influence du mode d'extraction peut apparaître sur les propriétés de biosorption des PEC. Ces articles mettent en avant un problème qui est rarement évoqué dans la littérature et qui peut donner lieu à des comparaisons de résultats non appropriées. L'extraction peut avoir des effets sur les propriétés des PEC et sur leur qualité, même si cela est difficilement

appréciable par des méthodes de caractérisation classiquement utilisée pour les PEC. On retiendra que l'utilisation de méthodes d'extraction à base de réactifs chimiques ou utilisant la chaleur est à proscrire dans le cas d'une étude sur les propriétés de biosorption des PEC.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La biosorption des PEC a fait pour l'instant l'objet de peu d'études. La plupart des travaux dans ce domaine s'appuie sur une technique de séparation des matières en suspension afin d'évaluer une capacité de biosorption des PEC. Cette technique présente l'énorme inconvénient de ne pas tenir compte de la capacité de biosorption des PEC en solution après séparation. Lors de la séparation, une partie des PEC se trouvent dans la phase aqueuse, laquelle est utilisée pour déterminer le métal résiduel adsorbé. Les capacités de complexation obtenues sont donc sous-estimées. De plus, la méthode nécessite une grande quantité de PEC extraits. Dans cette étude, la capacité des PEC à fixer les métaux a été appréhendée grâce à un dosage direct du métal libre par une technique électrochimique, la polarographie. Cette technique est aussi un bon outil pour l'étude de la biosorption des PEC en présence de plusieurs métaux ou lors d'une variation du pH.

Les PEC constituent un système complexe difficile à définir et à caractériser. Une caractérisation biochimique sommaire des PEC a été établie à partir de protocoles faisant référence dans la littérature et datant des années 50 pour certains. Les protéines et les polysaccharides sont les constituants principaux des PEC suivent ensuite les substances humiques, les acides uroniques, les acides nucléiques et les lipides. Afin de mieux appréhender les propriétés des PEC, les constantes d'acidité apparentes des PEC sont déterminées dans cette étude. A partir de la théorie de complexation de surface des oxydes, deux valeurs de pKa apparentes ont pu être calculées. Une première constante d'acidité autour de 6 est attribuée aux groupements fonctionnels carboxyliques et phosphoriques, tandis qu'une seconde autour de 8 est attribuée aux groupements amines et phénoliques des PEC. Ces valeurs de pKa constituent un outil supplémentaire dans l'approche mécanistique de la biosorption des PEC. Ainsi l'augmentation du pH (4-8) entraîne une augmentation de la capacité des PEC à lier le Pb, le Cd et le Cu. En effet, plus le pH augmente et plus les groupements fonctionnels, et en particulier les groupements carboxyliques et phosphoriques, se retrouvent sous formes dissociées, plus la fixation des métaux est favorisée. Cette étude a aussi permis de caractériser les PEC à partir de chromatogrammes établis par HPSEC. Dans certains cas, moyennant quelques précautions opératoires, une distribution du poids moléculaire (PM) des PEC a pu être réalisée à partir d'une droite étalon. Cependant ces attributions de PM sont très relatives aux standards utilisés pour la droite étalon et à la

colonne utilisée. Dans cette étude, ils ont permis d'identifier des différences qualitatives (différences dans la répartition de certaines fractions de PM en fonction de l'origine A ou B des PEC et de la méthode d'extraction utilisée) entre PEC extraits par différentes techniques.

Notre travail sur les PEC a nécessité leur extraction. Or dans la littérature, nous avons un très grand choix de méthode d'extraction. Il nous a semblé important de choisir parmi le panel de ces méthodes, huit des plus représentatives des travaux actuels menés sur les PEC. Une partie de ce travail a donc consisté en la comparaison des huit protocoles d'extraction (article n°1, 2 et 3): trois utilisant un extractant chimique, quatre faisant appel à un procédé physique et un servant de témoin. Les résultats ont montré que le protocole d'extraction influence fortement le rendement d'extraction (plus élevé pour les méthodes chimiques) et la composition des PEC (excepté le taux d'acide nucléique), mais aussi les valeurs de pKa, les profils chromatographiques établis en HPSEC, la distribution en PM et la capacité de biosorption des PEC envers certains métaux. Suite à ces résultats, l'utilisation de méthodes d'extraction faisant appel à des réactifs chimiques ou à la chaleur n'est pas envisageable dans le cas d'une étude sur les propriétés de biosorption des PEC. Les méthodes d'extraction utilisant la sonication, les résines, l'association sonication+résines peuvent être recommandées pour l'étude des propriétés de biosorption des PEC.

