

T

50376  
1999  
37

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

N° d'ordre : 2507

# **Thèse**

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I**

*Génie Enzymatique, Bioconversion, Microbiologie*

par

**David PARIS**

## **Etude microbiologique des boues activées d'un site papetier et biodégradabilité des résidus organiques des eaux épurées**

soutenue le 22 mars 1999 devant la commission d'examen

Président :	M. Le Pr. R. TAILLIEZ	Université des Sciences et Technologies de Lille
Directeur de Thèse :	M. Le Pr. R. BLONDEAU	Université des Sciences et Technologies de Lille
Rapporteurs :	M. Le Pr. J.M. LEBEAULT M. Le Pr. M. SANCHOLLE	Université de Technologie de Compiègne Université du Littoral - Calais
Examineurs :	M. M. PICHON M. D. TAVERNIER	Centre Technique du Papier - Grenoble Stora Corbehem

Ce travail concerne une étude essentiellement microbiologique, afin de préciser les possibilités d'optimisation de l'épuration biologique des effluents d'une papeterie produisant des pâtes thermomécaniques blanchies au peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin.

L'analyse des boues activées, assurant l'épuration secondaire des effluents, révèle la présence de quatre populations dominantes dont l'une est majoritaire. Cette population principale a été suivie pendant 26 mois grâce à des échantillonnages bimestriels. Il s'agit de bactéries à Gram positif appartenant au genre *Arthrobacter* (L-lysine détectée dans le peptidoglycane de la paroi, et un G+C de 72%). L'utilisation de sondes oligonucléotidiques a permis en outre de confirmer cette identification. La présence de ces *Arthrobacter* sp. dans un système d'épuration n'est pas classique, d'autant plus que ces germes sont dépourvus d'activités cellulolytiques, amylolytiques et ligninolytiques. Leur rôle principal serait plutôt d'ordre architectural : en stabilisant la structure du biofloc, ils assureraient le maintien d'une activité continue et régulière dans les bassins d'épuration.

La composition de la matière organique résiduelle, réfractaire au système d'épuration secondaire, a été déterminée à partir de lyophilisats. Elle se répartit en deux gammes de poids moléculaire ayant des valeurs proches de 1500 et de 15000 Da. L'analyse chimique et les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  de chacune d'elles ont révélé une structure complexe semblable aux polysaccharides de type hémicellulose.

La biodégradation de ces composés réfractaires a été obtenue par l'utilisation de certaines cultures fongiques qui induisent une décoloration et une diminution des poids moléculaires. Les mécanismes enzymatiques mis en jeu par *Trametes versicolor*, qui a été plus particulièrement utilisé, semblent correspondre à des activités peroxydasiques manganèse indépendantes.

Ces enzymes, immobilisées sur un support, pourraient probablement réduire la charge organique des effluents avant leur retour dans le milieu originel.

---

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF ACTIVATED SLUDGE  
FROM A PULP AND PAPER MILL AND BIODEGRADABILITY  
OF THE ORGANIC RESIDUES FROM TREATED WASTEWATER

To investigate optimization possibilities of the biological wastewater treatment from a pulp and paper mill using thermomechanical pulps bleached by alkaline peroxide, a microbiological study was undertaken.

Analysis of the cultivable population from activated sludge revealed four main bacterial groups with one being dominant. This dominant group was followed during twenty-six months at the rate of one two-months sampling. The taxonomic study of several isolates and the use of rRNA-targeted oligonucleotide probes led to the identification of *Arthrobacter* sp. (with a marked rod-coccus Gram-positive growth cycle, L-lysine in the cell wall peptidoglycan, and a % G+C of 72.0). The presence of *Arthrobacter* sp. in the wastewater treatment system was an uncommon nature. Moreover, these bacteria were devoid of cellulolytic, amyolytic and proteolytic activities. The preservation of biofloc efficiency seems to be the main function of these bacteria.

Concurrently, chemical composition of the refractory organic matter from wastewater treatment plant was determined from freeze-dried samples. The molecular weight distribution ranged in two fractions of about 1500 and 15000 Da. Chemical analysis and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectrum of these two fractions led to a complex structure similar to a polysaccharide of hemicellulose type.

Biodegradation of this refractory matter was revealed with fungal cultures that led to decolorization and removal of high molecular weight components. In *Trametes versicolor*, the enzymatic mechanisms implied in these processes seem to be manganese independent peroxidase activities.

To decolorize industrial effluents or treatment plant effluents before being released into the receiving environment, an attractive application would consist to immobilize these enzymatic activities on solid support.

Ce travail a été réalisé au sein du **Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille**, dirigé par **Monsieur le Professeur Roger Tailliez**, dans le cadre d'une convention CIFRE dont le partenaire industriel est **Stora Corbehem** représenté par **Monsieur le Directeur Général Jérôme Grassin**.

L'ensemble de ce travail a été orchestré sous la direction scientifique de **Monsieur le Professeur Roland Blondeau**. Sa discipline, sa rigueur scientifique ainsi que ses suggestions ont rendu possible l'aboutissement de ce projet. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour la formation scientifique qu'il m'a prodiguée.

Aux rapporteurs de la commission d'examen :

**Monsieur le Professeur Jean-Michel Lebeault,**  
Directeur du Département Génie Chimique de l'Université de Technologie de Compiègne,  
**Monsieur le Professeur Michel Sancholle,**  
Directeur du Laboratoire de Mycologie, Phytopathologie et Environnement  
de l'Université du Littoral,

vont mon profond respect et mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Je suis très honoré, en dépit de ses nombreuses occupations, de la participation de **Monsieur Michel Pichon**, Responsable Environnement du Centre Technique du Papier de Grenoble, au Jury de cette thèse.

Ma thèse a débuté par un séjour au **Département Recherches et Développement** de Stora Corbehem, dirigé par **Monsieur Gérard Valtat**. Tout au long de ce travail, j'ai été accueilli et soutenu par tous les membres, passés et présents, de ce laboratoire. Je tiens à leur exprimer ici ma plus profonde gratitude.

Je suis heureux de pouvoir compter parmi les membres du Jury de la soutenance **Monsieur Didier Tavernier**, digne représentant du « Docteur en entreprise » du Département R&D de Stora Corbehem. Recruteur, puis tuteur industriel, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Je remercie cordialement **Monsieur Jean-Pierre Coloos**, Responsable Environnement de Stora Corbehem, pour m'avoir éclairé sur les aspects de la législation et le suivi qu'il a su témoigner au fil de ce projet.

Je tiens à témoigner ma plus profonde reconnaissance à **Monsieur Alain Huré** ainsi qu'aux personnels du site de traitement des eaux de Stora Corbehem pour leur collaboration et leur sympathie.

Ma reconnaissance va également aux personnels permanents du **Laboratoire de Microbiologie** de l'Université des Sciences et Technologies de Lille qui ont su prêter une oreille attentive à mes propos divers et variés durant ces trois années.

Mes remerciements vont aussi à **Monsieur André Casagrande** pour sa participation active lors de la reproduction de ce mémoire imprimé sur du papier STORA (!!).

*Que toutes celles et tous ceux qui ont participé à, et soutenu ce travail de thèse soient sincèrement remerciés et assurés de mon amitié.*

**Etude microbiologique  
des boues activées d'un site papetier  
et biodégradabilité des résidus  
organiques des eaux épurées**

<b>RESUME</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>III</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>V</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>X</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>Partie 1- L'EAU : FLUIDE INDISPENSABLE EN PAPETERIE</b>	<b>4</b>
<hr/>	
<b>Partie 2- ETUDE DE LA MICROFLORE DES BOUES ACTIVEES</b>	<b>35</b>
<hr/>	
<b>Partie 3- ANALYSES CHIMIQUES DE LA MATIERE ORGANIQUE REFRACTAIRE</b>	<b>56</b>
<hr/>	
<b>Partie 4- EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE DES EAUX EPUREES</b>	<b>85</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES</b>	<b>106</b>
<hr/>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>109</b>
<hr/>	

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

<b>Partie 1- L'EAU : FLUIDE INDISPENSABLE EN PAPETERIE</b>	<b>4</b>
--	----------

*Chapitre 1- Le site industriel*

1.1- La production du papier couché	5
1.2- Le traitement des eaux du site papetier	10

*Chapitre 2- Composition et propriétés chimiques des effluents papetiers*

2.1- Composition chimique originelle de la matière organique du bois	20
2.2- Toxicité des effluents papetiers	26

*Chapitre 3- La microflore des boues activées et aspects environnementaux des eaux épurées*

3.1- Isolement et identification des populations bactériennes des boues activées	28
3.2- La microflore épuratrice des eaux usées papetières	30
3.3- Nature organique résiduelle des eaux papetières épurées	32

<b>Partie 2- ETUDE DE LA MICROFLORE DES BOUES ACTIVEES</b>	<b>35</b>
--	-----------

*Chapitre 1- Matériels et méthodes*

1.1- Echantillonnage et milieux de culture	35
1.2- Caractérisation des micro-organismes hétérotrophes cultivables	36
1.3- Analyses complémentaires	37

*Chapitre 2- Résultats*

2.1- Isolement et caractérisation de la microflore hétérotrophe	42
2.2- Identification de la population principale	44

<i>Chapitre 3- Discussion</i>	53
-------------------------------	----

<b>Partie 3- ANALYSES CHIMIQUES DE LA MATIERE ORGANIQUE REFRACTAIRE</b>	<b>56</b>
---	-----------

*Chapitre 1- Matériels et méthodes*

- |  |    |
|--|----|
| 1.1- Préparation de la matière organique réfractaire | 56 |
| 1.2- Analyses chimiques                              | 57 |

*Chapitre 2- Résultats*

- |   |    |
|---|----|
| 2.1- Analyses chimiques des lyophilisats des eaux épurées     | 60 |
| 2.2- Analyses chimiques de la matière organique réfractaire   | 70 |
| 2.3- Hydrolyse acide de la matière organique des eaux épurées | 78 |

*Chapitre 3- Discussion* 81

<b>Partie 4- EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE DES EAUX EPUREES</b>	<b>85</b>
---	-----------

*Chapitre 1- Matériels et méthodes*

- |                                |    |
|--------------------------------|----|
| 1.1- Préparations enzymatiques | 85 |
| 1.2- Préparations bactériennes | 86 |
| 1.3- Préparations fongiques    | 87 |

*Chapitre 2- Résultats*

- |   |    |
|---|----|
| 2.1- Essais de dégradation de la matière organique réfractaire<br>par des enzymes purifiées | 91 |
| 2.2- Dégradation de la matière organique réfractaire<br>par des cultures bactériennes       | 93 |
| 2.3- Décoloration de la matière organique réfractaire<br>par des cultures fongiques         | 95 |

*Chapitre 3- Discussion* 102

<b>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES</b>	<b>106</b>
---	------------

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>109</b>
------------------------------------	------------

<b>Figure 1-</b> Utilisation de l'eau à travers les différents stades de la production du papier couché.	4
<b>Figure 2-</b> Situation géographique du site industriel et photographies de la Scarpe.	6
<b>Figure 3-</b> Présentation d'une machine à papier couché et schéma de fabrication.	8
<b>Figure 4-</b> Production de bobines mères.	9
<b>Figure 5-</b> Plan schématique de la station d'épuration.	10
<b>Figure 6-</b> Présentation de la station d'épuration.	11
<b>Figure 7-</b> Traitement d'épuration en anaérobiose. Vue du méthaniseur.	13
<b>Figure 8-</b> Etapes de la dégradation de la matière organique par voie anaérobie.	14
<b>Figure 9-</b> Traitement d'épuration en aérobie. Vue des bassins d'aération à boues activées.	13
<b>Figure 10-</b> Boues activées observées par microscopie optique (Agrandissement x 400).	15
<b>Figure 11-</b> Représentation schématique de l'agglomération à la surface du floc enclenchée par un gradient de substrats.	16
<b>Figure 12-</b> Représentation schématique d'un stress physique ou chimique développant une agrégation cellulaire.	16
<b>Figure 13-</b> Représentation schématique de la structure d'un biofloc. Echelle arbitraire.	17
<b>Figure 14-</b> Modèle schématique d'une organisation à 3 niveaux d'un biofloc.	17
<b>Figure 15-</b> Représentation de la surface externe d'un biofloc.	17
<b>Figure 16-</b> Méthodes de mesure de la pollution organique globale.	19
<b>Figure 17-</b> Chaîne de cellulose formée par la répétition régulière de motifs $\text{glc}\beta\text{1-4glc}$ .	20
<b>Figure 18-</b> Exemples de chaînes linéaires et ramifiées d'hémicelluloses.	21
<b>Figure 19-</b> Exemples de formules structurales d'une partie d'une chaîne d'hémicelluloses de feuillus et de résineux.	22
<b>Figure 20-</b> Représentation schématique de monosaccharides à cinq carbones (pentoses) des hémicelluloses du bois.	22
<b>Figure 21-</b> Représentation schématique de monosaccharides à six carbones (hexoses) des hémicelluloses du bois.	22

<b>Figure 22-</b> Structure des principaux résidus unitaires des lignines.	24
<b>Figure 23-</b> Exemples des principales liaisons de covalence rencontrées dans la structure des lignines.	24
<b>Figure 24-</b> Structure des lignanes les plus abondants dans le bois et les effluents papetiers.	25
<b>Figure 25-</b> Structure des acides résiniques détectés dans les effluents papetiers.	27
<b>Figure 26-</b> Structure des composés aromatiques utilisés comme unique source de carbone.	39
<b>Figure 27-</b> Répartition des colonies isolées, sur milieu gélosé R <sub>2</sub> A, en fonction des principaux caractères phénotypiques.	43
<b>Figure 28-</b> Morphologie des cellules bactériennes (isolat A <sub>1</sub> ) après 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures d'incubation en culture liquide (MGYE).	45
<b>Figure 29-</b> Chromatographies des composants du peptidoglycane de la paroi d'isolats de la population principale.	47
<b>Figure 30-</b> Mesures de l'absorbance ( $\lambda_{\text{abs}} = 600 \text{ nm}$ ) des différentes cultures bactériennes en présence des dérivés simples de la lignine.	49
<b>Figure 31-</b> Spectres d'absorbance en ultraviolet de différents produits de lyophilisation de la matière organique des eaux épurées.	62
<b>Figure 32-</b> Comparaison des spectres UV des fractions retenues et non retenues sur colonne XAD-8.	63
<b>Figure 33-</b> Spectres UV des lyophilisats de la matière organique réfractaire après extraction au bromure d'acétyle.	65
<b>Figure 34-</b> Spectres UV témoins d'extraction au bromure d'acétyle.	66
<b>Figure 35-</b> Spectres UV de référence de lignines brutes et kraft traitées au bromure d'acétyle.	66
<b>Figure 36-</b> Spectres IR de deux produits de lyophilisation des eaux épurées.	67
<b>Figure 37-</b> Comparaison des spectres infrarouges des eaux épurées (1) et du carbonate de sodium (2).	67
<b>Figure 38-</b> Spectres infrarouges des lyophilisats des eaux épurées retenues (A) et non retenues (B) sur la résine XAD-8.	68
<b>Figure 39-</b> Spectres infrarouges de référence de complexes lignine-polysaccharides et de polysaccharides d'origine végétale.	69

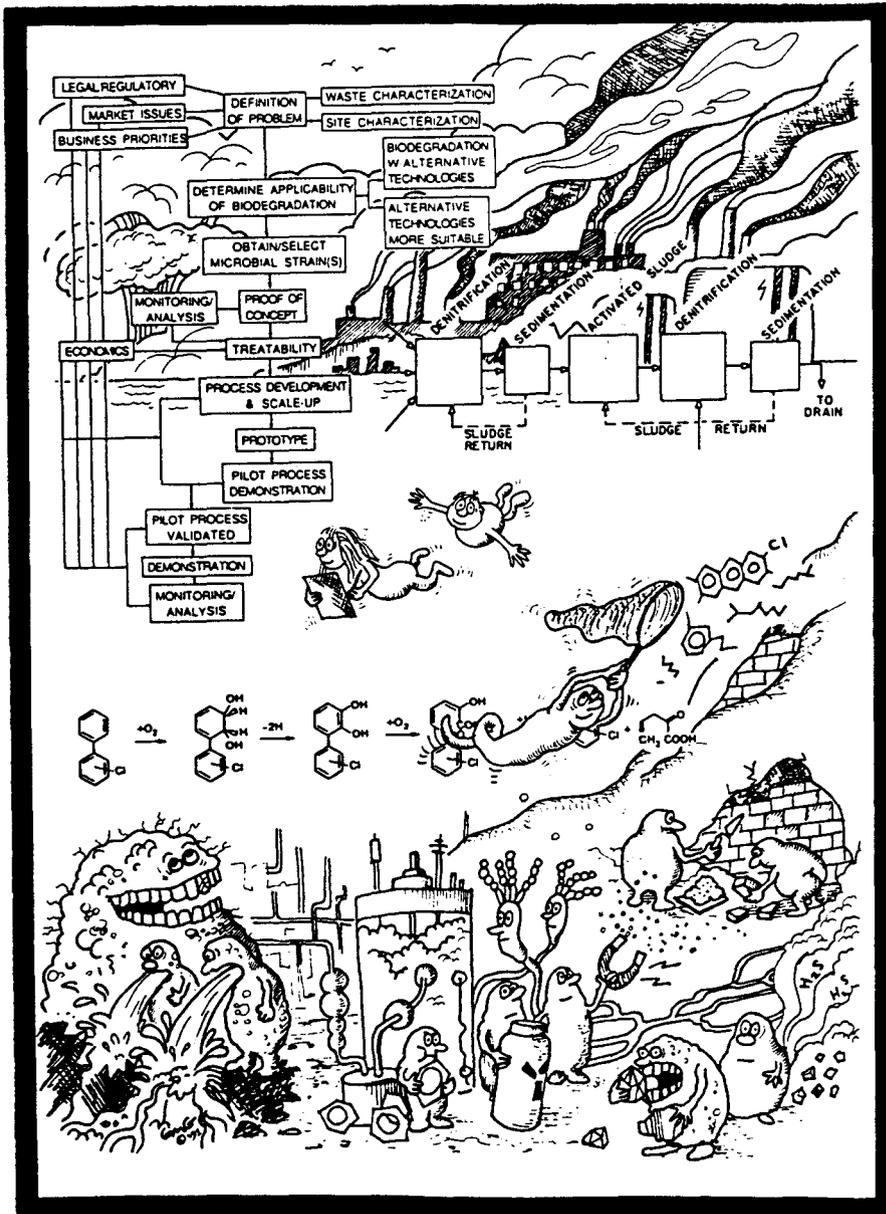
<b>Figure 40-</b> Profils d'élution des tamisages moléculaires (G50 et G25) de la matière organique réfractaire.	71
<b>Figure 41-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de la fraction de faible poids moléculaire de la matière organique réfractaire avant (A) et après (B) focalisation	73
<b>Figure 42-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de la fraction du haut poids moléculaire de la matière organique réfractaire avant (A) et après (B) focalisation.	74
<b>Figure 43-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de différentes extractions de cellulose du bois : (a) et (b), holocellulose ; (c) et (d), cellulose.	76
<b>Figure 44-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ d'hémicellulose (a, b) extraites de bois brut de pin par Kolodziejwski <i>et al.</i> (1982).	77
<b>Figure 45-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ : (a) bois brut (pin) ; (b, c) résidu de bois après extraction chimique.	77
<b>Figure 46-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ d'holocelluloses : (a) bois brut, holocellulose issue de traitement chloré par $\text{NaClO}$ (b) et par $\text{Cl}_2$ (c).	77
<b>Figure 47-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ : (a) boues de pâte à papier, (b) lignine, (c) holocellulose, (d) cellulose extraite de pâte à papier.	77
<b>Figure 48-</b> chromatogrammes sur couche mince de gel de silice des produits d'hydrolyse de la matière organique des eaux épurées.	80
<b>Figure 49-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ d'études des interactions de complexes lignine-polysaccharides : (a) extrait bois brut ;(b) holocellulose des gaz de traitement au chlore ; (c, d, e) différence du spectre b avec a, en augmentant graduellement l'intensité du spectre b ; (f) fraction lignine enrichie en complexes lignines-polysaccharides.	82
<b>Figure 50-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de polymères de lignines traitées.	82
<b>Figure 51-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ d'une préparation de pâte à bois.	82
<b>Figure 52-</b> Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de litières folières.	82
<b>Figure 53-</b> Profils d'élution des tamisages moléculaires sur Sephadex G50 des surnageants de culture fongique avant et après décoloration.	98
<b>Figure 54-</b> Comparaison des spectres d'absorbance en UV des surnageants de cultures fongiques avant (1) et après (2,3) décoloration.	99
<b>Figure 55-</b> Schéma réactionnel d'une peroxydase.	103

<b>Tableau 1-</b>	Historique de l'évolution du site de traitement des eaux de STORA Corbehem.	12
<b>Tableau 2-</b>	Les sondes nucléiques : séquences, site d'appariement, spécificités et références bibliographiques.	38
<b>Tableau 3-</b>	Culture des bactéries en présence de dérivés simples de la lignine.	40
<b>Tableau 4-</b>	Echelle d'interprétation de l'indice d'hydrophobicité, exprimé en pourcentage, selon Mozes et Rouxhet (1987).	41
<b>Tableau 5-</b>	Comparaison du nombre d'unités formant des colonies en fonction du milieu de culture à partir d'un même échantillon de boues activées après 5 jours d'incubation	42
<b>Tableau 6-</b>	Pourcentage de la population bactérienne principale dans les boues activées à différentes périodes de prélèvement.	44
<b>Tableau 7-</b>	Estimation de la teneur en G+C pour plusieurs isolats de la population dominante.	46
<b>Tableau 8-</b>	Hybridation des sondes oligonucléotidiques en fonction des cellules fixées.	48
<b>Tableau 9-</b>	Détermination et comparaison de l'hydrophobicité relative de la surface cellulaire des <i>Arthrobacter</i> isolés et des souches de collection.	52
<b>Tableau 10-</b>	Analyses minérales par ICPAES de différents produits de lyophilisation des eaux épurées.	61
<b>Tableau 11 -</b>	Teneur en carbone organique total et en oses totaux des lyophilisats.	61
<b>Tableau 12-</b>	Résultats des microanalyses (exprimés en pourcentage) de la matière organique réfractaire de différentes préparations de lyophilisation.	78
<b>Tableau 13-</b>	Répartition du carbone organique total après hydrolyse chimique de la matière organique des eaux épurées.	79
<b>Tableau 14-</b>	Enzymes et substrats spécifiques utilisés.	85
<b>Tableau 15-</b>	Descriptif des conditions réactionnelles des essais enzymatiques.	85
<b>Tableau 16-</b>	Composition pour un litre d'eau distillée du milieu standard pour culture fongique selon Tien et Kirk (1984a).	88
<b>Tableau 17-</b>	Composition pour un litre de solution basale pour les milieux de culture fongique.	89
<b>Tableau 18-</b>	Estimation de la dégradation de la matière organique des eaux épurées par différentes enzymes.	92

<b>Tableau 19-</b>	Croissances bactériennes après 72 heures d'incubation de différentes concentrations de matière réfractaire.	93
<b>Tableau 20-</b>	Caractéristiques des souches isolées des boues activées.	93
<b>Tableau 21-</b>	Dégradation de la matière organique réfractaire par des micro-organismes isolées des boues activées.	94
<b>Tableau 22-</b>	Décoloration obtenues par les cultures fongiques.	96
<b>Tableau 23-</b>	Optimisation des conditions de cultures fongiques.	96
<b>Tableau 24-</b>	Mise en évidence des activités peroxydases dans les surnageants de cultures fongiques (dosage par ABTS).	100
<b>Tableau 25-</b>	Mise en évidence des activités peroxydases dans les surnageants de cultures fongiques (dosage par 2,6-DMP).	101

ABTS	: 2,2'-azino- <i>bis</i> -éthylbenthiazoline
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATCC	: American type culture collection
C0 à 7	: Conditions de culture 0 à 7
COT	: Carbone organique total
Da	: Dalton
DBO	: Demande biochimique en oxygène
DCO	: Demande chimique en oxygène
2,6-DMP	: 2,6-diméthoxyphénol
DSM	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
ICPAES	: Ionization inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
$I_h$	: Indice d'hydrophobicité
$\lambda_{abs}$	: Longueur d'onde d'absorbance
MES	: Matières en suspension
MGYE	: Medium glucose yeast extract
min	: minute
MP	: Machine à papier
MVS	: Matières volatiles en suspension
PM	: Poids moléculaire
ppm	: partie par million
R24-R25	: Rejets n°24 et 25 du site d'épuration
R <sub>2</sub> A	: Reasoner 2 agar
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
s	: seconde
SSC	: Standard sodium citrate
TLC	: Thin layer chromatography
$T_m$	: Température de dénaturation
TSA	: Trypcase soy agar
UV	: Ultra violet
XAD-8	: Résine non ionique, amberlite

# INTRODUCTION



« Microbes can and will do anything : microbes are smarter, wiser and more energetic than microbiologists, chemists, engineers and others. »

Perlmon, D. (1980) *Developments in Industrial Microbiology*, 31, XV.

---

---

BULLETIN DES LOIS.

N.° 324.

---

---

(N.° 6062.) DÉCRET IMPÉRIAL relatif à la Contribution foncière des salins et marais salans et des salines.

Au palais de Fontainebleau, le 15 Octobre 1810.

**N**APOLÉON, EMPEREUR DES FRANÇAIS, ROI D'ITALIE, PROTECTEUR DE LA CONFÉDÉRATION DU RHIN, MÉDIATEUR DE LA CONFÉDÉRATION SUISSE;

Sur le rapport de notre ministre des finances ;

Notre Conseil d'état entendu,

Nous AVONS DÉCRÉTÉ et DÉCRÉTONS ce qui suit :

ART. 1.<sup>er</sup> Les salins et marais salans et les salines seront cotisés à la contribution foncière dans les rôles des communautés où ils sont situés ; les bâtimens qui en dépendent seront imposés d'après leur valeur locative, et les terrains et emplacements, sur le pied des meilleures terres labourables.

2. Notre ministre des finances est chargé de l'exécution du présent décret.

Signé NAPOLÉON.

Par l'Empereur :

Le Ministre Secrétaire d'état, signé H. B. DUC DE BASSANO.

Le développement des activités industrielles est indubitablement associé aux nuisances qui peuvent en découler.

Sous l'Ancien Régime, les diverses nuisances provenant des industries ne faisaient l'objet que de réglementations partielles imposées par les corporations, les villes ou les parlements, ce qui avait pour effet d'entraîner de grandes inégalités dans les réglementations soumises aux exploitants.

Le **décret du 15 octobre 1810** a eu pour objectif de soustraire les industries à l'arbitraire de réglementations locales et d'assurer le développement industriel en maintenant des conditions de concurrence normale.

Ce texte, s'il est l'ancêtre direct de la réglementation actuelle (**loi du 19 juillet 1976** relative aux installations classées pour la protection de l'environnement), avait donc des objectifs fort éloignés de la protection de l'environnement, au sens où nous l'entendons aujourd'hui. Néanmoins, il pose les bases de l'actuelle réglementation.

- ◆ Le système de l'autorisation préalable
- ◆ La répartition des établissements visés en 3 catégories. Le site est classé ou ne l'est pas. S'il est recensé comme tel, la loi prévoit un double régime. Il est soumis à autorisation s'il présente des nuisances, des inconvénients ou des dangers importants. Les autres sont soumis à déclaration.
- ◆ La nomenclature des contraintes et des limites à appliquer.

L'eau, élément majeur du monde minéral et biologique, est au centre de ce débat.

L'eau est constamment sollicitée lors des activités domestiques, agricoles et industrielles, et devient le vecteur de la pollution résultante.

A mesure que les activités humaines devenaient plus organisées, intensives, et diversifiées, la législation sur l'eau s'enrichissait en parallèle de règles et de normes.

La deuxième révolution industrielle, et surtout les trente années qui ont suivi la fin de la seconde guerre mondiale ont brusquement révélé les limites et les degrés de liberté qui régissaient les ressources en eau. En dépit du formidable développement des sciences et des

**LOI N°64-1245 DU 16 DECEMBRE 1964**

**relative au régime et à la répartition des eaux  
et à la lutte contre leur pollution**

*(Journal Officiel du 18 décembre 1964  
et rectificatifs J.O. des 15 janvier  
et 6 février 1965)*

**TITRE I<sup>er</sup>**

**DE LA LUTTE CONTRE LA POLLUTION DES  
EAUX ET DE LEUR REGENERATION**

**Article 1<sup>er</sup>**

Les dispositions du présent titre ont pour objet la lutte contre la pollution des eaux et leur régénération, dans le but de satisfaire ou de concilier les exigences :

- de l'alimentation en eau potable des populations et de la santé publique ;
- de l'agriculture, de l'industrie, des transports et de toutes autres activités humaines d'intérêt général ;
- de la vie biologique du milieu récepteur et spécialement de la faune piscicole ainsi que des loisirs, des sports nautiques et de la protection des sites ;
- de la conservation et de l'écoulement des eaux.

Elles s'appliquent aux déversements, écoulements, rejets, dépôts directs ou indirects de matière de toute nature et plus généralement à tout fait susceptible de provoquer ou d'accroître la dégradation des eaux en modifiant leurs caractéristiques physiques, chimiques, biologiques ou bactériologiques, qu'il s'agisse d'eaux superficielles, souterraines, ou des eaux de mer dans la limite des eaux territoriales.

**LOI N°76-663 DU 19 JUILLET 1976**

**relative aux installations classées  
pour la protection de l'environnement**

*(Journal officiel du 20 juillet 1976)*

**TITRE I<sup>er</sup>**

*Dispositions générales*

**Article 1<sup>er</sup>**

Sont soumis aux dispositions de la présente loi les usines, ateliers, dépôts, chantiers, carrières et d'une manière générale les installations exploitées ou détenues par toute personne physique ou morale, publique ou privée, qui peuvent présenter des dangers ou des inconvénients soit pour la commodité du voisinage, soit pour la santé, la sécurité, la salubrité publiques, soit pour l'agriculture, soit pour la protection de la nature et de l'environnement, soit pour la conservation des sites et monuments.

**LOI N°92-3 DU 3 JANVIER 1992**

**sur l'eau modifiée par la loi n°92-1336  
du 16 décembre 1992 et par la loi n°95-101  
du 2 février 1995**

*(Journal officiel du 4 janvier 1992,  
23 décembre 1992 et 3 février 1995)*

**Article 1<sup>er</sup>**

L'eau fait partie du patrimoine commun de la nation. Sa protection, sa mise en valeur et le développement de la ressource utilisable, dans le respect des équilibres naturels, sont d'intérêt général.

L'usage de l'eau appartient à tous dans le cadre des lois et règlements ainsi que des droits antérieurement établis.

techniques, et de leurs prolongements industriels, des conflits de plus en plus nombreux et aigus sont apparus.

La loi du 16 décembre 1964 sur le régime, la répartition des eaux, et la lutte contre leur pollution, est en France le point d'aboutissement de la prise de conscience de la nécessité de gérer l'eau en tenant compte de l'unicité de la ressource et de son cycle. La mise en oeuvre d'un dispositif institutionnel et financier s'est révélé, à l'usage, d'une grande efficacité : il s'agit du principe de gestion des ressources par bassins hydrographiques, et du système des redevances avec la création des agences de bassin, aujourd'hui dénommées agences de l'eau.

Un site industriel, comme la papeterie Stora Corbehem, reconnue en tant qu'installation classée (arrêté d'autorisation du 5 juin 1990, Préfecture du Pas-de-Calais) doit répondre aux obligations issues de réglementations spécifiques qui découlent de la loi du 19 juillet 1976.

La politique environnementale du groupe suédois STORA [adresse URL : <http://stora.se>] repose sur une alliance entre production de haute qualité et protection de l'environnement.

En tant que transformateur d'une matière renouvelable, l'industrie du bois joue un rôle important dans une société de plus en plus engagée vers une philosophie des écocycles. Elle se doit de transformer les produits de la forêt en produits utiles à la société, par application de procédés qui ne soient pas en contradiction avec les origines de la matière première.

Les papetiers veulent appliquer une production qui soit sans danger pour l'homme et mettent l'accent sur un impact global et minimal sur l'environnement (Stora Corbehem, déclaration environnementale 1996). Le respect de cette politique concerne toutes les matières premières d'un site papetier où l'eau représente une entité à part entière.

Afin de répondre aux attentes exprimées par les législateurs, et gérer les problèmes rencontrés lors du traitement des effluents industriels, un partenariat a été conclu entre l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Laboratoire de Microbiologie) et l'Industrie (Stora Corbehem). Cet échange a permis la mise en place de ce travail de thèse.

Les résultats de cette collaboration sont exposés dans les quatre parties de ce mémoire.

Après une présentation globale de la production papetière, le système d'épuration biologique des eaux usées du site est décrit.

Dans la première partie de ce travail, nous définissons la notion et l'organisation des boues activées, la population bactérienne susceptible d'y être rencontrée, ainsi que les paramètres de mesure utilisés quotidiennement pour la gestion d'un système d'épuration. Nous proposons ensuite une analyse bibliographique sur les connaissances actuelles relatives aux matières organiques susceptibles de se trouver dans les eaux usées de papeterie.

Les parties suivantes s'organisent autour de deux axes de recherche.

L'étude de la population microbienne des boues activées a été réalisée dans un premier temps. Il s'agit de révéler les populations impliquées lors de l'épuration des eaux usées papetières. Une population dominante a été caractérisée et plusieurs prospections ont été conduites dans le but de comprendre son rôle au sein du système épurateur.

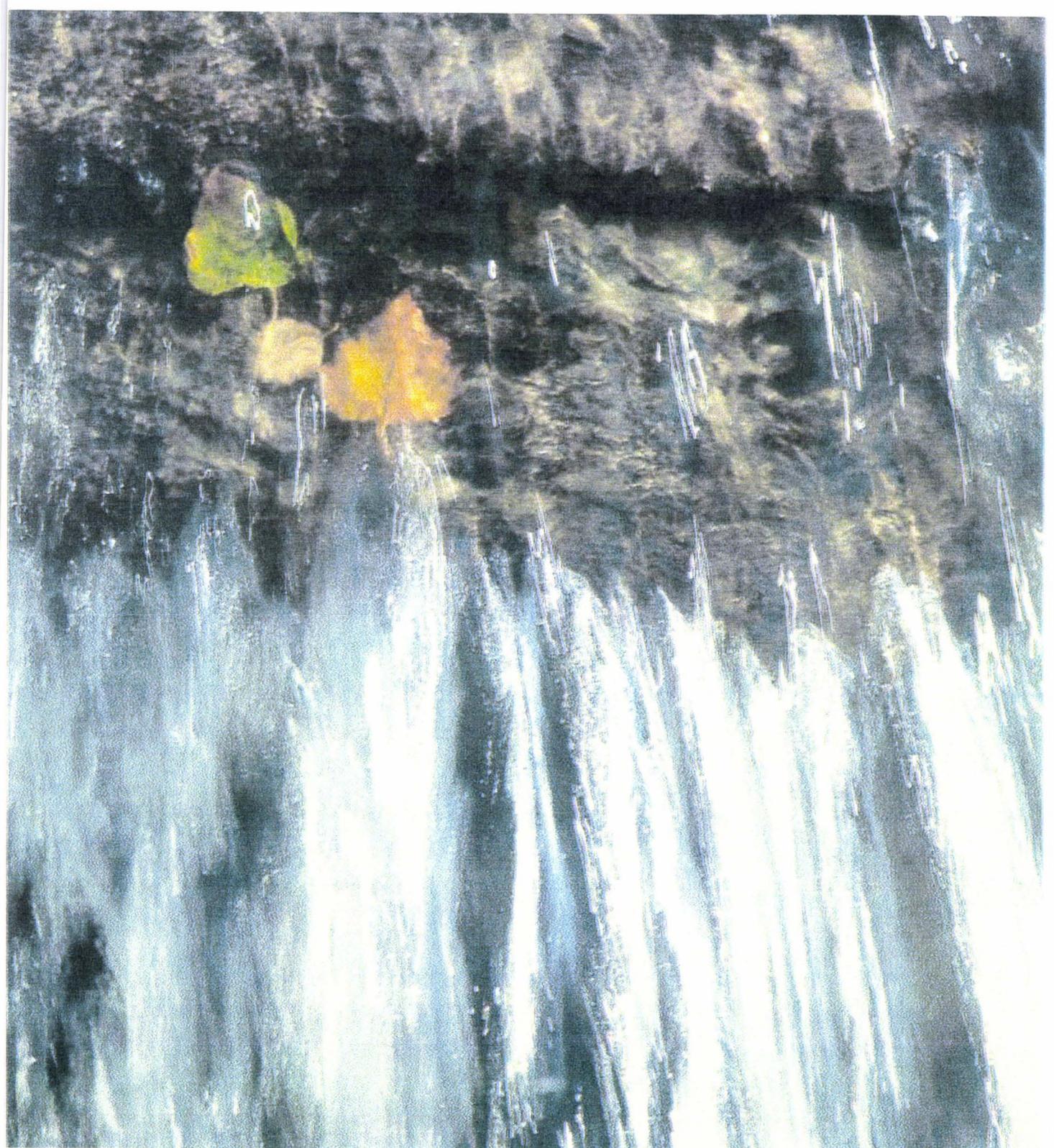
La composition de la matière organique présente dans les eaux épurées a ensuite été étudiée.

En parallèle, l'utilisation d'outils biologiques : enzymes, souches bactériennes ou fongiques, ont permis d'estimer la biodégradabilité de cette matière organique issue de l'épuration.

# PARTIE 1

---

## L'EAU : FLUIDE INDISPENSABLE EN PAPETERIE.



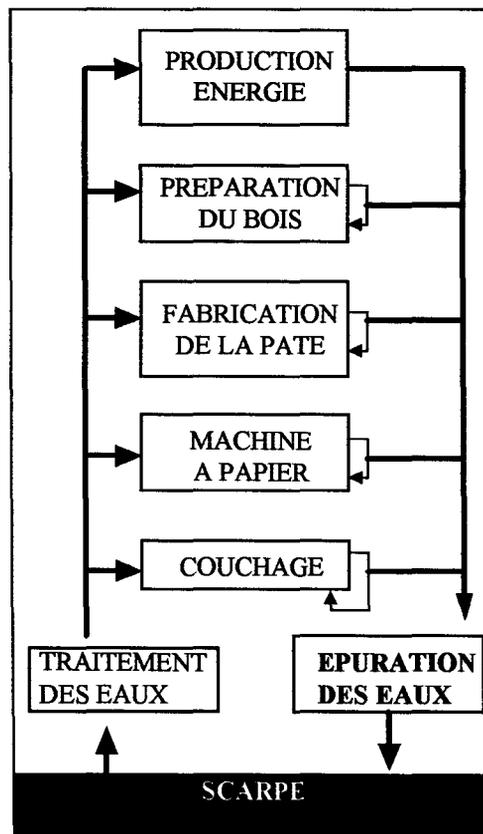
## CHAPITRE 1 - LE SITE INDUSTRIEL

Le papier couché est composé d'une feuille de base fabriquée à partir de fibres de cellulose extraites du bois sur laquelle est déposée de chaque côté une pellicule, ou « couche », constituée de latex et de kaolin.

Le papier couché présente des aptitudes remarquables à l'impression. Il est plus spécifiquement destiné aux magazines, dépliants publicitaires et catalogues commerciaux.

La papeterie Stora Corbehem produit 500 000 tonnes de papier couché par an. Les principales étapes de sa production sont :

- La production de pâte à bois.
- Le blanchiment de la pâte.
- La fabrication proprement dite du papier couché.



**Figure 1-** Utilisation de l'eau à travers les différents stades de la production du papier couché.

De l'écorçage des rondins, à la transformation du bois en pâte jusqu'au blanchiment de celle-ci, l'eau est utilisée en tant qu'échangeur thermique, permet le transport des pâtes, et intervient dans l'élaboration des solutions des réactifs. **L'eau est le fluide indispensable pour la production papetière.**

Au cours des stades de fabrication (**figure 1**), l'eau se charge progressivement de matières en suspension et de matières organiques dissoutes. Elle doit donc être épurée avant son rejet dans la Scarpe (**figure 2**) afin de respecter le milieu récepteur et la législation qui y est appliquée.

### 1.1- La production du papier couché

Le bois est défibré pour dissocier les fibres de cellulose sans les détruire. Elles doivent garder au maximum leur intégrité structurale pour adhérer les unes aux autres et donner sa cohésion à la feuille de base.

Pour la fabrication du papier couché, l'usine de Corbehem utilise un mélange de deux grands types de pâtes à bois (Valette et de Choudens, 1987) :

- Les pâtes **chimiques**, importées, consistent à dissocier les fibres en solubilisant certains constituants, notamment les lignines et les hémicelluloses. Elle s'effectue à des températures élevées (100 à 175°C) dans des lessiveurs ( 50 à 300 m<sup>3</sup>). Il existe deux techniques, soit les plaquettes sont mélangées avec du bisulfite de sodium (procédé acide), soit avec du sulfite de sodium (procédé alcalin ou kraft). Pour ces deux types, le rendement est de l'ordre de 50% (pâte/bois ; p/p).

90% des pâtes chimiques fabriquées dans le monde résultent du procédé kraft.

Pour les besoins du produit fini, le site de Corbehem utilise principalement des pâtes kraft de résineux du Canada blanchies. Depuis, les années 1990, les séquences de blanchiment à base d'ozone et de peroxyde d'hydrogène permettent de limiter les taux en AOX (adsorbable organic halogene) dans ce genre de pâtes. Actuellement, les pâtes importées ne contribuent qu'à une part marginale de la pollution générée par le site.

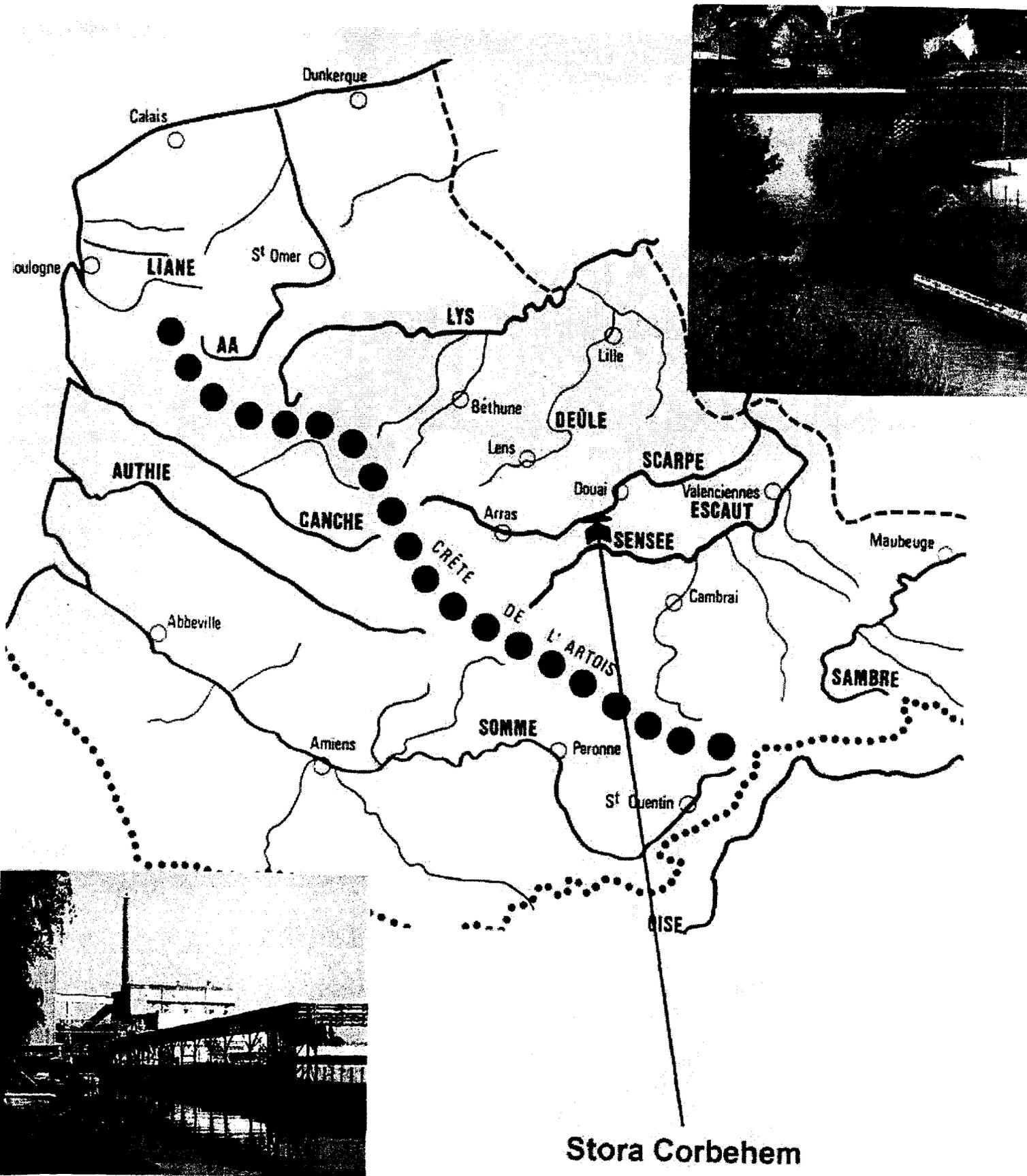


Figure 2- Situation géographique du site industriel et photographies de la Scarpe.

Il existe une grande variété de pâtes **mécaniques**, dites à haut rendement, en fonction des types moyens mécaniques et des produits chimiques employés. Les principaux types sont :

✓ **G.W.P.** (ground wood pulp), ces pâtes sont obtenues à partir de rondins broyés par une meule abrasive.

✓ **R.M.P.** (refiner mechanical pulp), ces pâtes utilisent des plaquettes issues des déchets de scieries et de menuiseries qui sont broyés dans des défibreurs atmosphériques à disques équipés de lames en matériaux durs.

✓ **T.M.P.** (thermomechanical pulp), les pâtes thermomécaniques sont des RMP dont les plaquettes peuvent préalablement subir ou non un traitement à la vapeur, mais dont le processus de défibrage se déroule sous pression.

✓ **C.T.M.P.** (chimiothermomechanical pulp), ces pâtes combinent un traitement chimique (soude ou sulfite de sodium) et un défibrage mécanique à une température supérieure à 100°C.

Les pâtes chimiques ont un indice de blancheur acceptable pour la production de papier couché car leur préparation entraîne l'élimination de la majeure partie des chromophores du bois. Par contre, les pâtes à haut rendement présentent une couleur jaune qui provient principalement de la structure de la lignine.

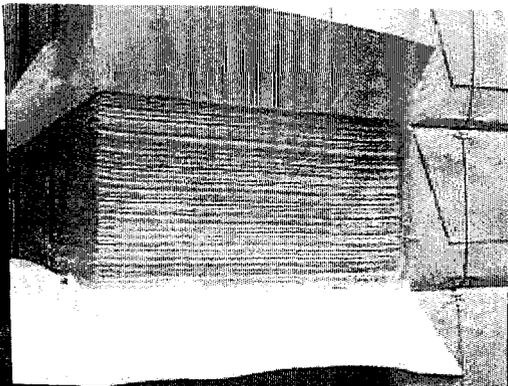
Les papetiers cherchent aujourd'hui à produire des papiers avec un maximum de pâtes mécaniques pour diminuer la part des pâtes chimiques, très coûteuses.

Pour cela, Stora Corbehem a choisi le procédé TMP avec un mélange de bois à base d'épicéa et de sapin pour le résineux et de peuplier pour le feuillu.

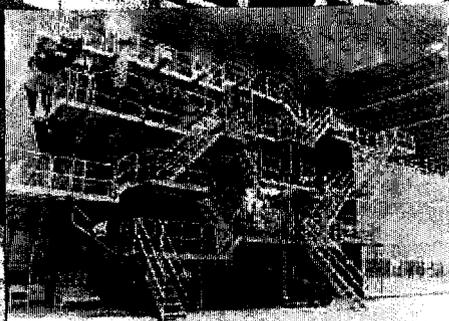
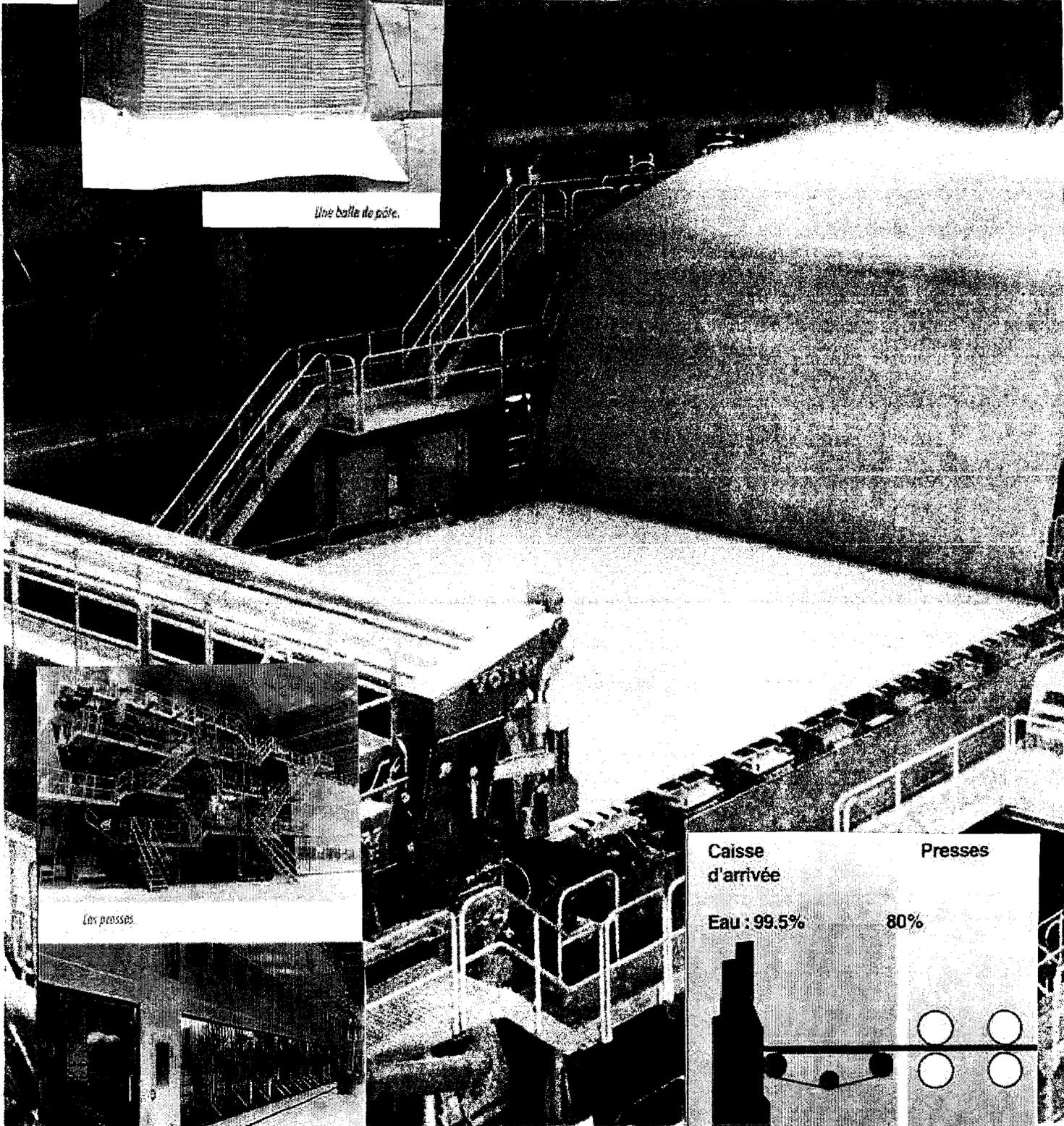
La pâte obtenue après une étape de sélection pour éliminer les éléments grossiers subit une étape de blanchiment au peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin.

Cette étape de production constitue la principale source de pollution, de plus l'obtention de très hauts niveaux de blanc permet une substitution importante des pâtes chimiques mais amplifie fortement les niveaux de pollution.

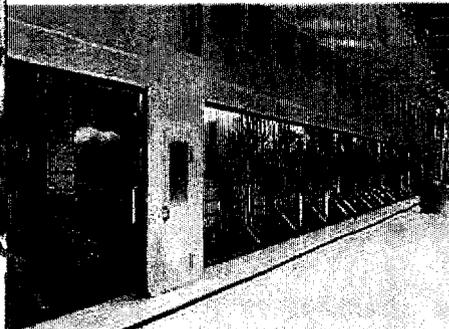
C'est une solution de cette pâte à 0,5% de matières solides (les fibres) qui est déposée en caisse de tête de la machine à papier (**figure 3**) pour aboutir à une bobine mère de papier contenant 4% d'humidité. (**figure 4**).



*Une balle de pâte.*



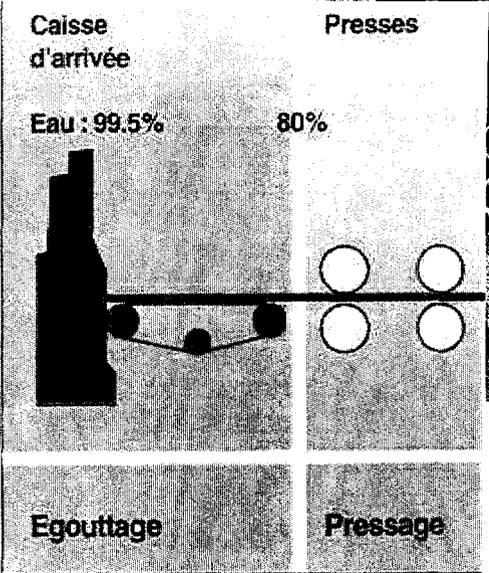
*Les presses.*



*La séchoie.*



*La coacheuse.*



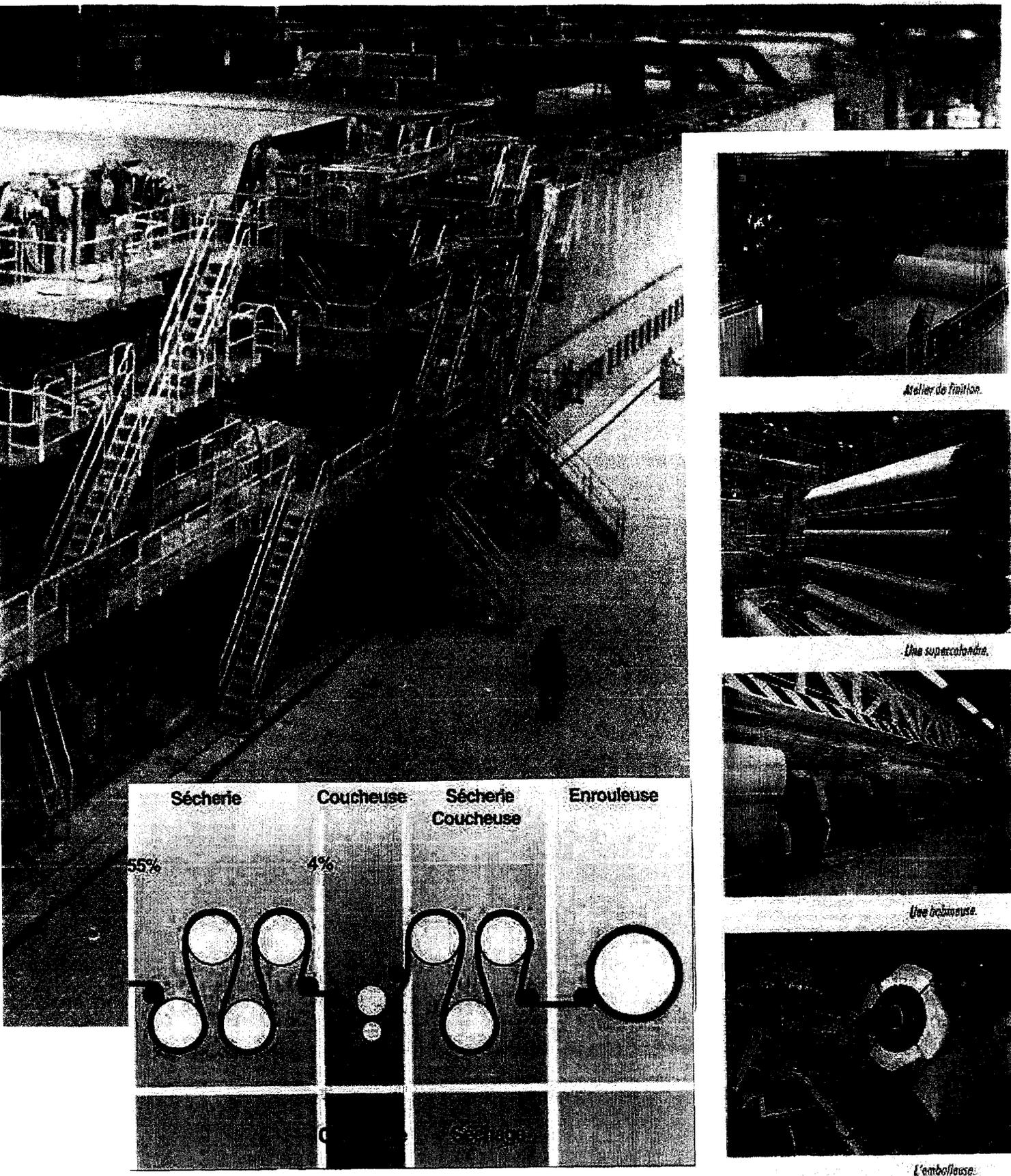


Figure 3- Présentation d'une machine à papier couché et schéma de fabrication.

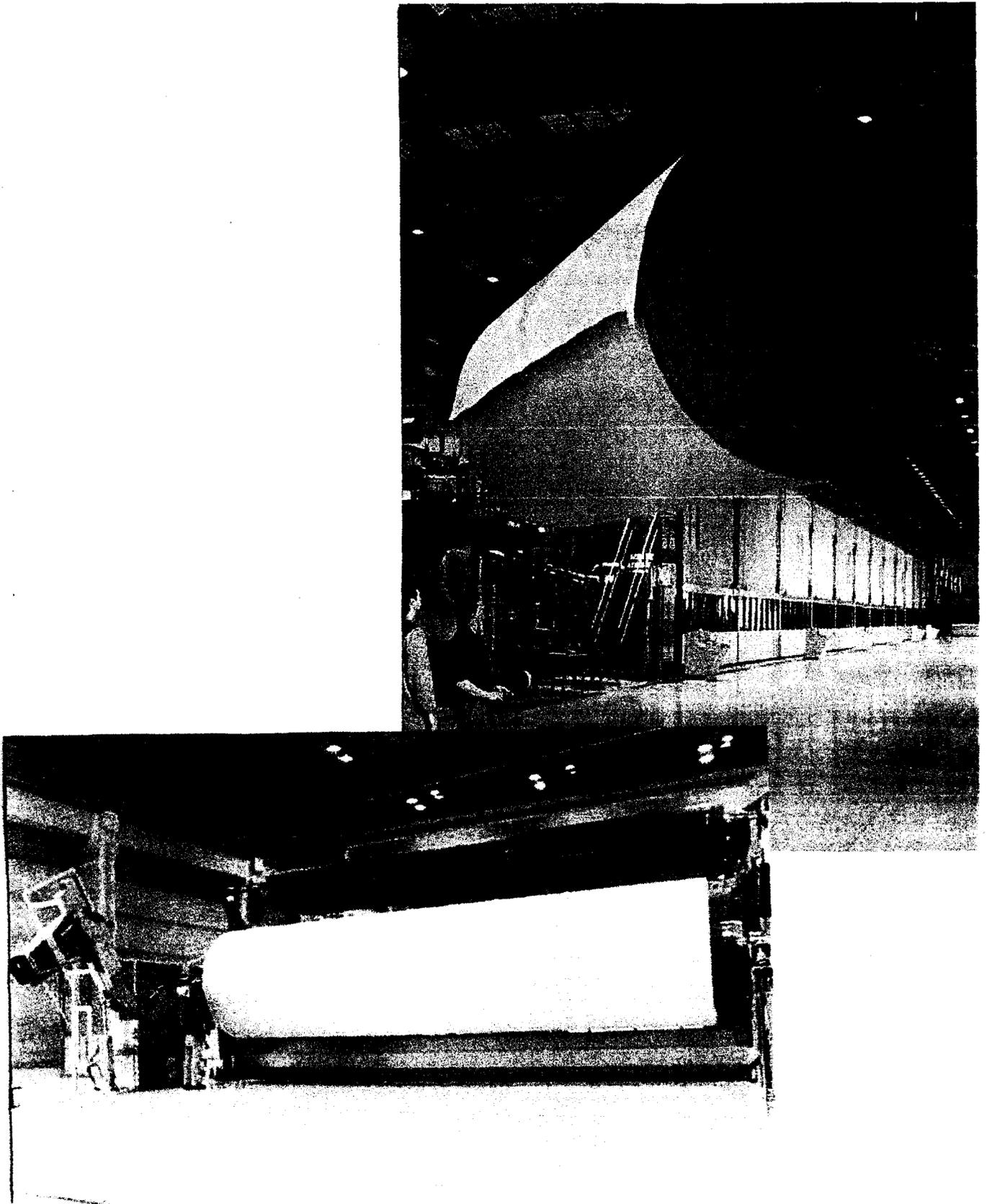


Figure 4- Production de bobines mères.

## 1.2- Le traitement des eaux du site papetier

Le traitement des eaux résiduelles implique généralement un traitement primaire, c'est-à-dire une épuration mécanique assistée parfois d'un procédé chimique ; puis l'épuration biologique proprement dite ou épuration secondaire (Vandevenne, 1985). Il s'agit de transformer la matière organique dissoute en matière organique insoluble représentée essentiellement par une biomasse.

La station d'épuration du site papetier (figure 5 et 6) a été réalisée en plusieurs étapes correspondant aux extensions de production (tableau 1).

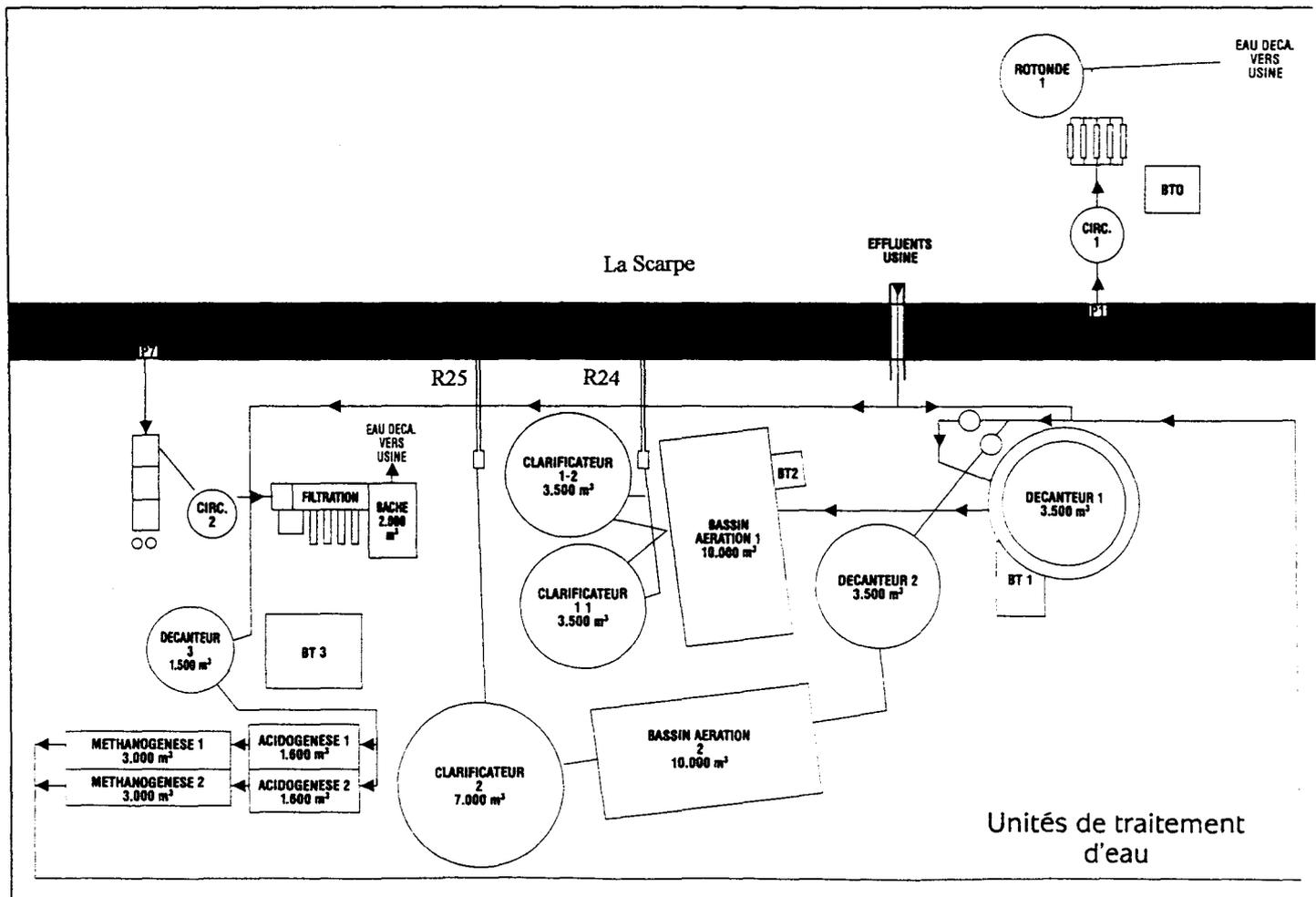


Figure 5- Plan schématique de la station d'épuration.

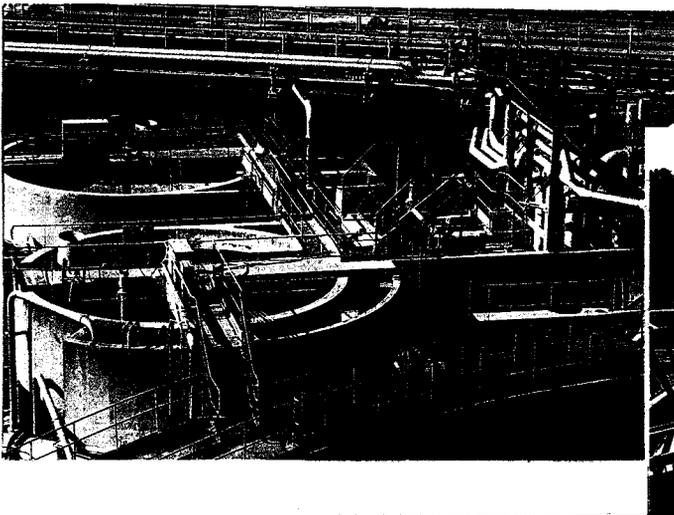
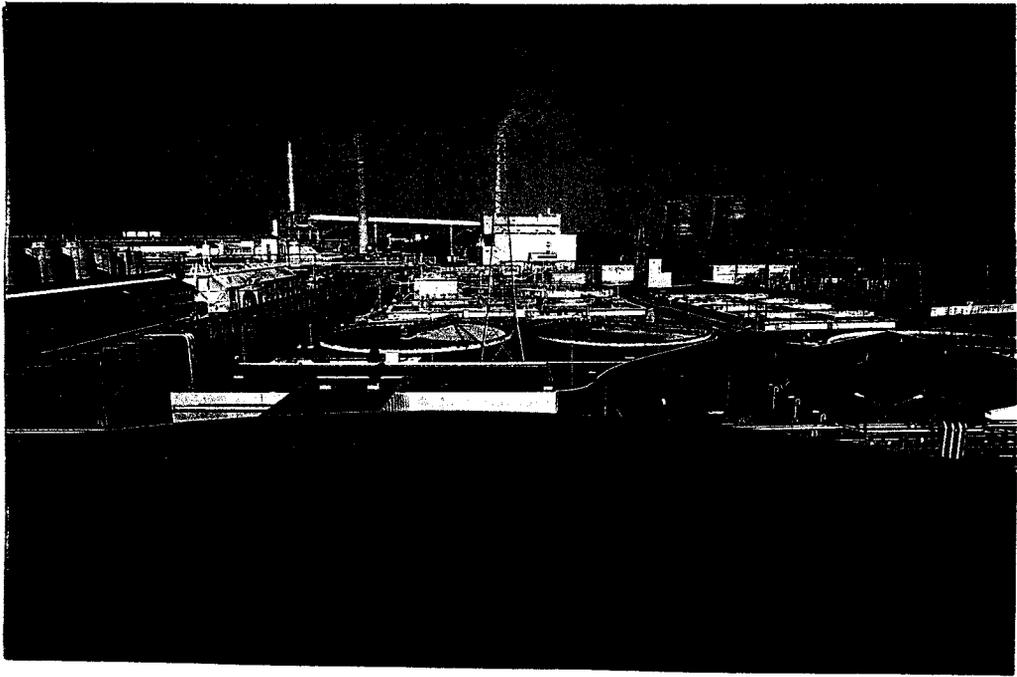


Figure 6- Présentation de la station d'épuration.

**Tableau 1- Historique de l'évolution du site de traitement des eaux de STORA Corbehem.**

## H I S T O R I Q U E

- |  |   |
|--|---|
| <p><b>1956</b> : Unité de décarbonatation de l'eau de Scarpe « accelator » 600 m<sup>3</sup>/h.</p> <p><b>1958</b> : Décanteur primaire, 90% des MES éliminées, 60% des rejets traités.</p> <p><b>1966</b> : Unité de décarbonatation de l'eau de Scarpe « circulator » 800 m<sup>3</sup>/h.</p> <p><b>1972</b> : Arrêt de la pâte chimicomécanique, réduction de 50% du flux de pollution organique.</p> <p><b>1974</b> : Flottations sur eaux blanches cartonnerie, récupération des fibres.</p> <p><b>1977</b> : Polydisk MP4 en remplacement des systèmes peu performants de récupération des fibres sur les eaux blanches.</p> <p><b>1981-82</b> : Essais pilote de traitement biologique.</p> <p><b>1984</b> : Mise en service du traitement biologique sur le rejet du décanteur primaire, 90% de la pollution organique traitée.</p> <p><b>1985</b> : Installation d'un récupérateur de fibres « polydisk » sur les eaux blanches de la MP3.</p> | <p><b>1986</b> : Installation d'un récupérateur de fibres « polydisk » sur les eaux blanches de la MP1.</p> <p><b>1988</b> : Mise en service décanteur primaire n°2 pour traiter les rejets directs qui sont supprimés après restructuration des réseaux internes.</p> <p><b>1989</b> : Doublement de la capacité du traitement biologique, construction du bassin d'aération n°2.</p> <p><b>1990</b> : Mise en service du « circulator » n°2, capacité de production 1500m<sup>3</sup>/h d'eau de Scarpe décarbonatée, arrêt de l'accelator.</p> <p><b>1990</b> : Mise en service du traitement anaérobie, comprenant 1 décanteur primaire et 2 lignes d'épuration par voie anaérobie en parallèle.</p> <p><b>1991</b> : Prix régional de l'Environnement.</p> <p><b>1998</b> : Déshydratation des boues biologiques, valorisation agricole.</p> |
|--|---|

### ● La station d'épuration

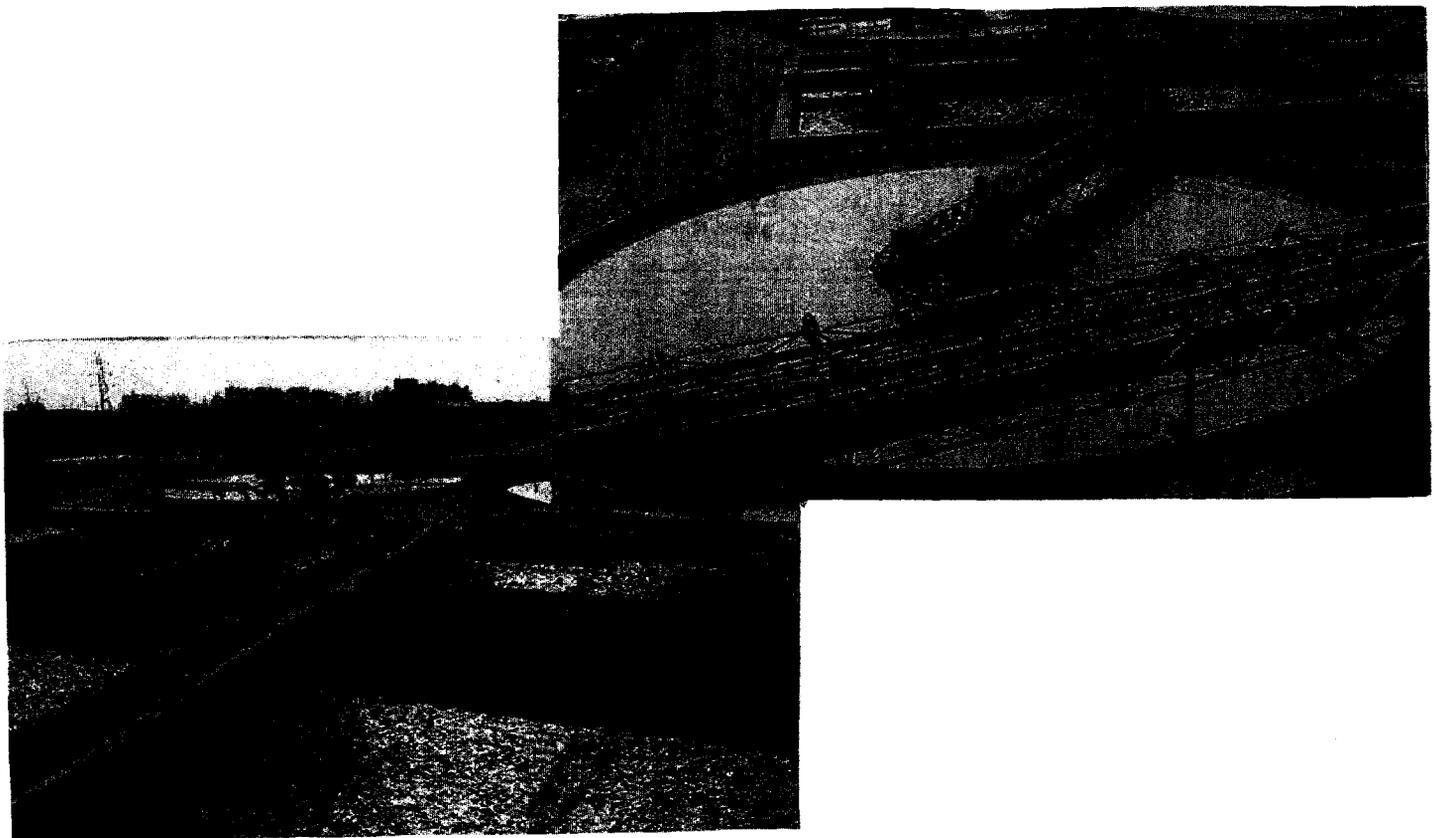
Les effluents les plus concentrés et chauds (production de la pâte thermomécanique) sont traités par deux réacteurs anaérobies avant d'être mélangés aux autres effluents pour une épuration dans des réacteurs aérobies à biomasse en suspension.

La combinaison d'un traitement anaérobie-aérobie est très efficace (Rintala et Puhakka, 1994 ; Liu *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1997). Le rendement moyen annuel de diminution de la charge organique, exprimé par les mesures de la demande chimique en oxygène, de la station d'épuration est de 89% (Stora Corbehem. Environnement, bilan annuel 1997), respectant la législation et les objectifs de sa politique environnementale (Stora Corbehem, déclaration environnementale 1996).

Le **traitement anaérobie** (figure 7) s'effectue dans un réacteur biologique maintenu à l'abri de l'air et de la lumière. La transformation anaérobie des matières organiques est assurée par une microflore très complexe.



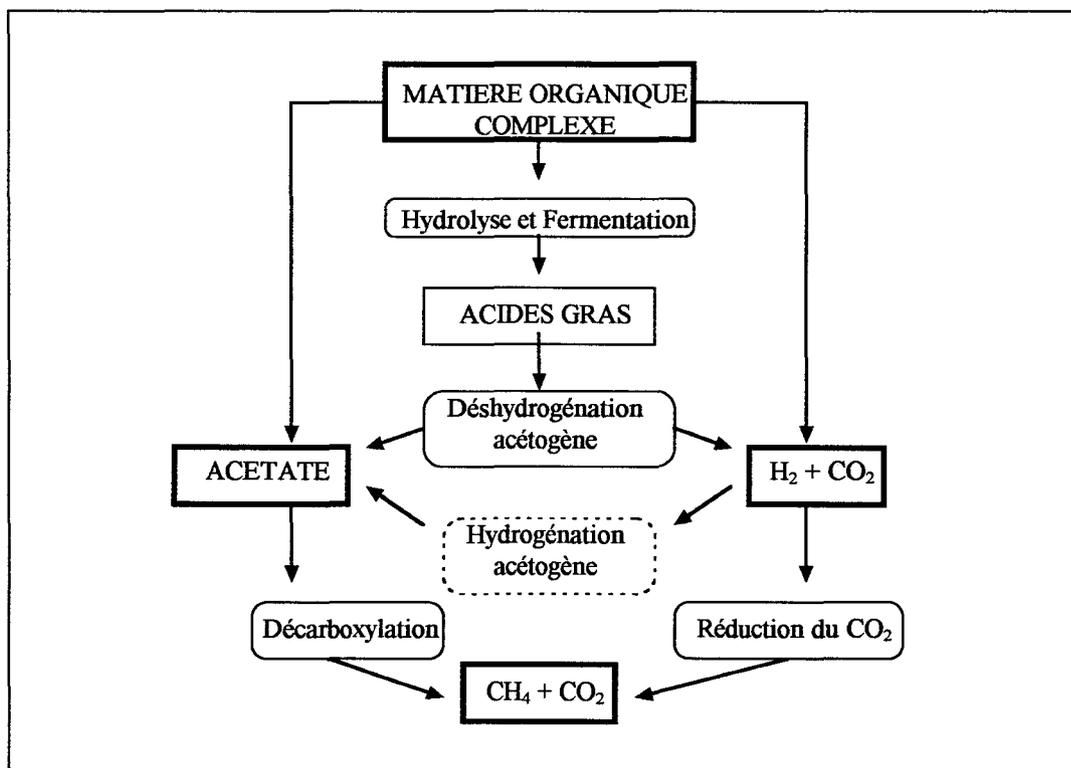
**Figure 7-** Traitement d'épuration en anaérobiose. Vue du méthaniseur.



**Figure 9-** Traitement d'épuration en aérobiose. Vue des bassins d'aération à boues activées.

Trois étapes caractérisent ce processus (**figure 8**):

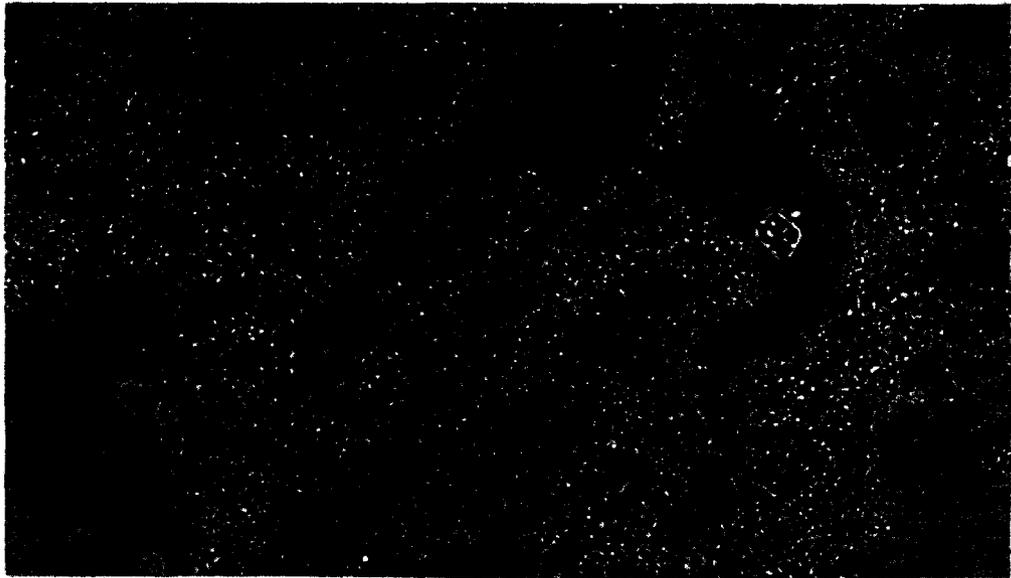
- ✓ L'hydrolyse et la solubilisation de la matière organique brute.
- ✓ L'acétogénèse : fermentation en acides gras, production d'acétate, d'hydrogène et de gaz carbonique.
- ✓ La méthanogénèse : production de méthane par décarboxylation de l'acétate ou réduction du  $\text{CO}_2$ .



**Figure 8-** Etapes de la dégradation de la matière organique par voie anaérobie (Edeline, 1993).

Le **traitement aérobie** consiste en un réacteur à boues activées (**figure 9, p13**). La flore épuratrice est en suspension dans un liquide de couleur marron à grise, aéré par des turbines.

Les boues épuratrices se présentent sous forme d'amas (**figure 10**) formés de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires, métazoaires), de débris minéraux, de végétaux, et d'animaux divers (Thomazeau, 1983 ; Védry, 1987). Cet ensemble forme un écosystème où bactéries et champignons consomment la « pollution » avant d'être consommés eux-mêmes par les protozoaires et métazoaires (Henze *et al.*, 1995).

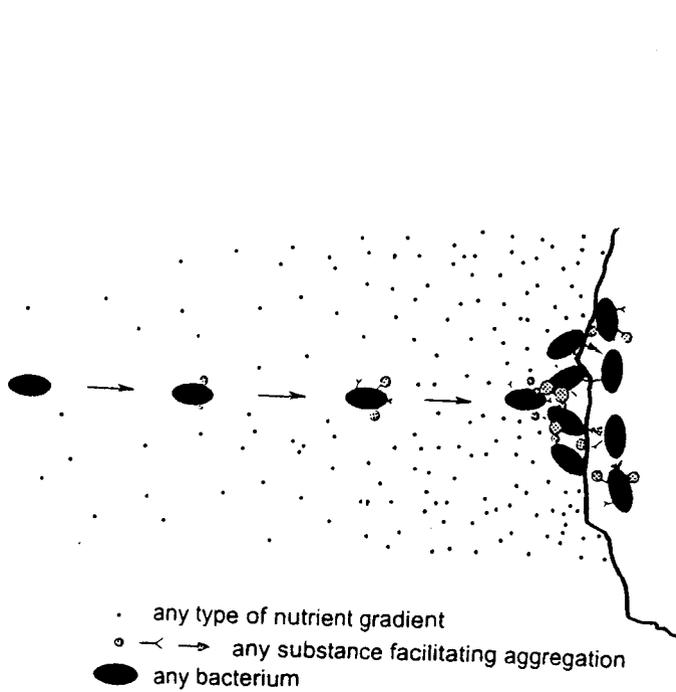


**Figure 10-** Boues activées observées par microscopie optique (agrandissement : 400x).

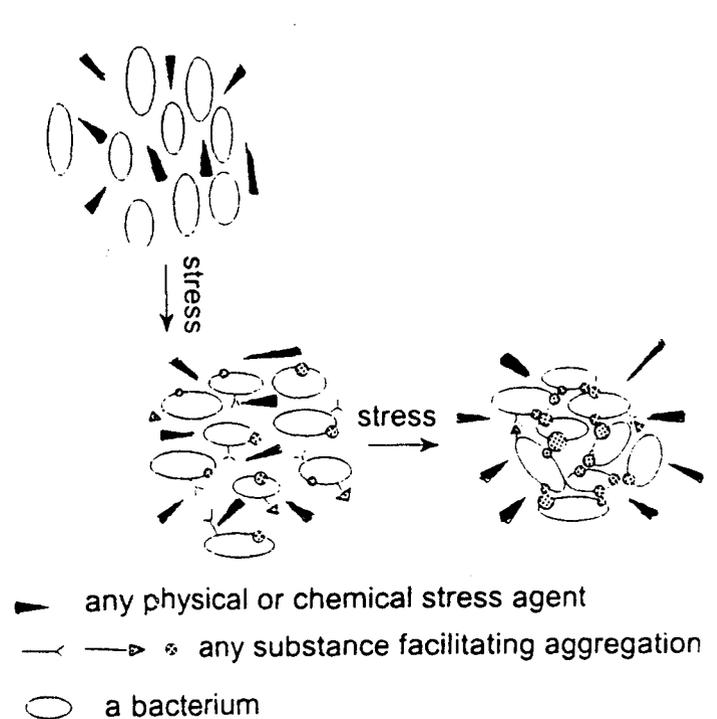
Les flocons ou agrégats de boues activées, ou floccs, sont plus couramment appelés **biofloccs**. Plusieurs modèles structuraux ont été proposés pour les décrire. Ils sont toujours formés d'une partie minérale précurseur de la mise en place de la partie organique :

- ✓ Une organisation en agrégats des bactéries favorisée par des facteurs environnementaux (Bossier et Verstraete, 1996). Ces auteurs citent, par exemple, la présence de particules organiques colloïdales qui s'adsorbent aux bactéries. Ces substances peuvent être dégradées par des enzymes extracellulaires. Les bactéries établissent alors un gradient de concentration de métabolites induisant la multiplication des cellules et favorisant ainsi leur agglomération (**figure 11**).

Une carence nutritive ou un stress pourraient également induire une agrégation bactérienne suite à une augmentation de leur hydrophobicité de surface ou par production d'éléments de surface favorisant ainsi leur floculation (**figure 12**).

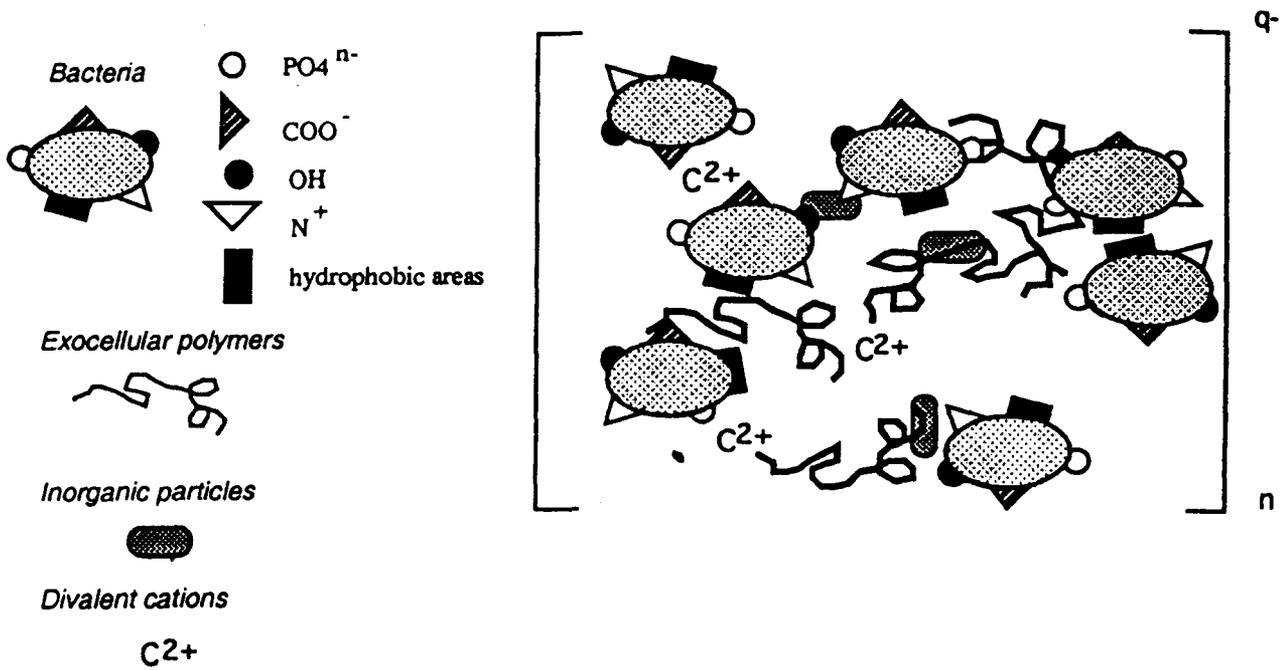


**Figure 11-** Représentation schématique de l'agglomération à la surface du floc enclenchée par un gradient de substrats (Bossier et Verstraete, 1996).

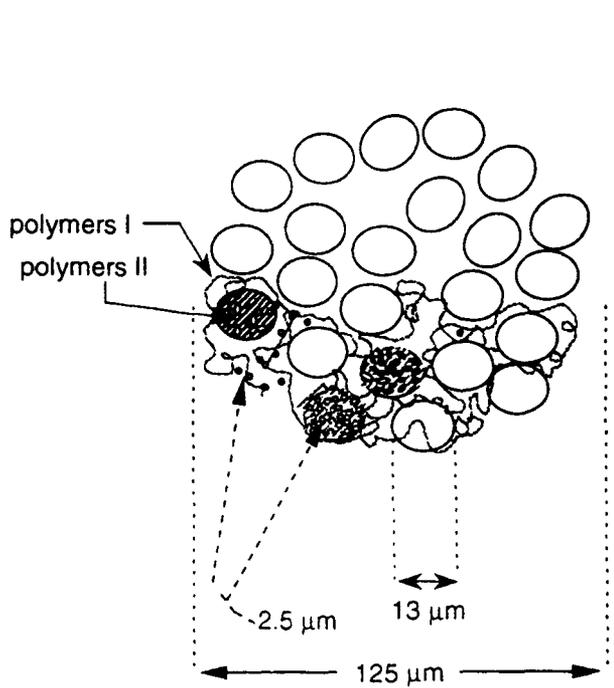


**Figure 12-** Représentation schématique d'un stress physique ou chimique développant une agrégation cellulaire (Bossier et Verstraete, 1996).

- ✓ Une organisation générée par des échanges d'interactions physico-chimiques (**figure 13**) entre les micro-organismes (principalement bactériens) et des particules inorganiques en présence d'ions polyvalents et de substances excrétées, des polymères exocellulaires (Eriksson *et al.*, 1992 ; Urbain *et al.*, 1993 ; Higgins et Novak, 1997). Ce principe repose sur les échanges de charges à la surface des cellules bactériennes (Jorand *et al.*, 1994, 1998 ; Hermasson *et al.*, 1982 ; Zita et Hermasson, 1997a).
- ✓ Une organisation complexe à 3 niveaux (**figure 14**). Une particule primaire correspondant à une cellule bactérienne s'agglomère avec d'autres pour former des particules secondaires, d'un diamètre moyen de 13  $\mu\text{m}$ . Ces dernières se regroupent ensuite en micro-colonies de 125  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ce phénomène est favorisé par la présence de polymères exocellulaires et d'ions polyvalents (Jorand *et al.*, 1995). Cette architecture (**figure 15**) crée une surface de contact démesurée par rapport au volume occupé, et favorise la clarification de l'eau (Snidaro *et al.*, 1997).



**Figure 13-** Représentation schématique de la structure d'un biofloc. Echelle arbitraire (Urbain *et al.*, 1993).



**Figure 14-** Modèle schématique d'une organisation à 3 niveaux d'un biofloc (Jorand *et al.*, 1995).



**Figure 15-** Représentation de la surface externe d'un biofloc (Snidaro *et al.*, 1997).

### ● Les paramètres de mesure

La composition des eaux résiduaires et l'efficacité de leur épuration constituent les paramètres de gestion de ces sites.

Du point de vue de la réglementation, les paramètres utilisés (Thomas, 1995) sont les suivants :

✓ La Demande Chimique en Oxygène [D.C.O.] définie comme la quantité d'un composé chimique nécessaire pour oxyder, dans des conditions définies, les matières organiques contenues dans l'eau. Cette méthode normalisée (AFNOR, NF T 90-101) est couramment employée par les exploitants de station mais ne peut en aucun cas permettre une comparaison avec la biodégradation naturelle où interviennent des processus d'oxydations biologiques complexes.

✓ La Demande Biochimique en Oxygène [D.B.O.] définie comme la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes pour décomposer dans des conditions d'incubation données et en un temps déterminé, les matières organiques qu'ils sont capables de métaboliser. Les méthodes normalisées imposent une incubation de cinq jours à 20°C, et à l'obscurité, définissant ainsi la D.B.O.<sub>5</sub> (AFNOR, NF T 90-103).

Par son principe et son mode opératoire, la D.B.O.<sub>5</sub> n'est pas une valeur absolue car le temps d'incubation peut être trop long, la composition de la microflore initiale est difficilement contrôlable, sa reproductibilité est mauvaise, et les conditions expérimentales sont éloignées des phénomènes naturels (Thomas, 1995).

✓ Le Carbone Organique Total [C.O.T.] est défini par la mesure du CO<sub>2</sub> produit après oxydation de la matière organique suite à une combustion à haute température, ou à une photo-oxydation consécutive à une exposition aux radiations ultraviolettes.

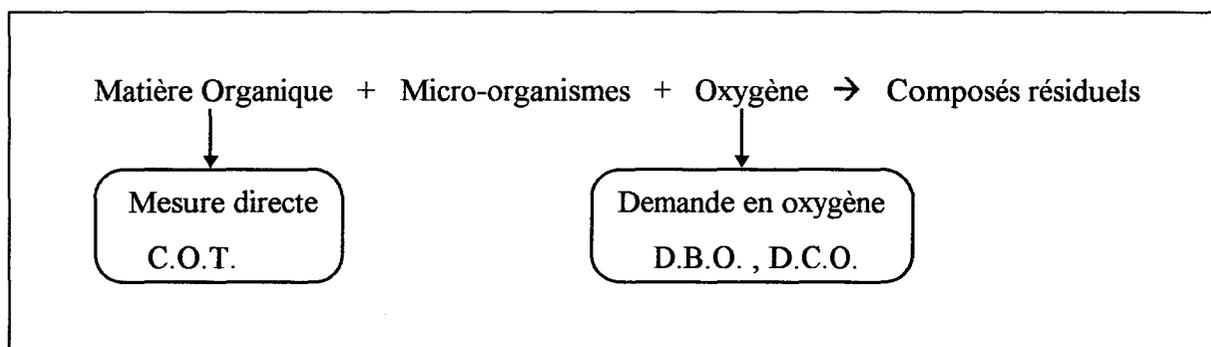
Le carbone minéral doit être éliminé avant la mesure car tous les atomes de carbone sont oxydés. Cette mesure normalisée (AFNOR, NF EN 1484) est la plus significative pour estimer la charge organique carbonée polluante.

Pour la pollution particulaire, les principaux paramètres utilisés sont :

✓ Les matières en suspension [M.E.S.] qui sont estimées par la mesure du poids sec de l'échantillon et comprennent les matières minérales et organiques.

- ✓ Les matières volatiles en suspension [M.V.S.] qui sont définies par la différence entre les poids des matières sèches en suspension avant et après calcination.

Il est à noter que toutes ces mesures ne reflètent ni le comportement des micro-organismes, ni la composition de la matière organique résiduelle des effluents des stations d'épuration (figure 16).



**Figure 16** - Méthodes de mesure de la pollution organique globale (Thomas, 1995).

Toutefois, l'activité propre de la biomasse des réacteurs aérobies peut être estimée par le dosage de l'ATP (Weddle et Jenkins, 1971) ou des activités déshydrogénasiques (Strotmann *et al.*, 1995 ; Griebe *et al.*, 1997). Une autre approche consiste à mesurer les activités respiratoires comme la consommation en oxygène (Marsilli-libelli et Vaggi, 1997) ou encore l'utilisation de l'azote ammoniacal ou des nitrates (Jorgensen *et al.*, 1992 ; Kristensen et Jorgensen, 1992).