L'étude des propriétés de biosorption des PEC a donc permis de montrer l'influence du protocole d'extraction des PEC sur l'évolution de la capacité de ces derniers à fixer les métaux. L'influence de l'origine des PEC (capacité de biosorption des PEC issus de boue activée supérieure à celle des PEC issus de souches pures bactériennes), l'influence du type de PEC considérés (capacité de biosorption des PEC « solubles » supérieure à celle des PEC « liés ») et l'influence du pH (capacité de biosorption des PEC augmente avec le pH) ont aussi été démontrées (article n°6, 7 et 5). La réactivité des PEC issus de boue activée s'applique principalement sur les groupements fonctionnels carboxyliques et phosphoriques. Dans la littérature, les fonctions carboxyliques sont connues pour leur capacité à fixer les métaux. En ce qui concerne les fonctions phosphoriques, cette étude a permis de rendre compte de leur implication dans les propriétés de biosorption des métaux par les PEC. Les concentrations de ces groupements fonctionnels varient en fonction de la composition des PEC elle-même dépendante de l'origine des PEC, de leur structure et de leur mode d'extraction. Elle a aussi permis d'établir un ordre d'affinité des métaux à pH 7 identique quelque soit la présence de plusieurs cations métalliques (article n°4), quelque soit l'origine des PEC (boue activée ou souches pures bactériennes) et quelque soit le type « soluble » ou « lié » des PEC.

Dans la perspective d'établir un modèle prédictif de la charge métallique associée à la boue activée en fonction d'une qualité d'effluent et des conditions de fonctionnement d'une unité de traitement, cette étude a permis d'identifier des facteurs à prendre en compte :

- des facteurs environnementaux tels que le pH, l'affinité des métaux pour les PEC,
- des facteurs propres aux PEC tels que les pKa, la quantité des PEC « solubles » et « liés »...

La présence d'autres métaux aux quantités environnementales peut être négligée.

La suite de ce travail pourrait être une étude des propriétés de biosorption de plusieurs fractions de PEC, en particulier la fraction polysaccharidique. Afin de séparer les PEC, la chromatographie d'exclusion stérique semble efficace. Les paramètres de complexation évalués dans cette étude comme la concentration en sites de fixation des métaux ou la constante de stabilité des complexes PEC/métaux formés sont en fait des paramètres globaux. Le fractionnement des PEC permettrait de les détailler et de pouvoir approfondir l'identification des différents paramètres dont ils dépendent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamson AW. (1990) Physical chemistry of surfaces, 5th ed. New York: Wiley

Aquino S.F., Stuckey D.C. (2004) Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, 38, 255-66

Azeredo J., Oliveira R., Lazarova V. (1998) A new method for extraction of exopolymers from activated sludges. *Water Science and Technology*, 37, 367-70

Azeredo J., Henriques M., Sillankorva S., Oliveira R. (2003) Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Science and Technology*, 47, 175-179

Batley GE. (1989) Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems. CRC Press, Boca Raton, FL

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484-89

Borrok DM., Fein JB. (2005) The impact of ionic strength on the adsorption of protons, Pb, Cd, and Sr onto the surfaces of Gram negative bacteria: testing non-electrostatic, diffuse, and triple-layer models. *Journal of Colloid and Interface Science*, 286, 110-126

Boyette SM., Lovett JM., Gaboda WG. (2001) Soares, J.A. Cell surface and exopolymer characterization of laboratory stabilized activated sludge from a beverage bottling plant. *Water Science and Technology* 43, 175-84

Brassard P., Kramer JR., Collins PV. (1990) Binding site analysis using linear programming. *Environmental Science and Technology* 23, 195-201

Breedveld MW., Zevenhuizen LPTM., Zehnder AJB. (1990) Excessive excretion of cyclic β -(1, 2)-Glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2080-86

Bridge TAM., White C., Gadd GM. (1999) Extracellular metal binding activity of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. *Microbiology*, 145, 2987-2995.