Ces analyses permettent de corréler un état physiologique des boues activées avec la charge organique à épurer (Barbusinski et Miksch, 1997). Etant astreignantes pour les exploitants de station d'épuration, elles ne sont guère utilisées qu'en recherche appliquée (Nybroe, 1995 ; Ohron et Cokgör, 1997 ; Ubisi *et al.*, 1997).

## CHAPITRE 2 - COMPOSITION ET PROPRIETES

### CHIMIQUES DES EFFLUENTS PAPETIERS

Suite aux différents traitements physiques et chimiques utilisés pour la production de pâte, et son blanchiment, l'eau s'enrichit de substances, dissoutes et colloïdales, issues du bois. Ces deux étapes sont les principales sources de la pollution organique des effluents papetiers (Virkola et Honkanen, 1985).

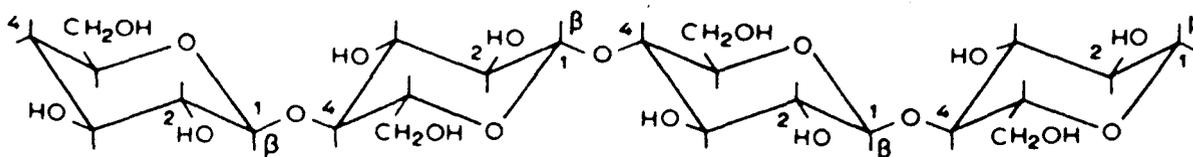
#### 2.1- Composition chimique originelle de la matière organique du bois

La composition chimique du bois est complexe, la plus grande partie des substances qui le composent étant constituée par de hauts polymères (Valette et de Choudens, 1987).

Quatre grandes familles de composés chimiques sont identifiables dans les eaux de pâte à bois (Sitholé, 1988 ; Suntio *et al.*, 1988 ; Mac Kague *et al.*, 1989 ; Thornton, 1993). Il s'agit des polysaccharides, des lipides, des protéines, et des lignines avec leurs composés apparentés. L'identification des constituants de chacune de ces familles est délicate.

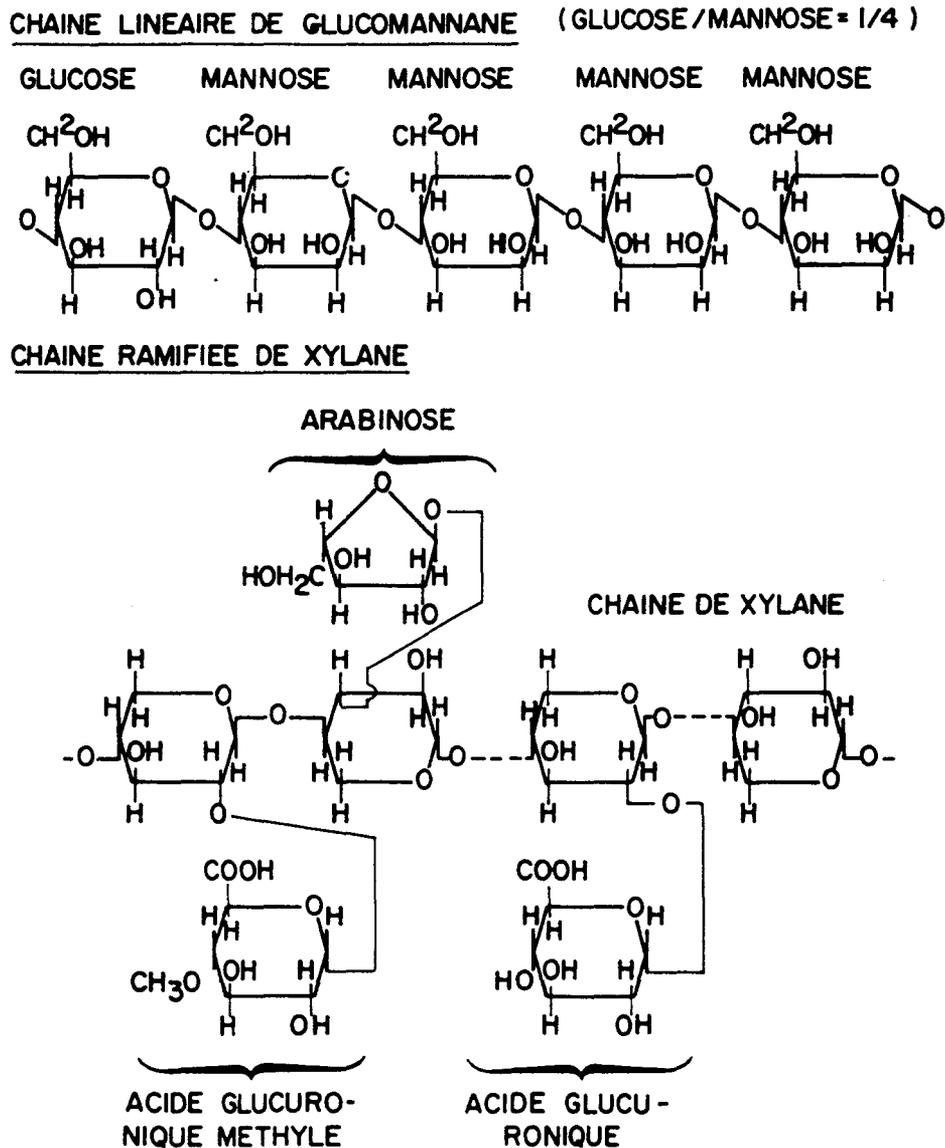
- Les **polysaccharides**, chaînes d'hydrates de carbone représentant 60 à 80 % du bois, sont représentés par la cellulose et les hémicelluloses.

La cellulose est une chaîne de motifs anhydroglucosés (**figure 17**) pratiquement insoluble dans l'eau, les solutions alcalines diluées et les solutions acides.



**Figure 17-** Chaîne de cellulose formée par la répétition régulière de motifs glcβ1-4glc (cellobiose).

Il existe une grande variété d'hémicelluloses dont les chaînes linéaires ou ramifiées (**figures 18 et 19**) sont constituées de pentoses dans les bois feuillus (**figure 20**), ou d'hexoses pour les bois résineux (**figure 21**). Les hémicelluloses sont caractérisées par leur solubilité en milieu alcalin dilué.



**Figure 18-** Exemples de chaînes linéaires et ramifiées d'hémicelluloses.

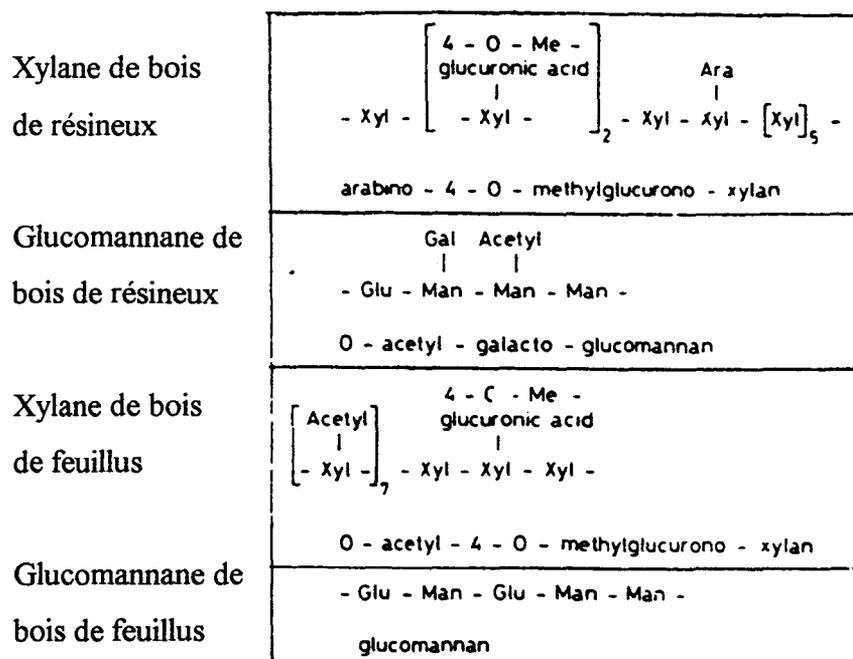


Figure 19- Exemples de formules structurales d'une partie d'une chaîne d'hémicelluloses de feuillus et de résineux (Jansson et Back, 1975).

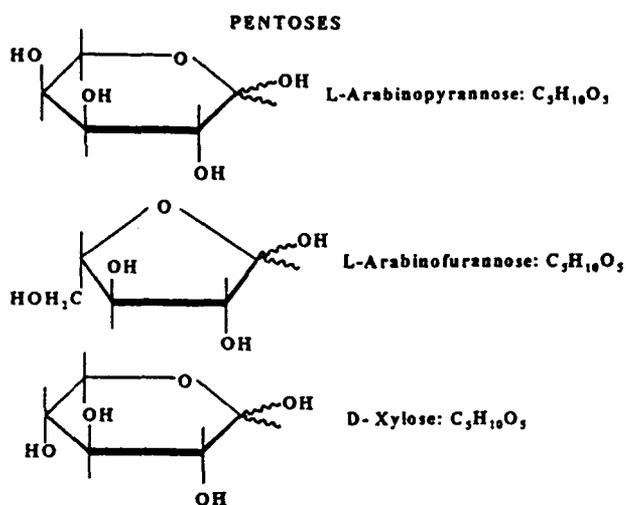


Figure 20- Représentation schématique de monosaccharides à cinq carbones (pentoses) des hémicelluloses du bois.

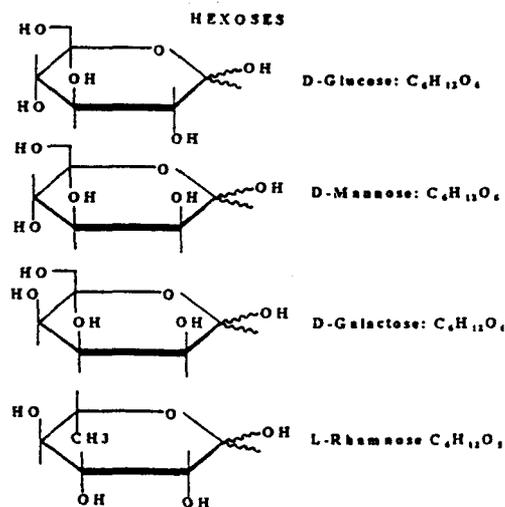


Figure 21- Représentation schématique de monosaccharides à six carbones (hexoses) des hémicelluloses du bois.

Des dérivés de cellulose (Jackson et Line, 1997a) et de sucres simples (Jansson et Back, 1975) sont détectés dans les eaux de pâtes thermomécaniques. Les techniques d'extraction retenues par Sjöström (1990) permettent de récupérer sélectivement les glucides neutres et chargés en vue de leur identification.

- Les extractions **lipophiles** permettent de récupérer des triglycérides et des acides gras d'esters de stéryl (Sjöström, 1990). Des composés appartenant à la famille des terpènes, des stéroïdes et des acides résiniques ont été également mis en évidence dans les eaux de pâtes thermomécaniques (Richardson et Bloom, 1982; Ekman et Holmbom, 1989a; Koistinen *et al.*, 1998).

- La présence de **protéines** est détectée mais leur nature n'est jamais précisée (Sjöström, 1990). Il s'agit de protéines issues des parois cellulaires des fibres (Northcote, 1972).

- La **lignine** et les **composés apparentés** (lignanes, tanins,...), molécules solubles en milieu alcalin et dans certains solvants organiques, sont présents dans les effluents de pâtes thermomécaniques (Pranovich *et al.*, 1994; Schnell *et al.*, 1997).

Les lignines sont des polymères tridimensionnels d'alcools phénylpropanoïques (**figure 22**). Une oxydation enzymatique amorce la réaction de polymérisation pour la mise en place de liaisons carbone-carbone ou carbone-oxygène-carbone (**figure 23**). La coloration naturelle des pâtes à bois demeure un problème majeur (Dellus, 1995), et a pour origine ces lignines.

Il existe de nombreux protocoles d'extraction et d'analyse de ce polymère complexe (Dean, 1997). L'extraction par le bromure d'acétyle est la plus courante ainsi que les analyses par ultraviolet [UV], par infrarouge [IR], ou par résonance magnétique nucléaire [RMN] du <sup>13</sup>C. Des analyses par chromatographie en phase gazeuse sont envisageables (Ekman et Holmbom, 1989a), avec des prétraitements spécifiques comme la thioacidolyse (Jacquet *et al.*, 1997), mais ces techniques ne sont applicables que sur des échantillons bruts de bois. La composition des eaux usées est trop hétérogène pour être analysée par ces techniques.

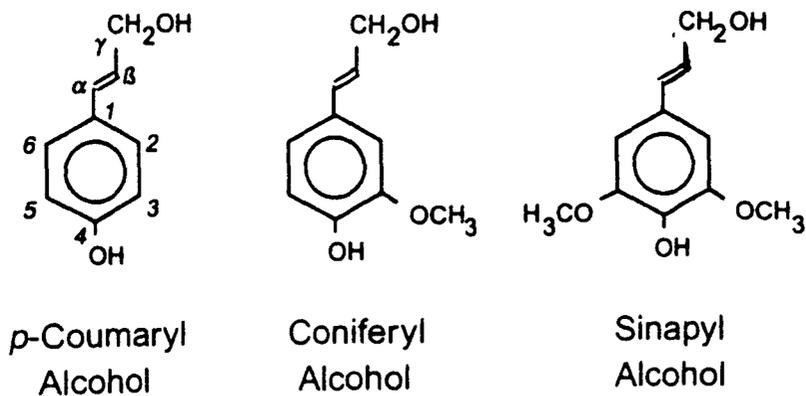


Figure 22- Structure des principaux résidus unitaires des lignines (Dean, 1997).

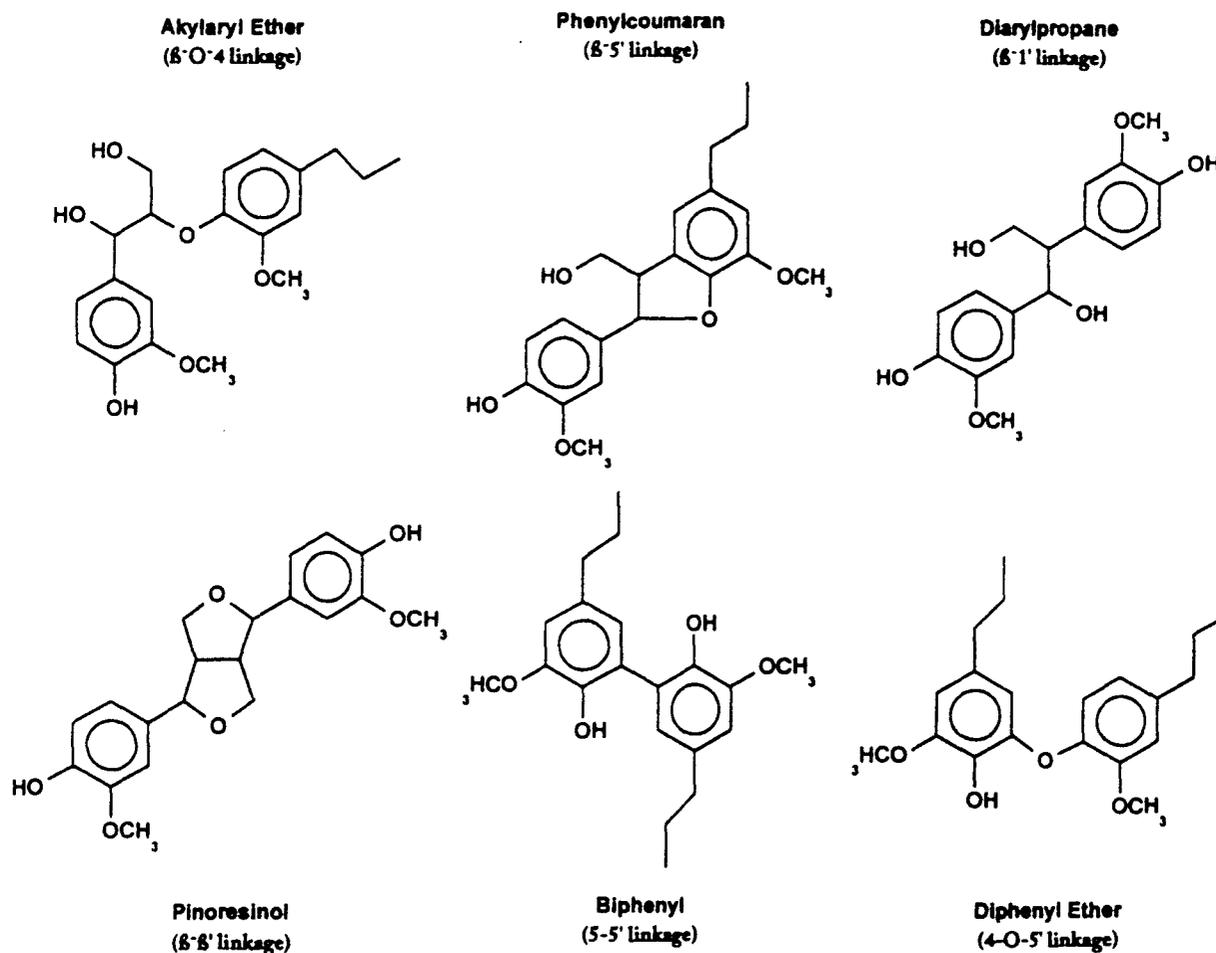
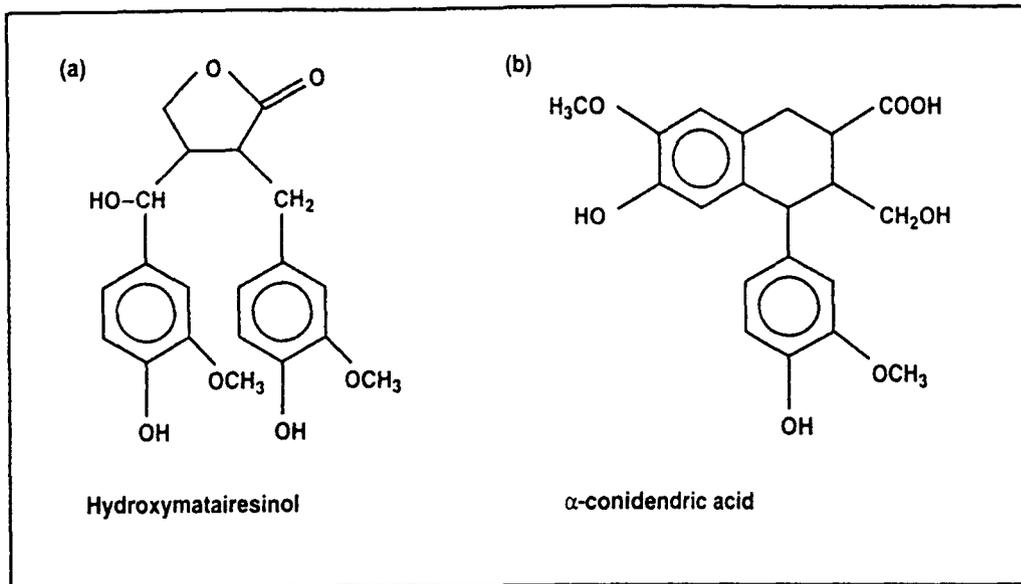


Figure 23- Exemples des principales liaisons de covalence rencontrées dans la structure des lignines (Dean, 1997).

Composés apparentés, les lignanes sont caractérisés par deux noyaux phénylpropane liés par leur carbone  $\beta$ . L'hydroxymatairesinol et l'acide  $\alpha$ -conidendric (figure 24) sont les lignanes les plus abondants dans le bois et les effluents papetiers (Jorgensen *et al.*, 1995).



**Figure 24-** Structure des lignanes les plus abondants dans le bois et les effluents papetiers (Jorgensen *et al.*, 1995).

Les tanins sont extraits par des solvants organiques et ne sont présents qu'en très faible quantité dans le bois, surtout les bois blancs. Il s'agit de glucosides, association de glucose et d'acide gallique, solubles dans l'eau et l'alcool. Leur présence est nuisible lors du blanchiment des pâtes (Tavernier, 1988).

L'étape de blanchiment modifie cette composition chimique des effluents (Thornton *et al.*, 1991). Si la fraction lipidique (acides gras libres et estérifiés) n'est pas altérée en présence de peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin, les acides résiniques, les lignanes, voire les tanins sont largement oxydés et dégradés (Ekman et Holmbom, 1989b). La majorité des polysaccharides dissous dans les eaux de pâtes thermomécaniques sont endommagés lors du blanchiment par le peroxyde d'hydrogène ; Thornton *et al.* (1994) ont mis en évidence des réactions de déacétylation des résidus O-acétylgalactoglucomananes présents dans les hémicelluloses. Les polysaccharides ainsi transformés peuvent représenter des inconvénients lors de la mise en feuille car à l'état dissous, ils interfèrent avec les composants de la feuille de base (Tavernier, 1988).

D'autre part, les acides organiques conséquents représentent une charge de pollution importante et très variable selon les conditions de blanchiment. Leur nature est peu explicitée.

## 2.2- Toxicité des effluents papetiers

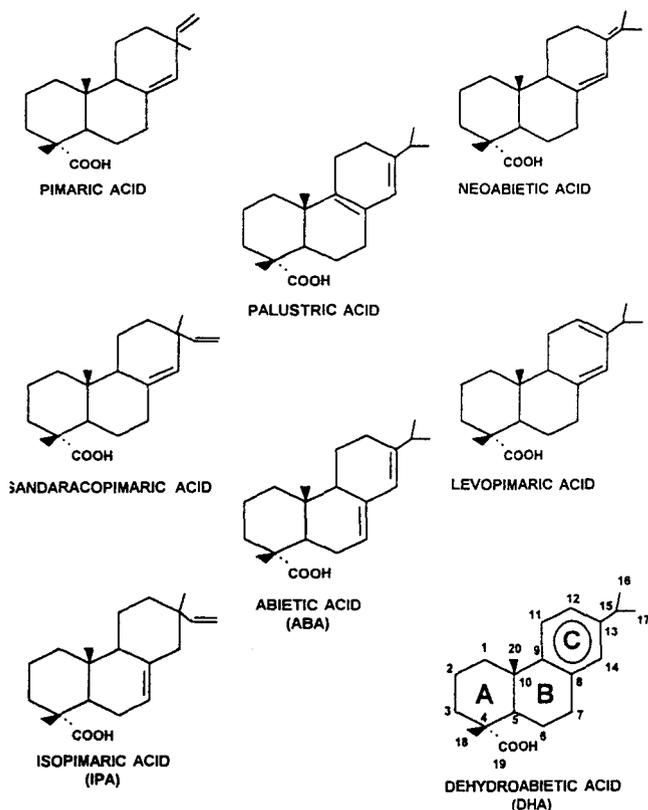
La toxicité d'une eau peut être estimée par des indicateurs biologiques, parmi lesquels les bactéries, les algues, et les poissons sont les plus fréquemment retenus. La toxicité est alors exprimée par la quantité de substances nécessaires pour diminuer de 50% : une activité enzymatique spécifique, un taux de croissance d'une bactérie donnée, une capacité de reproduction ou de survie d'une espèce animale ou végétale donnée...il existe autant d'unités de toxicité que de méthodologies.

Les eaux de pâtes thermomécaniques présentent effectivement une certaine toxicité (Bisailon *et al.*, 1991), dont l'origine est principalement attribuée aux acides résiniques (**figure 25**) et à la présence d'acides gras insaturés comme les acides oléique et linoléique (Leach et Thakore, 1976 ; Fein *et al.*, 1994).

Les acides résiniques sont présents dans les effluents primaires de pâtes thermomécaniques sous une forme colloïdale (Hoel et Aarsand, 1995). La toxicité de ces effluents a été appréhendée par la méthode Microtox (Microbics) par Roy-Arcand et Archibald (1996), Stephenson et Duff (1996), et Middaugh *et al.* (1997). L'unité de toxicité est, dans ce cas précis, exprimée par la concentration effective réduisant de moitié la luminescence de *Photobacterium phosphoreum* après un temps de contact de 15 minutes.

Une autre technique consiste à analyser les métabolites de poissons exposés aux effluents papetiers bruts (Johnsen *et al.*, 1995) ou après leur épuration biologique (Kovacs *et al.*, 1996). Ainsi, Martel *et al.* (1997a, b) ont isolé d'effluents des substances dérivées de terpènes et de stéroïdes induisant des activités oxygénasiques dans les tissus hépatiques chez la truite arc-en-ciel (Schlenk, 1996 ; Tyler *et al.*, 1998), ou des teneurs élevées en acides gras et en stéroïdes chez le merlan (Leppänen *et al.*, 1998).

Le suivi de la fréquence de reproduction et de la croissance de poissons est un outil fiable et très utilisé pour prévenir de la toxicité des effluents (Bailey et Young, 1997 ; Munkittrick *et al.*, 1997).



**Figure 25-** Structure des acides résiniques détectés dans les effluents papetiers (Liss *et al.*, 1997).

Enfin, une observation à grande échelle peut être effectuée. Sibley *et al.* (1998) ont estimé l'impact du rejet, d'un site papetier à procédé kraft, en décrivant la faune et la flore du site récepteur. Le relevé des espèces animales et végétales en amont et en aval de sites papetiers permet ainsi de révéler leur effet sur l'environnement. Les études de Saski *et al.* (1997) et Bard (1998) ont montré que les effluents non traités provoquaient une diminution dans la diversité et la structure des communautés animales et végétales des berges sur une distance de 25 km en aval des sites papetiers étudiés.

Le remplacement du procédé kraft par la production de pâtes thermomécaniques est encouragé par le fait que leurs effluents présentent une toxicité aiguë moins élevée (Johnston *et al.*, 1997 ; Welker et Schmitt, 1997 ; Karels *et al.*, 1998).

## CHAPITRE 3- LA MICROFLORE DES BOUES ACTIVEES

### ET ASPECTS ENVIRONNEMENTAUX

### DES EAUX EPUREES

Ce chapitre concerne l'identification des populations bactériennes présentes dans les boues activées, la flore microbienne épuratrice des effluents papetiers, ainsi que la nature de la charge organique résiduelle à l'issue du traitement biologique.

#### **3.1- Isolement et identification des populations bactériennes des boues activées.**

Les systèmes d'épuration à boues activées ont deux objectifs principaux : oxydation et floculation (Bitton, 1994).

- ✓ **Oxydation** de la matière organique soluble dans les bassins d'aération où elle est convertie en biomasse.
- ✓ **Floculation** qui assure la séparation de cette biomasse des effluents traités.

Les relations entre la diversité des populations et leur fonction au sein des boues activées sont encore peu comprises (Wagner *et al.*, 1993).

#### ● **Isolement**

Les premiers travaux d'investigation menés par Butterfield, en 1935, consistaient à cultiver les bactéries sur des milieux gélosés riches ou préparés à partir des effluents des bassins d'aération.

Le protocole préparatoire de l'échantillon est l'élément crucial pour conduire à bien ces études (Dias et Bhat, 1964).

Les techniques actuelles sont diverses : une simple homogénéisation avant dilution (Prakasam et Dondéro, 1967a,b), l'utilisation d'agents flocculants (Gayford et Richards, 1970), un traitement mécanique (Benedict et Carlson, 1971) en présence de billes de verre (Kavanaugh et Randall, 1994) ou la sonication (King et Forster, 1990). La sonication déstabilise la structure du biofloc pour mieux séparer les germes qui le composent, mais il n'est pas sans effet sur le profil des populations isolées (Morgan et Forster, 1992). Les cellules bactériennes situées à la périphérie du floc étant endommagées, cette technique favorise l'isolement des cellules présentes au centre du biofloc.

Comme le souligne Pipes (1966), la variété des milieux de culture utilisés lors des isolements induit de très grandes différences dans les populations bactériennes observées.

Kämpfer et Dott (1989) ont comparé différentes formules de milieux de culture gélosés et ont préconisé l'emploi d'un milieu non sélectif, adapté aux bactéries des milieux aquatiques mis au point par Reasoner et Geldreich (1985). C'est ainsi que Kämpfer *et al.* (1996) ont pu obtenir le plus grand nombre de bactéries cultivables par rapport à la population initiale de boues activées urbaines.

### ● Identification

L'analyse des populations microbiennes de ces écosystèmes présente un intérêt pour une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu lors de l'épuration (Peignen-Séraline et Manen, 1997).

Cet écosystème est complexe (Urbain *et al.*, 1997) ; plus de 300 espèces bactériennes peuvent être répertoriées dans une boue activée (Bitton, 1994).

La liste des principaux genres bactériens les plus souvent représentés dans les bioflocs comprend : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Zooglea*, et les bactéries filamenteuses *Microthrix* et *Sphaerotilus* (Pipes, 1966 ; Thomazeau, 1983 ; Bitton, 1994).

Les techniques moléculaires permettent une détection spécifique d'une bactérie dans son environnement. L'une d'entre elles repose sur la reconnaissance par une sonde monocaténaire oligonucléotidique d'une séquence spécifique de l'ARN ribosomal 16S ou 23S d'une bactérie (Sayler et Layton, 1990 ; Pickup, 1991).

Les sondes peuvent être marquées radioactivement (Giovanni *et al.*, 1988) ou par une molécule fluorescente (DeLong *et al.*, 1989). Amann *et al.* (1990) ont amélioré cette technologie pour permettre la détection de bactéries au sein de leur habitat naturel sans réaliser de cultures préalables (Amann *et al.*, 1995 ; 1997).

Cette technologie a été appliquée à des échantillons de boues activées de stations urbaines (Manz *et al.*, 1994 ; Kämpfer *et al.*, 1996 ; Snaidr *et al.*, 1997 ; Godon et Moletta, 1998). Les résultats de Snaidr *et al.* (1997) confirment l'unicité des profils de population de ces dernières en fonction du site épurateur.

Cette approche moléculaire supprime donc le problème de la sélectivité des milieux de culture et permet de mettre en évidence les populations bactériennes pouvant jouer un rôle important, direct ou indirect, dans le processus global d'épuration (Wagner *et al.*, 1994 ; Kämpfer *et al.*, 1996). De plus, l'application de ces sondes peut corriger certaines erreurs : c'est ainsi que *Zooglea ramigera* n'est plus reconnue comme la bactérie typique des boues activées responsable de la formation du biofloc (Rossello-Mora *et al.*, 1995).

### **3.2- La microflore épuratrice des eaux usées papetières**

Les études portent essentiellement sur des systèmes d'épuration par lagunage aéré d'effluents provenant de la production de pâte blanchie selon le procédé Kraft (Jansson, 1980 ; Bryant *et al.*, 1987, 1988 ; Lindström et Mohamed, 1988 ; Tomar et Allen, 1991 ; Liss et Allen, 1992). Les populations décrites correspondent au profil typique des stations d'épuration urbaines, avec une prédominance des bactéries hétérotrophes aérobies à Gram négatif. Pauli et Kaitala (1995) ont isolé plus précisément des *Acinetobacter* à partir de boues activées d'un site de production de pâte de bois traitée au sulfite.

Fulthorpe *et al.* (1993) présentent un profil détaillé de la population microbienne isolée d'un site d'épuration d'effluents kraft et de son milieu récepteur. La flore hétérotrophe dominante est composée de cellules pléomorphes méthylotrophes non identifiées, d'*Ancylobacter aquaticus*, de *Klebsiella* et de *Pseudomonas*. Ils ont révélé qu' *A. aquaticus*, un *Pseudomonas*, et des bactéries pléomorphes à pigment orange pouvaient utiliser plus spécifiquement des composés aliphatiques chlorés. Des dérivés aromatiques de la lignine sont métabolisés par un des *Pseudomonas* isolés.

Une autre approche consiste à isoler spécifiquement des souches pouvant utiliser des dérivés apparentés aux lignines comme unique source de carbone (**figures 22 et 24**).

Vicuna (1988) a pu sélectionner ainsi des souches bactériennes capables de les dégrader en aérobiose. Il s'agit de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* et *Streptomyces*.

La dégradation des acides résiniques, dérivés toxiques du bois, a également été étudiée (Liver et Hall, 1996). De nombreuses bactéries dégradant ces acides (**figure 25**), et plus particulièrement l'acide déhydroabiétique, sont citées dans la littérature. Il s'agit de *Flavobacterium resinoverum* (Biellman et Wennig, 1968 ; Cross et Myers, 1968), *Arthrobacter* sp. (Levinson *et al.*, 1968), *Alcaligenes* sp. et *Pseudomonas* sp. (Biellman *et al.*, 1973) et *Pseudomonas resinovorans* (Cross et Myers, 1968). Ces bactéries ne proviennent pas de sites d'épuration pourtant Hemingway et Greaves (1973) ont montré que les réacteurs à boues activées peuvent dégrader ces acides résiniques. Ils ont isolé des souches spécifiques mais soulignent que l'épuration est plus efficace par une communauté bactérienne qu'en présence de souches pures.

Kutney *et al.* (1981) et Bicho *et al.* (1994, 1995) ont également isolé des souches non identifiées capables de métaboliser l'acide déhydroabiétique et Zhang *et al.* (1997) ont utilisé par ailleurs ces isolats pour dégrader des effluents de pâtes chimiothermomécaniques. A partir d'un réacteur alimenté en effluents papetiers, Mohn (1995) a sélectionné deux bactéries : *Sphingomonas yanoikuyae* et *Zooglea ramigera* capables de dégrader l'acide déhydroabiétique. Une étude métabolique de ces souches, et d'un autre isolat de *Ralstonia* sp. a ensuite prouvé leur rôle dans des systèmes d'épuration (Mohn et Stewart, 1997).

Morgan et Wyndham (1996) ont également isolé *Comamonas* sp. et *Alcaligenes* sp. capables de dégrader les acides abiétique et déhydroabiétique, et Wilson *et al.* (1996), une souche de *Pseudomonas* sp. catabolisant l'acide isopimarique.

Le mécanisme de dégradation des acides résiniques par ces souches est encore peu connu et demande de plus amples prospections (Liss *et al.*, 1997).

Pour conclure, il faut préciser que la minéralisation sous conditions anaérobies de ces composés aromatiques, tels que les acides résiniques et les dérivés simples de la lignine, est faible ou inexistante (Sierra-Alvarez *et al.*, 1990).

### 3.3- Nature organique résiduelle des eaux papetières épurées

Après un traitement biologique adapté, les eaux de pâtes thermomécaniques, blanchies, voire les effluents issus du procédé kraft s'avèrent moins toxiques (Bisaillon *et al.*, 1991 ; Paice *et al.*, 1996 ; Middaugh *et al.*, 1997 ; Schnell *et al.*, 1997).

Les effluents épurés sont suffisamment dilués dans le milieu récepteur pour que le seuil de toxicité ne puisse être atteint (Richardson et Bloom, 1982).

Les eaux épurées de papeterie présentent une coloration marron et cet aspect visuel est un facteur très important vis à vis du public (House, 1996) pour qui coloration et toxicité sont couramment associées. L'origine de cette coloration est vraisemblablement due aux produits de dégradation de la lignine et de ses dérivés (Livernoche *et al.*, 1983 ; Perez *et al.*, 1997).

Cette matière organique présente après une épuration biologique est difficilement qualifiable. Doit-on la considérer comme :

- **non-biodégradable** : définition : qui ne peut pas être détruit par les bactéries ou d'autres agents biologiques.
- **bio-résistante** : définition : lat : *resistere*, se tenir ferme. Ne pas céder sous une action. Les activités biologiques n'ont aucun effet sur la matière organique.
- **bio-récalcitrante** : définition : lat : *recalcitrans*, rétif, rebelle. Ne peut être dégradée, utilisée par les voies métaboliques.

- **réfractaire** : définition : lat : *refractarius*, querelleur, de *refringere*, briser. Qui refuse de se soumettre, résiste, insensible à, qui résiste à certaines influences physiques, chimiques ou biologiques.

Il semble que ce dernier qualificatif soit le plus approprié (Namour et Müller, 1998).

La complexité structurale de cette matière organique exige probablement des conditions particulières pour permettre sa minéralisation complète (temps de séjour optimum dans les bassins d'aération, microflore épuratrice adaptée, exigences nutritionnelles respectées, apport en oxygène, stabilité du pH...).

D'autre part, les systèmes d'épuration biologique peuvent produire de nouvelles molécules à partir des composés de la pollution entrante.

Nous sommes en présence d'un rejet de station d'épuration biologique composé d'une matière organique réfractaire au système de traitement appliqué.

L'élimination de cette fraction réfractaire des eaux papetières est envisageable (Deschamps, 1985).

Les travaux de Bavendamm (1928) ont montré l'importance des champignons de la pourriture blanche du bois [white-rot fungi] et de nombreux auteurs ont cherché à exploiter les potentialités de ces champignons pour décolorer des eaux usées (Kirk et Farrell, 1987 ; Boyle *et al.*, 1992 ; Flouri *et al.*, 1996 ; Benito *et al.*, 1997 ; Knapp *et al.*, 1997 ; Young et Yu, 1997 ; Yateem *et al.*, 1998).

Le secteur papetier exploite cet outil biologique pour ramollir et décolorer les fibres de bois pour la fabrication de pâte (Kirk et Farrell, 1987). Deux espèces de champignons ont été spécifiquement retenues, il s'agit de *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor* (Paice *et al.*, 1989 ; Ho *et al.*, 1990 ; Reid *et al.*, 1990, 1994 ; Messner et Srebotnik, 1994 ; Call et Mücke, 1997 ; Moreira *et al.*, 1997). Les effluents papetiers peuvent également être

décolorés par ces micro-organismes (Joyce *et al.*, 1984 ; Kirk et Farrell, 1987 ; Raghukumar *et al.*, 1996 ; Call et Mücke, 1997). Les travaux de Livernoche *et al.* (1981, 1983) et de Perez *et al.* (1997) montrent les capacités de *Trametes versicolor* pour décolorer les effluents, bruts ou épurés, d'un site de production de pâte selon le procédé kraft. Malheureusement, il est difficile de prouver qu'il y a eu minéralisation.

# PARTIE 2

## ETUDE DE LA MICROFLORE DES BOUES ACTIVEES



## CHAPITRE 1 - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### **1.1- Echantillonnage et milieux de culture**

Cinq litres de boues activées sont prélevés en fin de ligne dans les deux bassins d'aération. Après leur transport au laboratoire, les boues activées sont utilisées de suite, ou deux heures après leur prélèvement.

La dispersion des bioflocs est assurée en agitant 30 mL d'échantillonnage des bassins d'aération pendant 5 min dans des tubes stériles en présence de billes de verre de diamètre compris entre 1,5 et 3 mm. 10 mL de cette suspension sont utilisés pour réaliser la première dilution.

Trois milieux de culture gélosés sont utilisés : R<sub>2</sub>A Agar (Difco) mis au point par Reasoner et Geldreich (1985) ; tryptic soy agar [TSA] (BioMérieux) et le milieu MGYE composé pour un litre de solution minérale : glucose, 1 g ; extrait de levure, 0,1 g ; agar, 15 g, pH 7,4. La composition de la solution minérale par litre d'eau distillée est la suivante : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,45 g; NH<sub>4</sub>Cl, 0,45 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,02 g; FeCl<sub>3</sub>, 0,005 g, et 1 mL d'une solution d'éléments traces contenant (mg.L<sup>-1</sup>) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 400; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 400; CoCl<sub>2</sub>, 50; NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 200; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 10; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 500.

A titre comparatif, et afin d'obtenir le plus grand nombre de bactéries cultivables, les influents des bassins d'aération ont été utilisés comme apport nutritif aux milieux de cultures.

Les effluents du site de production, ainsi que les eaux traitées en anaérobiose arrivent dans un collecteur central dans les bassins d'aération. Avant leur contact avec les boues activées, cinq litres d'effluents sont prélevés. Après filtration sur papier (MN600W, Macherey-Nagel), les eaux des bassins d'aération, gélosées (15 g.L<sup>-1</sup>) ou non, sont stérilisées par autoclavage (110°C, 30 min). Des influents des bassins d'aération gélosés ont également été stérilisés par exposition aux ultraviolets (15 min). Ce procédé de stérilisation limite les transformations chimiques de la matière organique.

Pour les isollements bactériens, les dilutions sériées  $10^{-4}$  à  $10^{-7}$  sont étalées sur milieu gélosé réparti en boîte de Pétri.

Les incubations ont lieu en aérobose à 30°C pendant 5 jours.

Les boîtes de Pétri retenues pour le comptage contiennent de 30 à 200 colonies.

## 1.2- Caractérisation des micro-organismes hétérotrophes cultivables

- Chaque colonie obtenue sur milieu gélosé est tout d'abord référencée par la coloration de Gram, la morphologie des cellules, et la production de cytochrome oxydase et de catalase mises en évidence selon les méthodologies couramment employées en microbiologie.
- A partir de cultures pures, la mobilité, l'exigence en oxygène et l'utilisation de l'acétate et du citrate comme unique source de carbone sont recherchées en utilisant un milieu de culture liquide contenant pour un litre de solution minérale : la source carbonée, 1 g ; de l'extrait de levure, 0,5 g (Biokar Diagnostics), et/ou des peptones, 0,5 g (Biokar Diagnostics) ; pH 7,4.
- Le besoin en vitamines est mis en évidence avec un milieu contenant 1 mL, par litre, d'une solution vitaminique composée, en mg.L<sup>-1</sup>, de : acide *p*-aminobenzoïque, 0,01; vitamine B<sub>12</sub>, 0,001, biotine, 0,01; Ca-panthoténate, 1; acide folique, 0,1; niacine, 1; pyridoxine-HCl, 0,5; riboflavine, 0,5; et thiamine, 1.
- Les activités amylolytiques, cellulolytiques et protéolytiques sont déterminées avec des milieux de culture contenant respectivement de l'amylose (10 g, amidon de pomme de terre, Serva) ; de la cellulose (5 g, CC31, Whatmann) ; ou de la gélatine (120 g, type A : peau de porc, Sigma) dans un litre de solution minérale complémentée en extrait de levure (0,5 g), pH 7,4.

### 1.3- Analyses complémentaires

Ces analyses concernent l'identification et les propriétés des populations dominantes des boues activées.

- L'analyse des acides aminés de la paroi a été réalisée selon les méthodes de Fiedler *et al.* (1973) et de Staneck et Roberts (1974). Les hydrolysats de la paroi cellulaire sont séparés par chromatographie en couche mince sur feuille de cellulose (TLC, aluminium sheets cellulose, Merck). Le solvant de migration est composé de : méthanol, 80 ; eau distillée, 26 ; HCl 6N, 4 ; pyridine, 10 ; v/v. La révélation des chromatogrammes est assurée par vaporisation de ninhydrine (0,2% dans l'acétone) et séchage à l'étuve (100°C, 3 min).

- La teneur en G+C de l'ADN est estimée par la méthode de dénaturation thermique ( $T_m$ ) dans une solution standard de citrate (Marmur et Doty, 1962). L'ADN est extrait et purifié selon la procédure de Marmur (1961).

- Identification par hybridation de sondes oligonucléotidiques.

Les bactéries immobilisées sur lames de verre sont traitées selon les protocoles décrits par Kämpfer *et al.* (1996) et Snaidr *et al.* (1997). Les sondes oligonucléotidiques choisies ciblent des séquences d'ARN ribosomal spécifique aux genres recherchés et sont décrites dans le **tableau 2**. Toutes les sondes ont été synthétisées et marquées par la fluorescéine-5-isothiocyanate (longueur d'onde d'excitation : 490 nm ; longueur d'onde d'émission : 520 nm) par Eurogentec (Belgique).

Les cellules bactériennes sont hybridées pendant une heure et demie à 46°C, sauf pour la sonde MIC847 (61°C). Les lames sont ensuite lavées par une solution tampon contenant du Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) ; du sodium dodécyl sulfate à 0,01% (p/v) et du NaCl 40 mM, à 48°C pendant 20 min. Les résultats d'hybridation sont observés avec un microscope à épifluorescence (Optiphot-2, Nikon). La sonde EUB338 est un témoin positif qui permet d'analyser l'efficacité du protocole d'hybridation. Deux souches référencées *Arthrobacter globiformis* ATCC8010 (American Type Culture Collection) et *Arthrobacter* sp. DSM20389 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) et deux souches du laboratoire *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* ont été utilisées pour les différents essais.

**Tableau 2-** Les sondes nucléiques : séquences, site d'appariement, spécificités et références bibliographiques

Sondes	Séquence (5'→3') de la sonde	Site de reconnaissance (localisation)	Spécificité	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-355)	Toutes les bactéries	Stahl <i>et al.</i> (1989)
GPHGC	TATAGTTACCACCGCCGT	23S (1901-1918)	Gram-positif à teneur élevée en G+C	Roller <i>et al.</i> (1994)
MIC841	GCGCGGAAAACGTGGAAT	16S (841-856)	<i>Micrococcus/Arthrobacter</i>	Kollöfel <i>et al.</i> (1997)
MIB1473	CTAATTACCGATCCC	16S (1473-1487)	<i>Microbacterium/Aureobacterium</i>	Kollöfel <i>et al.</i> (1997)

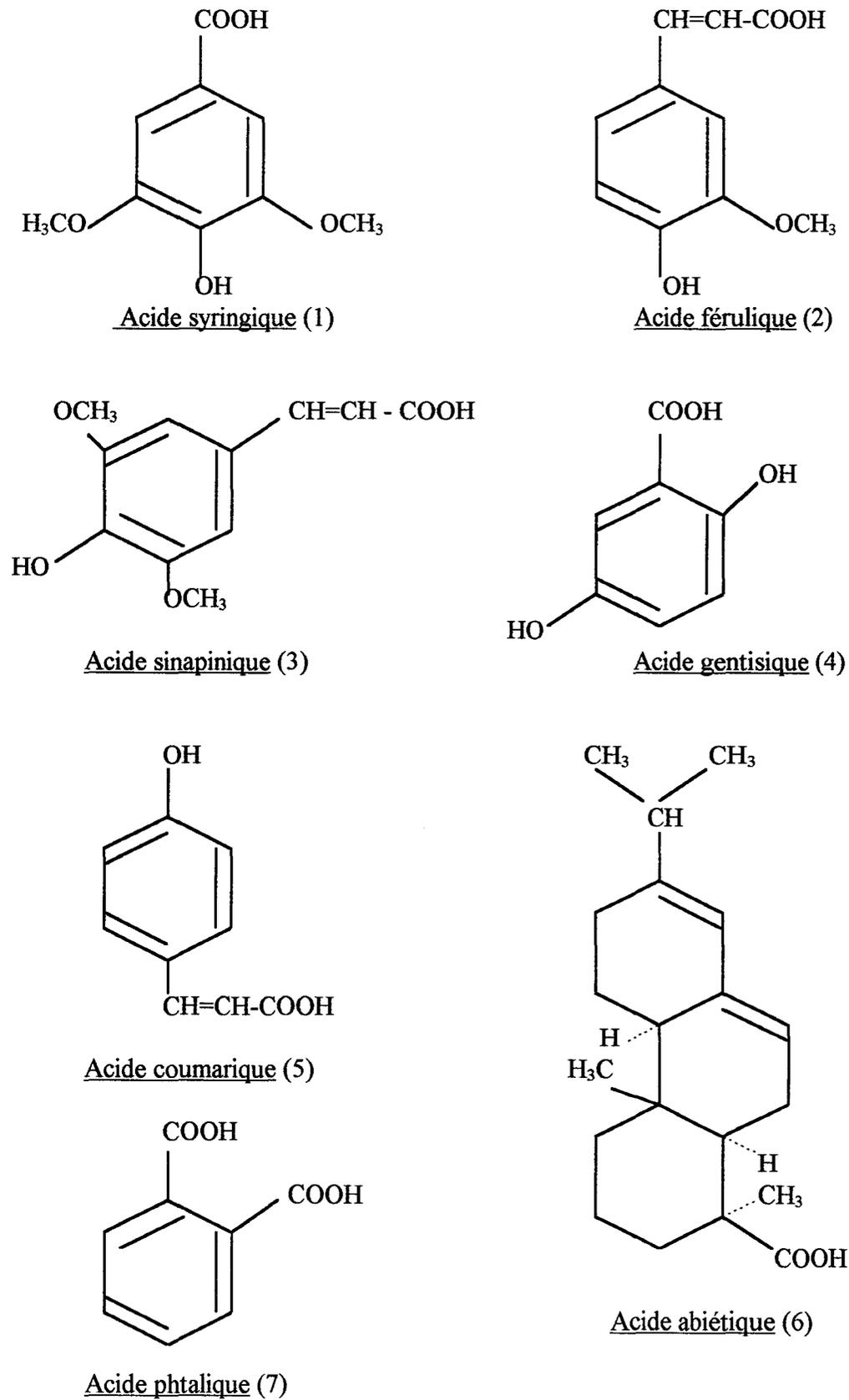
● Le calcul du temps de génération des bactéries est obtenu à partir des mesures d'absorbance réalisées à 600 nm (Uvikon 940, Kontron) sur des cultures en milieu liquide, incubées à 30°C avec agitation (100 tours.min<sup>-1</sup>). Le milieu contient (i) le mélange minéral avec 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose ou acétate et 10 µg.L<sup>-1</sup> de biotine ; ou (ii) le milieu minéral avec 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose et 10 g.L<sup>-1</sup> de tryptone (Biokar Diagnostics).

● L'utilisation de composés aromatiques dérivés de la lignine comme unique source de carbone a été estimée en suivant les protocoles définis par Bicho *et al.* (1995), Hernandez-perez *et al.* (1997) et Zhang *et al.* (1997).

Les composés testés sont : l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (Aldrich), l'acide abiétique, l'acide m-coumarique, l'acide syringique, l'acide férulique et l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (Sigma) (**figure 26**).

Des cultures liquides contenant le mélange minéral avec ces sources de carbone à différentes concentrations (de 100 à 1 000 mg.L<sup>-1</sup>), et l'extrait de levure (50 mg.L<sup>-1</sup>) sont incubées à 30°C en agitation va-et-vient (100 coups.min<sup>-1</sup>).

Pour chaque acide aromatique, une série de 7 milieux de culture liquides successifs (référéncés CO à C7) a été utilisée avec une diminution progressive de la concentration en glucose compensée par une augmentation de la teneur en acide aromatique (**tableau 3**).



**Figure 26-** Structure des composés aromatiques utilisés comme unique source de carbone.

Chaque milieu est inoculé par une aliquote de la culture précédente. Les temps d'incubation sont de plus en plus importants en fonction de la concentration en acides aromatiques.

La prolifération bactérienne est estimée par la mesure d'absorbance à 600 nm. Elle est comparée aux cultures réalisées dans les mêmes conditions avec le glucose (0,5 g.L<sup>-1</sup>) comme unique source de carbone.

**Tableau 3-** Culture des bactéries en présence de dérivés simples de la lignine.

Références des conditions de culture	Concentration en acides aromatiques (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentration en glucose (mg.L <sup>-1</sup> )	Durée de l'incubation (heures)
C0	0	500	24
C1	50	250	48
C2	50	100	72
C3	100	100	96
C4	250	100	96
C5	250	0	144
C6	500	0	168
C7	1000	0	168

- L'hydrophobicité de surface des cellules est évaluée en utilisant plusieurs approches préconisées par Dillon *et al.* (1986).

Les bactéries sont récupérées par centrifugation (4000 g) après culture à 30°C pendant 24 heures dans un milieu composé du mélange minéral avec du glucose, 0,5 g.L<sup>-1</sup> ; de l'extrait de levure, 50 mg.L<sup>-1</sup> ; pH 7,4.

Deux méthodologies ont été appliquées. La précipitation sélective par des sels suivant la technique de Lindahl *et al.* (1981) et la chromatographie d'interactions hydrophobes selon les protocoles de Zita et Hermasson (1997b) et d'Olofsson *et al.* (1998).

La première repose sur une précipitation sélective des cellules, par le sulfate d'ammonium, en fonction des charges disponibles sur leur surface. Les résultats sont exprimés par la concentration la plus faible nécessaire pour obtenir le précipité.

La seconde consiste à évaluer la proportion de cellules bactériennes retenues par un gel hydrophobe (Phényl sepharose CL4B, Pharmacia). L'indice d'hydrophobicité [ $I_h$ ] est exprimé ici par le pourcentage de rétention des cellules après passage sur le gel, à partir des mesures d'absorbance à 600 nm des éluats. Les résultats sont exploités selon les critères établis par Mozes et Rouxhet (1987) (**tableau 4**).

**Tableau 4-** Echelle d'interprétation de l'indice d'hydrophobicité, exprimé en pourcentage, selon Mozes et Rouxhet (1987).

Echelle des valeurs	Interprétation
$I_h > 80\%$	Surface très hydrophobe
$30\% < I_h < 80\%$	Surface hydrophobe
$15\% < I_h < 30\%$	Surface modérément hydrophobe
$I_h < 15\%$	Surface hydrophile

## CHAPITRE 2 - RESULTATS

### 2.1- Isolement et caractérisation de la microflore hétérotrophe

L'isolement de la population bactérienne cultivable des boues activées a été entrepris par la recherche de milieux de culture favorisant le développement du plus grand nombre de colonies. Un milieu riche (TSA), un milieu minéral minimum (MGYE) et un milieu adapté aux bactéries de l'eau ont ainsi été utilisés.

Le plus grand nombre de colonies est obtenu sur milieu gélosé R<sub>2</sub>A (**tableau 5**).

Les résultats insatisfaisants obtenus sur le milieu riche (TSA) sont probablement dus à une inhibition liée à la concentration élevée en peptone (20 g.L<sup>-1</sup>).

Des milieux de composition identiques mais préparés à partir des eaux des bassins d'aération puis stérilisés par autoclavage ou par irradiation aux ultraviolets n'ont pas abouti à des résultats plus intéressants. De ce fait, toutes les cultures ont ensuite été réalisées sur milieu R<sub>2</sub>A.

**Tableau 5-** Comparaison du nombre d'unités formant des colonies en fonction du milieu de culture à partir d'un même échantillon de boues activées après 5 jours d'incubation.

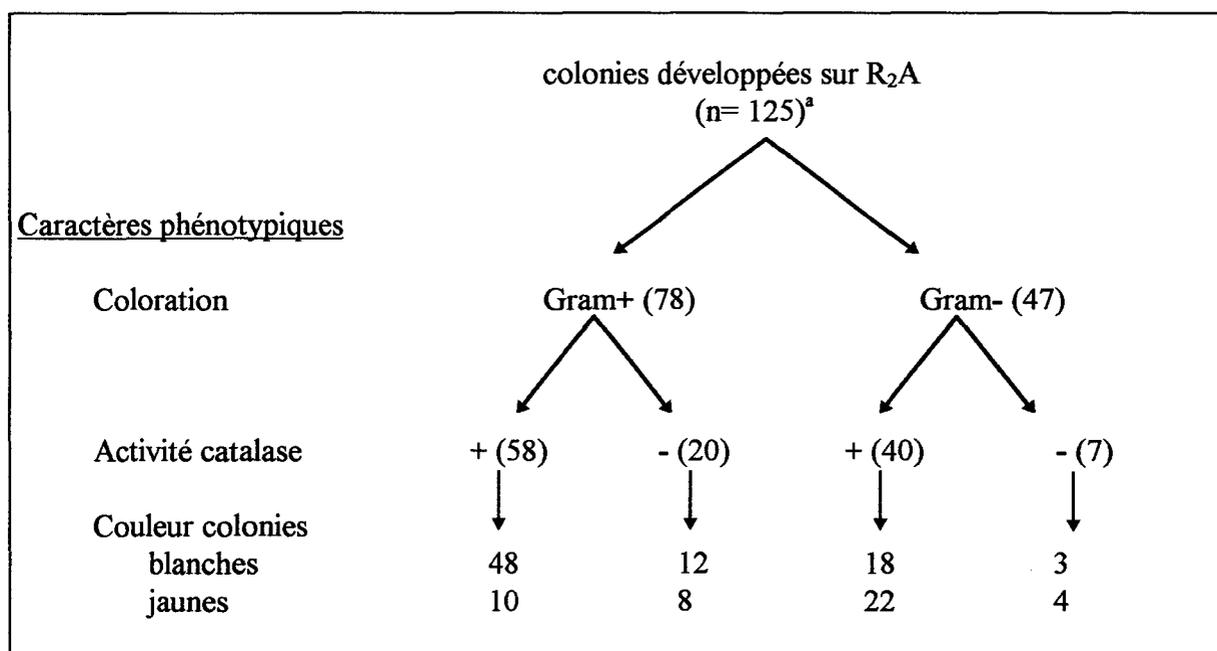
<i>Références du milieu de culture<sup>a</sup></i>	<i>MGYE</i>	<i>TSA</i>	<i>R<sub>2</sub>A</i>
Nombre d'unités formant colonies par ml de boues activées initiales	8,4.10 <sup>6</sup>	50,5.10 <sup>6</sup>	488.10 <sup>6</sup>

Note : (a) composition détaillée des milieux de culture Partie 2- Chapitre 1- § 1.1-

L'analyse bactérienne des boues activées a été réalisée à partir des prélèvements effectués en février 1996.

150 colonies sont prélevées à partir des étalements obtenus séparément pour un même facteur de dilution des aliquotes des deux bassins d'aération. Les isolats sont maintenus sur le milieu R<sub>2</sub>A. Les tests microbiologiques habituels (**figure 27**) ont révélé la dominance de bactéries à Gram positif dans les deux bassins d'aération (62,4% de la population totale).

- 61,5% de la population à Gram positif, soit 38,4% de la population totale, montre des caractères identiques. Les cellules sont petites et de formes irrégulières, présentent une activité catalase positive et cytochrome oxydase négative. Les colonies ont un diamètre compris entre 0,5 et 1 mm. Elles ne sont pas pigmentées, et sont à contour régulier. Plusieurs colonies de ce groupe sont choisies aléatoirement (référencées isolat A<sub>1, 2, 3</sub>) et maintenues sur milieu gélosé (R<sub>2</sub>A) ou en culture liquide (MGYE), pour effectuer les analyses complémentaires.



**Note :** (a) des 150 colonies, toutes n'ont pas proliféré lors des repiquages successifs.

**Figure 27-** Répartition des colonies isolées, sur milieu gélosé R<sub>2</sub>A, en fonction des principaux caractères phénotypiques.

- Trois autres groupes bactériens sont identifiables. Il s'agit (i) de bâtonnets à Gram négatif, catalase et cytochrome oxydase positifs, présents sous forme de colonies jaunes (17,6% de la population totale cultivée) ; (ii) de bâtonnets à Gram négatif, catalase et cytochrome oxydase positifs, dont les colonies sont blanches (14,4% de la population totale) ; (iii) de cocci à Gram positif donnant de très petites colonies blanches, à activités catalase et cytochrome oxydase négatives (9,6% de la population totale cultivée).

Contrairement aux autres, seul le groupe des bactéries à Gram négatif formant des colonies jaunes présente une activité cellulolytique et amylolytique.

Par contre aucune activité protéolytique n'est décelable parmi ces groupes.

La population principale a été suivie pendant 26 mois à partir de prélèvements réalisés tous les deux mois dans les deux bassins d'aération (**tableau 6**). Ces bactéries représentent en moyenne 39,5% de la population cultivable. Cette population demeure la plus importante quelle que soit la période de prélèvement.

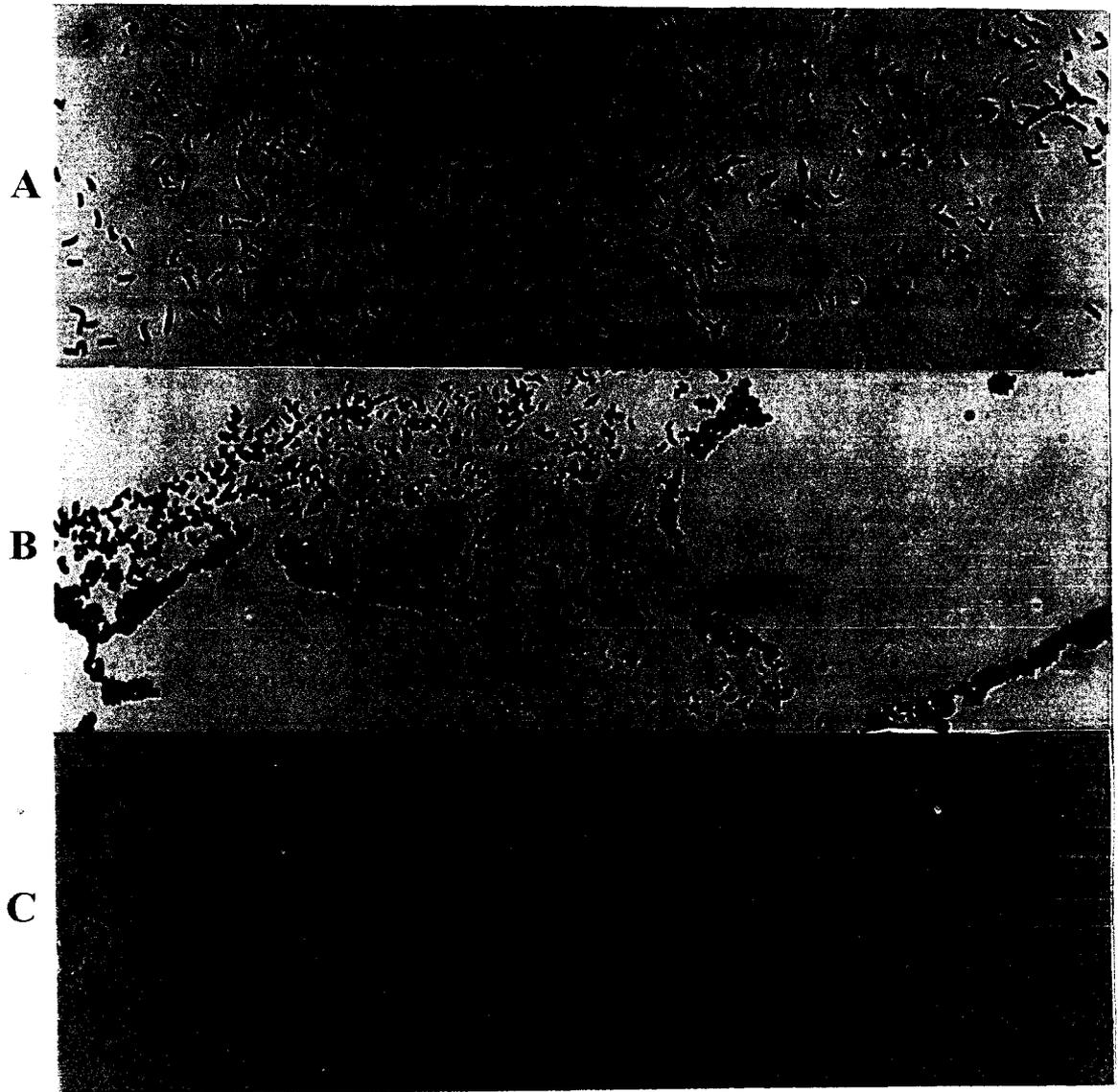
**Tableau 6-** Pourcentage de la population bactérienne principale dans les boues activées à différentes périodes de prélèvement.

<i>Date du prélèvement</i>	Bassin d'aération n°1	Bassin d'aération n°2
<i>12 mars 1996</i>	58,53	64,80
<i>18 juin 1996</i>	41,83	41,97
<i>22 août 1996</i>	57,60	44,83
<i>10 septembre 1996</i>	51,30	54,56
<i>13 novembre 1996</i>	35,29	32,63
<i>08 janvier 1997</i>	28,00	24,90
<i>19 mars 1997</i>	28,92	30,41
<i>22 mai 1997</i>	28,87	28,82
<i>22 juillet 1997</i>	58,52	56,72
<i>25 septembre 1997</i>	26,07	21,10
<i>06 mai 1998</i>	31,02	26,12

## 2.2- Identification de la population principale

Quelles que soient les conditions de culture, les bactéries représentant 38,4% de la population cultivable du prélèvement de février 1996, ont un cycle de croissance typique bâtonnet-cocci (**figure 28**). Elles sont aérobies strictes, non mobiles et ne peuvent pas hydrolyser la gélatine, l'amylose et la cellulose en poudre.

L'acétate et le citrate sont utilisables comme source de carbone dans le milieu minéral contenant de l'extrait de levure (0,5 g.L<sup>-1</sup>).



**Figure 28-** Morphologie des cellules bactériennes (isolat A<sub>1</sub>) après 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures d'incubation en culture liquide (MGYE).

Elles exigent un apport vitaminique qui peut être assuré par l'incorporation de biotine ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Cependant, après plusieurs cultures successives, les souches peuvent généralement se développer sans cet apport vitaminique.

L'analyse du peptidoglycane de la paroi a révélé la présence de L-lysine et L-alanine (**figure 29**). L'acide DL-diaminopimélique et la D-ornithine ne sont pas détectables.

A partir de l'ADN extrait selon la méthode de Marmur (1961), de plusieurs isolats, la teneur en G+C obtenue par dénaturation thermique est voisine de 72,0 % (**tableau 7**).

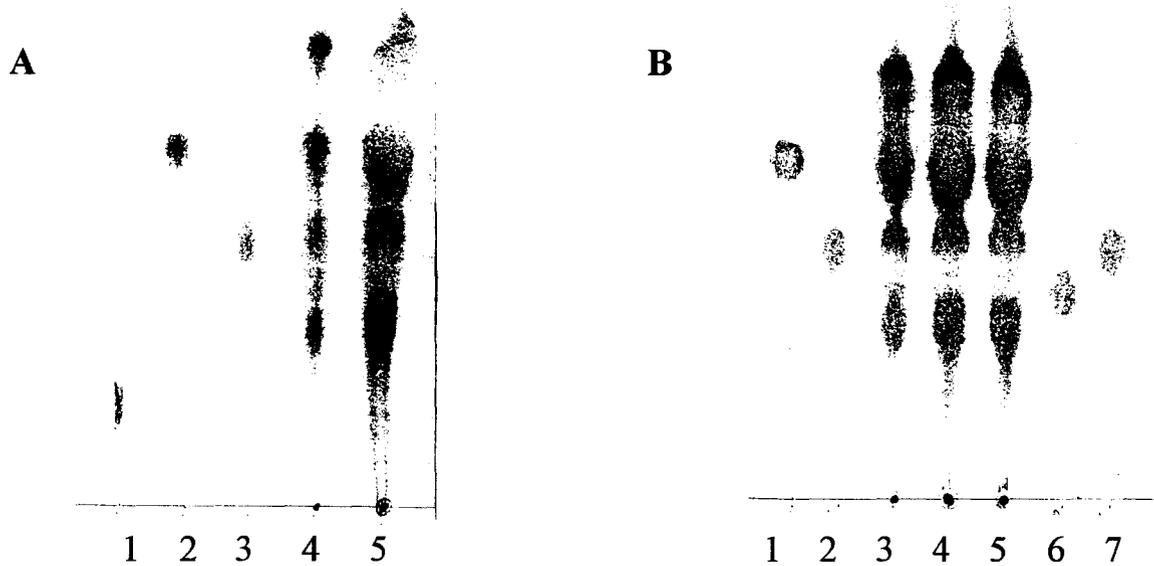
**Tableau 7-** Estimation de la teneur en G+C pour plusieurs isolats de la population dominante.

<i>Isolats</i>	Estimation du $T_m$ (°C) dans un tampon SSC	Teneur en G+C (%)
$A_1$	98,80	71,71
$A_2$	99,00	72,23
$A_3$	98,80	71,70

D'après ces résultats, le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) conduit au genre *Arthrobacter*.

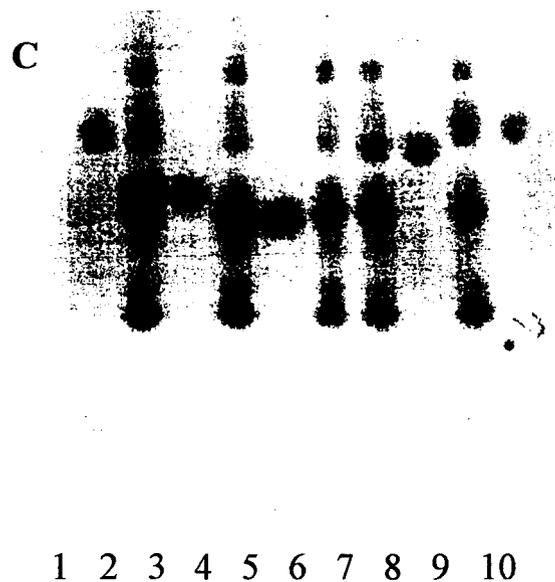
La sonde oligonucléotidique universelle (EUB338) a permis de vérifier et de valider les conditions opératoires. Les hybridations par les sondes spécifiques aux bactéries à Gram positif à teneur élevée en G+C (GPHGC) et aux genres *Micrococcus/Arthrobacter* (MIC841) confirment l'identification (**tableau 8**).

Les hybridations *in situ* permettent aussi d'après Amann *et al.* (1997) d'identifier les communautés bactériennes dans les boues activées. Nous avons appliqué cette hybridation directe avec un prélèvement d'eau des bassins d'aération. Les résultats ont été décevants à cause des interférences dues à la présence résiduelle des pigments naturels (kaolin, talc, carbonate de calcium) utilisés lors de la fabrication du papier.



Légende des dépôts	Plaque A	Plaque B
1	Acide DL-diaminopimélique	L-alanine
2	L-alanine	L-lysine
3	L-lysine	Isolat A <sub>1</sub>
4	Isolat A <sub>1</sub> (1µl)	Isolat A <sub>2</sub>
5	Isolat A <sub>2</sub> (5µl)	Isolat A <sub>3</sub>
6		D-ornithine
7		L-lysine

Légende des dépôts	Plaque C
1	L-lysine
2	Isolat A <sub>1</sub> + L-lysine
3	L-glutamate
4	Isolat A <sub>1</sub> + L-glutamate
5	Isolat A <sub>1</sub>
6	L-alanine
7	Isolat A <sub>1</sub> + L-alanine
8	L-thréonine
9	Isolat A <sub>1</sub> + L-thréonine
10	L-lysine



[chromatographie en couche mince sur feuille de cellulose. Solvant de migration: méthanol, eau, HCl 6N, pyridine (80/26/4/10, v/v/v/v)]

**Figure 29-** Chromatographies des composants du peptidoglycane de la paroi d'isolats de la population principale.

**Tableau 8-** Hybridation des sondes oligonucléotidiques en fonction des cellules fixées.

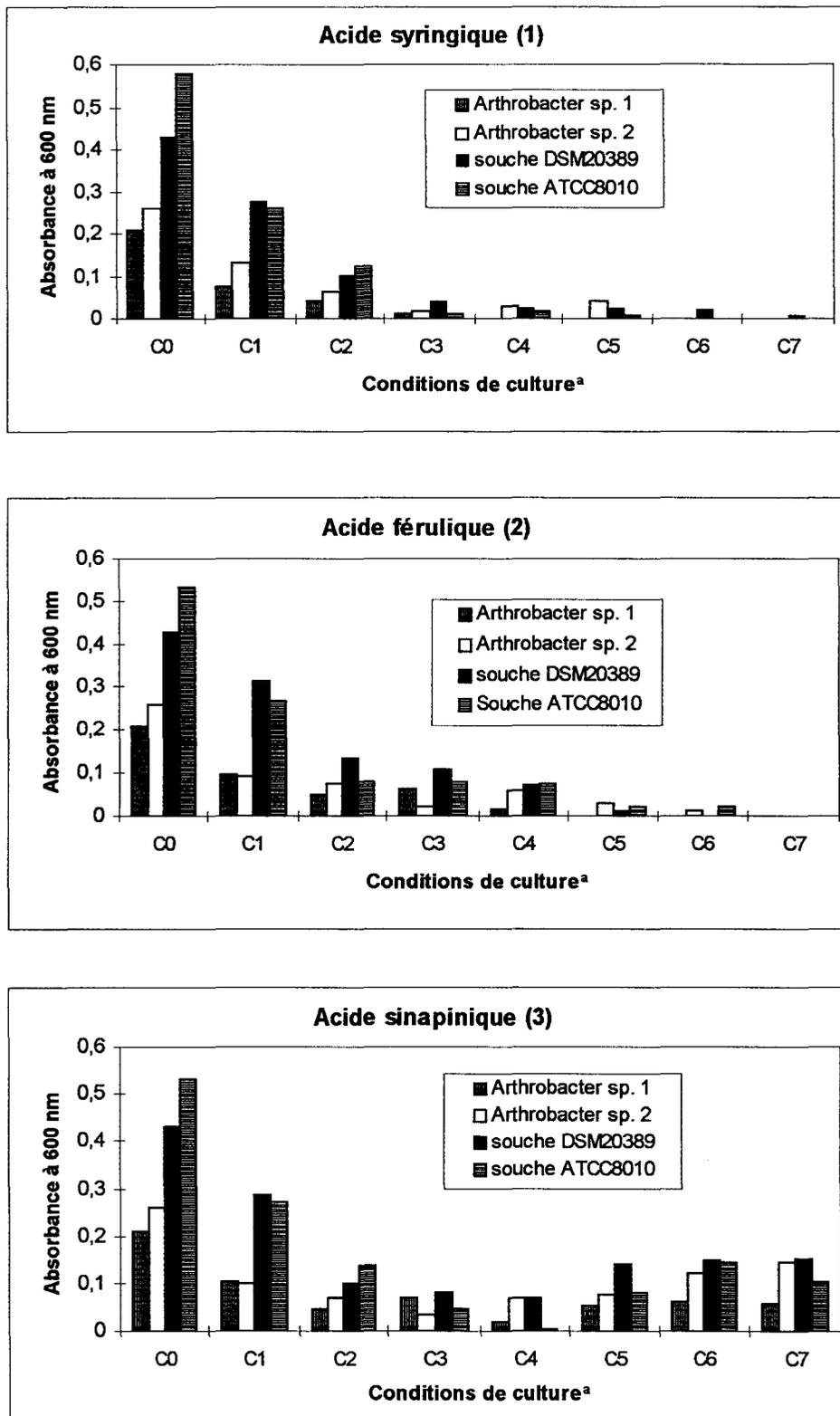
<i>Bactéries utilisées</i>	Observation de la fluorescence de la sonde			
	EUB338	GPHGC	MIC841	MIB1473
<i>Isolats A de la population principale</i>	+	+	+	-
<i>Arthrobacter sp</i> DSM20389	+	+	+	-
<i>Arthrobacter globiformis</i> ATCC8010	+	+	+	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-

Des analyses complémentaires ont été poursuivies pour essayer de comprendre la fonction de ces *Arthrobacter* dans les bassins d'épuration.

Nous avons déjà noté que la croissance de ces *Arthrobacter sp.* était inhibée dans un milieu de culture riche en peptones (20 g.L<sup>-1</sup>). Dans un milieu contenant du glucose ou de l'acétate (0,5 g.L<sup>-1</sup>), une période de latence de 5 heures et un temps de génération de 2,2 heures ont été enregistrés. Ces valeurs sont respectivement de 15 heures et de 3,3 heures lorsque le milieu est composé de glucose-tryptone (0,5-10 g.L<sup>-1</sup>). A titre comparatif, le temps de génération obtenu avec les *Arthrobacter* ATCC8010 et DSM20389 est d'une heure et demie dans le milieu glucosé.

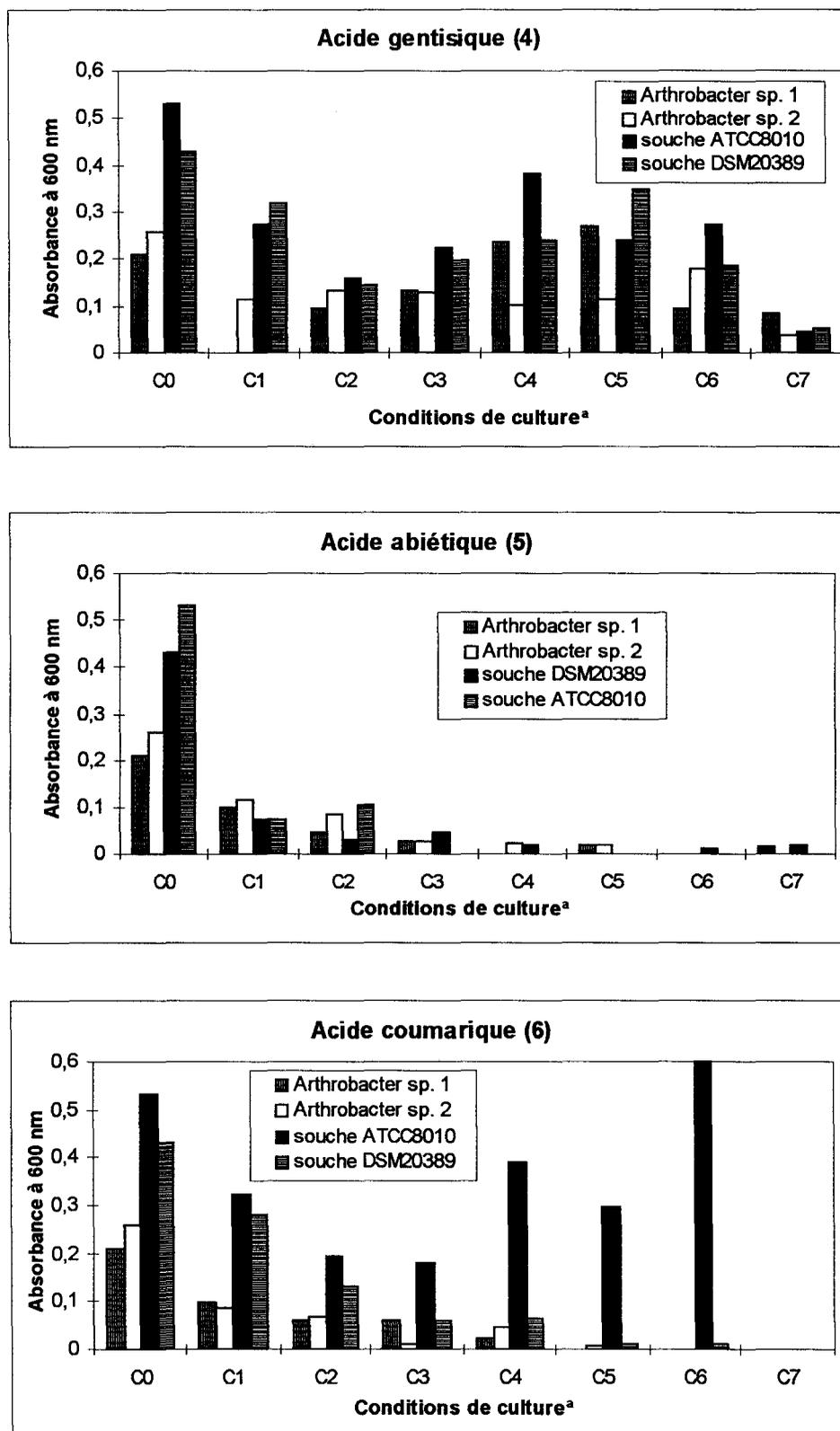
Une étude de la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations en acides aromatiques, apparentés à des dérivés simples de la lignine, a été conduite en combinant la présence de glucose (**tableau 3**). Le remplacement progressif du glucose par des acides aromatiques s'accompagne d'une diminution (de 50% dès la seconde série de culture C1) des valeurs d'absorbance des suspensions bactériennes (**figure 30**). Ces faibles proliférations illustrent l'effet de la carence du glucose et l'absence de l'utilisation des sources de carbone nouvellement apportées dans les milieux de culture.

Ces résultats montrent que les *Arthrobacter sp.* isolés des bassins d'aération n'utilisent pas ce type de substrat aromatique comme source unique de carbone.



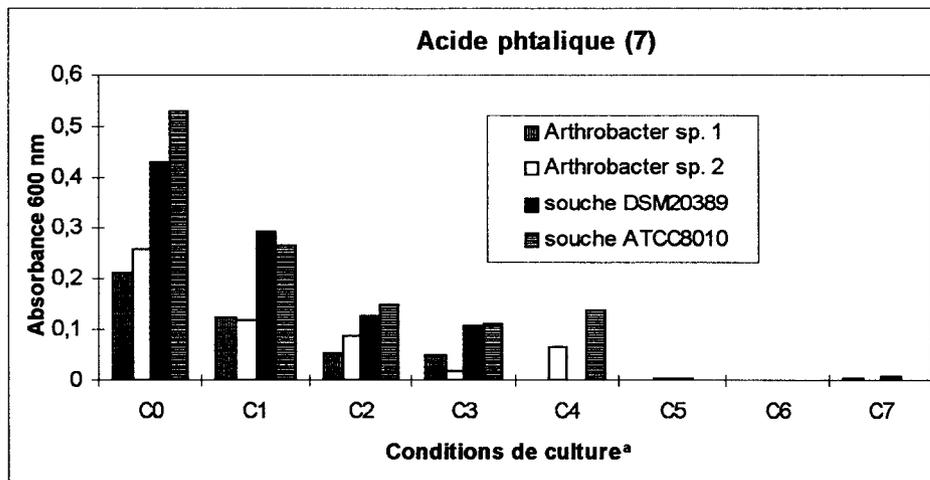
Notes : a, conditions de culture décrites dans la **Partie 2- Chapitre 1 §1.3-**  
(1) à (7) correspond aux structures présentées par la **figure 26**.

**Figure 30-** Mesures de l'absorbance ( $\lambda_{abs} = 600 \text{ nm}$ ) des différentes cultures bactériennes en présence des dérivés simples de la lignine.



Notes : a, conditions de culture décrites dans la **Partie 2- Chapitre 1 §1.3-**  
(1) à (7) correspond aux structures présentées par la **figure 26**.

**Figure 30 (suite)-** Mesures de l'absorbance ( $\lambda_{\text{abs}} = 600 \text{ nm}$ ) des différentes cultures bactériennes en présence des dérivés simples de la lignine.



**Figure 30 (suite)-** Mesures de l'absorbance ( $\lambda_{\text{abs}} = 600 \text{ nm}$ ) des différentes cultures bactériennes en présence des dérivés simples de la lignine.

La charge relative de la surface cellulaire des *Arthrobacter* isolées a été estimée par chromatographie d'interactions hydrophobes, et par précipitation sélective par le sulfate d'ammonium.

Selon Mozes et Rouxhet (1987), un indice d'hydrophobicité élevé ( $I_h > 80\%$ , **tableau 4**), de même qu'une précipitation des cellules bactériennes par une faible concentration en sels d'ammonium (de l'ordre de 0,2 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) reflètent une surface cellulaire très hydrophobe. Ce cas de figure représente un résultat théorique. Lors de ces études, les deux méthodologies utilisées sont nécessaires. Les interprétations en sont délicates, car les estimations de la charge de surface des cellules bactériennes aboutissent souvent à des contradictions (Lindahl *et al.*, 1981 ; Dillon *et al.*, 1986). Ces dernières résultent du fait que les interactions mises en jeu lors de la rétention sur un gel hydrophobe sont différentes de celles impliquées lors de l'agglutination des cellules.

Pour les deux souches de collection d'*Arthrobacter* isolées du sol, *Klebsiella oxytoca* et *Escherichia coli*, les résultats obtenus (**tableau 9**) confirment leur caractère hydrophobe.

En ce qui concerne *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*, le caractère hydrophile est bien vérifié.

Pour les *Arthrobacter* isolés, ces deux approches vont dans le sens d'un caractère plutôt hydrophile.

**Tableau 9-** Détermination et comparaison de l'hydrophobicité relative de la surface cellulaire des *Arthrobacter* isolés et des souches de collection.

Micro-organismes	Indice d'hydrophobicité $I_h$ (%) <sup>a, b</sup>	Test de précipitation saline <sup>c</sup>
<i>Arthrobacter</i> isolés des boues activées	14,30 (4,95)	2
<i>Arthrobacter globiformis</i> ATTC 8010	61,33 (11,73)	2
<i>Arthrobacter sp</i> DSM20380	78,50 (7,80)	2,5
<i>Escherichia coli</i> 111B4	70,0 (8,33)	1,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,81 (2,05)	1,6
<i>Micrococcus luteus</i>	44,96 (3,55)	1,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	50,82 (3,28)	1,6

Notes : (a) chromatographie d'interaction hydrophobe sur Phényl Sépharose CL4B, tampon citrate, pH 3,0.

(b) résultats exprimés par la moyenne (écart type) calculée à partir de trois chromatographies.

(c) concentration minimale en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  exprimée en  $\text{mol.L}^{-1}$  nécessaire pour observer une précipitation bactérienne.

## CHAPITRE 3- DISCUSSION

L'étude de la population microbienne cultivable des boues activées du site papetier a révélé la présence de quatre groupes bactériens principaux dont un majoritaire. Une analyse échelonnée sur 26 mois a confirmé l'importance de ce dernier groupe.

Une étude taxonomique de plusieurs isolats sélectionnés aléatoirement dans la population dominante a conduit à l'identification du genre *Arthrobacter*.

Ces bactéries à Gram positif présentent un cycle de croissance typique des germes corynéformes. Elles sont aérobies obligées, non mobiles et présentent des réactions catalase positive et cytochrome oxydase négative. La L-lysine est présente dans le peptidoglycane de la paroi cellulaire et la teneur en G+C de l'ADN est élevée (72,0% ; T<sub>m</sub>).

L'utilisation d'une sonde oligonucléotidique spécifique au genre (Köllofel *et al.*, 1997) a permis de confirmer notre identification.

D'autres bactéries corynéformes sont proches de ce profil taxonomique. Il s'agit de *Microbacterium*, mais il ne présente pas un cycle de croissance bâtonnet-coque ; ou de *Aureobacterium* (Collins *et al.*, 1983) qui contient la D-ornithine comme composé principal dans sa paroi cellulaire.

Bactéries saprophytes, les *Arthrobacter* sont très répandus dans le sol. Ils ont également été identifiés à partir de prélèvements voisins de ceux effectués dans le site étudié. Adamse (1968, 1970) en a isolé à partir de boues activées de laiterie, Nand et Rao (1972), et Seiler *et al.* (1980) à partir de stations urbaines. Par contre, en étudiant des boues activées d'un site papetier utilisant le procédé kraft, Fulthorpe *et al.* (1993) n'ont pas signalé d'activité particulière de bactéries à Gram positif. Le milieu riche utilisé peut être l'explication de ce résultat puisque la croissance bactérienne des *Arthrobacter* isolés des boues activées du site est inhibée par ces conditions de culture.

D'après Ban et Glanser-Soljan (1979) une communauté de micro-organismes incluant des *Arthrobacter* peut dégrader les lignosulfonates, et selon Mohn et Stewart (1997) et Bicho *et al.* (1995) des souches pures d'*Arthrobacter* peuvent montrer une activité catabolique en présence de ces effluents papetiers.

Les fonctions des *Arthrobacter*, que nous avons caractérisées dans les boues d'épuration aérobie, soulèvent de nombreuses interrogations.

Ces bactéries ne sont ni cellulolytiques, ni amylolytiques, non protéolytiques et n'utilisent pas les résidus simples de la lignine comme unique source de carbone. Leur besoin en vitamines reflète également un caractère singulier. La matière organique des bassins d'aération présentant une teneur très faible en vitamines, la communauté bactérienne du biofloc peut évidemment fournir ces éléments. Le faible taux de croissance de ces bactéries comparé aux souches de collection est également peu compatible avec une activité épuratrice potentielle.

Plusieurs indications nous permettent de penser que ces *Arthrobacter* sp. interviennent plutôt sur le maintien de la structure et sur l'efficacité du biofloc. Placées en culture liquide dans un milieu carencé en source de carbone, ou préparé avec l'eau des bassins d'aération, ces bactéries prolifèrent en formant des agrégats.

Les effluents papetiers ont une charge minérale élevée qui peut en outre faciliter la mise en place des interactions physico-chimiques favorisant la structure du biofloc (Urbain *et al.*, 1993 ; Snidaro *et al.*, 1997). Hwang et Tate (1997) ont montré aussi qu'une espèce d'*Arthrobacter* peut interagir avec des particules d'argile. Le caractère hydrophile des cellules isolées argumente cette hypothèse.

La charge de surface hydrophile des cellules isolées ne permet pas d'impliquer cette propriété dans la mise en place d'agrégats. Ces cellules sont issues d'un protocole d'isolement et maintenues sur milieu gélosé pouvant induire des variations sur les caractéristiques de la charge superficielle.

La capacité d'agrégation peut être favorisée par leur difficulté à se déplacer dans l'eau (cellules non mobiles) et leur potentialité à produire des polysaccharides (Van den Eynde *et al.*, 1984 ; Bodie, *et al.*, 1985 ; Fujita *et al.*, 1990a,b ; Senchenkova *et al.*, 1995 ; Yamazaki *et al.*, 1998), promoteurs de la formation des agrégats bactériens (Harris et Mitchell, 1973).

Il est peut-être important de souligner aussi que les bactéries corynéformes peuvent survivre pendant de longues périodes de carence nutritive. Dans ces situations, elles utilisent des réserves intracellulaires représentées par des matériels polymériques (Boylen et Mulks, 1978).

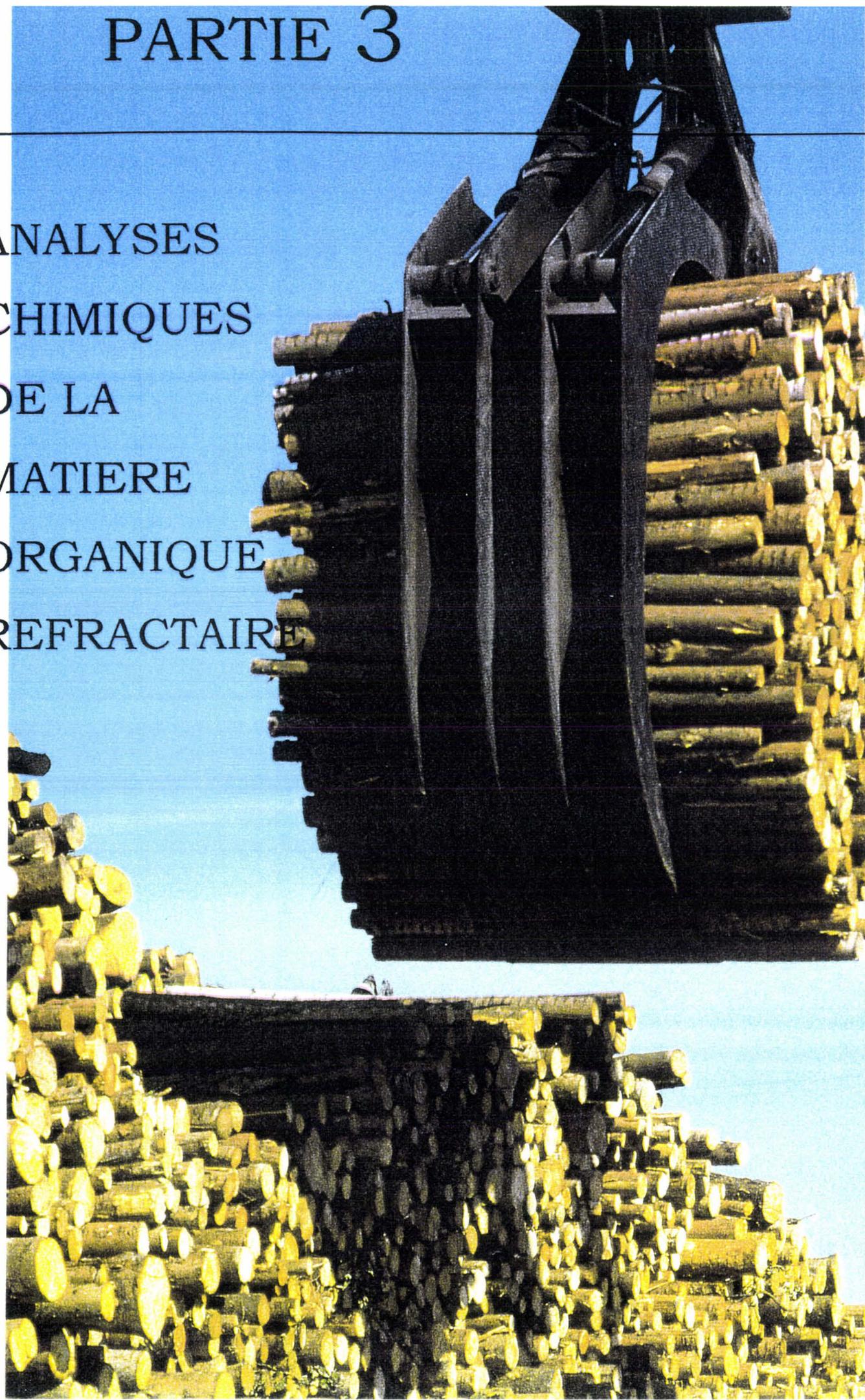
Le glycogène et les poly- $\beta$ -hydroxyalcanoates sont des polymères souvent présentés comme une forme de réserve bactérienne (Van Aalst *et al.*, 1997).

Ce caractère permet de suggérer que ces bactéries ont un métabolisme adapté aux variations nutritives des bassins d'aération. La charge organique n'est pas constante, le biofloc est soumis à un cycle abondance/famine. Il paraît alors stratégique de posséder au sein du biofloc des micro-organismes capables de stocker des sources carbonées lors des charges organiques élevées, et d'en disposer lors des stades de carence en substrats rapidement assimilables. Cet état de disponibilité permet d'assurer l'équilibre de la croissance bactérienne quelles que soient les conditions nutritives des bassins d'aération (Van Loosdrecht *et al.*, 1997a).

L'intérêt de ce comportement n'est pas de pouvoir maintenir l'équilibre du métabolisme interne des cellules mais de disposer d'un avantage vis-à-vis des micro-organismes incapables de produire des polymères de réserve lors des carences et des déséquilibres nutritifs (Van Loosdrecht *et al.*, 1997b).

# PARTIE 3

ANALYSES  
CHIMIQUES  
DE LA  
MATIERE  
ORGANIQUE  
REFRACTAIRE



## CHAPITRE 1 - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### **1.1- Préparation de la matière organique des eaux épurées**

Les échantillons d'eaux épurées sont prélevés en fin de traitement au niveau des deux canaux de rejet de la station d'épuration (R24 et R25, **figure 5**).

Au laboratoire, ces échantillons sont aérés par barbotage d'air comprimé pendant 24 heures à température ambiante.

Les eaux de rejet ne peuvent être lyophilisées directement en raison de leur forte concentration saline (moyenne annuelle : 250-300 mg.L<sup>-1</sup>) et de la faible concentration en carbone organique (moyenne annuelle : 35 mg COT.L<sup>-1</sup>).

Après filtration sur coton de verre et acidification à pH 2,0 (HCl N), le passage sur résine adsorbante Amberlite XAD-8 (résine d'esters acryliques non aromatiques, Merck) permet de retenir la matière organique. Celle-ci est alors éluée par une solution de soude 0,1 N.

Le pH de l'éluat est rapidement corrigé à 7,0 (HCl N). Les sels sont éliminés par dialyse à l'eau distillée en utilisant des membranes Spectra Por 6/7 (Spectrum) d'exclusion de poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Après 24 heures de dialyse à 4°C, l'eau distillée est remplacée et une dialyse de 48 heures est reconduite. L'éluat dialysé est alors concentré par évaporation sous vide jusqu'à obtention d'un volume réduit au 1/200 par rapport à l'échantillon initial. Une troisième dialyse de 24 heures est réalisée avant congélation (48h, -20°C). Ces préparations sont alors lyophilisées (72h, -20°C, lyophilisateur Virtis, Gardiner).

L'étape de lyophilisation de la matière organique réfractaire est primordiale. La composition supposée complexe et hétérogène implique un mode opératoire qui ne doit ni sélectionner, ni altérer la charge organique à concentrer. Nous nous sommes inspirés de la méthode préparative de Thurman et Malcolm (1981) qui proposent une adsorption sur des résines non ioniques.

## 1.2- Analyses chimiques

### ● Carbone organique total

Les dosages du carbone organique total [COT] sont effectués au laboratoire de contrôle de la station d'épuration de Stora Corbehem (COTmètre 410, Seres).