Brown MJ., Lester JN. (1979) Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. *Water Research*, 13, 817-37

Brown MJ., Lester JN. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 179-85

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

Brown MJ., Lester JN. (1982b) Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge: II- Effects of mean cell retention time. *Water Research*, 16, 1549-1560

Brown MRW., Gibert P. (1993) Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology Symp Suppl*, 74, 87S-97S

Bruus JH., Nielsen PH., Keiding K. (1992) On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Water Research*, 26, 1597-1604

Buffle J. (1988a.) *Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach*. Ellis Horwood, Chichester.

Buffle (1988b.) The determination of trace metals in natural waters. In IUPAC Report, eds T.S. West and H.W.Nurnberg. Blackwell, Oxford.

Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee BC., Droppo IG., Leppard GG., Liss SN. (1998) Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Science and Technology*, 37, 325-333

Burton K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, 62, 315-23

Busch PL., Stumm W. (1968) Chemical interactions in the aggregation of bacteria. Biofloculation in waste treatment. *Environmental Science and Technology*, 2, 49-53

Cadieux JE., Kuzio J., Milazzo FH., Kropinski AM. (1983) Spontaneous release of lipopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 155, 817- 825

Chao AC., Keinath TM. (1979) Influence of process loading intensity on sludge clarification and thickening characteristics. *Water Research*, 13, 1213-1220

Chang JS., Law R., Chang CC. (1996) Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, 31, 1651-58

Characklis WG., Marshall K. (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. Inc: Characklis WG, Marshall KG (eds) *Biofilms*. Wiley, New York, pp 3-15

Chen JH., Lion LW., Ghiorse WC., Shuler ML. (1995) Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research*, 29, 421-30

Cheng MH., Patterson JW., Minear RA. (1975) Heavy metals uptake by activated sludge. *Journal of Water Pollution Control Federal*, 47, 362-376

Chen YG., Yang HZ., Gu GW. (2001) Effect of acid and surfactant treatment on activated sludge dewatering and settling. *Water Research*, 35, 2615-2620

Christensen BE., Characklis WG. (1990) Physical and chemical properties of biofilms, in *Biofilms* ed. Characklis, WG and Marshall KG, pp 93-130, New York: John Wiley et Sons, Inc

Cox JS., Smith DS., Warren LA., Ferris FG. (1999) Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environmental Science and Technology* 33, 4514-4521

Croué JP., Lefebvre E., Martin B., Legube B. (1993) Removal of dissolved hydrophobic and hydrophilic organic substances during coagulation/flocculation of surface waters. *Water Science and Technology*, 27, 143-152

Davis TA., Volesky B., Mucci A. (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 37, 4311-4330

Decho AW. (1994) Molecular-scale events influencing the macroscale cohesiveness of exopolymers. In: Krumbein WE, Paterson DM, Stal LJ (eds) *Biostabilization of sediments*. BIS-Verlag, Oldenburg, Germany, pp 135-148

Decho AW. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20, 1257-7.

De Philippis R., Vincenzini M. (1998) Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS. Microbiology Reviews* 22, 151-175

Derjaguin BV., Landau L. (1941) Theory of stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physica Chemistry*, 14, 633-62

Dignac MF., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P. (1998) Chemical description of extracellular polymers : implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology* 38, 45-53

Erikson L., Steen I., Tendaj M. (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Water Science and Technology*, 25, 251-265

Eriksson L., Alm B. (1993) Characterization of activated sludge and conditioning with cationic polyelectrolytes. *Water Science and Technology* 28, 203-212

Evans E., Brown MRW., Gilbert P. (1994) Iron chelator, exopolysaccharide and protease production in *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of effects of specific growth rate in biofilm and planktonic culture. *Microbiology*, 140, 153-7

Falla JA., Bauda P., Block JC. (1988) Isolation of cell envelope layers of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Microbiological Methods*, 1988, 7, 285-294