Le carbone organique total est minéralisé par une oxydation sous ultraviolets. Le gaz carbonique formé est détecté et dosé par une cellule à infrarouge. Les échantillons sont toujours dosés avec le même appareillage, et des dilutions sont faites dans l'eau distillée afin de respecter la gamme de dosage de l'analyseur (0 à 100 mg de carbone par litre).

### ● Microanalyses

Les dosages du carbone, de l'hydrogène, et de l'azote sont réalisés par le Service Central d'Analyses du C.N.R.S. (Vernaison, France). Les échantillons lyophilisés sont amenés à combustion complète et chaque élément est dosé spécifiquement par détection infrarouge.

Les éléments minéraux sont dosés par spectrophotométrie d'émission atomique avec excitation par plasma [ICPAES] qui permet une détermination simultanée d'un grand nombre d'éléments chimiques (3510 ICP, Applied Research Laboratories). Ces analyses sont effectuées au Département Recherche et Développement (Stora Corbehem).

### ● Analyses spectrophotométriques

- ✓ Les spectres d'absorption pour les longueurs d'ondes comprises entre 200 et 700 nm ont été réalisés par un spectrophotomètre Uvikon 940 (Kontron).
- ✓ Les spectres infrarouges (400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) par spectrophotométrie à simple faisceau (5PC FT-IR, Nicolet) ont été réalisés au département Recherche et Développement de Stora Corbehem.
- ✓ Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 [RMN  $^{13}\text{C}$ ] ont été effectués au centre commun de RMN de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (spectrophotomètre asx 400, Bruker). Ces spectres sont réalisés à 100,62 MHz, à partir de

tubes (5 mm de diamètre) contenant 30 à 100 mg de lyophilisat solubilisé dans 500  $\mu\text{L}$  d'eau deutérée [ $\text{D}_2\text{O}$ ] avec un temps d'acquisition de 0,16 s, un temps d'attente de 0,40 s, et un angle de pulse de  $45^\circ$ . Pour chaque spectre, 150 000 balayages sont enregistrés. Toutes les mesures spectrales et énergétiques sont exprimées en hertz et les déplacements chimiques sont donnés en partie par million [ppm].

### ● Extraction des lignines

Les lyophilisats (25 mg) de la matière organique des eaux épurées ont été traités par 5 mL d'une solution de bromure d'acétyle à 25% (v/v, acide acétique) en présence de 0,2 mL d'acide perchlorique 70% (Liyama et Wallis, 1988). Les tubes scellés sont placés à  $70^\circ\text{C}$  pendant 40 minutes. Une agitation manuelle toutes les 10 minutes assure une dissolution complète.

Les fonctions carbonyles des dérivés de lignine sont acétylées suite à la libération d'acide acétique et de bromure d'hydrogène (substitution nucléophile, types 1 et 2). Un balayage spectrophotométrique des solutions d'extraction des longueurs d'ondes comprises entre 250 et 400 nm (spectrophotomètre Uvikon 940, Kontron) révèle un spectre caractérisé par une absorbance maximale à 280 nm. Afin de disposer de spectres UV témoins, des extractions ont été préalablement effectuées sur des préparations de lignine alcaline (Aldrich).

### ● Estimation des poids moléculaires

Les chromatographies par tamisage moléculaire sont réalisées sur des colonnes de Sephadex G25 (Pharmacia, séparation des poids moléculaires compris entre 1000 et 5000 Da) ou G50 (Pharmacia, séparation des poids moléculaires compris entre 1500 et 30000 Da).

L'éluant employé est une solution de Tris-HCl, pH 9,0 (force ionique, 0,05). L'absorbance à 280 nm des fractions collectées (volume : 3 mL) permet de tracer le profil d'élution.

Le volume d'exclusion de la colonne est estimé par dépôt d'une solution de Bleu Dextran. Les colonnes sont calibrées avec le cytochrome c (PM : 12 500 Da), l'aprotinine (PM : 6500 Da) et la vitamine B<sub>12</sub> (PM : 1350 Da).

## ● Hydrolyse acide

Cette expérience permet d'estimer la proportion de composés hydrolysables, et d'apporter des indications sur la nature chimique de la matière organique des eaux épurées.

- ✓ Le protocole suivi découle des travaux d'Uzaki et Ishiwatari (1983). 25 mg de lyophilisats des eaux épurées (soit 2,3 mg de C.O.T.) sont dissous dans 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique normale dans un tube à centrifuger en pyrex scellé sous azote. Les échantillons sont hydrolysés par chauffage (105°C) pendant 15 heures. Après centrifugation, (4500 g, 15 min), le surnageant est récupéré. Le culot est repris par 5 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 2% et après centrifugation, le culot subit un troisième traitement identique. Les trois surnageants sont homogénéisés.

Une mesure du carbone organique total, le dosage des oses totaux et une chromatographie sur couche mince de gel de silice des hydrolysats sont réalisés afin de révéler l'efficacité de la réaction d'hydrolyse.

- ✓ A l'issue de la réaction d'hydrolyse, un précipité est systématiquement formé. Afin d'estimer la charge organique de ce dernier des mesures du carbone organique total sont assurées au laboratoire du traitement des eaux (Stora Corbehem).
- ✓ Les produits d'hydrolyse peuvent correspondre à des dérivés glucosidiques. Le dosage des oses totaux a été effectué selon la méthode au phénol - acide sulfurique de Dubois *et al.* (1956).
- ✓ Les produits d'hydrolyse peuvent être observés après une séparation chromatographique sur couche mince et révélés par un réactif à large spectre de détection et d'identification valable aussi bien pour des produits naturels que synthétiques. Le protocole employé s'inspire des travaux de Modzeleski *et al.* (1971). Les surnageants de centrifugation sont passés sur une résine anionique (Dowex 50, Sigma) puis cationique (Dowex 1-2, Sigma). Après élution avec de l'eau distillée, les volumes collectés sont concentrés par évaporation sous vide. 2 à 6 µL d'hydrolysats concentrés sont déposés sur le gel de silice (feuilles d'aluminium F256, Merck). Les plaques sont placées pour migration dans un tampon propanol/pyridine/eau (7/1/12, v/v/v) pendant 3h30. Après séchage, elles sont révélées par pulvérisation d'une solution d'anisaldéhyde (KR296, Sigma) puis fixées à 100°C pendant 15 min.

## CHAPITRE 2- RESULTATS

### **2.1- Analyses chimiques des lyophilisats des eaux épurées**

La résine XAD-8 retient 60 % de la matière carbonée des eaux épurées. Cette valeur est estimée en mesurant la teneur en carbone organique total avant et après passage d'un volume défini d'eau épurée.

Après les différentes étapes de dialyse et de concentration, les lyophilisats contiennent en moyenne 80 % de matière organique (**tableau 10**). Nous avons cité, à titre indicatif, la teneur en matière organique avant et après dialyse afin de vérifier l'efficacité du protocole préparatoire des lyophilisats.

La charge minérale est principalement composée de sels de sodium (29 %, p/p). Cette présence s'explique par l'utilisation de la soude destinée à corriger le pH.

La répartition des éléments détectés ne couvre pas la totalité de la charge minérale car les sels de ces éléments sont présents sous forme de carbonates.

La teneur en métaux lourds est de 0,8 % (p/p) pour l'aluminium, et à l'état de trace (de l'ordre de 0,01 à 0,10 %) pour les autres éléments.

Il est à noter que la présence d'éléments minéraux, comme le Zn, Fe, Cu, Ni, et Mo, indispensables pour la croissance des micro-organismes est toujours détectable dans les eaux épurées, par conséquent aucune carence au niveau des bassins d'aération ne peut être suspectée.

Le dosage des oses totaux (**tableau 11**) de la matière organique réfractaire indique une teneur moyenne de 50 µg par mg de lyophilisat. La charge organique étant de 100 µg de COT par mg de lyophilisat, il peut être signifié que 25% de la matière organique carbonée serait donc de nature glucidique.

L'analyse spectrophotométrique en ultraviolet de cette matière organique donne des spectres ne présentant aucun pic caractéristique (**figure 31**).

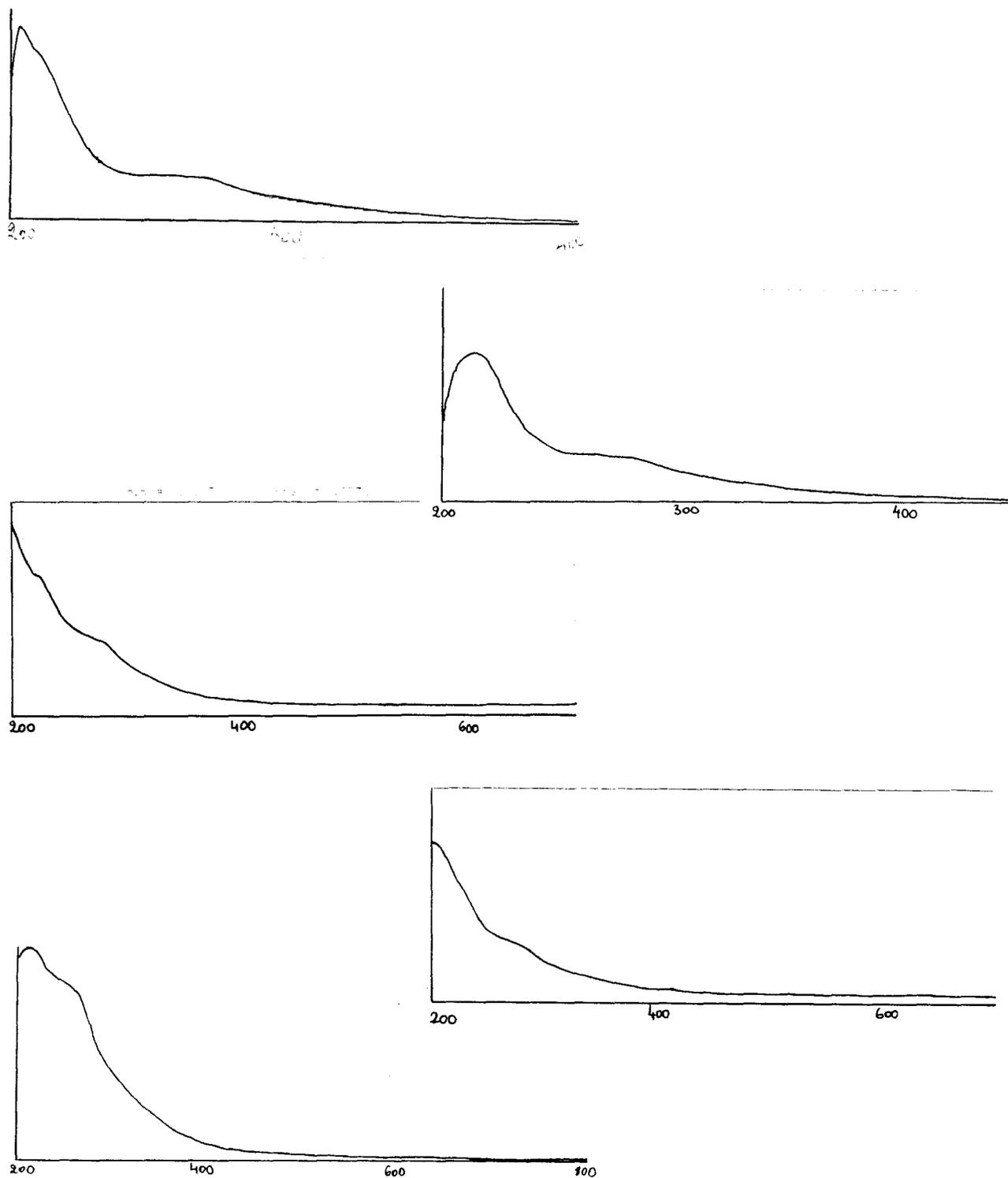
**Tableau 10-** Analyses minérales par ICPAES de différents produits de lyophilisation des eaux épurées.

Lyophilisat	non dialysé <sup>a</sup>	dialysé <sup>b</sup>	dialysé <sup>c</sup>	dialysé <sup>d</sup>
% en mat. minérale	<b>89.90</b>	<b>5.59</b>	<b>21.70</b>	<b>21.20</b>
% en mat. organique	10.10	94.41	78.30	78.80
<b>Détection des éléments minéraux dans la charge minérale (% , P/P)</b>				
Na	28.24	27.10	30.29	23.48
K	0.05	2.60	3.21	2.45
Mg	0.01	0.33	0.96	0.76
Mn	0.00	0.03	0.02	0.01
Ca	0.03	2.70	6.21	6.18
Si	0.08	1.17	0.29	0.76
P	0.00	0.00	0.08	0.53
S	0.10	8.43	0.26	4.48
Fe	0.00	0.04	0.12	0.12
Ba	0.00	0.03	0.01	nd
Ti	0.00	0.14	0.01	0.03
Co	0.00	0.01	0.01	0.01
Cu	0.00	0.05	0.05	0.07
Zn	0.01	1.16	0.16	nd
Cr	0.00	0.00	0.02	0.03
Ni	0.00	0.10	0.02	0.02
Al	0.01	0.78	0.35	0.74
Mo	0.00	0.00	0.02	nd
Cd	0.00	0.00	0.01	nd

Note : a et b, produits de lyophilisation d'un même échantillon d'eaux épurées ; c et d, correspondent à deux prélèvements distincts d'eaux épurées.

**Tableau 11 -** Teneur en carbone organique total et en oses totaux des lyophilisats.

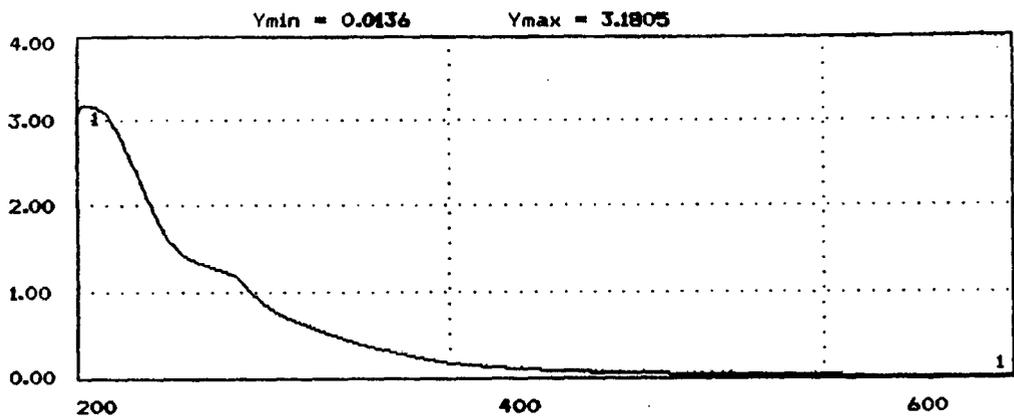
Date du prélèvement des eaux épurées	Teneur en COT (µg /mg de lyophilisat)	Teneur en oses totaux (µg /mg de lyophilisat)
29/09/97	200	65
10/10/97	92	45
20/10/97	92	50
20/10/97	100	51
20/10/97	95	51



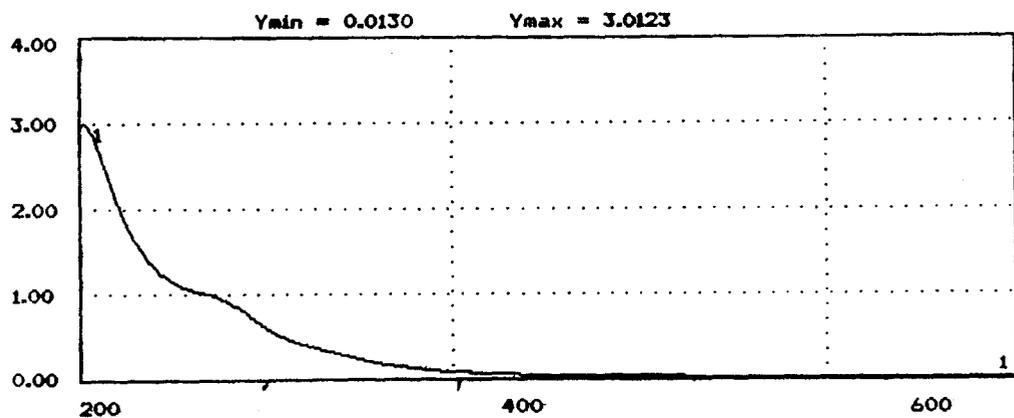
Note : ordonnée en unités arbitraires ; abscisse en nm ( $\lambda_{\text{abs}}$ )

**Figure 31-** Spectres d'absorbance en ultraviolet de différents produits de lyophilisation de la matière organique des eaux épurées.

Afin de s'assurer que les différentes étapes du protocole de préparation des lyophilisats n'éliminent pas significativement certaines fractions de la matière organique des eaux épurées, nous avons comparé les spectres UV des fractions retenues et non retenues par la résine non ionique (XAD-8) du protocole préparatoire de lyophilisation (figure 32). L'aspect des spectres ainsi obtenus ne présente pas de différences.



Spectre UV de la fraction retenue sur XAD-8



Spectre UV de la fraction non retenue sur XAD-8

**Figure 32-** Comparaison des spectres UV des fractions retenues et non retenues sur colonne XAD-8.

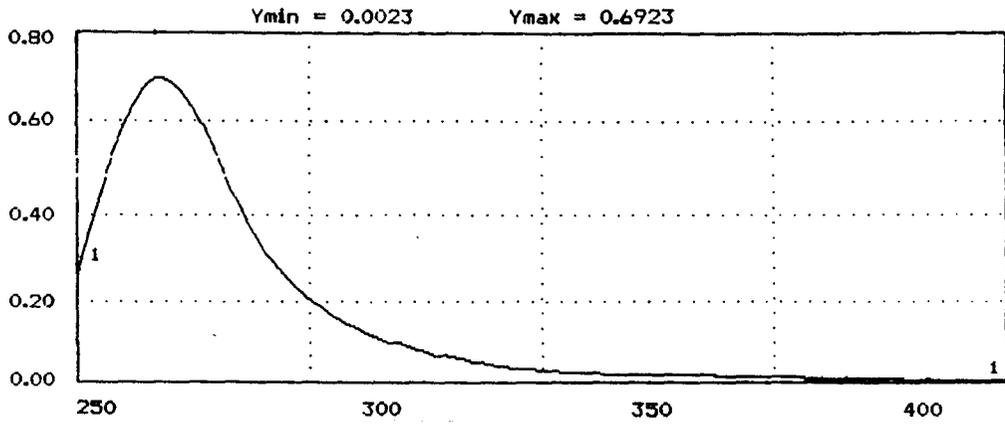
La réaction du bromure d'acétyle sur la charge organique des eaux épurées n'induit aucun changement sur l'aspect des spectres d'absorbance en ultraviolet, (**figure 33**) par rapport à ceux observés précédemment (**figure 32**). Ce protocole a été envisagé afin de détecter la présence potentielle de lignines et de ses dérivés apparentés, vu l'origine de nos effluents. Ces spectres ne révèlent aucune présence de tels composés après comparaison avec les résultats obtenus pour les témoins (**figure 34**), et ceux significatifs cités dans la littérature (**figure 35**). Les spectres des lyophilisats ne présentent pas les absorbances à 280 et 305 nm spécifiques de la détection de ces composés.

Les spectres en infrarouge de deux préparations de lyophilisats des eaux épurées (**figure 36**) révèlent la présence d'une importante proportion en matière minérale et plus particulièrement en sels de carbonates comme nous les indiquent les spectres comparatifs de la **figure 37**. L'interprétation de ces spectres est rendue délicate à cause de ces sels minéraux.

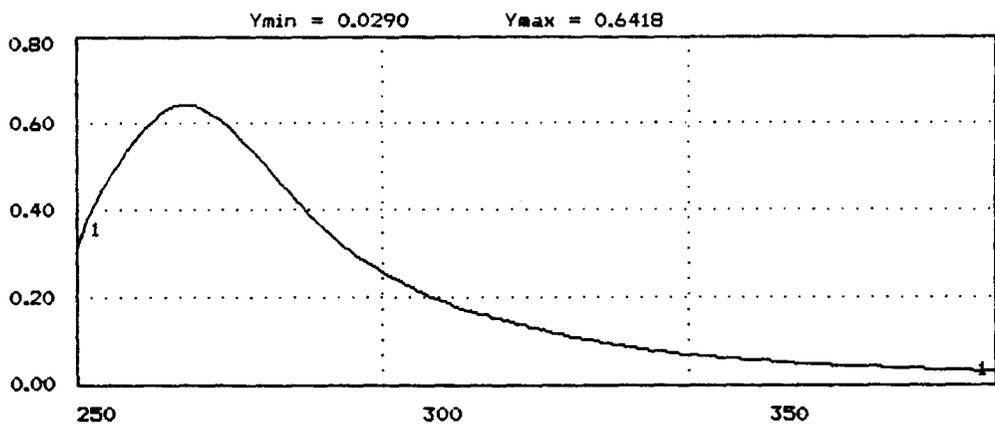
Les spectres obtenus pour la matière carbonée retenue par la colonne XAD-8 (**figure 38, A**) indiquent que cette fraction est plus diversifiée en familles de composés chimiques par rapport à la constitution de la fraction non retenue (**figure 38, B**).

Le spectre de la fraction retenue indique la présence de chaînes aliphatiques (pics compris entre 1600 et 650  $\text{cm}^{-1}$ ).

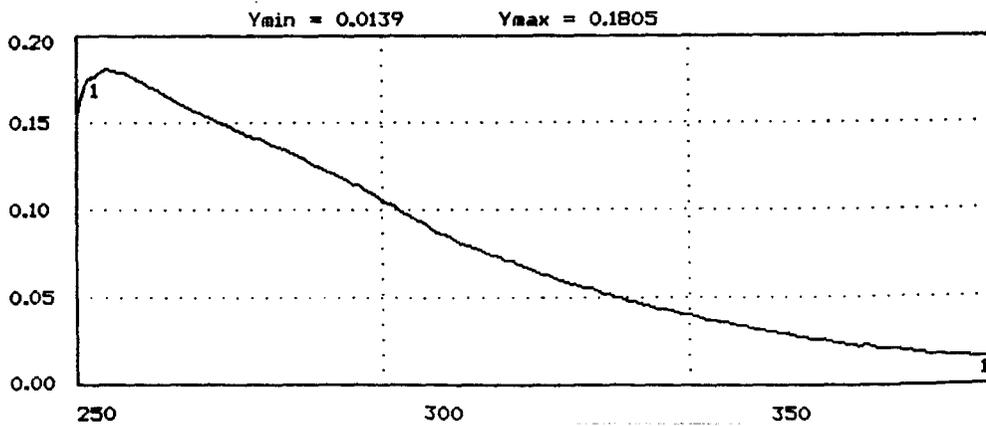
Les absorptions dans la région 1600-1400  $\text{cm}^{-1}$  pourraient correspondre à des doubles liaisons C=C.



Spectre UV du lyophilisat de la matière organique réfractaire



Spectre UV de la fraction retenue sur XAD-8



Spectre UV de la fraction non retenue sur XAD-8

**Figure 33-** Spectres UV des lyophilisats de la matière organique réfractaire après extraction au bromure d'acétyle.

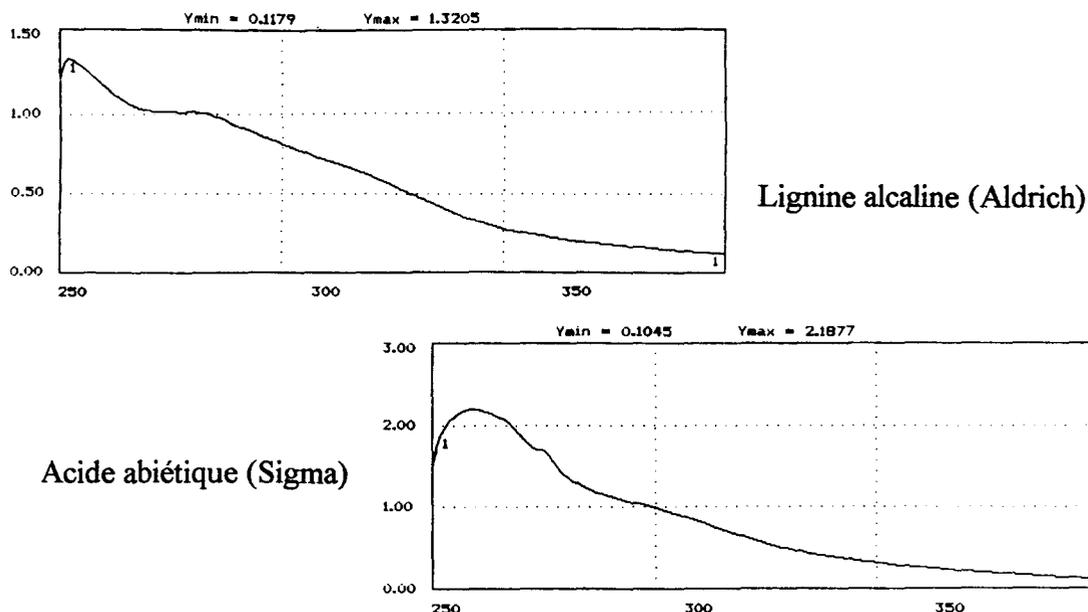
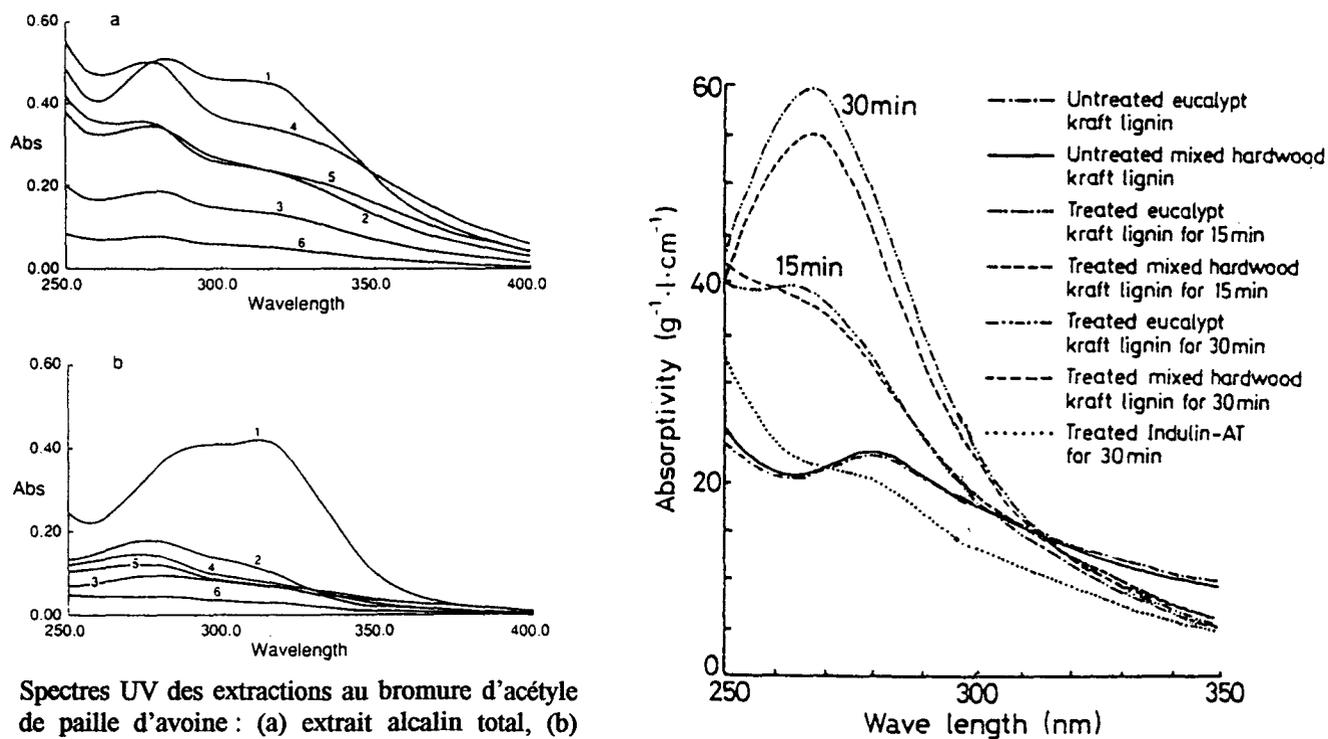


Figure 34- Spectres UV témoins d'extraction au bromure d'acétyle.



Spectres UV des extractions au bromure d'acétyle de paille d'avoine : (a) extrait alcalin total, (b) extrait diéthyl éther soluble. 1, non traité ; 2, extrait ; 3, pyrrolidine/pyridine + eau ; 4, méthoxyde de sodium ; 5, méthoxyde de sodium + eau ; 6, soude, 0,05M. (Morrison et Stewart, 1995).

Spectres UV de lignines kraft traitées au bromure d'acétyle (Liyama et Wallis, 1988).

Figure 35- Spectres UV de référence de lignines brutes et kraft traitées au bromure d'acétyle.

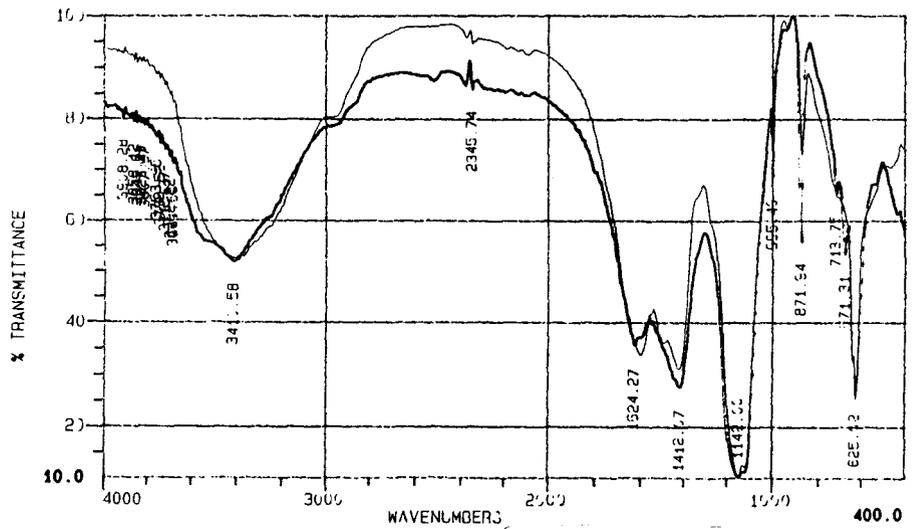


Figure 36- Spectres IR de deux produits de lyophilisation des eaux épurées.

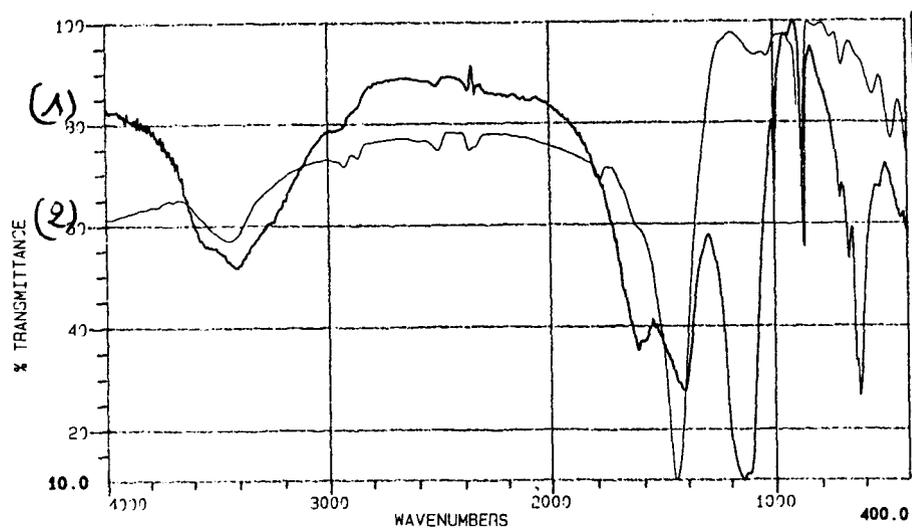
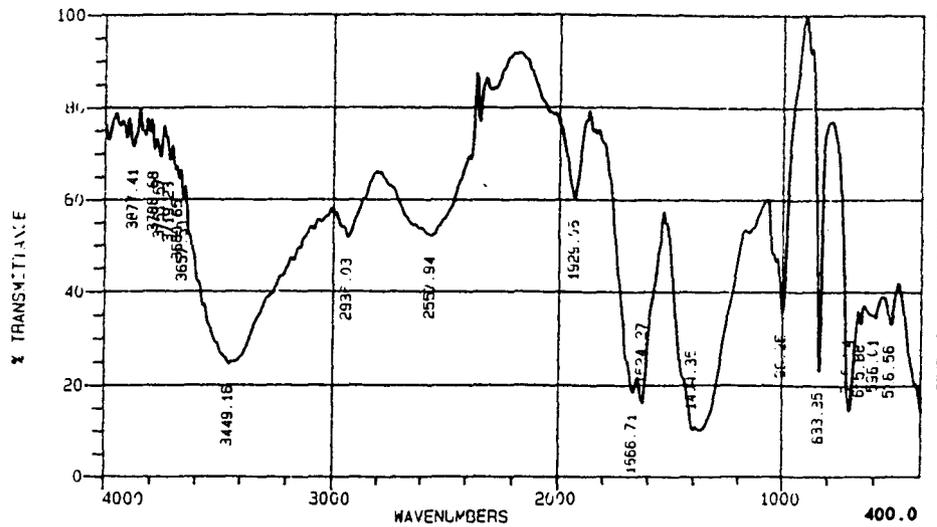
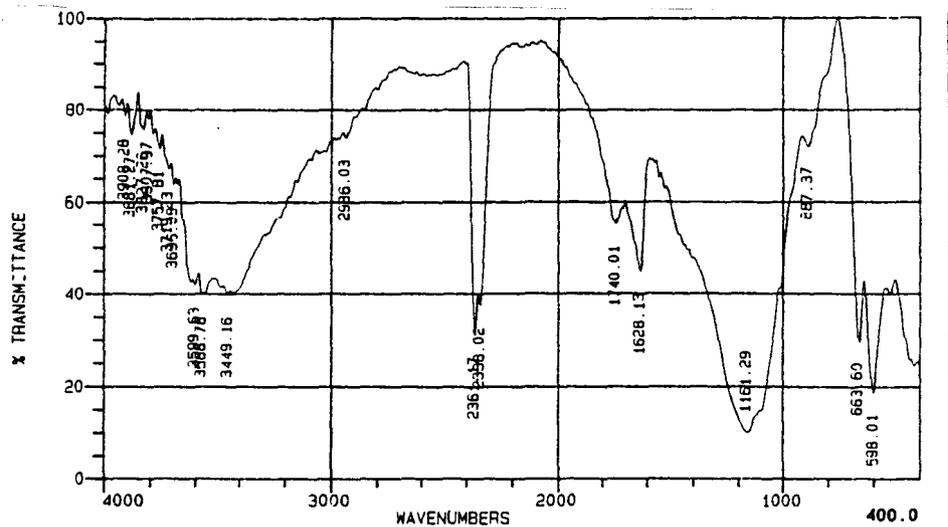


Figure 37- Comparaison des spectres infrarouges des eaux épurées (1) et du carbonate de sodium (2).

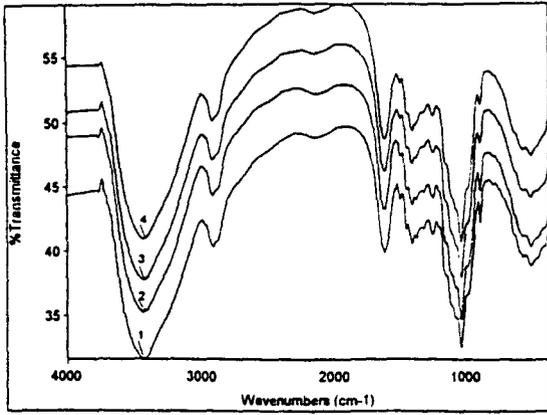


**A- Spectre IR de la fraction retenue sur la colonne XAD-8.**

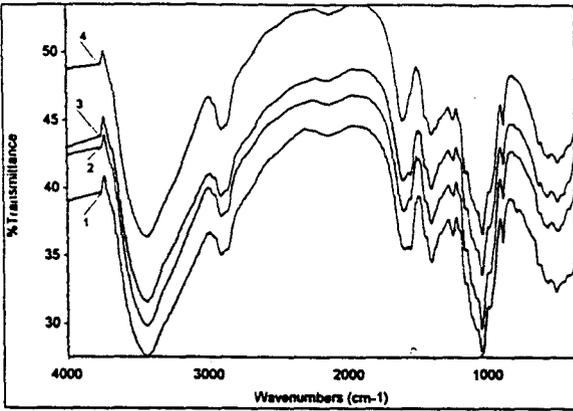


**B- Spectre IR de la fraction non retenue sur la colonne XAD-8.**

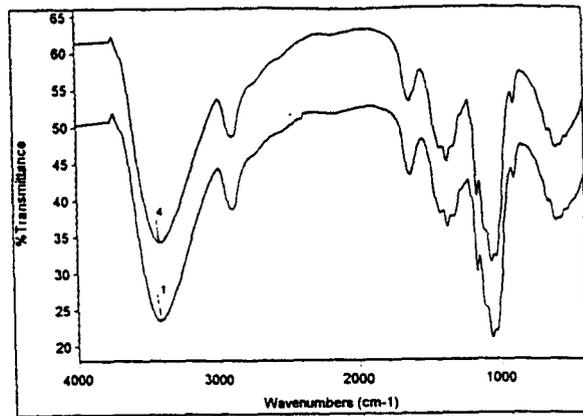
**Figure 38-** Spectres infrarouges des lyophilisats des eaux épurées retenues (A) et non retenues (B) sur la résine XAD-8.



FT-IR spectra of hemicellulose-lignin complex fractions 1-4.

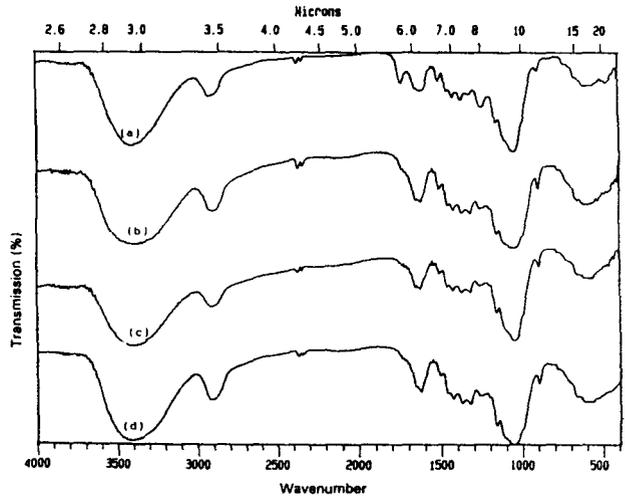


FT-IR spectra of residual hemicellulose fractions 1-4.

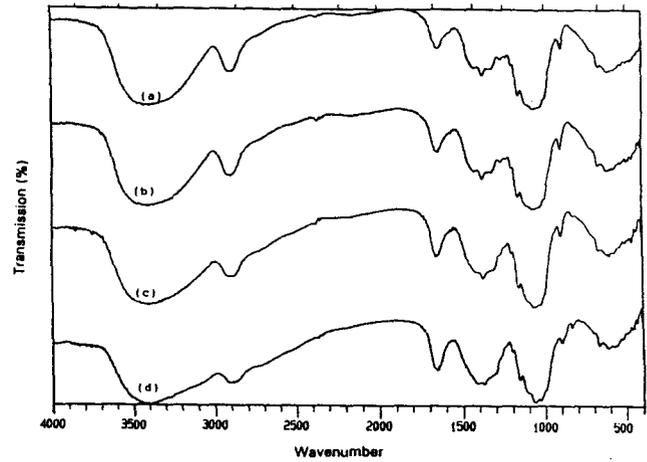


FT-IR spectra of cellulose fractions 1 and 4.

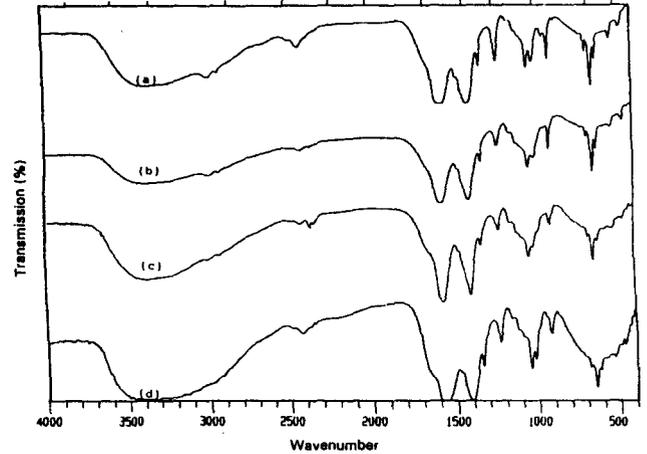
Sun *et al.* (1998)



FTIR spectra of wheat straw (a), 0.5 h (b), 6 h (c) and 24 h (d) pre-treated (1.5% NaOH, 20°C) wheat straw



FTIR spectra of wheat straw cellulose extracted from untreated wheat straw (a), 0.5 h (b), 6 h (c) and 144 h (d) pre-treated (1.5% NaOH, 20°C) wheat straw.



FTIR spectra of wheat straw hemicellulose extracted with 24% KOH and 2% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> at 20°C for 2 h from untreated wheat straw (a), 0.5 h (b), 6 h (c) and 144 h (d) pre-treated (1.5% NaOH, 20°C) wheat straw.

Sun *et al.* (1995).

Figure 39- Spectres infrarouges de référence de complexes lignine-polysaccharides et de polysaccharides d'origine végétale.

Le pic enregistré à  $1100\text{ cm}^{-1}$  représente les chaînes aliphatiques.

Le pic caractéristique à  $1900\text{ cm}^{-1}$  révèle la présence de liaisons cétoniques.

La région  $3600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  peut correspondre aux liaisons alcools ou amines primaires (Sun *et al.*, 1998).

Par comparaison avec les spectres décrits dans la littérature (**figure 39**), ceux des eaux épurées présentent des ressemblances avec les spectres de cellulose et d'holocellulose obtenus par Sun *et al.* (1995, 1998). Il faut noter que ces spectres diffèrent uniquement par l'absence du pic à  $1000\text{ cm}^{-1}$ , ce dernier semble être décalé à  $1100\text{ cm}^{-1}$ . Ces auteurs soulignent que les bandes à  $1520\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des dérivés apparentés à la lignine, mais dans notre cas, aucune absorption n'apparaît à ce niveau.

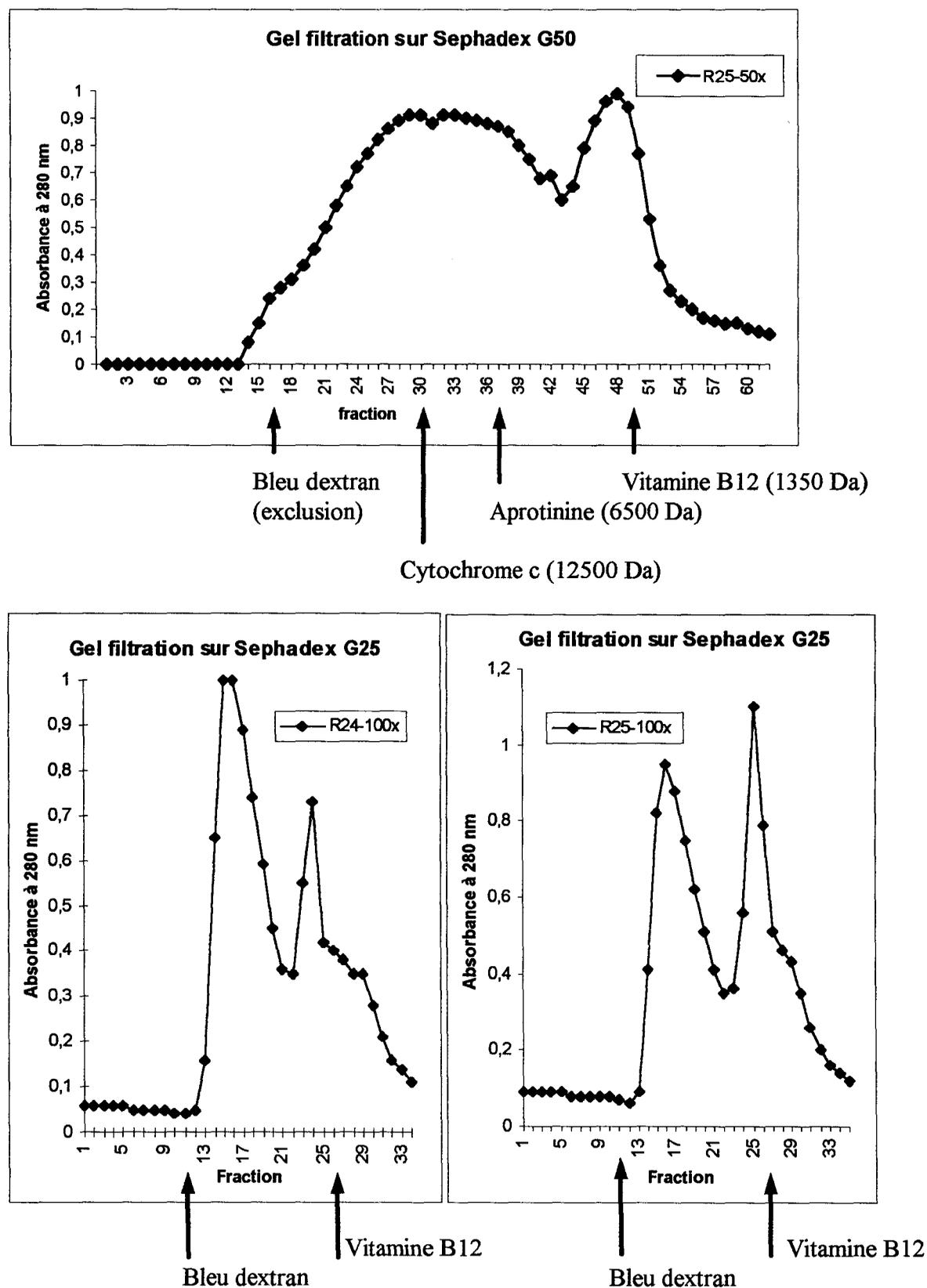
Cette technique d'analyse est particulièrement adaptée à l'identification de substances pures, voire de mélanges simples. De part les interférences dues aux résidus minéraux, et la diversité des composés présents dans les eaux épurées, ces techniques deviennent rapidement restrictives.

## 2.2- Analyses chimiques de la matière organique réfractaire

### ● Tamisage moléculaire

Le poids moléculaire des composés organiques des eaux épurées a été déterminé par gel filtration.

Les courbes d'élution (**figure 40**) révèlent une distribution en deux gammes de molécules séparables sur Sephadex G50 : une de haut poids moléculaire compris entre 10 000 et 15 000 Da, et une seconde de faible poids moléculaire voisin de 1 500 Da. L'utilisation d'un tamisage moléculaire à séparation plus restreinte permet de visualiser distinctement les deux familles de poids moléculaires.



**Figure 40-** Profils d'élution des tamisages moléculaires (G50 et G25) de la matière organique réfractaire.

### ● Spectres RMN du $^{13}\text{C}$ de la matière réfractaire

Les fractions d'éluion correspondant aux deux poids moléculaires (fractions 14 à 17, et 24 à 27 ; colonne Sephadex G25) ont été récupérées et dialysées afin de réaliser une analyse spectroscopique par résonance magnétique nucléaire du carbone 13. Leurs spectres respectifs sont caractérisés par un déplacement chimique élevé pour la région 58-61 ppm pour la fraction de faible poids moléculaire (**figure 41 A**) et 57-68 ppm pour la fraction de haut poids moléculaire (**figure 42 A**). Ce déplacement de forte intensité influe sur le calcul de la ligne de base des spectres. Il est nécessaire de focaliser les spectres afin d'observer les déplacements chimiques des autres fonctions présentes (**figure 41 et 42, B**).

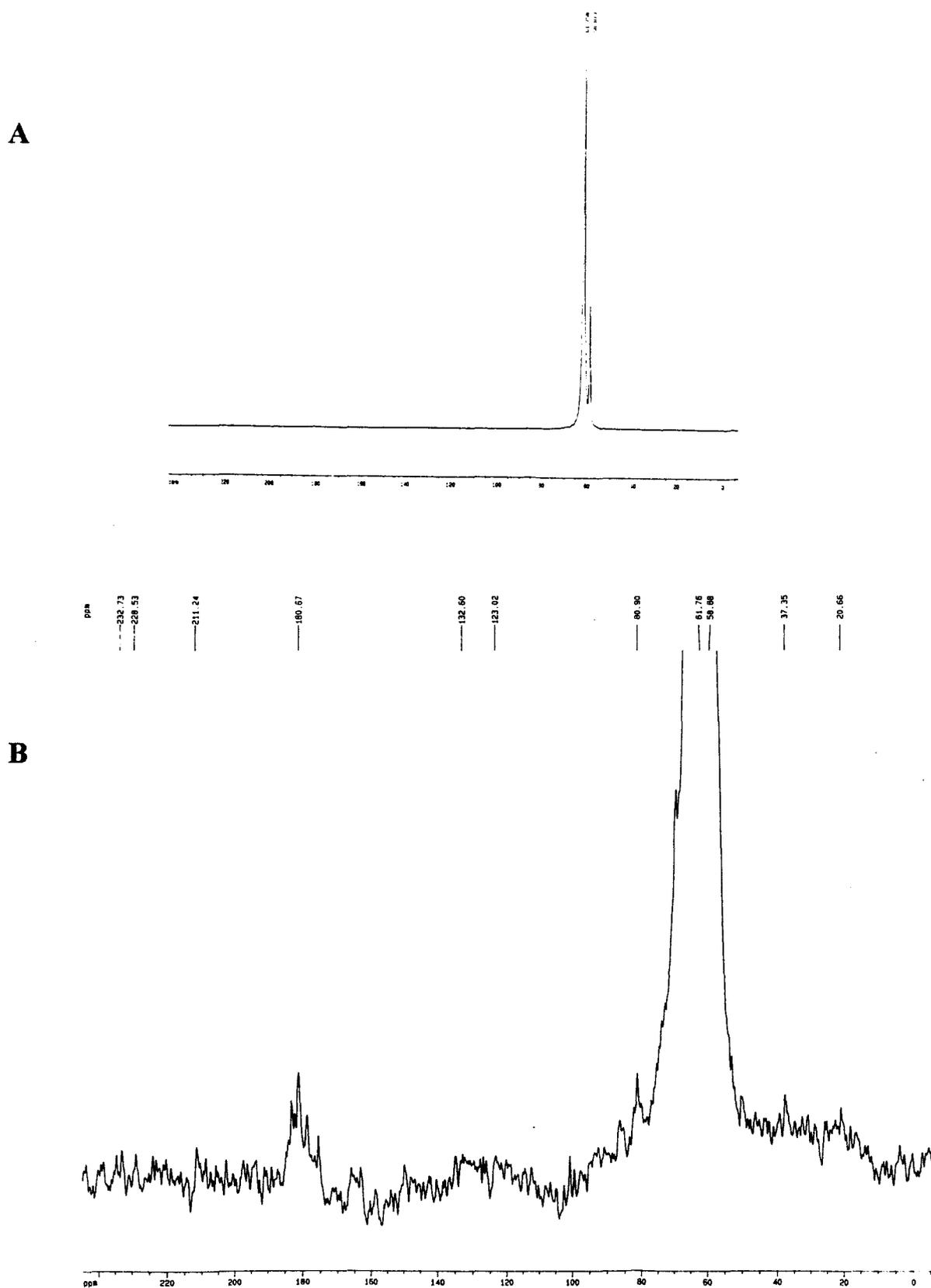
Les spectres de chaque fraction moléculaire présentent des profils de déplacements chimiques relativement similaires. Seule la présence de pics dans la région 20 à 50 ppm pour la fraction de haut poids moléculaire les différencie.

✓ Cette première région du spectre de la fraction de haut poids moléculaire est marquée par 2 pics principaux. D'après Kolodziejcki *et al.* (1982), le déplacement à 20 ppm correspondrait aux fonctions méthyl de groupements acétate présentes dans la structure des hémicelluloses (**figure 18**), et les déplacements à 37-39 ppm, les groupements alkyles des chaînes aliphatiques.

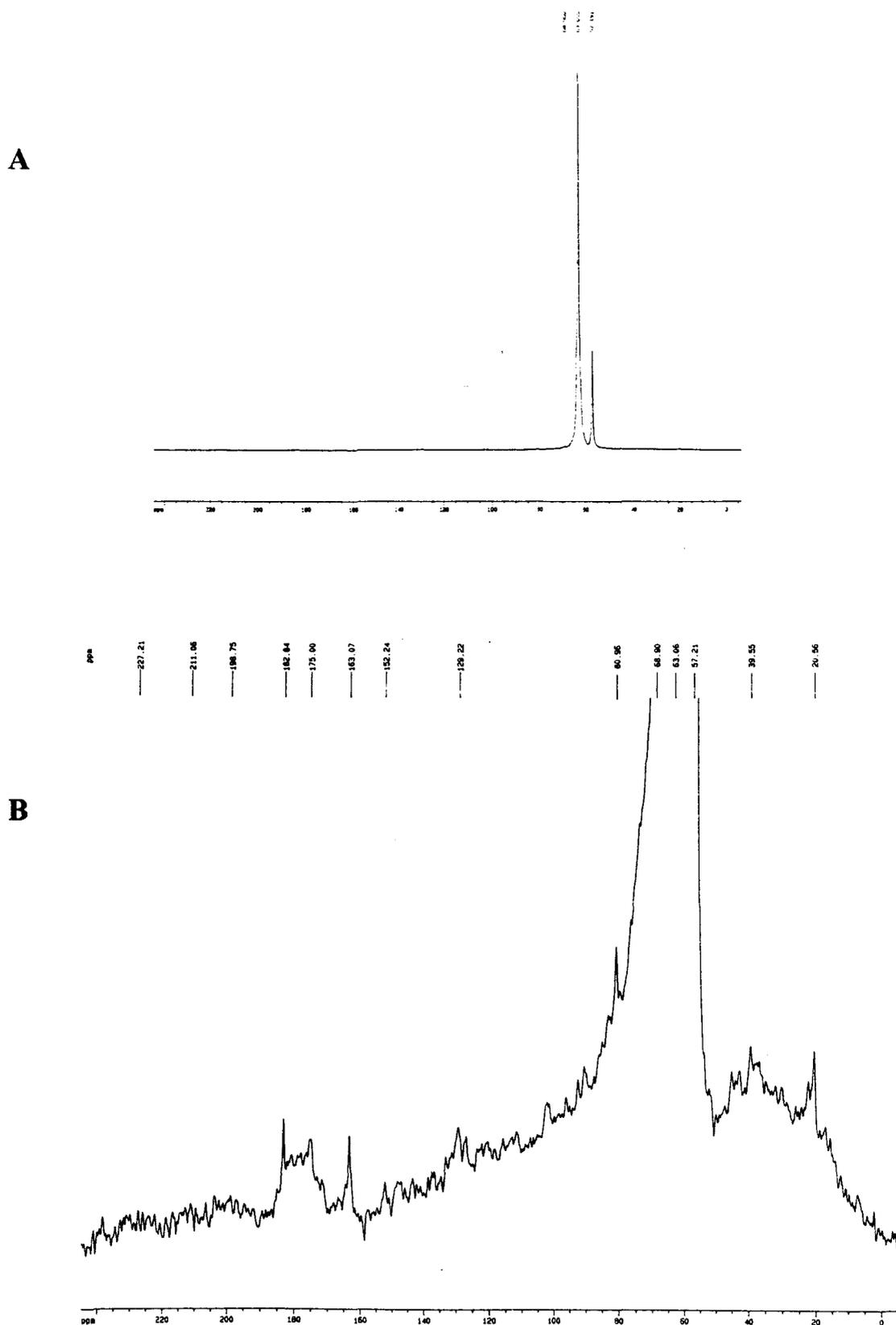
Seuls, les signaux de cette région ne se suffisent pas pour conclure directement à une structure hémicellulosique (Kolodziejcki *et al.*, 1982).

Le reste du spectre peut être divisé en 4 régions de déplacement chimique significatif : de 50 à 75 ppm, le pic à 80 ppm, puis la région de 80 à 160 ppm, et enfin de 160 à 180 ppm.

✓ Les déplacements prédominants observés dans la région 57-68 ppm illustrent d'après Kolodziejcki *et al.* (1982) la résonance des carbones C6 des hexoses des hémicelluloses. Les déplacements entre 55 et 58 ppm peuvent plus particulièrement correspondre aux signaux de carbone des fonctions méthoxyles d'hémicelluloses ou des lignines (Akim *et al.*, 1997). Les déplacements compris entre 72 et 75 ppm sont interprétés comme la résonance des C2, C3, et C6 des hémicelluloses (Kolodziejcki *et al.*, 1982 ; Jackson et Line, 1997b).



**Figure 41-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  de la fraction de faible poids moléculaire de la matière organique réfractaire avant (A) et après (B) focalisation.



**Figure 42-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  de la fraction de haut poids moléculaire de la matière organique réfractaire avant (A) et après (B) focalisation.

Des déplacements chimiques dans les régions 50-80 ppm, et 103-105 ppm révèlent selon Haw *et al.* (1984) la présence d'unités répétées typiques des hémicelluloses telles que le xylose, le mannose, et l'arabinose. Dans les deux spectres, le pic de référence du C1 anomérique des hémicelluloses à 103-105 ppm est absent mais il faut souligner que cette zone est difficilement interprétable car elle est adjacente au déplacement très intense de la région 55-80 ppm qui perturbe le calcul de l'intégration définissant la ligne de base des spectres.

✓ Le pic à 80 ppm peut indiquer soit la présence des liaisons internes  $\beta$ -O-4 du C $\beta$  (**figure 22**) caractéristiques des résidus des lignines (Akim *et al.*, 1997), soit la résonance du C4 des acides 4-O-méthyl glucuroniques (Almendros *et al.*, 1992; Preston *et al.*, 1997).

✓ Les déplacements notés dans la région 80-160 ppm peuvent correspondre aux signaux de carbones aromatiques présents dans les lignines (Kolodziejski *et al.*, 1982; Akim *et al.*, 1997).

Couplés avec le pic à 56 ppm, les pics présents dans la région 104 à 140 ppm révèlent les déplacements dûs aux C2 et C6 des lignines syringyl et aux fonctions carbonyl des tanins (Akim *et al.*, 1997).

✓ Le déplacement à 160-180 ppm correspond à des fonctions cétoniques d'acides aliphatiques, ou d'esters aliphatiques (Almendros *et al.*, 1992).

Seul le spectre de la fraction de haut poids moléculaire présente des pics distincts à 160, 175 et 180 ppm.

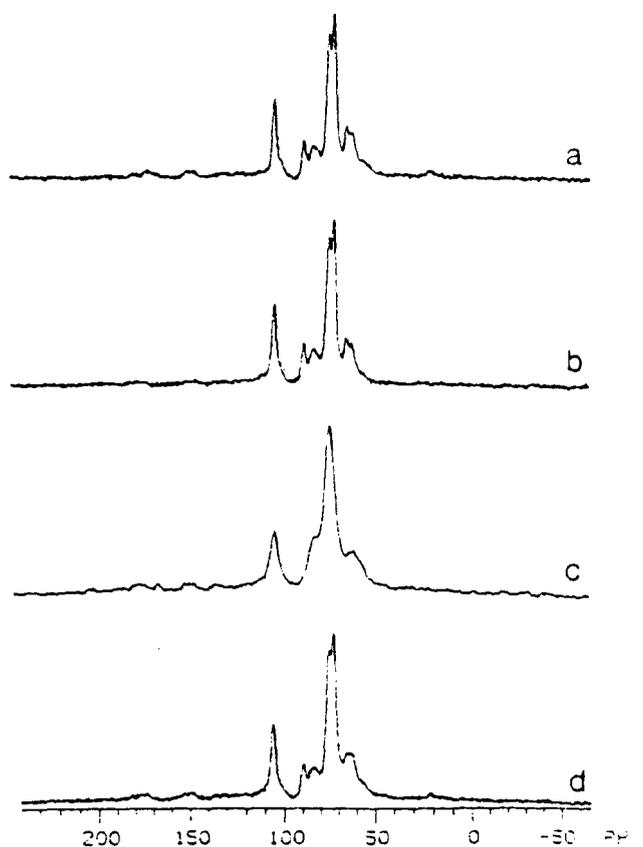
D'après Jackson et Line (1997b) la présence simultanée des pics à 22 et 175 ppm signale la présence de carbonyles et de méthyles des groupements acétate constitutifs des 4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucuronoxylanes des hémicelluloses.

Le pic à 175 ppm caractérise les fonctions carboxyliques, et le pic à 180 ppm peut correspondre au déplacement de groupements carboxyliques saponifiées des carbonyles selon Kolodziejski *et al.* (1982).

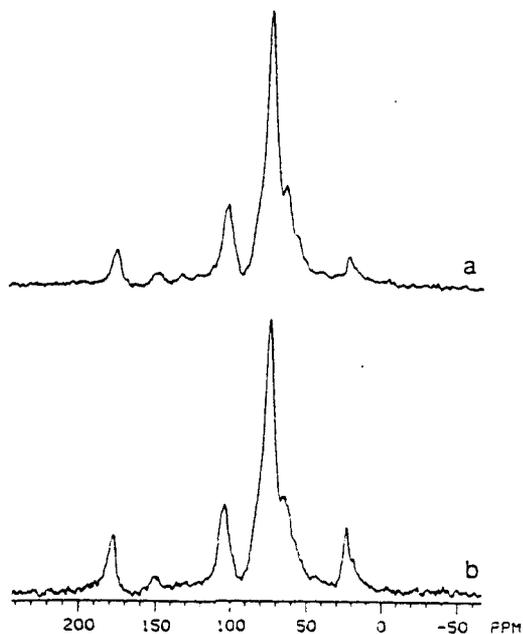
L'analyse de ces spectres tend à montrer que la matière organique réfractaire contient des structures polysaccharidiques de type hémicellulose.

Ces spectres sont d'ailleurs comparables aux résultats de Kolodziejcki *et al.* (1982) relatifs à des extraits de nature cellulosique (**figure 43**) et hémicellulosique (**figure 44**) caractérisés par un pic prépondérant recouvrant la région 60 à 80 ppm et la présence d'un pic à 100 ppm. Le pic à 180 ppm marque la spécificité des déplacements dûs aux fonctions carboxyliques des hémicelluloses.

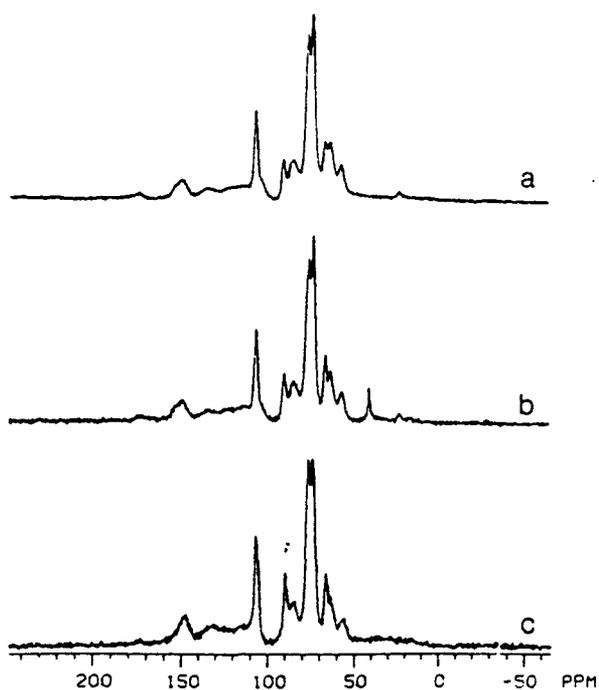
De même, les spectres obtenus à partir d'échantillons de bois brut (**figure 45**) ou traités selon des procédés papetiers (**figure 46 et 47**) présentent des similitudes avec ceux réalisés pour la matière organique réfractaire. Le pic imposant de la région 60 à 80 ppm est systématiquement présent.



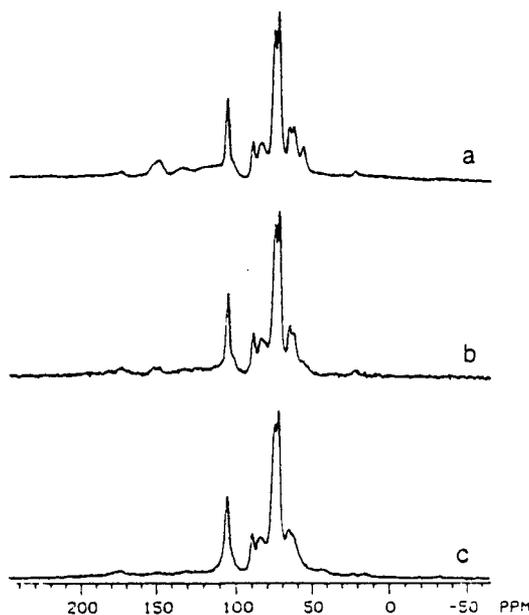
**Figure 43-** Spectres RMN du <sup>13</sup>C de différentes extractions de cellulose du bois : (a) et (b), holocellulose ; (c) et (d), cellulose (Kolodziejcki *et al.*, 1982).



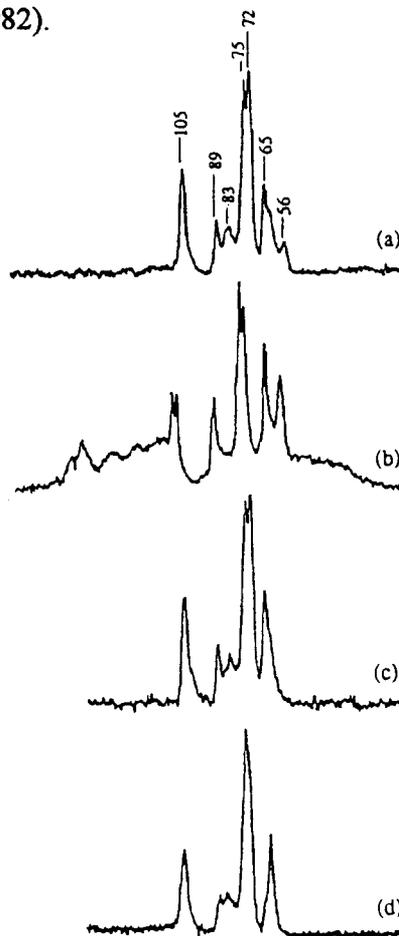
**Figure 44-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  d'hémicelluloses (a, b) extraites de bois brut de pin par Kolodziejski *et al.* (1982).



**Figure 45-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$ : (a) bois brut (pin); (b, c) résidu de bois après extraction chimique (Kolodziejski *et al.*, 1982).



**Figure 46-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  d'holocelluloses : (a) bois brut, holocellulose issue de traitement chloré par  $\text{NaClO}$  (b) et par  $\text{Cl}_2$  (c), (Kolodziejski *et al.*, 1982).



**Figure 47-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$ : (a) boues de pâte à papier, (b) lignine, (c) holocellulose, (d) cellulose extraite de pâte à papier (Jackson *et al.*, 1997b).

La faible teneur en composés aromatiques est confirmée par les résultats des microanalyses (**tableau 12**) puisque le rapport atomique des proportions en hydrogène par rapport au carbone est supérieur à 1 (en moyenne : H/C = 2,39).

**Tableau 12** - Résultats des microanalyses (exprimés en pourcentage) de la matière organique réfractaire de différentes préparations de lyophilisation.

Eléments	Produit de lyophilisation des eaux épurées		Fractions du tamisage moléculaire			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	de faible poids		de haut poids	
			3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
C	32,48	32,34	30,77	31,03	37,17	36,91
H	4,73	4,83	7,23	7,24	8,02	8,03
Rapport atomique <sup>b</sup>	1,74	1,79	2,82	2,89	2,59	2,61

Note : a ; 1, 2, 3, et 4 correspondent aux produits de lyophilisation d'échantillons d'eaux épurées prélevés à différentes dates.

b ; rapport atomique = (%H)/(%C/12)

### 2.3- Hydrolyse acide de la matière organique des eaux épurées

Afin d'estimer la fraction hydrolysable de la matière organique des eaux épurées, une hydrolyse acide a été réalisée à partir de différents produits de lyophilisation.

La matière organique lyophilisée des eaux épurées est parfaitement solubilisée avant la réaction d'hydrolyse. Après 12 heures d'incubation à 100°C, un précipité est formé. La première démarche a consisté à estimer les teneurs respectives en carbone organique du surnageant et du précipité. Une perte de 20 à 30 % par rapport à la teneur initiale en COT des mélanges réactionnels est constatée (**tableau 13**). Nous pouvons émettre l'hypothèse que le produit d'hydrolyse est libéré sous forme gazeuse, donc non mesurable par la méthode employée.

Pour la charge restante, les conditions d'hydrolyse ne sont pas adaptées. Cette partie de la matière organique réfractaire est tellement stable que même une hydrolyse acide ne peut l'altérer.

**Tableau 13** - Répartition du carbone organique total après hydrolyse chimique de la matière organique des eaux épurées.

<i>Réaction de l'hydrolyse<sup>a</sup></i>	Estimation du COT après hydrolyse dosée dans le	
	Surnageant	Précipité
1	75,20 %	4,35 %
2	67,56 %	4,87 %
3	66,00 %	8,69 %
4	56,60 %	7,60 %
5	57,30 %	11,5 %

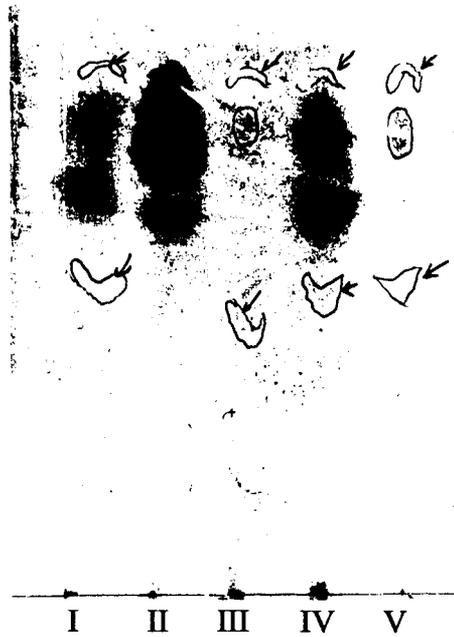
Note : a, les chiffres correspondent à cinq hydrolyses effectuées pour différents lyophilisats des eaux épurées.

Partant du principe que la matière organique réfractaire contient des polysaccharides de type hémicellulose, nous avons posé l'hypothèse qu'une hydrolyse peut libérer des composés osidiques.

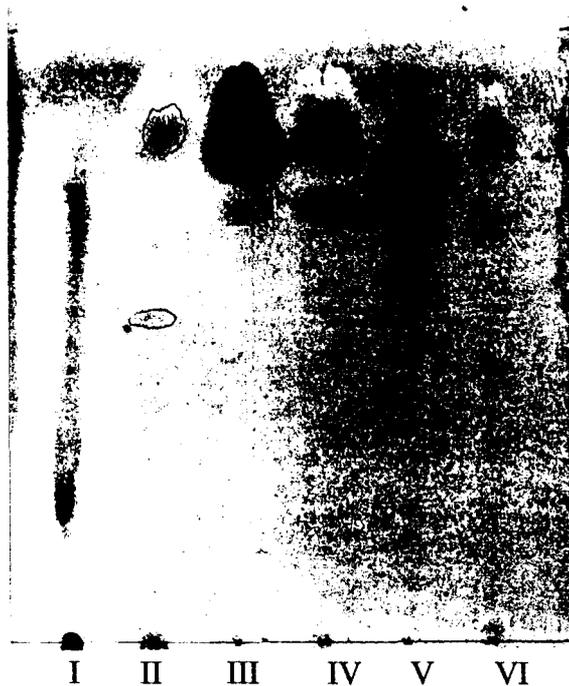
Le dosage des oses totaux, avant et après hydrolyse totale, aboutit au même constat : 75% des oses totaux initiaux sont présents dans le surnageant et 15% dans le précipité. Une perte de 10% est à nouveau constatée.

Les migrations sur couche mince de gel de silice (**figure 48**) de la matière carbonée réfractaire avant et après hydrolyse montrent des différences significatives. Le produit d'hydrolyse se sépare en deux tâches alors que la matière organique initiale s'étale en une bande de migration. Cette matière organique est donc hydrolysable et détectable avec un révélateur spécifique des composés glucidiques.

References	Dépôts
I	Produit hydrolyse 1 + amidon
II	Témoin amidon
III	Produit hydrolyse 1
IV	Produit hydrolyse 2 + amidon
V	Produit hydrolyse 2



References	Dépôts
I	Lyophilisat 3
II	Produit hydrolyse 3
III	Témoin amidon
IV	Produit hydrolyse 3 + amidon
V	Témoin glucose
VI	Produit hydrolyse 4



Note : 1, 2, 3, 4 correspondent aux produits de plusieurs lyophilisations des eaux épurées .  
[chromatographie sur gel de silice. Solvant de migration : propanol/pyridine/eau (7/1/12, v/v/v)]

**Figure 48-** Chromatogrammes sur couche mince de gel de silice des produits d'hydrolyse de la matière organique des eaux épurées.

## CHAPITRE 3- DISCUSSION

A l'issue du traitement d'épuration, les effluents papetiers contiennent encore des composés qualifiés de réfractaires. La composition de cette matière réfractaire est peu connue car les recherches se focalisent plus généralement sur les composés présentant une toxicité.

L'origine des effluents permet de préfigurer un profil de la composition chimique de la charge organique à épurer. Les familles potentiellement présentes ont permis de diriger les recherches.

Dans le cas présent, les extractions par le bromure d'acétyle ne permettent pas d'identifier la présence des lignines et de dérivés apparentés.

Les spectres infrarouges réalisés à partir des eaux de pâte à papier par Jackson et Line (1997b) ont également confirmé l'absence de dérivés aromatiques.

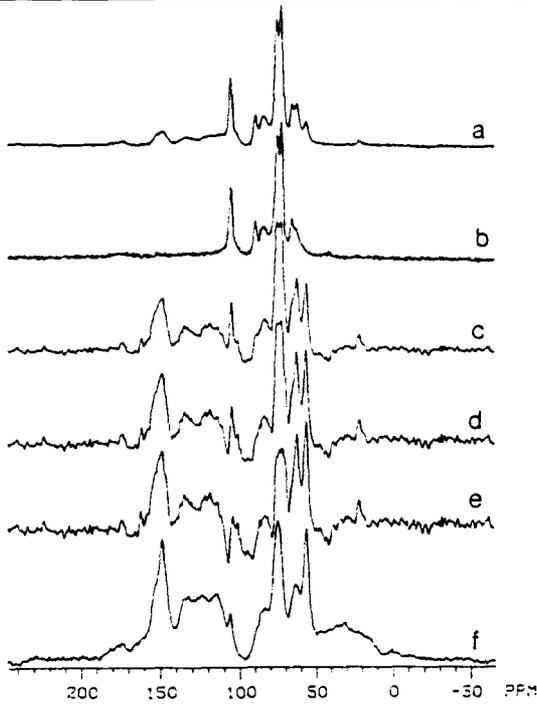
De même, les spectres infrarouges présentés par Sun *et al.* (1998) à partir de complexes lignine-polysaccharidiques nous incitent à penser que ces structures aromatiques sont peu présentes dans nos spectres.

L'analyse en RMN du  $^{13}\text{C}$  a révélé des profils spectraux (**figures 41 et 42**) correspondant à une structure polysaccharidique. La comparaison avec les spectres d'extraction de cellulose, d'holocelluloses (**figure 43**), et d'hémicelluloses (**figure 44**) illustrent parfaitement cette conclusion.

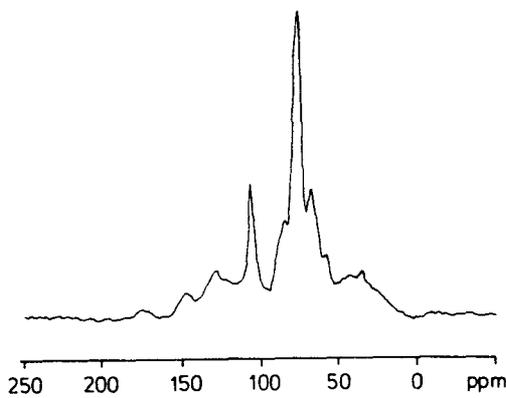
La présence de structures aromatiques est manifeste, mais leur importance est faible par rapport aux spectres référencés des complexes lignine-polysaccharides (**figure 49**) ou de lignines (**figure 50**).

Les déplacements chimiques de forte intensité dans la région 50 à 75 ppm sont fréquemment observés dans les profils spectraux d'échantillons de bois traités (**figure 49**).

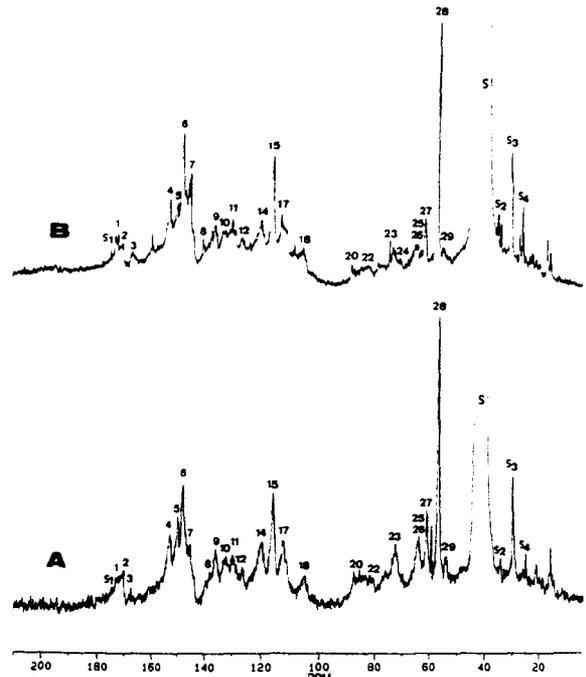
Beyer *et al.* (1997) obtiennent un pic prépondérant dans la région 60-80 ppm en analysant la charge organique de boues de production de pâtes de bois (**figure 51**).



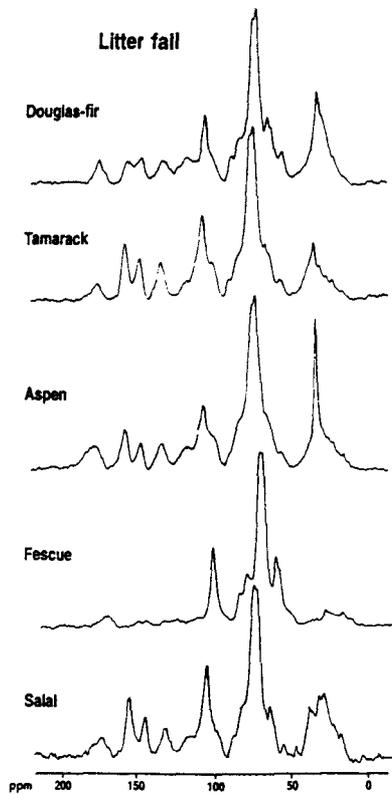
**Figure 49-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  d'études des interactions de complexes lignine-polysaccharides : (a) extrait bois brut ;(b) holocellulose des gaz de traitement au chlore ; (c, d, e) différence du spectre b avec a, en augmentant graduellement l'intensité du spectre b ; (f) fraction lignine enrichie en complexes lignine-polysaccharides (Kolodziejcki *et al.*, 1982).



**Figure 51-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  d'une préparation de pâte de bois (Beyer *et al.*, 1997).



**Figure 50-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  de polymères de lignines traitées (Pascoal Neto *et al.*, 1996).



**Figure 52-** Spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  de litières foliaires (Preston *et al.*, 1997).

Les profils de résonance du  $^{13}\text{C}$  (**figure 52**) de litières foliaires de Preston *et al.* (1997) corroborent la présence d'une structure polysaccharidique voisine de ce que nous obtenons avec la charge organique des eaux épurées.

De plus, ces auteurs ont effectué leurs prélèvements dans des domaines forestiers constitués par les mêmes essences que celles utilisées pour la production de la pâte thermomécanique du site (sapin, épicéa, peuplier).

En conclusion, la matière organique réfractaire du site d'épuration de la papeterie possède une structure complexe essentiellement composée d'hémicelluloses. La possibilité d'hydrolyse par voie chimique a été démontrée, mais l'identification des unités glucidiques libérées n'a pas abouti.

Bien qu'inattendue, la présence de polysaccharides est souvent notée dans les eaux de pâtes de bois blanchies, et dans les eaux blanches des machines à papier. Pour Jansson et Back (1975) plus de la moitié des matières organiques des eaux de pâtes de bois et de machines sont d'origine glucidique. 15 à 20% sont apparentées aux lignines, et 2 à 5 % sont inorganiques. Ces auteurs identifient aussi des hémicelluloses de type glucomannane conservant toujours leur groupement acétyl après les étapes de fabrication des pâtes thermomécaniques.

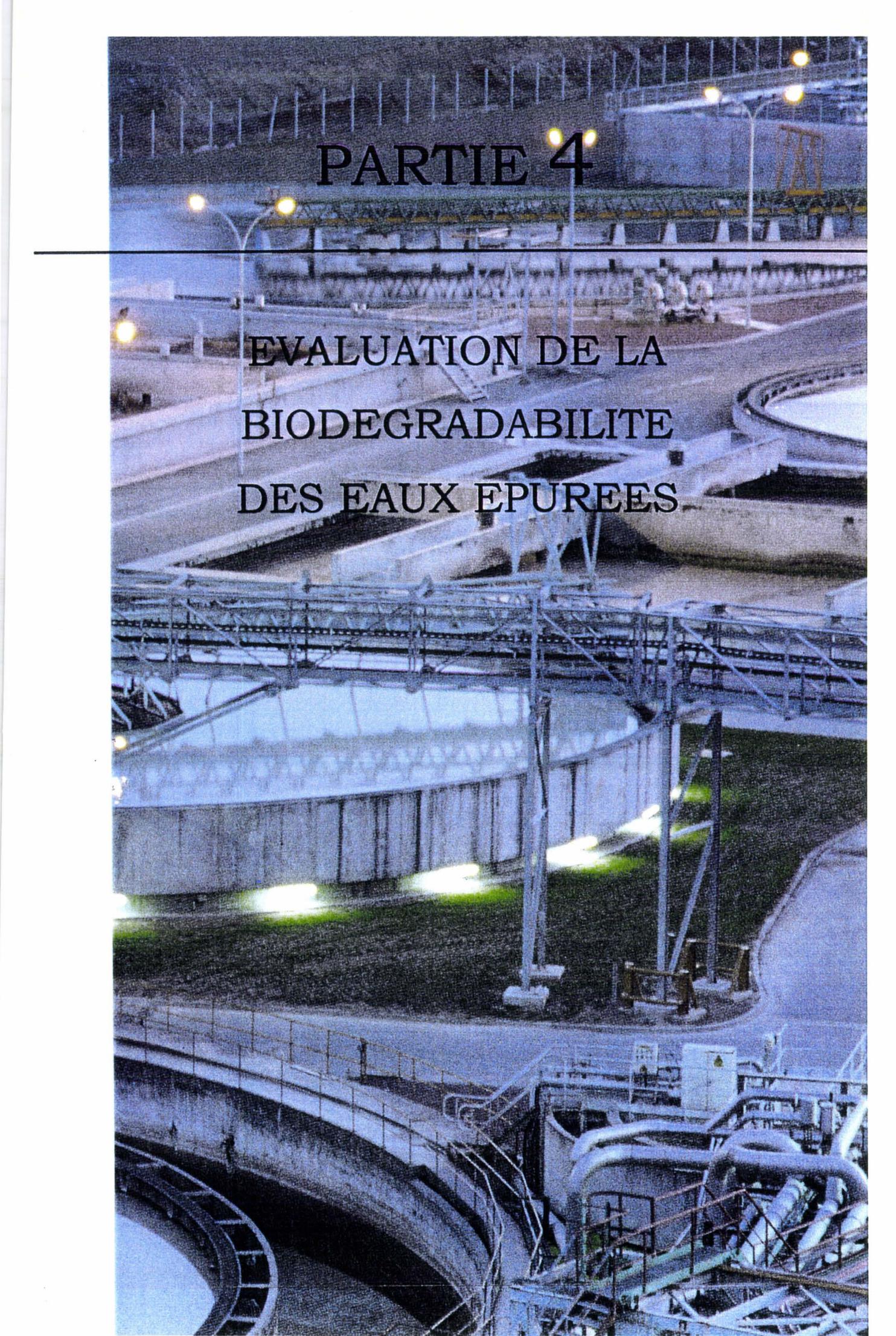
Haw *et al.* (1984) indiquent que les liaisons des fonctions carbonyle et méthyle avec les groupements acétate présents dans les hémicelluloses sont susceptibles d'être hydrolysées au moment du raffinage et du blanchiment de la pâte de bois.

Pranovich *et al.* (1994) soulignent également la faible teneur (0,6%, p/p) en lignine dissoute, même après le blanchiment au peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin qui favorise pourtant l'extraction de ces composés du bois.

La composition des eaux de production papetière est difficilement qualifiable dans sa totalité. Des structures ne peuvent être révélées. Jansson (1980) souligne cet état de fait par la mise en évidence que 75 % des acides uroniques de la charge initiale demeurent dans les eaux épurées,

traduisant à ce niveau la présence d'une charge réfractaire d'origine polysaccharidique. Malheureusement, pour notre cas d'étude, leur détection par un dosage des fonctions carbonyles s'est avéré infructueuse. La complexité de la structure du réfractaire, et la charge minérale des eaux épurées rendent délicat l'application de ces techniques de dosage.

Dans le bois, les acides uroniques, comme les acides 4-O-méthylglucuroniques présentent une liaison chimique avec la matrice xylane très résistante aux hydrolyses. Le degré de dégradation biologique de ces acides est faible par rapport aux autres composés des hémicelluloses.



PARTIE 4

EVALUATION DE LA  
BIODEGRADABILITE  
DES EAUX EPUREES

## CHAPITRE 1 - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1- Préparations enzymatiques

#### ● Enzymes

Plusieurs activités enzymatiques (**tableau 14**) ont été incubées en présence de la matière organique des eaux épurées.

**Tableau 14-** Enzymes et substrats spécifiques utilisés.

ENZYMES	Substrats
<b>CELLULASE</b> d' <i>Aspergillus niger</i> , Sigma	Cellulose en poudre (CC31, Whatman)
<b>HEMICELLULASE</b> d' <i>Aspergillus niger</i> , Sigma	Hémicellulose (gomme, graine de caroube, Sigma)
<b>XYLANASE</b> de <i>Trichoderma viride</i> , Sigma	Poly-xylopyranose (Xylane, Sigma)

#### ● Conditions expérimentales

Les réactions enzymatiques sont effectuées dans des tubes à essai contenant 5 mL (volume final) de solution. Chaque réaction est réalisée en triple exemplaire selon les conditions d'incubation précisées dans le **tableau 15**.

**Tableau 15-** Descriptif des conditions réactionnelles des essais enzymatiques

ENZYMES	<i>Cellulase</i>	<i>Hémicellulase</i>	<i>Xylanase</i>
Substrat (mg)	Cellulose en poudre (5)	Hémicellulose (5)	Xylane (5)
Unité d'enzyme (U)	1	1	10
Lyophilisat (mg)	5	5	5
Volume réactionnel (mL)	5	5	5
Tampon acétate, pH	5,0	5,0	4,5

**● Mise en évidence des activités**

- ✓ La **cellulase** libère des unités glucose. Elles sont dosées par méthode enzymatique avec la glucose oxydase (glucose assay kit, Sigma) et une lecture de l'absorbance à 540 nm.
- ✓ L'**hémicellulase** libère du galactose, du mannose et du glucose. La libération du glucose dosé par la glucose oxydase (glucose assay kit, Sigma) est la seule méthode envisageable. En effet, des dosages moins sélectifs sont biaisés par la présence de sucres réducteurs dans les impuretés des préparations de l'hémicellulose.
- ✓ La **xylanase** libère des unités xylose. Ce glucide peut être détecté par la méthode colorimétrique de dosage des sucres réducteurs avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique [D.N.S.] (Sigma) décrite par Miller (1959). 0,2 mL de solution à doser sont mélangés à 0,6 mL de la solution de DNS. Après avoir porté le mélange à 100°C pendant 10 minutes, il faut refroidir l'ensemble dans la glace puis ajouter 3,2 mL d'eau distillée.  
Les valeurs des absorbances à 540 nm permettent de calculer la teneur en sucres réducteurs de l'échantillon par rapport à des courbes réalisées à partir de concentrations connues en glucides (glucose, galactose, mannose, xylose).

Le dosage des produits formés est effectué en double exemplaire sur trois volumes réactionnels distincts afin d'exprimer une valeur moyenne et un écart type pour chaque condition opératoire.

**1.2- Préparations bactériennes**

A partir de la flore bactérienne présente sur le site d'épuration, différentes études prospectives ont été engagées dans le but d'estimer leur capacité minéralisatrice sur la matière organique réfractaire des eaux épurées.

Avant d'engager les essais avec différents isolats, il était nécessaire de vérifier si les composés réfractaires des échantillons n'étaient pas toxiques ou inhibiteurs de la croissance bactérienne.

Dans ce but, deux souches de la collection du laboratoire (*Escherichia coli* et *Micrococcus luteus*) sont pré-incubées en culture liquide riche (bouillon nutritif, Biokar Diagnostics) pendant 24 heures à 30°C avec agitation (100 tours.min<sup>-1</sup>). 0,1 mL de ces pré-cultures est

inoculé dans 10 mL de milieu riche complétement par différentes quantités de lyophilisats des eaux épurées correspondant aux concentrations prévues pour nos expériences ultérieures. Après 3 jours d'incubation à 30°C avec agitation, les multiplications bactériennes de chaque triplicata sont estimées par la mesure de l'absorbance à 600 nm (Uvikon 940, Kontron).

Pour les essais impliquant des souches isolées des bassins, une incubation de 10 jours est réalisée à 30°C avec agitation (100 tours.min<sup>-1</sup>) dans une solution concentrée des eaux du rejet (100 mg C.L<sup>-1</sup>) stérilisées (110°C, 30 min). Aucun apport nutritif n'est assuré.

L'estimation de la dégradation de la matière organique réfractaire a été réalisée par comparaison des mesures du COT des aliquotes de surnageants après décantation et microfiltration des cultures liquides par rapport à un milieu incubé en présence d'azide de sodium (poison métabolique).

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne obtenue pour les triplicatas (écart type) de chaque isolat incubé.

### 1.3- Préparations fongiques

#### ● Souches fongiques

Deux basidiomycètes, *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767 (ATCC24725, American Type Culture Collection) et *Trametes* (syn-*Polyporus*, syn-*Dichomitus*, syn-*Coriolus*) *versicolor* DSM3086 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) sont maintenus sur milieu gélosé (extrait de malt (Biokar Diagnostics), 30 g.L<sup>-1</sup>; agar (Sobigel), 15 g.L<sup>-1</sup>; pH 5,5).

Il s'agit de champignons de la pourriture « blanche » du bois.

#### ● Préparation de l'inoculum

Le mycélium développé sur le milieu gélosé précédent est placé en incubation dans 30 mL de milieu standard (Tien et Kirk, 1984a), à 30°C sans agitation. La composition du milieu est précisée dans le **tableau 16**, cette formule est uniquement utilisée lors des pré-cultures fongiques.

Après cinq jours de culture, l'inoculum fongique est obtenu par homogénéisation de mycélium dans de l'eau stérile en présence de billes de verre de 3 mm de diamètre.

**Tableau 16-** Composition pour un litre d'eau distillée du milieu standard pour culture fongique selon Tien et Kirk (1984a).

REFERENCE	Composants	Quantité
<b>MILIEU STANDARD</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	96 mg
	Solution d'oligo-éléments	1 mL
	Thiamine-HCl	1 mg
	Glucose	10 g
	Alcool vératrylique	252 mg
	Tartrate de sodium	20 mM, pH 4,5
	Eau distillée	QSP 1L
<b>SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS</b>	Nitriloacétate	1,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	NaCl	1,0 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
	$\text{CoSO}_4$	100 mg
	$\text{CaCl}_2$	82 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg
	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10 mg
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	10 mg
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg
	Eau distillée	QSP 1L

#### ● Culture en présence de la matière organique réfractaire

Des triplicatas de 30 mL de solution basale (**tableau 17**) définie par de Kirk *et al.* (1978) sont autoclavés (110°C, 30min) dans des flacons à plasma de 500 mL avec septum. Ces flacons reçoivent ensuite 2 mL d'une solution concentrée composée de matière organique réfractaire lyophilisée (22,5 mg.mL<sup>-1</sup>), de glucose (0,15 mg.mL<sup>-1</sup>) et de sulfate de magnésium (0,75 mg.mL<sup>-1</sup>). Cette solution concentrée est préalablement filtrée sur une membrane en fibre de verre (type A/C) et stérilisée par microfiltration (filtre de 0,45 µm, Millipore).

Chaque flacon est inoculé avec 0.1 mL de la suspension mycélienne.

Les flacons sont incubés à 30°C pendant 21 jours sans agitation.

Après 5 jours de culture, les flacons peuvent être purgés stérilement avec de l'oxygène pur (1 bar, 2 min). Cette opération est renouvelée toutes les 48 heures pendant 8 jours.

Les expérimentations d'évaluation de la biodégradabilité de la matière organique réfractaire ont été réalisées à partir de plusieurs prélèvements des eaux épurées. Les lyophilisats préparés recouvrent une période d'activités de douze mois. Si les eaux usées du site sont variables qualitativement et quantitativement en fonction du produit fini, les expérimentations tiennent compte de ces fluctuations.

**Tableau 17-** Composition pour un litre de solution basale pour les milieux de culture fongique.

Composant	Quantité
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g
Solution d'oligo-éléments (tableau 16)	1 mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	96 mg
Tartrate de sodium	20 mM, pH 4,5

#### ● Evaluation de la biodégradation

Après incubation, les cultures sont filtrées sur une membrane en fibre de verre (type A/C). La décoloration du filtrat est évaluée par la mesure de l'absorbance à 350 nm. Cette longueur d'onde permet d'apprécier les variations d'absorbance de la matière organique réfractaire sans interférences avec les protéines potentiellement excrétées lors de la croissance mycélienne ou avec les différents composants du milieu de culture.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par comparaison avec des cultures non inoculées et incubées sous les mêmes conditions.

Le mycélium est ensuite repris dans 15 mL d'une solution de soude (0,1 N) pour libérer les molécules éventuellement adsorbées sur la paroi (Perez *et al.*, 1997). La couleur de ces eaux

de lavage est estimée comme précédemment et les valeurs obtenues sont prises en compte pour l'estimation finale du pourcentage de décoloration.

Le mycélium récupéré est placé à l'étuve à 100°C pendant 24 heures pour estimer la quantité de biomasse développée.

### ● Détection d'activités enzymatiques

- ✓ Les activités peroxydasiques sont mises en évidence par une absorbance croissante à 420 nm due à l'oxydation du 2,2'-azino-bis-ethylbenthiazoline [ABTS] selon Wolfenden et Wilson (1982).

Une aliquote du surnageant de culture fongique est reprise dans un tampon malonate, 50 mM, pH 5,0 ; en présence d'ABTS 0,5 mM ; de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  1 mM ; et de  $H_2O_2$  0,5 mM (la cuve témoin ne contient pas de  $H_2O_2$ ).