Farrah SR., Unz RF. (1976) Isolation of extracellular polymer from *Zoogloea* strains MP6 and 106 and from activated sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 33-37

Fazio SA., Uhlig DJ., Parker JH., White DC. (1982) Estimations of uronic acid as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1151-1159

Figueroa LA., Silverstein J.A. (1989) Ruthenium red absorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 941- 947

Flemming H-C., Wingender J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects, *Water Science and Technology*, 43,9-16

Foley I., Gilbert P. (1996) Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* 10, 331-346

Forster, C.F. (1968) The surface of activated sludge particles in relation to their settling characteristics. *Water Research*, 2, 767-776

Forster, C.F. (1971) Activated sludge surfaces in relation to the sludge volume index. *Water Research*, 5, 861-870

Forster CF. (1976) Bioflocculation in the activated sludge process. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 26, 291

Forster CF. (1985) Factors involved in the settlement of activated sludge process. 1. Nutrients and surface polymers. *Water Research*, 19, 1259-64

Forster CF., Clarke AR. (1983) The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation. *Water Pollution Control*, 82, 430-433

Frolund B., Keiding K., Nielsen P. (1994) A comparative study of biopolymers from a conventional and advanced activated sludge treatment plant. *Water Science and Technology*, 29, 137-141

Frolund B., Griebe T., Nielsen P. (1995) Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 755-761

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

Fukushi K., Duk C., Ghosh S. (1996) Enhanced heavy metal uptake by activated sludge cultures grown in the presence of biopolymer stimulators. *Water Science and Technology*, 34, 267-272

Garnier C., Gorner T., Lartiges BS., Abdelouhab S., deDonato P. (2005 in press) Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research*, 35, 3044-3054

Geesey GG., Bremer PJ., Fischer WR., Wagner D., Keevil CV., Walker JT., Chamberlain AHL., Angell P. (1994) Unusual types of pitting corrosion of copper tubes in potable water systems. In *Microbial Biofilms* (ed. GG Geesey), pp 243-263. New-York. Lewes Publishing Company.

Gehr R., Henry JG. (1983) Removal of extracellular material: techniques and pitfalls. *Water Research* 17, 1743-1748

Goodwin JAS., Forster CF. (1989) An examination of the extracellular polymers produced by activated sludge. *Microbios*, 57, 179-185

Görner T., De Donato P., Ameil M-H., Montarges-Pelletier E., Lartiges BS. (2003) Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research*, 37, 2388-2393

Gregory J. (1989) Fundamentals of flocculation. *CRC Critical Review in Environmental Control*, 19, 185-230

Guibaud G., Baudu M., Dollet P., Condat ML., Dagot C. (1999) Role of extracellular polymers in cadmium adsorption by activated sludges. *Environmental Technology*, 20, 1045-53

Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. (2003) Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*, 52, 1701-10

Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. (2004) Use of a polarographic method to determine Copper, Nickel and Zinc constant of complexation by extracellular polymers extracted from activated sludge. *Process Biochemistry*, 39, 833-839

Hedges JJ. (1988) Polymerization of humic substances in natural environments. In: Frimmel FH, Christman RF (eds) Humic substances and their role in the environment. Wiley, Chichester, pp 45-58

M Hermansson. (1999) The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 105-119

Higgins MJ., Novak JT. (1997a) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*, 123, 479-85

Higgins MJ., Novak JT. (1997b) The effect of cations on the settling and dewatering of activated sludges: laboratory results. *Water Environmental Research*, 69, 215-24

Horan NJ., Eccles CR. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*, 20, 1427-1432

Houghton JJ., Quarmby J., Stephenson T. (2000) Impact of digestion on sludge dewaterability. *Trans IchemE Part B. Process Safety and Environmental Protection* 2000, 78, 153-159

Hsieh KM., Murgel GA., Lion LW., Schuler M.L. (1994a) Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: 1. Observation and modeling of cell growth, attachment and production of extracellular polymer. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 219-231

Hsieh KM., Murgel GA., Lion LW., Schuler ML. (1994b) Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: 2. Prediction and verification of an integrated computer model of lead (II) Distribution in the presence of microbial activity. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 232-239

Iqbal M., Edyvean RGJ. (2003) Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Minerals Engineering* 17, 217-223