L'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol [2,6-DMP] utilisé par Périé et Gold (1991) permet également de rechercher la présence de peroxydases.

Le suivi de l'absorbance à 469 nm du mélange réactionnel contenant du  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 1 mM ; 2,6-DMP 1 mM ;  $H_2O_2$  0,5 mM ; pH 4,5, tampon malonate de sodium 50 mM ; permet de visualiser cette activité dans une aliquote du surnageant de culture. Ici encore la cuve témoin ne contient pas de  $H_2O_2$ .

Dans les deux cas précédents, l'absence de  $MnSO_4$  et de  $H_2O_2$  dans la cuve témoin permet de doser l'activité peroxydasique Mn-indépendante.

- ✓ Les activités de la lignine-peroxydase ont été révélées par la détection de l'oxydation de l'alcool vératrylique en véraldéhyde comme l'ont décrit Tien et Kirk (1984b).

Un échantillon du filtrat de culture fongique est incubé à 37°C dans un tampon tartrate, 200 mM, pH 3,0 ; en présence d'alcool vératrylique 0,02 M. La réaction est déclenchée par ajout de  $H_2O_2$  0,04 mM. L'oxydation est suivie par une mesure de l'absorbance à 310 nm.

Les activités enzymatiques, réalisées en triple exemplaire, sont exprimées par la quantité de produit oxydé ( $nmol \cdot mL^{-1}$ ) par minute à partir des coefficients d'extinction molaire respectifs de l'ABTS,  $\epsilon_{420} = 3600 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  ; du 2,6-DMP,  $\epsilon_{469} = 27500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  ; et du véraldéhyde,  $\epsilon_{310} = 9300 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

## CHAPITRE 2- RESULTATS

La structure et la complexité, de nature polysaccharidique, de la matrice organique des eaux épurées permet d'envisager une étude de leur biodégradabilité. Pour cela, nous avons suivi une approche en trois étapes. Des essais de dégradation par des enzymes purifiées, par des isolats bactériens du site d'épuration et enfin par des champignons de la pourriture blanche ont été développés.

### **2.1- Essais de dégradation de la matière organique réfractaire par des enzymes purifiées**

Cette approche consiste à effectuer des réactions de dégradation de la matière organique réfractaire par des enzymes purifiées capables de dégrader des substrats polysaccharidiques.

Le dosage des produits de dégradation permet d'estimer l'efficacité des activités enzymatiques vis-à-vis de la matière organique présentée.

Lors d'études préliminaires, le dosage des sucres réducteurs a été envisagé pour détecter les produits de l'hydrolyse de la matière organique par la cellulase. Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas exploitables. Les concentrations présentes dans la solution pure de cellulose et des produits de lyophilisation des eaux épurées sont élevées. Il n'est pas envisageable de révéler les produits des activités de dégradation dans ces conditions.

Cependant, la méthode de dosage enzymatique du glucose a permis de montrer que les activités cellulases sont inhibées par la présence de la matière organique réfractaire (**tableau 18**). Lorsque l'enzyme est incubée en présence du produit de lyophilisation des eaux épurées et de cellulose, il n'y a aucune libération de glucose supplémentaire. Les quantités mesurées pour ce mélange réactionnel correspondent à la somme des concentrations obtenues séparément dans les préparations de cellulose et des produits de lyophilisation.

Par comparaison avec la teneur initiale en glucose du lyophilisat, la cellulase en présence uniquement de la matière organique réfractaire semble libérer des unités glucosidiques (23  $\mu\text{g}$  de glc dosé par mL de mélange réactionnel) correspondant à 10  $\mu\text{g}$  par mg de lyophilisat.

L'hémicellulase n'a aucune activité sur la charge organique des eaux épurées. Les dosages n'ont mis en évidence que la teneur initiale de la matière organique réfractaire (**tableau 18**).

Pour la détection des produits de dégradation par la xylanase, le dosage des sucres réducteurs a pu être appliqué. Ce dernier ne révèle pas de sucres libres dans la préparation de xylane et dévoile parfaitement les produits de dégradation après contact avec l'enzyme.

En présence de la matière organique des eaux épurées, la xylanase ne libère aucune fonction réductrice (**tableau 18**).

**Tableau 18-** Estimation de la dégradation de la matière organique des eaux épurées par différentes enzymes.

<u>Enzyme : CELLULASE</u>	Technique de dosage : Glucose oxydase
<i>Mélange réactionnel</i>	<u>Quantité de glucose dosé (µg/mL)</u>
	<b>moyenne (écart type)</b>
<i>Témoin : cellulose uniquement</i>	7,20 (1,00)
<i>Témoin : lyophilisat des eaux épurées uniquement</i>	10,80 (1,10)
<i>Cellulose + cellulase</i>	52,20 (8,20)
<i>Cellulose + cellulase + lyophilisat</i>	20,60 (0,20)
<i>Cellulase + lyophilisat</i>	23,20 (2,40)

<u>Enzyme : HEMICELLULASE</u>	Technique de dosage : Glucose oxydase
<i>Mélange réactionnel</i>	<u>Quantité de glucose dosé (µg/mL)</u>
	<b>moyenne (écart type)</b>
<i>Témoin : hémicellulose uniquement</i>	0,00
<i>Témoin : lyophilisat des eaux épurées uniquement</i>	13,66 (0,78)
<i>Hémicellulose + hémicellulase</i>	54,88 (4,15)
<i>Hémicellulose + hémicellulase + lyophilisat</i>	15,39 (0,73)
<i>Hémicellulase + lyophilisat</i>	14,77 (0,41)

<u>Enzyme : XYLANASE</u>	Technique de dosage : Méthode au DNS
<i>Mélange réactionnel</i>	<u>Quantité de sucres réducteurs dosés (µg/mL)</u>
	<b>moyenne (écart type)</b>
<i>Témoin : xylane uniquement</i>	0,00
<i>Témoin : lyophilisat des eaux épurées uniquement</i>	100 (20)
<i>Xylane + xylanase</i>	517,50 (95,46)
<i>Xylane + xylanase + lyophilisat</i>	555 (25,98)
<i>Xylanase + lyophilisat</i>	90 (10)

Il n'a donc pas été possible de dégrader la matière organique réfractaire par des préparations enzymatiques. De plus, la complexité de la charge organique des eaux épurées a restreint le choix des techniques de dosages couramment appliquées et adaptées à ce type de démarche.

## 2.2- Dégradation de la matière organique réfractaire par des cultures bactériennes

La matière organique réfractaire ne semble pas inhiber la croissance bactérienne comme le montrent les résultats obtenus avec *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* (tableau 19).

**Tableau 19-** Croissances bactériennes après 72 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de matière réfractaire.

Teneur en COT (mg COT/l)	Absorbance à 600 nm des cultures, <b>moyenne</b> (écart type)	
	Souches bactériennes	
	HB 101- <i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
0	<b>0,67</b> (0,01)	<b>0,64</b> (0,01)
100	<b>0,68</b> (0,02)	<b>0,60</b> (0,04)
200	<b>0,70</b> (0,03)	<b>0,65</b> (0,04)
300	<b>0,62</b> (0,05)	<b>0,75</b> (0,01)

Nous avons alors envisagé des expériences avec les isolats bactériens du site (tableau 20) en présence de la matière organique réfractaire concentrée comme unique source de carbone.

**Tableau 20-** Caractéristiques des souches isolées des boues activées

Référence <sup>a</sup>	Coloration de Gram	Morphologie cellulaire	Couleur colonies	Réactions aux tests		Identification
				Catalase	Oxydase	
Souche A <sub>1</sub>	+	irrégulière	non pigmentée	+	-	<i>Arthrobacter</i>
Souche B <sub>1,2</sub>	-	batônnets	jaunes	+	+	nd
Souche C <sub>2</sub>	-	batônnets courts	blanches	+	+	nd
Souche D <sub>1</sub>	+	coccus	blanches	-	-	nd

Note : a, référence attribuée aux isolats des boues activées du site (Partie 2- Chapitre 2)

Lors de ces expérimentations, la concentration en carbone organique total est de 100 mg par litre de culture. Cette concentration correspond à la gamme de mesure fiable de l'appareillage utilisé pour observer toute diminution de la teneur en COT. Elle équivaut à un rejet concentré 5 fois.

La prolifération bactérienne de ces cultures est très faible. Aucun trouble n'est observable visuellement. Seules des numérations sur milieu gélosé R<sub>2</sub>A ont révélé une faible multiplication bactérienne d'un facteur 10<sup>3</sup>.

Après 24 heures sans agitation, une aliquote des milieux est prélevée stérilement.

Afin de vérifier si la biomasse interfère sur les mesures du COT, les prélèvements sont microfiltrés avant le dosage. Aucune différence significative n'a été révélée, par conséquent les mesures de COT sont réalisées directement à partir des volumes prélevés dans les cultures.

Quelles que soient les conditions appliquées (**tableau 21**), la diminution en COT est estimée, en moyenne, à 15%.

**Tableau 21-** Dégradation de la matière organique réfractaire par des micro-organismes isolées des boues activées.

Origine de l'échantillon	Diminution de la teneur en COT (%)	Observations
✓ Dilution Bassin d'Aération	14,60	● <i>Ensemencement par une dilution d'un prélèvement des bassins d'aération (10<sup>-3</sup>).</i>
✓ Dilution BA (échantillon microfiltré avant mesure du COT)	16,92	
✓ Souche A <sub>1</sub>	12,30	● <i>Témoin expérimental : Lyophilisat + azide.</i>
✓ Souche A <sub>1</sub> (échantillon microfiltré avant mesure du COT)	14,23	
✓ Souche B <sub>1</sub>	13,53	● <i>Numération sur boîtes de Pétri (R<sub>2</sub>A)</i> <i>Prolifération faible d'un facteur 10<sup>3</sup>.</i>
✓ Souche B <sub>2</sub>	13,23	
✓ Souche C <sub>2</sub>	15,79	
✓ Souche D <sub>1</sub>	14,16	

Bien que les lyophilisats ne présentent que la matière organique réfractaire à la communauté bactérienne des boues activées, ces derniers permettent d'enregistrer une diminution de 15 % du COT. Les conditions opératoires (concentrations en substrats, agitation, température, temps d'incubation) sont différentes de celles rencontrées dans les bassins d'aération afin de favoriser la mise en place de voies métaboliques et d'activités spécifiques.

Le rendement mesuré demeure toutefois limité et confirme la définition de réfractaire que nous avons attribuée à la charge organique des eaux épurées du site.

La dégradation révélée peut être justifiée également par l'assimilation de résidus issus du traitement de préparation lors de la lyophilisation de la matière organique réfractaire.

Afin de favoriser la prolifération bactérienne et de satisfaire toutes les exigences nutritionnelles, les milieux de culture ont été complétés en glucose ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) et en apport vitaminique ( $1 \text{ ml.L}^{-1}$  ; la composition du mélange vitaminique est décrite dans la **partie 2, chapitre 1 §1.2-**). Ces nouvelles conditions n'ont pas permis d'améliorer les dégradations bactériennes.

### **2.3- Décoloration de la matière organique réfractaire par des cultures fongiques**

#### **● Essais préliminaires**

Deux souches de la pourriture blanche du bois ont été incubées en présence de la matière organique réfractaire des eaux épurées du site papetier.

*Trametes versicolor* présente des capacités de décoloration (absorbance à 350 nm) plus importantes que *Phanerochaete chrysosporium* (**tableau 22**).

**Tableau 22-** Décoloration obtenues par les cultures fongiques.

Souches fongiques	Pourcentage de décoloration Valeur moyenne (écart type)	Biomasse mg poids sec (écart type)
<b>Expérimentation n°1</b>		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	27,71 (5,16)	nd
<i>Trametes versicolor</i>	43,86 (2,41)	nd
<b>Expérimentation n°2</b>		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	31,72 (5,86)	152 (20)
<i>Trametes versicolor</i>	41,18 (4,47)	63 (4)

### ● Optimisation des conditions de culture

Aucune variation de pH par rapport au pH initial n'est observée au cours de l'incubation des milieux. Les décolorations observées sont assurées ne pas être influencées par ce paramètre (tableau 23).

Le manganèse est le plus souvent impliqué dans les activités peroxydasiques car il est constitutif du groupement prosthétique de ces enzymes. Nous avons employé deux concentrations ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mM ou 0,003 mM) afin d'observer son importance.

L'apport en manganèse peut être assuré à une concentration minimale de 0,003 mM puisqu'il favorise dans ces conditions les rendements de décoloration (tableau 23).

**Tableau 23-** Optimisation des conditions de cultures fongiques

Conditions de culture	pH final	Biomasse mg de poids sec	Pourcentage de décoloration moyenne (écart type)	
$\text{Mn}^{2+}$ , 0,1 mM	4,49 (0,05)	44,00 (5,57)	40,94 (5,91)	(1)
$\text{Mn}^{2+}$ , 0,003 mM	4,43 (0,02)	23,67 (5,51)	48,51 (3,46)	(1)
	5,02 (0,29)	21,00 (6,89)	65,26 (9,80)	(2)
$\text{Mn}^{2+}$ , 0,003 mM avec $\text{O}_2$	4,43 (0,03)	23,33 (1,53)	63,88 (4,26)	(2)
	4,94 (0,12)	21,20 (6,18)	73,86 (6,15)	(2)

Note : (1) et (2) correspondent à la référence de deux lyophilisations de la matière réfractaire.

Nous avons vérifié qu'un apport en oxygène améliore l'efficacité des décolorations (**tableau 23**) : avant la mise en oeuvre d'un flux d'oxygène les rendements de décoloration sont de 55%. L'apport effectué les amène à 70%.

#### ● Evaluation de la biodégradabilité du réfractaire

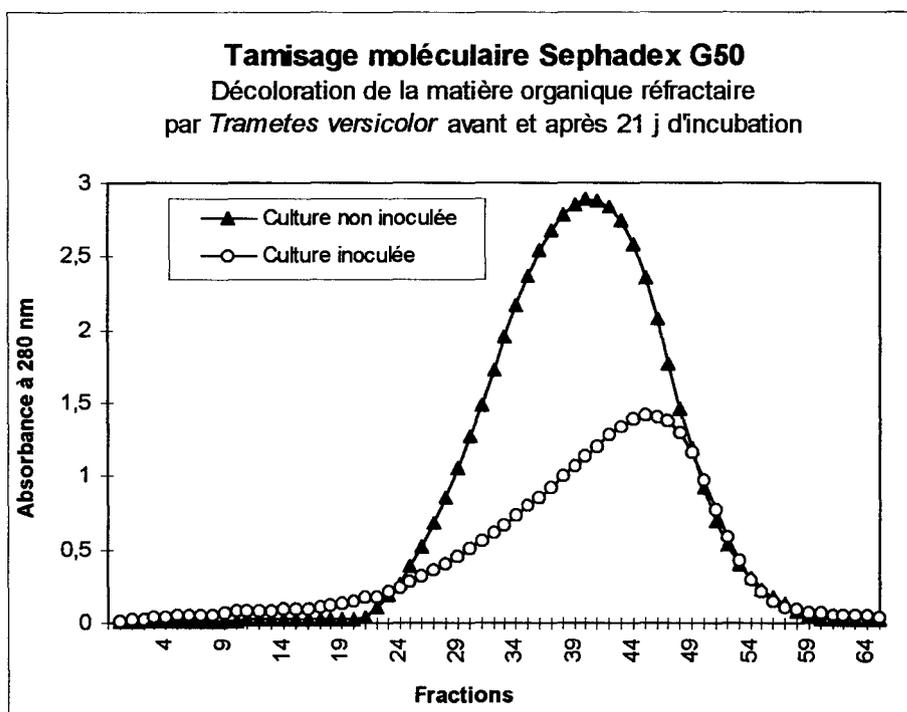
Afin de vérifier si les champignons réalisent effectivement une biodégradation des molécules, nous avons comparé la polydispersion des poids moléculaires de la matière organique réfractaire avant et après décoloration par *Trametes versicolor*. Des aliquotes des milieux de culture sont concentrées à un volume de 1 mL par évaporation sous vide.

L'estimation de la polydispersion des poids moléculaires est réalisée avec une colonne Sephadex G50 en suivant le protocole décrit dans la **partie 3- chapitre 1**. Les profils d'élution des surnageants de culture avant et après 21 jours d'incubation (**figure 53.A**) indiquent une diminution des hauts poids moléculaires, témoin d'une dégradation de la matière organique des eaux épurées.

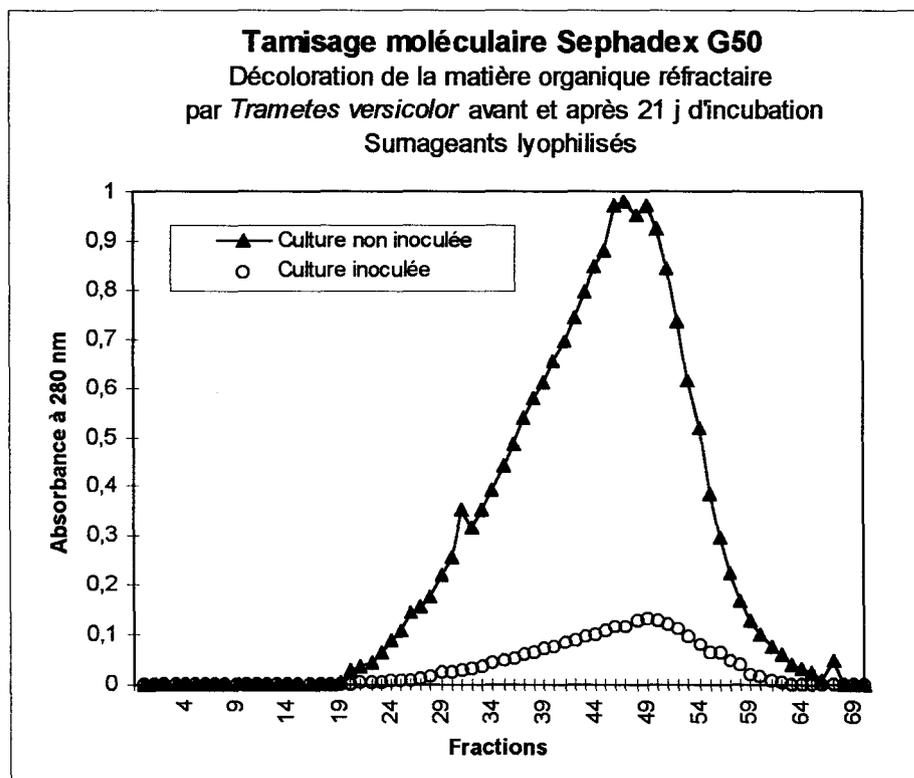
Le protocole de lyophilisation (**Partie 3- chapitre 1**) a été appliqué à des surnageants de cultures fongiques avant et après décoloration. Cette technique permet de concentrer et de dessaler les échantillons et d'exclure tous les composés ioniques pouvant interférer avec la chromatographie par tamisage moléculaire.

Les profils d'élution du tamisage moléculaire de ces nouvelles préparations confortent les résultats obtenus précédemment (**figure 53.B**).

A

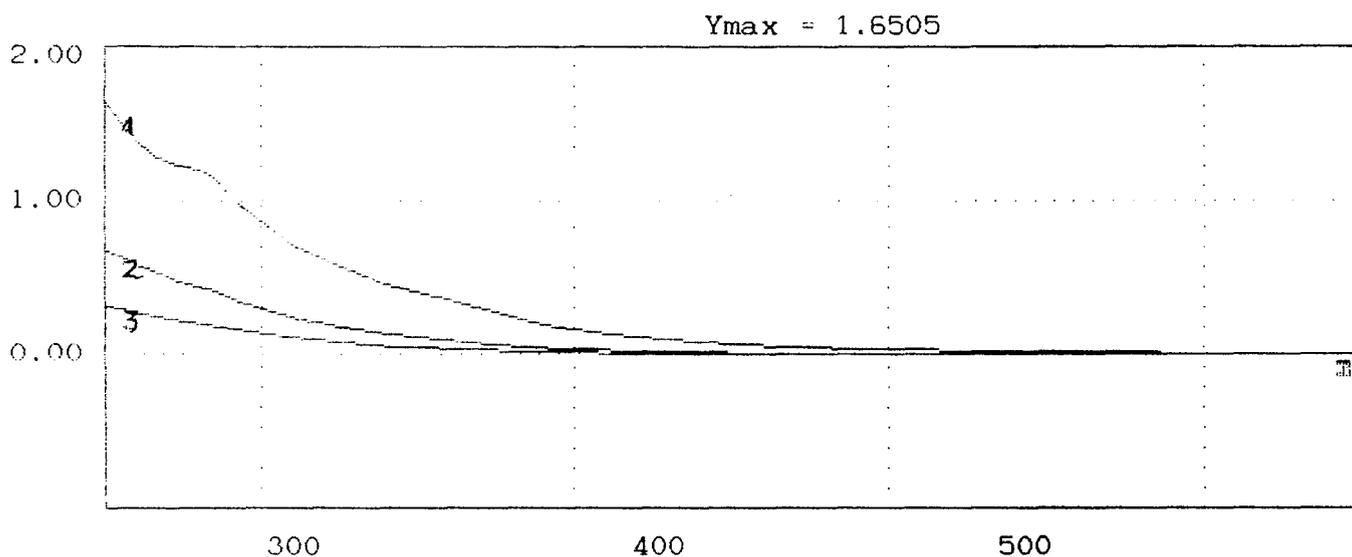


B



**Figure 53-** Profils d'élution des tamisages moléculaires sur Sephadex G50 des surnageants de culture fongique avant et après décoloration.

La valeur des absorbances à une longueur d'onde donnée étant proportionnelle à la teneur en matière organique (Thomas *et al.*, 1993), l'observation des spectres en UV des surnageants des cultures (**figure 54**) confirment une diminution de teneur en matière organique.



**Figure 54-** Comparaison des spectres d'absorbance en UV des surnageants de cultures fongiques avant (1) et après (2,3) décoloration.

#### ● Mise en évidence des activités enzymatiques impliquées

Les décolorations observées sont probablement le résultat d'activités enzymatiques. Nous avons recherché à localiser le système enzymatique impliqué. Pour cela, le mycélium obtenu après une culture de *Trametes versicolor* ayant décoloré la matière réfractaire est à nouveau incubé dans un milieu liquide de même composition mais exempt de glucose. Après trois jours de contact, aucune décoloration significative n'a été mesurée.

En parallèle, si le filtrat de cette culture reçoit une nouvelle incorporation de matière organique réfractaire à une concentration identique à celle de départ, aucune décoloration n'est perceptible.

A partir des surnageants de cultures, plusieurs activités enzymatiques ont néanmoins été recherchées. Il est en effet difficile d'admettre une pénétration de cette matière organique réfractaire dans le mycélium.

L'oxydation de l'alcool vératrylique n'a pas été détectée dans les surnageants des cultures. Les activités spécifiques de la lignine-peroxydase ne semblent pas être impliquées dans les décolorations observées.

Les deux autres méthodologies ont permis de détecter la présence de peroxydases.

L'oxydation de l'ABTS a été mise en évidence dans les surnageants de cultures après décoloration (**tableau 24**), mais les vitesses d'oxydation obtenues à partir des cultures fongiques d'une même série expérimentale sont assez fluctuantes.

**Tableau 24-** Mise en évidence des activités peroxydases dans les surnageants de cultures fongiques (dosage par ABTS).

Conditions de culture	Activités enzymatiques exprimées en nmol d'ABTS oxydés par ml et par minute.		
	Peroxydase totale	Peroxydase Mn-indépendante	Peroxydase Mn-dépendante
✓Témoin culture fongique	16,60	5,50	12,50
✓Mélanoïdines	25,00	9,70	13,80
✓Lyophilisats des eaux épurées			
(1)	147,20	55,50	91,60
(2)	105,50	41,60	59,70
(3)	300,00	266,70	33,30

Note : (1), (2) et (3) : références des dosages réalisés pour trois milieux de culture de composition identique.

Les résultats montrent que les activités peroxydasiques les plus représentées sont manganèse indépendantes. Ceci confirme les observations relatives à l'optimisation des conditions de décoloration (les milieux de culture liquides à faible teneur en manganèse ont présenté les meilleurs rendements de décoloration).

L'oxydation du 2,6-DMP (**tableau 25**) a permis également de mesurer des activités enzymatiques dans les surnageants de culture mais uniquement des activités peroxydases manganèse indépendantes.

**Tableau 25-** Mise en évidence des activités peroxydases dans les surnageants de cultures fongiques (dosage par 2,6-DMP).

Conditions de culture	Activités enzymatiques exprimées en nmol de 2,6-DMP oxydé par ml et par minute.		
	Peroxydase totale	Peroxydase Mn-indépendante	Peroxydase Mn-dépendante
✓Témoin culture fongique	0	0	0
✓Mélanoidines	3,60	1,10	2,50
✓Lyophilisats des eaux épurées			
(1)	4,00	3,20	0,73
(2)	0	0	0
(3)	21,80	21,80	0

Note : (1), (2) et (3) : références des dosages réalisés pour trois milieux de culture de composition identique.

En conclusion, *Trametes versicolor* décolore une solution concentrée en matière organique réfractaire du site d'épuration papetier. Le système actif impliqué pourrait correspondre à des activités peroxydasiques.

## CHAPITRE 3- DISCUSSION

L'estimation de la biodégradabilité de la charge organique des eaux épurées par des cultures bactériennes a été exprimée par la perte en carbone organique (mesures de la teneur en COT). Une diminution de 15% a été enregistrée à partir des incubations réalisées en présence de souches isolées des bassins d'aération.

Block *et al.* (1992) ont réalisé des essais de même nature avec des inoculats bactériens provenant de sources diverses. Ils ont constaté qu'après une période d'incubation de 21 jours, l'origine de l'inoculum introduisait très peu de variations sur la quantité de carbone organique biodégradable éliminé. La principale source de variance des résultats provenait plutôt des techniques d'analyses employées.

Nous avons ensuite montré que la matière organique réfractaire à l'action des bactéries pouvait être attaquée par des cultures fongiques.

Plus particulièrement, *Trametes versicolor* permet une décoloration de 70% (exprimée par le rapport des mesures d'absorbance à 350 nm) des cultures en milieu liquide contenant ces substances réfractaires.

L'observation d'une diminution des hauts poids moléculaires de ces substances au cours de l'incubation prouve en outre l'intervention d'un processus de biodégradation.

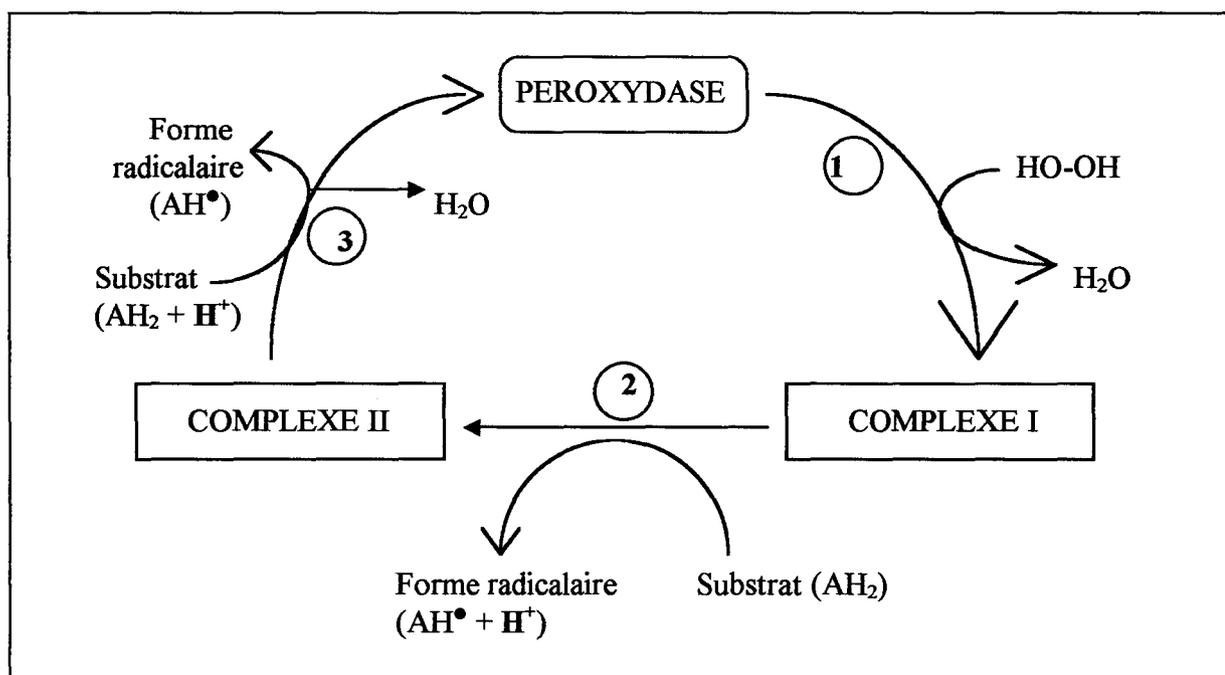
A l'issue des décolorations de la matière organique réfractaire effectuées par *Trametes versicolor*, des activités peroxydases manganèse dépendantes et indépendantes ont été détectées.

Ces activités peroxydases sont caractéristiques des champignons de la pourriture blanche, et sont responsables de leurs activités cataboliques exceptionnelles (Kirk et Farrell, 1987).

L'implication des peroxydases dans les mécanismes de décoloration est reconnue. Miyata *et al.* (1998) considèrent que les activités peroxydases manganèse dépendantes et

indépendantes sont les enzymes clés des décolorations fongiques. Malheureusement, les mécanismes réactionnels impliqués sont peu ou mal connus.

Les peroxydases sont des hydrogène peroxyde oxydoréductases. Leur fonctionnement s'explique par la formation d'un complexe obtenu après la perte de deux électrons. Le principe repose sur un schéma réactionnel compliqué. Il peut toutefois être décomposé de manière succincte en trois étapes (**figure 55**).



**Légende :** Etape 1- Perte de deux électrons pour le complexe.  
Etape 2- Gain d'un électron pour le complexe  $\rightarrow$  Possibilité d'oxydation d'une ou deux molécules de substrat.  
Etape 3- Gain d'un électron pour le complexe

**Figure 55** - Schéma réactionnel d'une activité peroxydasique.

En présence de peroxyde d'hydrogène, l'enzyme cède deux électrons pour former un premier complexe. Le retour à la forme initiale s'effectue en deux étapes par l'intermédiaire de la formation du complexe II grâce au gain de deux électrons. Ces deux électrons peuvent provenir de l'oxydation d'une ou deux molécules de substrat. De ces formes oxydées peut survenir une multitude de réactions en cascade indépendantes de l'enzyme.

La perte de ces deux électrons est couramment associée au groupement prosthétique de l'enzyme. Les éléments chimiques les plus souvent impliqués sont le fer ou le manganèse, qui cèdent respectivement un électron lors de la première étape ( $\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{IV}}$  ;  $\text{Mn}^{\text{II}} \rightarrow \text{Mn}^{\text{III}}$ ). Ils influencent et régissent les activités enzymatiques (Vares et Hatakka, 1997).

En outre, Brown *et al.* (1990) ont démontré que les éléments chimiques tels que le nickel, le molybdène, le zinc, le cobalt, ou le magnésium peuvent également induire les activités peroxydasiques.

Les papetiers utilisent plutôt les propriétés et les potentiels métaboliques des champignons de la pourriture blanche du bois pour réaliser du « biopulping », c'est-à-dire ramollir les fibres avant le raffinage et décolorer biologiquement la pâte de bois. *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor* sont les souches les plus communément appliquées (Paice *et al.*, 1989, 1993 ; Reid *et al.*, 1990 ; Monteiro et De Carvalho, 1998). Ces souches ont été ensuite utilisées pour décolorer des effluents papetiers avant leur épuration biologique ou leur rejet direct dans le milieu naturel (Ferrer *et al.*, 1991).

Les systèmes enzymatiques impliqués dans les décolorations d'effluents de papier kraft ont été identifiés par Michel *et al.* (1991). Il s'agit essentiellement de peroxydases exocellulaires à activités manganèse dépendantes.

Seuls Perez *et al.* (1997) ont réalisé des cultures fongiques avec des effluents papetiers préalablement épurés par des réacteurs anaérobies et aérobies. L'efficacité de décoloration des eaux épurées par les champignons de la pourriture blanche les amène à préconiser un développement des applications biotechnologiques. L'isolement, la purification, la caractérisation et la régulation de ces enzymes sont les étapes indispensables afin de développer un traitement biochimique efficace et rapide.

En ce qui concerne nos résultats, l'isolement des peroxydases manganèse indépendantes peut conduire également à une application attractive destinée à la décoloration des eaux usées de papeterie.

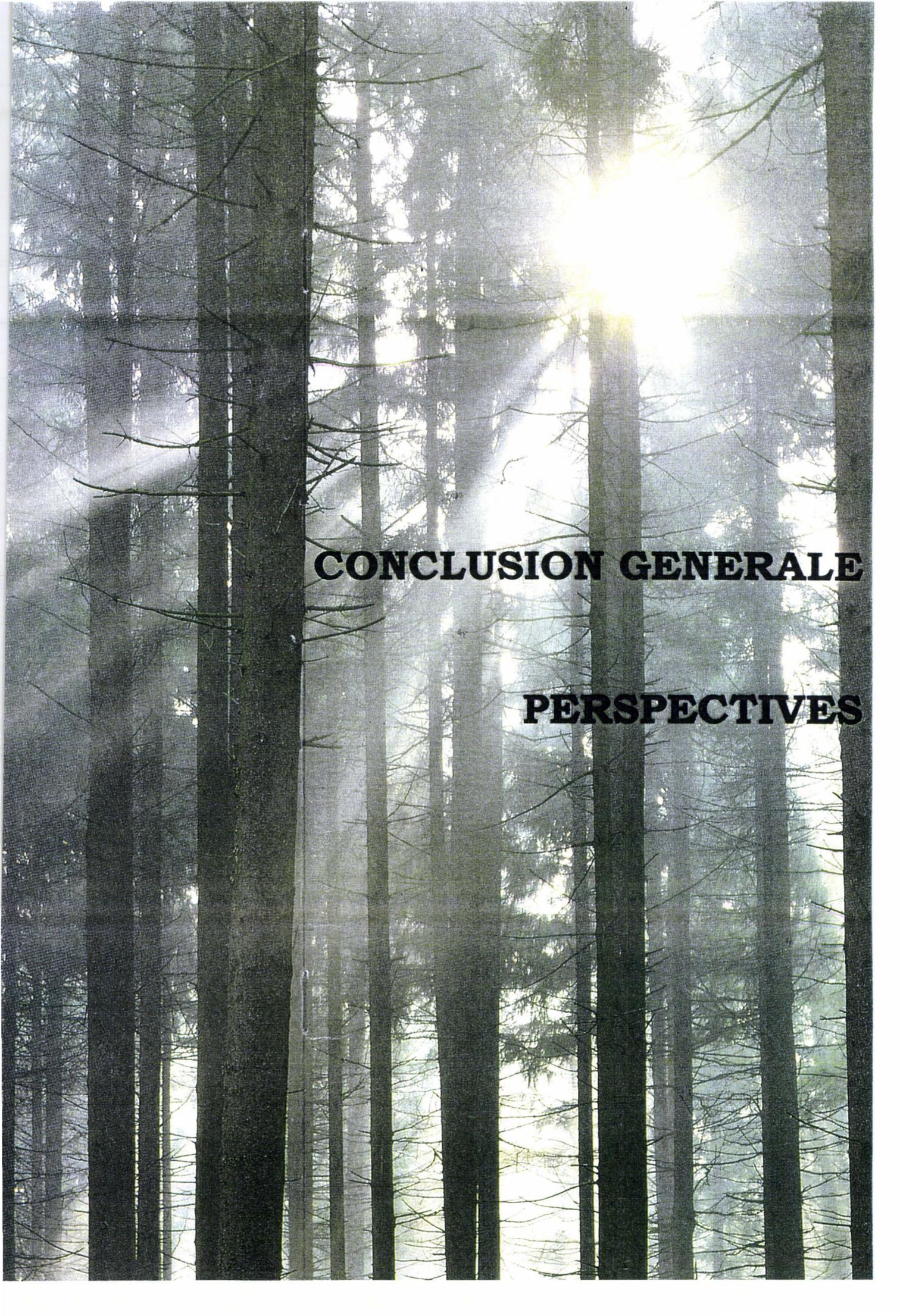
L'utilisation de peroxydases purifiées puis immobilisées sur des supports solides a déjà été envisagée pour traiter les eaux usées issues du traitement biologique (Davis et Burns, 1990) ou les effluents provenant des différentes étapes de la production papetière (Peralta-Zamora *et al.*, 1998).

Davis et Burns (1990) fixent leurs enzymes dans des billes d'alginate, et obtiennent des rendements de décoloration encourageants (20-30 %) pour des temps d'incubation courts (72 heures).

L'immobilisation sur de la silice modifiée ou des résines échangeuses d'ions, des activités peroxydasiques a permis à Peralta-Zamora *et al.* (1998) de décolorer, en quelques heures, différents effluents de production papetière.

La rapidité et l'efficacité du système présenté dévoile un essor potentiel d'applications biochimiques dans la compétition aux techniques de décoloration des effluents industriels.

Ce domaine de recherche présente de nombreuses ouvertures et autant d'applications rapidement exploitables.

A photograph of a forest with sunlight filtering through the trees, creating a bright, hazy atmosphere. The sun is positioned in the upper right quadrant, casting a strong glow and creating a lens flare effect. The trees are tall and thin, with their branches and leaves silhouetted against the bright light. The overall scene is peaceful and serene.

**CONCLUSION GENERALE**

**PERSPECTIVES**

La production de pâtes thermomécaniques blanchies au peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin nécessite l'utilisation de quantités très importantes en eau, qui vont se charger d'une pollution organique et minérale.

Ces effluents de site papetier sont épurés par un traitement biologique impliquant principalement des bassins d'aération à boues activées.

L'étude de la population microbienne cultivable de ces boues activées a révélé la présence de quatre groupes bactériens principaux dont un majoritaire. Une analyse échelonnée sur 26 mois a confirmé l'importance de ce dernier groupe identifié au genre *Arthrobacter*.

Ces germes ne sont ni cellulolytiques, ni amylolytiques, ni protéolytiques et n'utilisent pas les résidus simples de la lignine comme unique source de carbone. Le besoin en vitamines reflète également un caractère singulier. Ces observations nous permettent de penser que ces *Arthrobacter* participent plutôt au maintien de la structure du biofloc qu'à l'épuration proprement dite des effluents du site papetier.

Cette population pourrait en effet permettre de régulariser les variations des conditions nutritives couramment rencontrées dans ce type de traitement d'épuration. La charge organique à épurer est en effet variable sur le plan quantitatif et qualitatif en fonction des caractéristiques du produit fini.

La conception que nous proposons repose sur un métabolisme spécifique aux *Arthrobacter* qui seraient capables de stocker des « réserves » carbonées en présence d'une charge organique élevée des eaux de production. Ces « réserves » deviendraient disponibles en présence d'une situation de carence en substrats rapidement assimilables. La communauté bactérienne pourrait ainsi répondre aux exigences physiologiques permettant sa survie.

La mise en évidence de cette population bactérienne impliquée dans le maintien de l'architecture du biofloc et, par voie de conséquence, dans l'efficacité du système d'épuration souligne l'adaptation possible d'une population bactérienne au site étudié.

Ces conclusions illustrent la notion de microsociété au sein des boues activées, développée par différents auteurs.

Les eaux usées d'un site industriel après une épuration conventionnelle présentent toujours une matière organique que nous avons qualifiée de réfractaire. Cette source carbonée, qui est à l'origine de la coloration des effluents de la station d'épuration, ne permet pas d'envisager un recyclage, en l'état, des eaux au cours des stades de fabrication du papier.

Des analyses chimiques ont révélé une structure complexe proche des polysaccharides de type hémicellulose. Son caractère réfractaire s'explique par le fait qu'il ne s'agit pas d'une structure glucidique typique car celle-ci serait hydrolysée et assimilée rapidement au niveau des réacteurs biologiques.

La charge organique ainsi définie a une structure complexe dont les liaisons chimiques de polymérisation ne sont pas déstabilisées lors de l'épuration biologique.

Par conséquent, la matière réfractaire du site de traitement peut être issue soit directement des fibres de bois lors du raffinage et/ou du blanchiment de la production des pâtes thermomécaniques, soit des produits de transformations propres aux bassins d'aération.

Des essais de biodégradabilité de cette charge organique ont été entrepris. Il a été possible de décolorer les eaux par un champignon de la pourriture blanche du bois : *Trametes versicolor*.

Le profil de la polydispersion des poids moléculaires et des spectres UV avant et après décoloration ont permis de mettre en évidence une dégradation de la matière réfractaire.

La recherche des activités enzymatiques potentiellement impliquées dans ce processus a permis de caractériser la présence de peroxydases.

Ces enzymes sont peu connues ; elles sont définies comme des médiateurs dans les réactions de dégradation de matières organiques complexes. Dans des cultures donnant les meilleurs rendements de décoloration, un système enzymatique manganèse indépendant semble être le principal intervenant.

L'isolement et la purification de cette peroxydase permettront d'en étudier son mode d'action. Immobilisé, ce système actif peut permettre la mise en place d'un traitement biochimique, direct, de décoloration des eaux épurées.

A l'issue de ce travail, l'industriel dispose d'une étude biologique de son site de traitement des eaux.

A l'issue de ce travail, l'industriel dispose d'une étude microbiologique de son site de traitement des eaux.

C'est ainsi qu'il dispose de connaissances nécessaires à la gestion de la pollution générée afin de respecter les arrêtés préfectoraux et satisfaire les objectifs de sa politique environnementale.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

1. **Adamse, A. D.** (1968) Formation and final composition of the bacterial flora of a dairy waste activated sludge. *Wat. Res.* **2**, 665-671.
2. **Adamse, A.D.** (1970) Some characteristics of Arthrobacters from a dairy waste activated sludge. *Water Res.* **4**, 797-803.
3. **Akim, L.G., Fedulina, T.G., Shevchenko, S.M.** (1997)  $^{13}\text{C}$  NMR of lignins in aqueous alkali. II. Ionization effects on the spectra of technical lignins. *Holzforschung* **51**, 419-427.
4. **Almendros, G., Martinez, A.T., Gonzalez, A.E., Gonzalez-Vila, F.J., Fründ, R., Lüdemann, H-D.** (1992) CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR study of lignin preparations from wheat straw transformed by five lignocellulose-degrading fungi. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1297-1302.
5. **Amann, R., Glöckner, F., Neef, A.** (1997) Modern methods in subsurface microbiology : in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 191-200.
6. **Amann, R.I., Krumhloz, L., Stahl, D.A.** (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762-770.
7. **Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-163.
8. **Bailey, H.C., Young, L.** (1997) A comparison of the results of freshwater aquatic toxicity testing of pulp and paper mill effluents. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 305-313.
9. **Ban, S., Glanser-Soljan, M.** (1979) Rapid biodegradation of calcium lignosulfonate by means of a mixed culture of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1917-1928.
10. **Barbusinski, K., Miksch, K.** (1997) Relationships between organic loading and some properties of activated sludge. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 357-361.
11. **Bard, S.M.** (1998) A biological index to predict pulp mill pollution levels. *Wat. Environ. Res.* **70**, 108-122.
12. **Bavendamm, W.** (1928) Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz.* **38**, 257-276.
13. **Benedict, R.G., Carlson, D.A.** (1971) Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *Wat. Res.* **5**, 1023-1030.
14. **Benito, G.G., Miranda, M.P., Rodriguez de los Santos, D.** (1997) Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. *Biores. Technol.* **61**, 33-37.

15. **Beyer, L., Fründ, R., Mueller, K.** (1997) Short-term effects of a secondary paper mill sludge application on soil properties in a Psammentic Haplumbrept under cultivation. *Sci. Total Environ.* **197**, 127-137.
16. **Bicho, P.A., Martin, V., Saddler, J.N.** (1994) Enrichment and characterization of resin acid degrading bacteria from bleached kraft effluents. *Inter. Environ. Conf. Tappi Proc.* 79-383.
17. **Bicho, P.A., Martin, V., Saddler, J.N.** (1995) Growth, induction, and substrate specificity of dehydroabietic acid-degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3245-3250.
18. **Biellman, J., Branlant, G., Gero-Robert, M., Poiret, M.** (1973) Dégradation bactérienne de l'acide déhydroabiétique par un *Pseudomonas* et une *Alcaligenes*. *Tetrahedron* **29**, 1237-1241.
19. **Biellman, J., Wennig, R.** (1968) Microbial degradation of diterpenic acids. *Chem. Commun.* **1968**, 168-169.
20. **Bisaillon, J-G., Perron, J., Paquet, M., Paquette, G., Lépine, F., Beaudet, R.** (1991) Effet d'un traitement anaérobie sur la charge organique et la toxicité d'un effluent thermomécanique. *Sci. Tech. Eau Mai*, 137-142.
21. **Bitton, G.** (1994) Wastewater microbiology. Edité par John Wiley & Sons, New York. 478 p.
22. **Block, J-C., Mathieu, L., Servais, P., Fontvieille, D., Werner, P.** (1992) Indigenous bacterial inocula for measuring the biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in waters. *Wat. Res.* **26**, 481-486.
23. **Bodie, E.A., Schwartz, R.D., Catena, A.** (1985) Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 629-633.
24. **Bossier, P., Verstraete, W.** (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge ? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 1-6.
25. **Boyle, C.D., Kropp, B.R., Reid, I.D.** (1992) Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3217-3224.
26. **Boylen, C.W., Mulks, M.H.** (1978) The survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 323-334.
27. **Brown, J.A., Glenn, J.K., Gold, M.H.** (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **172**, 3125-3130.
28. **Bryant, C.W., Amy, G.L., Alleman, B.C.** (1987) Organic halide and organic carbon distribution and removal in a pulp and paper wastewater lagoon. *J. Water Pollut. Control Fed.* **59**, 890-896.

29. **Bryant, C.W., Amy, G.L., Neill, R., Ahmad, S.** (1988) Partitioning of organic chlorine between bulk water and benthal interstitial water through a kraft mill aerated lagoon. *Wat. Sci. Technol.* **20**, 73-79.
30. **Butterfield, C.T.** (1935) Studies of sewage purification. II. A zooglea-forming bacterium isolated from activated sludge. *Publ. Hlth. Rept.* **50**, 671-684.
31. **Call, H.P., Mücke, I.** (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *J. Biotechnol.* **53**, 163-202.
32. **Collins, M.D., Jones, D., Keddie, R.M., Kroppenstedt, R.M., Schleifer, K.H.** (1983) Classification of some coryneform bacteria in a new genus *Aureobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 236-252.
33. **Cross, B., Myers, P.** (1968) The bacterial transformation of abietic acid. *Biochem. J.* **108**, 303-310.
34. **Davis, S., Burns, R.G.** (1990) Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 721-726.
35. **Dean, J.F.** (1997) Chapter 17. Lignin analysis. *In* Methods in plant biochemistry and molecular biology, pp. 199-215. Ed W.V. Dashek, CRC Press, Boca Raton, New-York.
36. **DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R.** (1989) Phylogenetic stains : ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360-1363.
37. **Deschamps, A.** (1985) Vers une biotechnologie de la lignine. *Biofutur Mai*, 59-64.
38. **Dias, F.F., Bhat, J.V.** (1964) Microbial ecology of activated sludge. I. Dominant bacteria. *Appl. Microbiol.* **12**, 412-417.
39. **Dillon, J.K., Fuerst, J.A., Hayward, A.C., Davis, H.G.** (1986) A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. *J. Microbiol. Meth.* **6**, 13-19.
40. **Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
41. **Edeline, F.** (1993) L'épuration biologique des eaux. Editions CEBEDOC sprl, Liège. 303 p.
42. **Ekman, R., Holmbom, B.** (1989a) Analysis by gas chromatography of the wood extractives in pulp and water samples from mechanical pulping of spruce. *Nord. Pulp. Pap. Res. J.* **1**, 16-24.
43. **Ekman, R., Holmbom, B.** (1989b) The wood extractives in alkaline peroxide bleaching of groundwood from Norway spruce. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **3**, 188-191.

44. **Eremektar, G., Germili, F., Orhon, D.** (1998) Inert COD fractions in two-stage treatment of a pulp and paper mill effluent. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72**, 7-14.
45. **Eriksson, L., Steen, I., Tendaj, M.** (1992) Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Wat. Sci. Tech.* **25**, 251-265.
46. **Fein, J.E., Omotani, K., Hunter, H., Buckholz, J., Potts, D.** (1994) Toxicity identification and reduction for two fine paper mill effluents. *Proc. Tappi Environ. Conf.* **420**, 899-922.
47. **Ferrer, I., Dezotti, M., Duran, N.** (1991) Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* **13**, 577-582.
48. **Fiedler, F., Schleifer, K.H., Kandler, O.** (1973) Amino acid sequence of the threonine-containing mureins of coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **113**, 8-17.
49. **Flouri, F., Sotirchos, D., Ioannidou, S., Balis, C.** (1996) Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *Intl. Biodeterio. Biodegrad.* 189-192.
50. **Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H., Kitahara, S.** (1990a) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 913-919.
51. **Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H., Kitahara, S.** (1990b) Transfructosylation catalyzed by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2655-2661.
52. **Fulthorpe, R.R., Liss, S.N., Allen, D.G.** (1993) Characterization of bacteria isolated from a bleached kraft pulp mill wastewater treatment system. *Can. J. Microbiol.* **39**, 13-24.
53. **Gayford, C.G., Richards, J.P.** (1970) Isolation and enumeration of aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *J. Appl. Bact.* **33**, 342-350.
54. **Giovanni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R.** (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**, 720-726.
55. **Godon, J.J., Moletta, R.** (1998) Une carte d'identité moléculaire pour les microéboueurs. *Biofutur* **178**, 38-40.
56. **Grady Jr, C.P.L., Magbanua Jr, B.S., Sanders III, R.W.** (1997) A simple technique for estimating the contribution of abiotic mechanisms to the removal of synthetic organic chemicals by completely mixed activated sludge. *Wat. Environ. Res.* **69**, 1232-1237.

57. **Griebe, T., Schaule, G., Wuertz, S.** (1997) Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 118-122.
58. **Harris, R.H., Mitchell, R.** (1973) The role of polymers in microbial aggregation. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**, 27-50.
59. **Haw, J.F., Maciel, G.E., Schroeder, H.A.** (1984) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Anal. Chem.* **56**, 1323-1329.
60. **Hemingway, R.W., Greaves, H.** (1973) Biodegradation of resin acid sodium salts. *Tappi* **56**, 189-192.
61. **Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., Arvin, E.** (1995) Wastewater treatment, biological and chemical processes. Eds. Springer-Verlag, Berlin. 383 p.
62. **Hermasson, M., Kjelleberg, S., Korhonen, T.K., Strenstrom, T.** (1982) Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Arch. Microbiol.* **131**, 308-312.
63. **Hernandez-Perez, G., Goma, G., Rols, J.L.** (1997) Degradation of lignosulfonated compounds by *Streptomyces viridosporus* strain T7A. *Biotechnol. Lett.* **19**, 285-289.
64. **Higgins, M.J., Novak, J.T.** (1997) Characterization of exocellular protein and its role in biofloculation. *J. Environ. Eng.* **123**, 479-485.
65. **Ho, C., Jurasek, L., Paice, M.G.**, (1990) The effect of inoculum on bleaching of hardwood kraft pulp with *Coriolus versicolor*. *J. Pulp Paper Sci.* **16**, J78-J83.
66. **Hoel, H., Aarsand, R.** (1995) Acute toxicity of colloidal and dissolved material in TMP effluents. *Nord. Pulp. Pap. Res. J.* **10**, 98-109.
67. **House, M.A.** (1996) Public perception and water quality management. *Wat. Sci. Tech.* **34**, 25-32.
68. **Hwang, S., Tate III, R.L.** (1997) Interactions of clay minerals with *Arthrobacter crystallopoietes*: starvation, survival and 2-hydroxypyridine catabolism. *Biol. Fertil. Soils* **24**, 335-340.
69. **Jackson, M.J., Line, M.A.** (1997a) Windrow composting of a pulp and paper mill sludge: process performance and assessment of product quality. *Comp. Sci. Util.* **5**, 6-14.
70. **Jackson, M.J., Line, M.A.** (1997b) Organic composition of a pulp and paper mill sludge determined by FTIR, <sup>13</sup>C CP MAS NMR, and chemical extraction techniques. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2354-2358.

71. **Jacquet, G., Pollet, B., Lapierre, C., Francesch, C., Rolando, C., Faix, O.** (1997) Thioacidolysis of enzymatic dehydrogenation polymers from p-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl precursors. *Holzforschung* **51**, 349-354.
72. **Jansson, M.B.** (1980) Chemistry of fiber building board mill effluent before and after biological treatment. *Tappi* **63**, 78-80.
73. **Jansson, U.M.B., Back, E.L.** (1975) Chemical characterization of fiber building board mill effluent. *Wood Sci.* **8**, 112-121.
74. **Johnsen, K., Mattsson, K., Tana, J., Stuthridge, T., Hemming, J., Lehtinen, K.** (1995) Uptake and elimination of resin acids and physiological responses in rainbow trout exposed to total mill effluent from an integrated newsprint mill. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 1561-1568.
75. **Jonhston, P. A., Stringer, R. L., Santillo, D., Stephenson, A. D., Labounskaia, I. Ph., McCartney, H.M.A.** (1997) Towards zero-effluent pulp and paper production : the pivotal role of totally chlorine free bleaching. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **4**, 130-131.
76. **Jorand, F., Guicherd, P., Urbain, V., Manem, J., Block, J-C.** (1994) Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria. *Wat. Sci. Tech.* **30**, 211-218.
77. **Jorand, F., Boué-Bigne, F., Block, J-C., Urbain, V.** (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Wat. Sci. Tech.* **37**, 307-315.
78. **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. *Wat. Res.* **29**, 1639-1647.
79. **Jorgensen, G., Carlberg, G.E., Hoel, H., Lystad, E.** (1995) Lignans in TMP effluents : fate and effects. *Tappi J.* **78**, 171-176.
80. **Jorgensen, P.E., Eriksen, T., Jensen, B.K.** (1992) Estimation of viable biomass in wastewater and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Wat. Res.* **26**, 1495-1501.
81. **Joyce, T.W., Chang, H., Campbell, A.G., Gerrard, E.D., Kirk, T.K.** (1984) A continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. *Biotech. Adv.* **2**, 301-308.
82. **Jurgensen, S.L., Benjamin, M.M., Ferguson, J.F.** (1985) Treatability of thermomechanical pulping process effluents with anaerobic biological reactors. *Tappi Proc. Environ. Conf.* 83-92.
83. **Kämpfer, P., Dott, W.** (1989) Numerische Identifizierung aquatischer Mikroorganismen mittels automatisierter Methoden am Beispiel von Bakterien aus dem belebten Schlamm. *Zbl. Bakt. Hyg.* **B187**, 216-229.

84. **Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M., Amann, R.** (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* **32**, 101-121.
85. **Karels, A.E., Soimasuo, M., Lappivaara, J., Leppänen, H., Aaltonen, T., Mellanen, P., Oikari, O.J.** (1998) Effects of ECF-bleached kraft mill effluent on reproductive steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology* **7**, 123-132.
86. **Kavanaugh, R.G., Randall, C.W.** (1994) Bacterial populations in a biological nutrient removal plant. *Wat. Sci. Tech.* **29**, 25-34.
87. **King, R.O., Forster, C.F.** (1990) Effects of sonication on activated sludge. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 109-115.
88. **Kirk, T.K., Farrell, R.L.** (1987) Enzymatic « combustion » : the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 465-505.
89. **Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G.** (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**, 277-285.
90. **Knapp, J.S., Zhang, F., Tapley, K.N.** (1997) Decolourisation of orange II by a wood-rotting fungus. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 289-296.
91. **Koistinen, J., Lehtonen, M., Tukia, K., Soimasuo, M., Lahtipera, M., Oikari, A.** (1998) Identification of lipophilic pollutants discharged from a finnish pulp and paper mill. *Chemosphere* **37**, 219-235.
92. **Kollöfel, B., Burri, S., Meile, L., Teuber, M.** (1997) Development of 16S rRNA oligonucleotide probes for *Brevibacterium*, *Micrococcus/Arthrobacter* and *Microbacterium/Aureobacterium* used in dairy starter cultures. *System. Appl. Microbiol.* **20**, 409-417.
93. **Kolodziejcki, W., Frye, J.S., Maclel, G.E.** (1982) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood. *Anal. Chem.* **54**, 1419-1424.
94. **Kovacs, T.G., Gibbons, J.S., Martel, P.H., Voss, R.H.** (1996) Improved effluent quality at a bleached kraft mill as determined by laboratory biotests. *J. Toxicol. Environ. Health* **49**, 533-561.
95. **Kristensen, G.H., Jorgensen, P.E.** (1992) Characterization of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Wat. Sci. Tech.* **25**, 43-57.

96. **Kutney, J.P., Singh, M., Hewitt, G., Salisbury, P.J., Worth, B.R., Servizi, J.A., Martens, D.W., Gordon, R.W.** (1981) Studies related to biological detoxification of kraft pulp mill effluent. I. The biodegradation of dehydroabietic acid with *Mortierella isabellina*. *Can. J. Chem.* **59**, 2334-2341.
97. **Leach, J.M., Thakore, A.N.** (1976) Toxic constituents in mechanical pulping effluents. *Tappi J.* **59**, 129-132.
98. **Leppänen, H., Marttinen, S., Oikari, A.** (1998) The use of fish bile metabolite analyses as exposure biomarkers to pulp and paper mill effluents. *Chemosphere* **36**, 2621-2634.
99. **Levinson, A.S., Carter, B.C., Taylor, M.L.** (1968) Microbial degradation of methyl dehydroabietate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, p. 1344.
100. **Lindahl, M., Faris, A., Wadstrom, T., Hjerten, S.** (1981) A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **677**, 471-476.
101. **Lindström, K., Mohamed, M.** (1988) Selective removal of chlorinated organics from Kraft mill total effluents in aerated lagoons. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **1**, 26-33.
102. **Liss, S.N., Allen, D.G.** (1992) Microbiological study of a bleached kraft pulp mill aerated lagoon. *J. Pulp Pap. Sci.* **18**, 216-221.
103. **Liss, S.N., Bicho, P.A., Saddler, N.** (1997) Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents : a minireview. *Can. J. Microbiol.* **75**, 599-611.
104. **Liu, H.W., Lo, S.N., Lavallée, H.C.** (1996) Theoretical study on the two-stage anaerobic-aerobic biological treatment of a CTMP effluent. *Water Qual. Res.* **31**, 21-35.
105. **Liver, S.F., Hall, E.R.** (1996) Interactions of resin acids with aerobic and anaerobic biomass-I. Degradation by non-acclimated inocula. *Wat. Res.* **30**, 663-671.
106. **Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorica, J.** (1983) Removal of color from kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 2055-2065.
107. **Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Veliky, I.A.** (1981) Decolorization of a kraft mill effluent with fungal mycelium immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnol. Lett.* **3**, 701-706.
108. **Liyama, K., Wallis, A.F.A.** (1988) An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci. Technol.* **22**, 271-280.
109. **Mac Kague, A.B., Jarl, M., Kringstad, K.P.** (1989) An up-to-date list compounds identified in bleaching effluents as of January 1989 « SSLV-Miljö 90 », rapport n°49, project bleaching, Stockholm, Sweden. Disponible au AF-IPK, Box 8309- S-104 20-Stockholm, Sweden.

110. **Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K-H.** (1994) In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* **28**, 1715-1723.
111. **Marmur, J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
112. **Marmur, J., Doty, P.** (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**, 109-118.
113. **Marsilli-Libelli, S., Vaggi, A.** (1997) Estimation of respirometric activities in bioprocesses. *J. Biotechnol.* **52**, 181-192.
114. **Martel, P.H., Kovacs, T.G., O'Connor, B.L., Voss, R.H.** (1997a) Source and identity of compounds in athermomechanical pulp mill effluent inducing hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2375-2383.
115. **Martel, P., Kovacs, T.** (1997b) A comparison of the potential of primary- and secondary- treated pulp and paper mill effluents to induce mixed function oxygenase (MFO) activity in fish. *Wat. Res.* **31**, 1482-1488.
116. **Messner, K., Srebotnik, E.** (1994) Biopulping : an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 351-364.
117. **Michel, F.C. Jr, Balachandra Dass, S., Grulke, E.A., Adinarayana Reddy, C.** (1991) Role of manganese peroxidases and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2368-2375.
118. **Middaugh, D.P., Beckham, N., Fournie, J.W., Deardorff, T.L.** (1997) Evaluation of bleached kraft mill process water using micotox, *Ceriodaphnia dubia*, and *Menidia beryllina* toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**, 367-375.
119. **Miller, G.L.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31** : 426-428.
120. **Miyata, N., Iwahori, K., Fujita, M.** (1998) Manganese-independent and -dependent decolorization of melanoidin by extracellular hydrogen peroxide and peroxidases from *Coriolus hirsutus* pellets. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 550-553.
121. **Modzeleski, J.E., Laurie, W.A., Nagy, B.** (1971) Carbohydrates from Santa Barbara bassin sediments : Gas chromatography spectrometric analysis of trimethylsilyl derivatives. *Geochim. Cosmochim. Acta* **35** : 825-838.
122. **Mohn, W.W.** (1995) Bacteria obtained from a sequencing batch reactor that are capable of growth on dehydroabiatic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2145-2150.

123. **Mohn, W.W., Stewart, G.R.** (1997) Bacterial metabolism of chlorinated dehydroabietic acids occurring in pulp and paper mill effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3014-3020.
124. **Monteiro, M.C., De Carvalho, M.E.A.** (1998) Plulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 983-993.
125. **Moreira, M.T., Feijoo, G., Sierra-Alvarez, R., Lema, J., Field, J.A.** (1997) Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. *J. Biotechnol.* **53**, 237-251.
126. **Morgan, C.A., Wyndham, R.C.** (1996) Isolation and characterization of resin acid degrading bacteria found in effluent from a bleached kraft pulp mill. *Can. J. Microbiol.* **2**, 423-430.
127. **Morgan, J.W., Forster, C.F.** (1992) A comparative study of the sonication of anaerobic and activated sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **55**, 53-58.
128. **Morrison, I.M., Stewart, D.** (1995) Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.* **69**, 151-157.
129. **Mozes, N., Rouxhet, P.G.** (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* **6**, 99-112.
130. **Munkittrick, K.R., Servos, M.R., Carey, J.H., Van der Kraak, G.J.** (1997) Environmental impacts of pulp and paper wastewater: evidence for a reduction in environmental effects at north american pulp mills since 1992. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 329-338.
131. **Namour, P., Müller, M.C.** (1998) Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the refractory part of effluents. *Wat. Res.* **32**, 2224-2231.
132. **Nand, K., Rao, D.V.** (1972) *Arthrobacter mysorens* - a new species excreting L-glutamic acid. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II.* **127**, 324-331.
133. **Northcore, D.H.** (1972) Chemistry of the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **23**, 113-132.
134. **Nybroe, O.** (1995) Assessment of metabolic activity of single bacterial cells - new developments in microcolony and dehydrogenase assays. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**, 77-84.
135. **Olofsson, A., Zita, A., Hermansson, M.** (1998) Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology* **144**, 519-528.

136. **Orhon, D., Cokgör, E.U.** (1997) COD fractionation in wastewater characterization - The state of the art. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **68**, 283-293.
137. **Paice, M.G., Jurasek, L., Ho, C., Bourbonnais, R., Archibald, F.** (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. *Tappi J.* **72**, 217-221.
138. **Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S., Jurasek, L.** (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 260-265.
139. **Paice, M.G., Elliott, A., Young, F., Dorica, J.G.** (1996) Activated sludge treatment of mechanical pulp mill effluents containing sulphite. *Pulp Paper Can.* **97**, 88-94.
140. **Pascoal Neto, C., Cordeiro, N., Seca, A., Domingues, F., Gandini, A., Robert, D.** (1996) Isolation and characterization of a lignin-like polymer of the cork of *Quercus suber* L. *Holzforschung* **50**, 563-568.
141. **Pauli, A.S.L., Kaitala, S.** (1995) Optimal growth conditions for *Acinetobacter* isolates from activated sludge treating forest-industry wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 746-754.
142. **Peignen-Séraline, P., Manem, J.** (1997) Des bactéries épuratrices. *Biofutur* **165**, 38-40.
143. **Peralta-Zamora, P., Esposito, E., Pelegrini, R., Groto, R., Reyes, J., Duran, N.** (1998) Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. *Environ. Technol.* **19**, 55-63.
144. **Perez, J., Saez, L., De la Rubia, T., Martinez, J.** (1997) *Phanerochaete flavido-alba* lignolytic activities and decolorization of partially bio-depurated paper mill wastes. *Wat. Res.* **31**, 495-502.
145. **Périé, F.H., Gold, M.H.** (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2240-2245.
146. **Pickup, R.W.** (1991) Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1009-1019.
147. **Pipes, W.O.** (1966) The ecological approach to the study of activated sludge. *Adv. Appl. Microbiol.* **8**, 77-103.
148. **Prakasam, T.B.S., Dondero, N.C.** (1967a) Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. I. Enumeration. *Appl. Microbiol.* **15**, 461-467.
149. **Prakasam, T.B.S., Dondero, N.C.** (1967b) Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. II. Method of characterization of activated sludge bacteria. *Appl. Microbiol.* **15**, 1122-1127.

150. **Pranovich, A.V., Holmbom, B., Sjöholm, R.** (1994) Characterization of dissolved lignins in thermomechanical pulp suspensions. 3rd European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Stockholm. pp. 219-222.
151. **Preston, C.M., Trofymow, J.A., Sayer, B.G., Niu, J.** (1997)  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy with cross-polarization and magic-angle spinning investigation of the proximate-analysis fractions used to assess litter quality in decomposition studies. *Can. J. Bot.* **75**, 1601-1613.
152. **Pribyl, M., Tucek, F., Wilderer, P.A., Wanner, J.** (1997) Amount and nature of soluble refractory organics produced by activated sludge microorganisms in sequencing batch and continuous flow reactors. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 27-34.
153. **Raghukumar, C., Chandramohan, D., Michel, F.C., Reddy, C.A.** (1996) Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent by marine fungi. *Biotechnol. Lett.* **18**, 105-106.
154. **Reasoner, D.J., Geldreich, E.E.** (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1-7.
155. **Reid, L.D., Paice, M.G.** (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 369-376.
156. **Reid, L.D., Paice, M.G., Ho, C., Jurasek, L.** (1990) Biological bleaching of softwood kraft pulp with *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Tappi J.* **73**, 149-153.
157. **Richardson, D.E., Bloom, H.** (1982) Analysis of resin acids in untreated and biologically treated thermomechanical pulp effluent. *Appita* **35**, 477-482.
158. **Rintala, J. A., Puhakka, J. A.** (1994) Anaerobic treatment in pulp and paper-mill waste management : a review. *Biores. Technol.* **47**, 1-18.
159. **Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H.** (1994) *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**, 2849-2858.
160. **Rossello-Mora, R.A., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K-H.** (1995) The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 702-707.
161. **Roy-Arcand, L., Archibald, F.** (1996) Selective removal of resin and fatty acids from mechanical pulp effluents by ozone. *Wat. Res.* **30**, 1269-1279.
162. **Saski, E.K., Mikkola, R., Kukkonen, J.V.K., Salkinoja-Salonen, M.S.** (1997) Bleached kraft pulp mill discharged organic matter in recipient lake sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **4**, 194-202.
163. **Sayler, G.S., Layton, A.C.** (1990) Environmental application of nucleic acid hybridization. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 625-648.

164. **Schlenk, D.** (1996) The role of biomarkers in risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2**, 251-256.
165. **Schnell, A., Sabourin, M.J., Skog, S., Garvie, M.** (1997) Chemical characterization and biotreatability of effluents from an integrated alkaline-peroxide mechanical pulping/machine finish coated (APMP/MFC) paper mill. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 7-14.
166. **Seiler, H., Braazt, R., Ohmayer G.** (1980) Numerical cluster analysis of the coryneform bacteria from activated sludge. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **C1**, 357-375.
167. **Senchenkova, S.N., Knirel, Y.A., Likhoshevstov, L.M., Shashkov, A.S., Shibaev, V.N., Starukhina, L.A., Deryabin, V.V.** (1995) Structure of a simusan, a new acidic exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp. *Carbohydr. Res.* **266**, 103-113.
168. **Sibley, P.K., Dixon, D.G., Barton, D.R.** (1998) Environmental assessment of benthic impacts associated with pulp mill discharges. II. Distribution of sediment EOX in relation to environmental factors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 158-166.
169. **Sierra-Alvarez, R., Kato, M., Lettinga, G.** (1990) The anaerobic biodegradability of paper mill wastewater constituents. *Environ. Technol.* **11**, 891-898.
170. **Sitholé, B.B.** (1995) Pulp and paper. *Anal. Chem.* **67**, 87-95.
171. **Sjöström, J.** (1990) Fractionation and characterization of organic substances dissolved in water during groundwood pulping of spruce. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **1**, 9-15.
172. **Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.** (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2884-2896.
173. **Snidaro, D., Zartarian, F., Jorand, F., Bottero, J-Y., Block, J-C., Manem, J.** (1997) Characterization of activated sludge flocs structure. *Wat. Sci. Tech.* **36**, 313-320.
174. **Stahl, D.A., Devereux, R., Amann, R.I., Flesher, B., Stromley, J.** (1989) Ribosomal RNA based studies of natural microbial diversity and ecology. In *Recent advances in microbial ecology* (Edited by Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R., Uchida, A.) . pp669-673. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
175. **Staneck, J.L., Roberts, G.D.** (1974) Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**, 226-231.
176. **Stephenson, R.J., Duff, S.J.B.** (1996) Coagulation and precipitation of mechanical pulping effluent-II. Toxicity removal and metal salt recovery. *Wat. Res.* **30**, 793-798.
177. **Stora Corbehem**, déclaration environnementale 1996. Edité par Stora Corbehem, B.P.2, 62113 Corbehem, France. 9 p.
178. **Stora Corbehem**, environnement, bilan annuel 1997. 10<sup>ème</sup> édition février 1998. 14 p.

179. **Strotmann, U.J., Keinath, A., Hüttenhain, S.H.** (1995) Biological test systems for monitoring the operation of wastewater treatment plants. *Chemosphere* **30**, 327-338.
180. **Sun, R., Fang, J.M., Rowlands, P., Bolton, J.** (1998) Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2804-2809.
181. **Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B.** (1995) Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **4**, 127-145.
182. **Suntio, L.R., Shiu, W.Y., Mackay, D.** (1988) A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere* **17**, 1249-1290.
183. **Tan, K.N., Chua, H.** (1997) COD adsorption capacity of the activated sludge. Its determination and application in the activated sludge process. *Environ. Monitor. Assess.* **44**, 211-217.
184. **Tavernier, D.** (1988) Etude biologique et chimique des accidents de blanchiment des pâtes à papier. Thèse, Université de Lille I, 157 p.
185. **Thomas, O.** (1995) Métrologie des eaux résiduaires. Editions CEBEDOC sprl, Liège. 192 p.
186. **Thomas, O., Mazas, N., Massiani, C.** (1993) Determination of biodegradable dissolved organic carbon in waters with the use of UV absorptiometry. *Environ. Technol.* **14**, 487-493.
187. **Thomazeau, R.** (1983) Contribution à l'étude de l'écologie bactérienne des boues activées. Thèse, Université de Paris VII, 175 p.
188. **Thornton, J.** (1993) Dissolved and colloidal substances in the production of wood-containing paper. Academic dissertation, Abo Akademi University, Finland, 136 p.
189. **Thornton, J., Eckerman, C., Ekman, R.** (1991) Effects of peroxyde bleaching of spruce TMP on dissolved and colloidal organic substances. *6<sup>th</sup> Intl. Symp. Wood Pulping Chem. Proc.* Vol 1., 571-577.
190. **Thornton, J., Ekman, R., Holmbom, B., Orsa, F.** (1994) Polysaccharides dissolved from Norway spruce in thermomechanical pulping and peroxide bleaching. *J. Wood Chem. Technol.* **14**, 159-175.
191. **Thurman, E.M., Malcolm, R.L.** (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 463-466.
192. **Tien, M., Kirk, T.K.** (1984a) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth. Enzymol.* **161**, 238-249.

193. **Tien, M., Kirk, T.K.** (1984b) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* : purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2280-2284.
194. **Tomar, P., Allen, D.G.** (1991) Removal of organochlorines from Kraft pulp mill effluent by anaerated lagoon. *Water Pollut. Res. J. Can.* **26**, 101-117.
195. **Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P.** (1998) Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* **28**, 319-361.
196. **Ubisi, M.F., Jood, T.W., Wentzel, M.C., Ekama, G.A.** (1997) Activated sludge mixed liquor heterotrophic active biomass. *Wat. SA.* **23**, 239-248.
197. **Urbain, V., Block, J-C., Manem, J.** (1993) Biofloculation in activated sludge : an analytic approach. *Wat. Res.* **27**, 829-838.
198. **Urbain, V., Mobarry, B., de Silva, V., Stahl, D.A., Rittman, B.E., Manem, J.** (1997) Integration of performance, molecular biology and modeling to describe the activated sludge process. *Proceed. Second Internatl. Conf. On microorganisms in activated sludge and biofilm processes*, Eds Jenkins et Hermanowicz, 131-137.
199. **Uzaki, M., Ishiwatari, R.** (1983) Determination of cellulose and non cellulose carbohydrates in recent sediments by gas chromatography. *J. Chromat.* **260**, 487-492.
200. **Vallette, P., de Choudens, C.** (1987) Le bois, la pâte, le papier. Editions du centre technique de l'industrie des papiers, cartons et cellulose, Grenoble, 181 p.
201. **Van Aalst-Van Leeuwen, M.A., Pot, M.A., Van Loosdrecht, M.C.M.** (1997) Kinetic modeling of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production and consumption by *Paracoccus pantotrophus* under dynamic substrate supply. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 773-782.
202. **Van den Eynde, E., Vriens, L., Wynants, M., Verachtert, H.** (1984) Transient behaviour and time aspects of intermittently and continuously fed bacterial cultures with regard to filamentous bulking of activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 44-52.
203. **Van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A., Heijnen, J.J.** (1997b) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 41-47.
204. **Van Loosdrecht, M.C.M., Smolders, G.J., Kuba, T., Heijnen, J.J.** (1997a) Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 109-116.
205. **Vandevenne, L.** (1985) Epuration biologique des eaux usées. Principes - Calculs - Technologie. Librairies Lavoisier. 284 p.
206. **Vares, T., Hatakka, A.** (1997) Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi : effects of manganese and malonate. *Can. J. Bot.* **75**, 61-71.

207. **Vedry, B.** (1987) L'analyse écologique des boues activées, à l'usage des exploitants de stations d'épuration. Ed Christian Bruckner, Segetec (Vicq, France), 120 p.
208. **Vicuna, R.** (1988) Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 646-655.
209. **Virkola, N.E., Honkanen, K.** (1985) Wastewater characteristics. *Wat. Sci. Tech.* **17**, 1-28.
210. **Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H.** (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1520-1525.
211. **Wang, X., Mize, T.H., Saunders, F.M., Baker, S.A.** (1997) Biotreatability test of bleach wastewaters from pulp and paper mills. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 101-108.
212. **Weddle, C., Jenkins, D.** (1971) The viability and activity of activated sludge. *Wat. Res.* **5**, 621-640.
213. **Welker, A., Schmitt, T.G.** (1997) A basic investigation in origins of AOX-substances in paper sludges. *Wat. Res.* **31**, 805-815.
214. **Wilson, A.E.J., Moore, E.R.B., Mohn, W.W.** (1996) Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3146-3151.
215. **Wolfenden, B.S., Wilson, R.L.** (1982) Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions : pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **1982**, 805-812.
216. **Yamazaki, K., Inukai, K., Suzuki, M., Kuga, H., Korenaga, H.** (1998) Structural studies on a sulfated polysaccharide from an *Arthrobacter* sp. by NMR spectroscopy and methylation analysis. *Carbohydr. Res.* **305**, 253-260.
217. **Yateem, A., Balba, M.T., Al-Awadhi, N.** (1998) White rot fungi and their role in remediate oil-contaminated soil. *Environ. Internatl.* **24**, 181-187.
218. **Young, L., Yu, J.** (1997) Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* **31**, 1187-1193.
219. **Zhang, Y., Bicho, P.A., Breuil, C., Saddler, J.N.** (1997) Resin acid degradation by bacterial strains grown on CTMP effluent. *Wat. Sci. Technol.* **35**, 33-39.
220. **Zita, A., Hermasson, M.** (1997a) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1168-1170.

221. **Zita, A., Hermasson, M.** (1997b) Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 299-306.



Pergamon

Wat. Res. Vol. 33, No. 4, pp. 947-950, 1999  
 © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved  
 Printed in Great Britain  
 0043-1354/99 \$ - see front matter

PII: S0043-1354(98)00298-X

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *ARTHROBACTER* SP. FROM ACTIVATED SLUDGE OF A PULP AND PAPER MILL

DAVID PARIS and ROLAND BLONDEAU\*

Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment SN2, F-59655  
 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

(First received September 1997; accepted in revised form July 1998)

**Abstract**—The bacterial population from activated sludge samples of a pulp and paper mill was investigated. Analysis of colonies on plates count, including Gram stain, cells and colonies morphology, cytochrome oxidase and catalase reactions, revealed the presence of four main bacterial groups with a major one. The presence of this main population (24.90% to 64.80% of the total population) was followed during one year at the rate of one two-months sampling. The taxonomic study of several isolates and use of rRNA-targeted oligonucleotide probes led to the identification of *Arthrobacter* sp., with a marked rod-coccus Gram-positive growth cycle, catalase-positive and oxidase-negative reactions and obligately aerobic non-motile cells. L-lysine was identified in the cell wall peptidoglycan and the % G + C of the DNA was about 72.0 (Tm). The presence of *Arthrobacter* sp. in the wastewater treatment system had a singular character. Moreover, these bacteria were devoid of cellulolytic, amyolytic and proteolytic activities. The preservation of biofloc efficiency seems to be the main function of these bacteria. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

**Key words**—activated sludge, pulp and paper mill, industrial wastewater treatment, *Arthrobacter* sp., microbial consortium

### INTRODUCTION

The coated wood paper mills generate an organic carbon pollution classically expressed by the chemical oxygen demand (COD), requiring a wastewater treatment.

The thermomechanical pulping process, with mechanical defibering of wood, used by the pulp and paper mill factories, has the advantage of producing effluents with lower concentrations of chemically modified organic residues such as kraft lignin and lignosulphonates. These thermomechanical pulp effluents are treated by a biological process that includes an activated sludge stage. However this treatment does not allow to eliminate total organic compounds.

To know the nature and origin of the refractory carbon compounds from these effluents and to optimize the biological treatment, the first objective of this study was to investigate microbial analysis of the activated sludge of the pulp and paper mill treatment.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Sampling location*

The pulp and paper mill factory is located in Corbehem, in the north of France. The production capacity reaches 550,000 tons of coated wood paper per year. Water from the Scarpe river, after carbonate removal, is used in the log-debarking, pulping, pulp bleaching and paper-making processes in the mill. The plant uses the following main raw materials: (i) thermomechanical pulp, produced and bleached by alkaline peroxide (Leask, 1987) at the plant from hardwood and softwood (i.e., poplar, spruce), (ii) purchased chemical pulps from several external suppliers, (iii) binders, pigments and adjuvants used as coating.

The most charged organic matter effluents from the thermomechanical pulp production are treated by anaerobic processes, and then mixed to other effluents, which are treated in an aerobic tank composed of two parallel activated sludge lines. The wastewater treatment performed a chemical oxygen demand removal efficiency of 91.5%.

#### *Sample collection and isolation media for bacteria*

Grab samples (5 l) of mixed liquor were collected from the two aerobic lines of the wastewater treatment plant. The flocs dispersion was made with 30 ml aliquots by a 5 min agitation in sterile tubes with glass beads (diameter 1.5–3 mm).

For bacterial isolation, serial dilutions within the range of  $10^{-4}$ – $10^{-7}$  were plated on several media: R<sub>2</sub>A agar (Difco) used by Reasoner and Geldreich (1985), Trypcase Soy agar (BioMérieux) and MGYE medium composed of: glucose, 1 g; yeast extract, 0.1 g; agar, 15 g; basal

\*Author to whom all correspondence should be addressed. [Fax: +33-3-20-43-65-04. E-mail: Roland.Blondeau@univ-lille1.fr].

salt's medium, 1 l; pH 7.4. The basal salt's medium contained per liter of distilled water: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.45 g; NH<sub>4</sub>Cl, 0.45 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 g; FeCl<sub>3</sub>, 0.005 g; and trace elements solution, 1 ml containing (mg l<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 400; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 400; CoCl<sub>2</sub>, 50; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 200; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 300; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 500. Plates were scored after an incubation period of 5 d at 30 C under aerobic conditions.

*Characterization of the heterotrophic microorganisms*

First analysis of colonies on plates included Gram stain, cells and colonies morphology, cytochrome oxidase and catalase reactions.

The other analyses were carried out from pure cultures kept on nutrient medium agar: motility, oxygen requirement, and utilization of acetate or citrate as sole carbon source with a liquid medium containing carbon source, 1 g; peptone, 0.5 g; yeast extract, 0.5 g; basal salt's solution, 1 l; pH 7.4.

The vitamins requirement was tested with a vitamins mixture (1 ml for 1 l medium) containing (mg l<sup>-1</sup>): *p*-aminobenzoic acid, 0.01; vitamin B<sub>12</sub>, 0.001, biotin, 0.01; Ca-pantothenate, 1; folic acid, 0.1; niacin, 1; pyridoxine-HCl, 0.5; riboflavin, 0.5; thiamine, 1.

Proteolytic, amylolytic and cellulolytic activities were determined with gelatin (120 g l<sup>-1</sup>, Type A: from porcine skin, Sigma), amylose (10 g, potato starch, Serva) or cellulose powder (5 g, CC31 Whatman), respectively in basal salt's solution supplemented with 0.5 g l<sup>-1</sup> yeast extract; pH 7.4.

*Additional analyses*

These analyses concern identification and properties of the dominant population in the studied sludges.

Cell wall amino acid analysis was performed using the Fiedler *et al.* (1973) and Staneck and Roberts (1974) methods. Cell wall hydrolysates were separated by thin-layer chromatography (TLC aluminium sheets cellulose, Merck) and then visualized with ninhydrin.

The G + C content of the DNA was estimated by the thermal denaturation method (T<sub>m</sub>) in standard saline citrate (Marmur and Doty, 1962). DNA was extracted and purified by the Marmur procedure (Marmur 1961).

Oligonucleotides probes allow the *in situ* identification of bacterial communities in their natural habitats (Amann *et al.*, 1995) and may also be applied as a tool of identification by whole-cell hybridization. Hybridizations with fixed dominant isolate immobilized on glass slides were performed as described by Kämpfer *et al.* (1996), and Snaird *et al.* (1997). The rRNA-targeted oligonucleotide probes are described in Table 1. All probes were synthesized and labelled with fluorescein-5-isothiocyanate (excitation wavelength, 490 nm; emission wavelength, 520 nm) supplied by Eurogentec (Belgium). Hybridizations were performed for 1.5 h at 46°C, except for MIC847 (61°C). A stringent washing step was performed at 48°C for 20 min in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.01% sodium dodecyl sulphate, and 40 mM NaCl. The hybridization results were examined using an epifluorescence microscope (Optiphot-2, Nikon). EUB338 was uti-

lized as a positive control of hybridization efficiency. Two reference strains were used: *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010 (American Type Culture Collection) and *Arthrobacter* sp. DSM 20389 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen). Two other bacteria from the laboratory collection, i.e., *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* were used for protocol adaptation.

Generation time of bacteria was measured spectrophotometrically at 600 nm during incubation in a gyratory shaker (100 rpm min<sup>-1</sup>) at 30 C. The media contained: (i) basal salt's medium with 10 µg l<sup>-1</sup> biotin and 0.5 g l<sup>-1</sup> glucose or acetate; (ii) basal salt's medium with 0.5 g l<sup>-1</sup> glucose and 1 g l<sup>-1</sup> tryptone.

The utilization of the aromatic compounds of lignin residues as sole carbon source by the main population was tested. These compounds were 2.5-dihydroxybenzoic acid (Aldrich), abietic acid, *m*-coumaric acid, syringic acid, ferulic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (all from Sigma). The liquid media contained a carbon source, 100, 250 or 1000 mg; yeast extract, 50 mg; basal salt's medium, 1 l, pH 7.4. A 5 ml volume of these media was incubated for 10 d at 30 C with agitation on a reciprocating shaker (100 strokes min<sup>-1</sup>).

RESULTS

*Isolation and characterization of the heterotrophic microflora*

After 5 d incubation the plating on the different nutrient agar media showed a higher number of colonies on the R<sub>2</sub>A medium. The unsatisfactory result concerning the colony-forming units on the TSA medium was probably due to its high peptone concentration (20 g l<sup>-1</sup>). A comparative isolation on a medium of the same composition prepared with aeration tank water sterilized by autoclaving or U.V. radiation did not increase the amount of total cultivable population. Therefore, the R<sub>2</sub>A medium was used for further analysis of the activated sludges total microflora.

The bacterial analysis of the activated sludges was investigated from samples recovered in February 1996. Among a range of 150 colonies growing on R<sub>2</sub>A medium the application of the usual microbiological tests revealed the dominance of Gram-positive bacteria in the two aeration tanks (62.4% of total population). 61.5% of Gram-positive bacteria (38.4% of the total population) showed similar characteristics: irregular small cells, catalase-positive, oxidase-negative, non-pigmented small colonies with regular outline on agar plate. In this group, several colonies were chosen at random for additional analysis.

Table 1. Oligonucleotide probes: sequences, target sites, specificities and references

Probe	Sequence (5' → 3') of probe	Target site (rRNA positions)	Specificity	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-355)	bacteria	Stahl <i>et al.</i> (1989)
GPHGC	TATAGTTACCACCGCGT	23S (1901-1918)	Gram-positive with high G + C content of DNA	Roller <i>et al.</i> (1994)
MIC841	GCGCGAAACGTGGAAT	16S (841-856)	<i>Micrococcus</i> ; <i>Arthrobacter</i>	Kollöfel <i>et al.</i> (1997)
MIB1473	CTAATTCAGATCCC	16S (1473-1487)	<i>Microbacterium</i> ; <i>Aureobacterium</i>	Kollöfel <i>et al.</i> (1997)

Table 2. Percentage of the main bacterial population from activated sludge samples of the paper mill wastewater treatment plant

Sampling day	Aerobic line 1	Aerobic line 2
12 March, 1996	58.53	64.80
18 June, 1996	41.83	41.97
22 August, 1996	57.60	44.83
10 September, 1996	51.30	54.56
13 November, 1996	35.29	32.63
08 January, 1997	28.00	24.90
19 March, 1997	28.92	30.41

Three other bacterial clusters were also revealed: (i) Gram-positive cocci, catalase- and oxidase-negative, very small white colonies (9.6% of the total population); (ii) Gram-negative rods, catalase- and oxidase-positive, yellow colonies (18.4% of the total population), (iii) Gram-negative short rods, catalase-positive, oxidase-positive, white colonies (15.2% of the total population). Contrary to the others, the group of Gram-negative bacteria giving rise to yellow colonies displayed strong cellulolytic and amyolytic activities. No proteolytic activity was revealed from these four bacterial groups.

The presence of the main population was followed during one year at the rate of one two-months sampling from the two treatment lines of activated sludges (Table 2). For each analysis, the morphology of colonies grown on R<sub>2</sub>A plate allowed the characterization of the same dominant bacteria with the usual tests.

*Characterization and identification of the main population*

These bacteria, representing 38.4% of the cultivable population from the studied sample, showed a rod-coccus growth cycle after cultivation on R<sub>2</sub>A medium or on more complex media. They were aerobic, non-motile and did not hydrolyze gelatin, amylose, nor cellulose powder.

Acetate and citrate were used as carbon source in mineral medium containing yeast extract (0.5 g l<sup>-1</sup>). The vitamins requirement could be substituted by incorporation of only biotin (10 µg l<sup>-1</sup>) and generally, after several subcultures, the strains grew without vitamins.

Peptidoglycan analysis revealed the presence of L-lysine and L-alanine in the cell wall. LL-diaminopimelic acid and D-ornithine were not detected.

Determination of the G + C content from several isolates gave a value close to 72.0% (Tm).

According to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jones and Collins, 1986), these bacteria correspond to the genus *Arthrobacter*.

The use of oligonucleotide probes confirmed their belonging to Gram-positive bacteria with a high G + C content and specifically to this genus (Table 3).

To explain the functions of these bacteria in the activated sludges, additional analysis showed that the growth of these *Arthrobacter* sp. was inhibited

in a medium with a high peptone content (20 g l<sup>-1</sup>) but in glucose or acetate medium, a latent period of 5 h and a generation time of 2.2 h were recorded. In glucose-tryptone, the latent period was extended to 15 h and the generation time to 3.3 h. In comparison, the generation time of *Arthrobacter* ATCC8010 and DSM 20389 in the glucose medium was 1.5 h. No growth of the isolate with aromatic compounds of lignin residues as sole carbon source was observed.

DISCUSSION

Analysis of the total microbial population of activated sludge from the paper mill factory showed the presence of four main bacterial groups with one major group. The one-year study confirmed the dominance of this group.

The taxonomic study of several isolates taken at random from this group led to identification of *Arthrobacter* sp., with a marked rod-coccus Gram-positive growth cycle, catalase-positive and oxidase-negative reactions and obligately aerobic non-motile cells. L-lysine was identified in the cell wall peptidoglycan and the % G + C of the DNA was about 72.0 (Tm).

Other coryneform bacteria were closely related but *Microbacterium* was eliminated because of absence of a marked rod-coccus growth cycle and possible fermentative metabolism, and *Aureobacterium* (Collins *et al.*, 1983) because D-ornithine was present in the cell wall.

The soil is known as the usual habitat of these *Arthrobacter* but some strains were isolated from samples similar to ours. Adamse (1968, 1970) has revealed *Arthrobacter* from dairy waste activated sludge, Nand and Rao (1972) and Seiler *et al.* (1980) from activated sludge of a municipal sewage. However, in activated sludges of a bleached kraft pulp mill wastewater treatment studied by Fulthorpe *et al.* (1993) no major Gram-positive bacterium was noticed. The rich medium used by these authors may explain these results. Ban and Glanser-Soljan (1979) showed otherwise that a consortium of mixed cultures of microorganisms including *Arthrobacter* species deteriorates calcium lignosulfonate.

Table 3. Results of whole-cell oligonucleotide probing

Taxon	Strain	Fluorescence signal of probe			
		EUB338	GPHGC	MIC841	MIB1473
Dominant isolate		+	+	+	-
<i>Arthrobacter</i> sp.	DSM20389	+	+	+	-
<i>Arthrobacter globiformis</i>	ATCC8010	+	+	+	-
<i>Micrococcus luteus</i>		+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>		+	-	-	-

The role of these *Arthrobacter* sp. in the treatment lines raises some questions. These bacteria are not cellulolytic, not amylolytic and not proteolytic and do not use the aromatic compounds of lignin residues as carbon source. The vitamins requirement, recorded with fresh isolates, also reflects a singular character, because of the very low vitamin content in the organic matter from the aeration lines. The sludges bacterial consortium might ensure this supply. Moreover, growth studies of isolates showed a lower growth rate compared to the two reference strains.

Several indications permit us to think that these *Arthrobacter* sp. may contribute to the preservation of biofloc efficiency. According to some culture condition in liquid medium, these bacteria proliferate by aggregate forming. This feature could be promoted by their non-motile character and the production of polysaccharides (Van den Eynde *et al.*, 1984; Senchenkova *et al.*, 1995) enhancing the microbial aggregation (Harris and Mitchell, 1973).

The particular survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation by using intracellular polymeric materials as catabolic substrates (Boylen and Mulks, 1978) may also be emphasized. The role of this intracellular material accumulation in the activated sludges ecosystem has recently been precised by Van Loosdrech *et al.* (1997).

*Acknowledgements*—This research was supported by a grant from STORA Corbehem pulp and paper mill factory and CIFRE Contract (No. 96/38) of Association Nationale de la Recherche Technique.

REFERENCES

Adamse A. D. (1968) Formation and final composition of the bacterial flora of a dairy waste activated sludge. *Water Res.* 2, 665-671.

Adamse A. D. (1970) Some characteristics of *Arthrobacter*s from a dairy waste activated sludge. *Water Res.* 4, 797-803.

Amann R. I., Ludwig W. and Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.

Ban S. and Glanser-Soljan M. (1979) Rapid biodegradation of calcium lignosulfonate by means of a mixed culture of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1917-1928.

Boylen C. W. and Mulks M. H. (1978) The survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *J. Gen. Microbiol.* 105, 323-334.

Collins M. D., Jones D., Keddie R. M., Kroppenstedt R. M. and Schleifer K. H. (1983) Classification of some coryneform bacteria in a new genus *Aureobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 236-252.

Fiedler F., Schleifer K. H. and Kandler O. (1973) Amino acid sequence of the threonine-containing mureins of coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 113, 8-17.

Fulthorpe R. R., Liss S. N. and Allen D. G. (1993) Characterization of bacteria isolated from a bleached kraft pulp mill wastewater treatment system. *Can. J. Microbiol.* 39, 13-24.

Harris R. H. and Mitchell R. (1973) The role of polymers in microbial aggregation. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 27-50.

Jones D. and Collins M. D. (1986) Irregular, non-sporulating Gram-positive rods. In *Berger's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, Vol. 2, pp. 1261-1434. Williams and Wilkins, Baltimore.

Kämpfer P., Erhart R., Beimfohr C., Böhringer J., Wagner M. and Amann R. (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiol. Ecol.* 32, 101-121.

Kollöfel B., Burri S., Meile L. and Teuber M. (1997) Development of 16S rRNA oligonucleotide probes for *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* and *Microbacterium*, *Aureobacterium* used in dairy starter cultures. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 409-417.

Leask R. A. (1987) Refiner pulping. In *Pulp and Paper Manufacture*, eds. R. A. Leask and M. J. Kocurek, Vol. 2, pp. 87-282. The joint executive committee of the vocational educational committees of pulp and paper industry. CPPA, Montreal, Canada.

Marmur J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.

Marmur J. and Doty P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5, 109-118.

Nand K. and Rao D. V. (1972) *Arthrobacter mysorens*: a new species excreting L-glutamic acid. *Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. II* 127, 324-331.

Reasoner D. J. and Geldreich E. E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7.

Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K. H. (1994) *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140, 2849-2858.

Seiler H., Braatz R. and Ohmayer G. (1980) Numerical cluster analysis of the coryneform bacteria from activated sludge. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* C1, 357-375.

Senchenkova S. N., Knirel Y. A., Likhoshesterov L. M., Shashkov A. S., Shibaev V. N., Starukhina L. A. and Deryabin V. V. (1995) Structure of a simusan, a new acidic exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp.. *Carbohydr. Res.* 266, 103-113.

Snaidr J., Amann R., Huber I., Ludwig W. and Schleifer K. H. (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884-2896.

Stahl D. A., Devereux R., Amann R. I., Flesher B. and Stromley J. (1989) Ribosomal RNA based studies of natural microbial diversity and ecology. In *Recent Advances in Microbial Ecology*, eds. T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Morita and A. Uchida, pp. 669-673. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.

Staneck J. L. and Roberts G. D. (1974) Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28, 226-231.

Van den Eynde E., Vriens L., Wynants M. and Verachtert H. (1984) Transient behaviour and time aspects of intermittently and continuously fed bacterial cultures with regard to filamentous bulking of activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 44-52.

Van Loosdrech M. C. M., Pot M. A. and Heijnen J. J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Wat. Sci. Tech.* 35, 41-47.