Jang A., Kim SM., Kim SY., Lee SG., Kim IS. (2001) Effect of heavy metals (Cu, Pb, and Ni) on the compositions of EPS in biofilms. *Water Science and Technology*, 43, 41-48

Jia XS., Fang HHP., Furumai H. (1996) Surface charge and extracellular polymer of sludge in the anaerobic degradation process. *Water Science and Technology*, 34, 309-316

Jin B., Wilen B-M., Lant P. (2004) Impacts of morphological, physical and chemical properties of sludge flocs on waterability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 98, 115-126

Jorand F., Guicherd P., Urbain V., Manem J., Block J.C. (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-growth bacteria. *Water Science and Technology*, 30, 211-218

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, 29, 1639-1647

Jorand F., Boué-Bigne F., Block J.C., Urbain V. (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Science and Technology*, 37, 307-15

Karapanagiotis N.K., Rudd T., Sterritt R.M., Lester J.N. (1989) Extraction and characterisation of extracellular polymer in digested sewage sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 44, 107-20

Keevil C.W. (2004) The physico-chemistry of biofilm-mediated pitting corrosion of copper pipe supplying potable water. *Water Science and Technology* 49, 91-98

Keiding K., Wybrandt L., Nielsen P.H. (2001) Remember the water – a comment on EPS colligative properties. *Water Science and Technology*, 43, 17-23

Kim D.W., Cha D.K., Wang J., Huang C.P. (2001) Heavy metal removal by activated sludge: influence of *Nocardia amarum*. *Chemosphere*, 46, 137-142

Kramer J.R., Collins P., Brassard P. (1991) Characterization of multiple functional groups on kaolinite. *Marine Chemistry*, 36, 1-8

Lapidou C.S., Rittmann B.E. (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, 36, 2711-20

LeChevallier M.W., Cawthon C.D., Lee R.G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2492-2499

Ledin M., Pedersen K., Allard B. (1995) Effects of pH and ionic strength on the adsorption of Cs, Sr, Eu, Zn, Cd and Hg by *Pseudomonas Putida*. *Water Air and Soil pollution*, 93, 367-381

Ledin M., Pedersen K., Allard B. (1997) Effects of pH and ionic strength on the adsorption of Cs, Sr, Eu, Zn, Cd and Hg by *Pseudomonas putida*. *Water Air and Soil Pollution*, 93, 367-381

Lee SM., Davis AP. (2001) Removal of Cu (II) and Cd (II) from aqueous solution by seafood processing waste sludge. *Water Research*, 16, 1549-1560

Li X-G., Cao H-B., Wu J-C., Zhong F-L., Yu K-T. (2002) Enhanced extraction of extracellular polymeric substances from biofilms by alternating current. *Biotechnology Letters* 24, 619-621

Liao BQ., Allen DG., Droppo IG., Leppard GG., Liss SN. (2001) Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, 35, 339-50

Lindahl MA., Faris A., Wadstrom T., Hjerten S. (1981) A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Acta Biochimica Biophysica*, 677, 471-476

Lindberg B. (1990) Components of bacterial polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 48, 279-318

Liu Y., Lam MC., Fang HHP. (2001) Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology*, 43, 59-66

Liu H., Fang HHP. (2002a) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 806-11

Liu H., Fang H. (2002b) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95, 249-256

Liu Y., Fang HHP. (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33, 237-73

- Liu Y-Q, Liu Y., Tay J-H. (2004) The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biobiogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 143-148
- Loaec M., Olier R., Guezennec J. (1998) Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate polymers*, 35, 65-70
- Loaec M., Olier R., Guezennec J. (1997) Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*, 31, 1171-79
- Lopez A., Lazaro N., Priego JM., Marques AM. (2000) Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 24, 146-151
- Lorentz MG., Wackernagel W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbial Review*, 58, 563-602
- Martin-Cereceda M., Jorand F., Guinea A., Block J.C. (2001) Characterization of extracellular polymeric substances in rotating biological contactors and activated sludge flocs. *Environmental Technology*, 22, 951-959
- Martinez RE., Smith DS., Kulczycki E., Ferris FG. (2002) Determination of intrinsic bacterial surface acidity constants using a Donnan Shell model and a continuous pK_a distribution method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253, 130-139
- Matias VRF., Cammarota MC., Sant'Anna JR. (2003) Extraction of activated sludge bacteria exopolymers by ultrasonication. *Biotechnology Letters*, 25, 1351-1356
- McKinney RE. (1952) A fundamental approach to the activated sludge process II. A proposed theory of floc formation. *Sewage Industrial Wastes*, 24, 280-7
- McSwain BS., Irvine RL., Hausner M., Wilderer PA. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1051-1057
- Miquel G. (2001) Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, rapport n°261 du Sénat, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- Mikkelsen LH. Author's response. *Water Research*, 37, 4307-4309

Mikkelsen LH., Keiding K. (2002) Comment on "The shear sensitivity of activated sludge: an evaluation of the possibility for a standardized floc strength test". *Water Research*, 36, 2931-2940

Mittelman MW., Geesey GG. (1985) Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 846-851

Morgan JN., Forster CF., Evison L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research*, 24, 743-50

Morton LHG., Greenway DLA., Gaylarde CC., Surman SB. (1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247-259

Morlay C., Cromer M., Mougnot Y., Vittori O. (1998) Potentiometric study of Cu(II) and Ni(II) complexation with two high molecular weight poly(acrylic acids). *Talanta*, 45, 1177-88

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

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

Nielsen PH., Keiding K. (1998) Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Water Research*, 32, 313-320

Nielsen PH., Jahn A. (1999) Extraction of EPS. In: Wingender J, Neu TR, Fleming H-C, editors. *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Berlin: springer

Ozdemir G., Ozturk T., Ceyhan N., Isler R., Cosar T. (2003) Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology*, 90, 71-74

Pardo R., Herguedas M., Barrado E., Vega M. (2003) Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 26-32

Pavoni JL., Tenney MW., Echelberger WF. (1972) Bacterial extracellular polymers and biological flocculation. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 44, 414-31

Platt RM., Geesey GG., Davis JD., White DC. (1985) Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 657-680

Reddad Z., Gerente C., Andres Y., Le Cloirec P. (2002) Modeling of single and competitive metal adsorption onto a natural polysaccharide. *Environmental Science and Technology* 36, 2242-2248

Riffaldi R. (1982) Humic substances in sewage sludges. *Environmental Pollution*, 3, 139-146

Robinson JA., Trulear MG., Characklis WG. (1984) Cellular reproduction and extracellular polymer formation by *Pseudomonas aeruginosa* in continuous culture. *Biotechnology Bioengineering* 26, 1409-1417

Rudd, T., Steritt, R., Lester, J. Extraction of extracellular polymers from activated sludge. *Biotechnol Let* 1983, 5, 327-332.

Rudd T., Sterritt RM., Lester JN. (1984) Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process. *Journal WPCF* 56, 1260-1268

Sato T., Ose Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Water Research*, 14, 333-338

Schiewer S., Volesky B. (1995) Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption. *Environmental Science and Technology*, 29, 3049-58

Schiewer S., Volesky B. (1997) Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons. *Environmental Science and Technology*, 31, 2478-85

Schindler PW., Stumm W. (1987) The surface chemistry of oxides, hydroxides and oxide minerals, In: Stumm W (ed) Aquatic surface chemistry. Wiley, New-York, pp 83-110

Sheintuch M., Lev O., Einav P., Rubin E. (1986) The role of exocellular polymer in the design of activated sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1546-1576

Shin HS., Kang ST., Nam SY. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology*, 43, 193-196

Singh S., Pradhan S., Rai LC. (2000) Metal removal from single and multimetallic systems by different biosorbent materials as evaluated by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Process Biochemistry*, 36, 175-82

Smith JJ., Qunitero EJ., Geesey GG. (1990) A sensitive chromatographic method for the detection of pyruval groups in microbial polymers from sediments. *Microbial Ecology*, 19, 137-147

Sobeck DC., Higgins MJ. (2002) Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research*, 36, 527-538

Spath R., Flemming HC., Wuertz S. (1998) Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology* 37, 207-210

Sponza DT. (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 375-85

Sponza DT. (2002) Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems. *Process Biochemistry*, 37, 983-998

Sutherland W. (1990) *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press

Tezuka Y. (1969) Cation dependent flocculation in a *Flavobacterium* species predominant in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 222-226

Toner B., Manceau A., Marcus MA., Millet DB., Sposito G. (in press) Zinc sorption by a bacterial biofilm. *Environmental Science and Technology*, in press

Tiravanti G., Lore F., Sonnante G. (1985) Influence of the change density of cationic polyelectrolytes on sludge conditioning. *Water Research*, 19, 93-97

Urbain V. (1992) Caractérisation physico-chimique des boues activées en relation avec leur propriété de décantation. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré (Nancy I)

Urbain V., Block JC., Manem J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Water Research*, 27, 829-38.

Varney MS., Turner DR., Whitfield M., Mantoura RFC. (1984) The use of electrochemical techniques to monitor complexation capacity titrations in natural waters. In. *Complexation of trace metals in natural waters*, eds CJM Kramer and JC Duimker, pp 33-46. Nijhof M and Junk W. Publishers, The Hague.

Van Leeuwen H., Cleven R., Buffle J. (1989) Voltammetric techniques for complexation measurements in natural aquatic media. *Pure and Applied Chemistry*, 61, 255-274

Verway EJW., Overbeek JG. (1948) *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Verway EJW., Overbeek JG. Eds., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

Wallen LL., Davis EN. (1972) Biopolymers of activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 6, 161-164

Wang J., Huang CP., Allen HE. (2003) Modeling heavy metal uptake by sludge particulates in the presence of dissolved organic matter. *Water Research* 37, 4835-42.

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

Wingender J., Neu TR., Flemming HC. (1999) *Microbial extracellular polymeric substances: characterisation, structure and function*. Berlin: Springer, 123 p

Whitfield C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 415-420

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

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

Zykova IV., Panov VP., Makashova TG., Baigel'dinov AK. (2002) Fundamental aspects of heavy metal adsorption by activated sludge microorganisms. *Russian journal of applied chemistry*, 75, 1650-1652

Zhang X., Bishop P., Kinkle B. (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology*, 39, 211-8

Zita A., Hermansson M. (1997) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1168-70.

Yee N., Fowle DA., Ferris FG. (2004) A Donnan Model for metal sorption onto *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 3657-3664

MOTS CLEFS

Polymère extra-cellulaire (PEC), boues activées, métaux lourds, biosorption, pKa, fonctions carboxyliques et phosphoriques, PEC soluble/lié

RESUME

Le procédé par boues activées est couramment utilisé dans le traitement des eaux usées. La présence d'éléments traces métalliques a été mise en évidence dans les boues. L'élimination des boues par épandage agricole peut entraîner une pollution des sols...Les boues contiennent majoritairement des exopolymères (PEC) qui jouent un rôle dans la sorption d'ions métalliques. L'objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur les interactions PEC/métaux et d'identifier des fonctions chimiques mises en cause dans la biosorption des métaux par les PEC à pH 7. Pour ce faire, des liens entre caractérisation et capacités de biosorption des PEC ont pu être faits et ont donné lieu à la rédaction de sept articles. Parmi les résultats obtenus, on retiendra que la caractérisation des PEC a permis de déterminer deux valeurs de pKa apparents. Les fonctions carboxyliques et phosphoriques ont été identifiées comme ayant une implication importante dans les capacités de biosorption des PEC.

SUMMARY

The activated sludge process is commonly used for wastewater treatment. Since the presence of metals has been highlighted in the sludges, their elimination by land treatment can provoke soil pollution...The sludges are mainly composed of extracellular substances (EPS) which play a key role in the ionic metallic sorption. The objective of this work is to better understand the interactions EPS/metals and thus to identify what chemical groups are implied in metal biosorption by EPS at pH 7. Relations between characterization and the biosorption capacities of EPS have been done and have led to the redaction of seven articles. Among the results obtained, we notice that the EPS characterization has allowed two apparent pKa values to be determined. The carboxylic and phosphoric groups have been identified as having an implication in the biosorption capacities of EPS.