AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de Lorraine

Ecole Nationale Supérieure de Géologie

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire Environnement et Minéralurgie

Thèse

présentée à

l'Université de Lorraine

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'UL

GEOSCIENCES

par

Marie-Eve KRAPF

AGREGATION DE CELLULES BACTERIENNES PAR DES POLYMERES CATIONIQUES (POLYETHYLENEIMINE) : INFLUENCE DE LA MASSE MOLECULAIRE DU POLYMERE ET DE LA PRESENCE/ABSENCE DE SURSTRUCTURES EXOPOLYMERIQUES BACTERIENNES SUR LA DESHYDRADATION DES BOUES BIOLOGIQUES

Soutenue publiquement le 23 février 2012 devant la commission d'examen

Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE	Rapporteur	AgroParisTech, Massy
Jérôme ROSE	Rapporteur	CEREGE, Aix-en-Provence
Marie-Paule MINGEOT-LECLERCQ	Examinateur	UCL, Bruxelles
Gilles GUIBAUD	Examinateur	GRESE, Limoges
Grégory FRANCIUS	Examinateur	LCPME-UL, Nancy
Bruno LARTIGES	Examinateur	LEM-UL, Nancy
Jérôme DUVAL	Examinateur	LEM-UL, Nancy
Christophe MERLIN	Invité	LCPME-UL, Nancy

Le secret est de ne pas renoncer.

Paolo Coelho

Remerciements

Ce travail a été réalisé durant la période d'octobre 2008 à janvier 2012 au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (UMR 7569), à Vandoeuvre-lès-Nancy et a été financé par l'Institut Carnot Eau et Environnement en Lorraine (ICEEL).

Mes premiers remerciements vont à Jérôme Rose, directeur de recherche au CNRS, CEREGE et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Professeur à AgroParisTech, pour avoir accepté d'être les rapporteurs ce travail de thèse.

Je remercie également Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Professeur à l'Université Catholique de Louvain pour accepter la lourde tâche de présider ce jury de thèse, et Gilles Guibaud, Professeur à l'Université de Limoges, pour avoir accepter de juger ce travail.

Dans la mesure où j'ai eu la chance de côtoyer des gens exceptionnels durant cette période de trois ans et quelques mois, cette partie risque d'être légèrement répétitive. En effet, l'inconvénient est que j'ai un grand nombre de « mercis » à énoncer.

Tout d'abord, je remercie Fabien Thomas, directeur du Laboratoire Environnement et Minéralurgie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour l'ambiance conviviale que tu sais y faire régner.

Mes plus vifs remerciements vont à mon directeur de thèse, Bruno Lartirges, pour m'avoir accordé sa confiance durant ces années de dur labeur. Ces trois années à ton contact ont été extrêmement agréables et enrichissantes. Merci d'avoir toujours gardé ton enthousiasme et ta joie de vivre malgré les moments de doute et d'avoir su me guider à travers les écueils de la thèse. Et un merci particulier pour ta disponibilité en cette fin de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement Jérôme Duval, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Tu as su insuffler à ce travail ton enthousiasme, ton professionnalisme et ta rigueur. Un grand merci également pour avoir toujours su prendre le temps de m'écouter, de me conseiller et de me remotiver dans les moments difficiles, lors de discussions professionnelles ou personnelles. J'ai beaucoup appris de toi.

Je remercie également Christophe Merlin, pour ta contribution essentielle à ce travail. Merci de m'avoir « présenté » Schewanella *Oneidensis* MR-1 et pour m'avoir initiée aux gestes de base de la microbiologie. Merci également pour toutes nos discussions microbiologiques, notamment celles de la fin de la journée, lors des cultures du soir. Et plus sérieusement, un immense merci pour avoir pris part, de manière active, à l'encadrement de mes travaux de thèse et pour avoir su m'encourager, en particulier, lors de la rédaction de l'article et du manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite à Grégory Francius pour ta disponibilité, ta jovialité et son extrême gentillesse, même lorsque, pour la énième fois, les bactéries ou agrégats se détachaient de la plaque de verre lors des « interminables » acquisitions de données de nos séances d'AFM. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de tes connaissances expérimentales et biologiques, ainsi que de m'avoir initiée aux us et coutumes guadeloupéens.

Merci à Jaafar Ghanbaja pour avoir été mon guide lors de observations MET et de m'avoir initiée à cette technique. Je retiendrai de ces séances ton obstination à trouver les agrégats même lorsque ces derniers se cachaient tel de minuscules grains de sable au milieu de cette immense mer de résine Epoxy, ainsi que ta rigueur lors de l'interprétation de ces observations.

Merci à Pavel Polyakov m'avoir initiée aux traitements de données acquises via spectroscopie de force et pour ta disponibilité lorsqu'il fallait débugger le programme afin d'extraire les paramètres souhaités.

Enfin, je remercie Christophe Baravian pour m'avoir formée aux manipulations rhéologiques. Un grand merci également à Laurent Michot pour ton aide lors de l'interprétation de ces résultats. Mon seul regret est que, ces manipulations intervenant à la fin de ma thèse, je n'ai pu bénéficier de votre savoir et de votre expérience que très peu de temps.

Ces trois années m'ont permis de mûrir et d'évoluer, aussi bien scientifiquement que personnellement. Je le dois aussi à tout le personnel du LEM, sans qui, ce laboratoire ne serait pas ce qu'il est actuellement.

Je tiens donc à remercier Céline Caillet, qui fut ma première collègue de bureau, toujours souriante, pour m'avoir accueillie avec tant de gentillesse. Je n'oublierai pas nos fous rires, en particulier lors d'une certaine correction de projet 2A et autre canicule. Merci également à Yves Waldvogel pour ton aide durant les manipulations d'électrophorèse, ainsi que pour les conversations, les petits chocolats et biscuits qui m'ont remonté le moral et, surtout pour ta constante bonne humeur. Merci à Delphine Martin qui est toujours venue au chevet de mon vaillant ordinateur lorsqu'il était malade, à Karine Devineau pour les « bonjours » du soirs, à Nicole Magnabosco et Dominique Marandon pour votre gentillesse, à Mukendi Kongolo et Angelina Razafitianamaharavo pour votre affabilité, à Isabelle Bihannic (désolée de n'avoir pu faire plus de tomographie), à Philippe de Donato et Tatiana Görner pour votre amabilité, à Emmanuelle et Manuel Pelletier, pour votre bienveillance. Merci à l'équipe du LCPME, Hélène Guillauteau, Edith Angel et Laurence Mathieu pour votre disponibilité durant mes manipulation de microbiologie, et David pour ta bonne humeur. Merci à Muriel Prost, Najib Lamsaye (j'espère que j'orthographie comme il faut) et Yolande Corneil, mes stagiaires, pour votre bonne humeur, votre disponibilité et pour m'avoir donné le gôut de l'enseignement 'sur le terrain'.

Un grand merci à Isabelle Henrot qui fut ma responsable lors de mon monitorat, pour avoir fait preuve d'une si grande ouverture d'esprit et compréhension au sujet des contraintes liées au travail sur des échantillons biologiques qui furent les miennes durant ces trois ans, et pour avoir su m'initier, avec tant de conviction et de générosité aux joies de l'enseignement 'en salle'. Ce serait une grande joie d'arriver un jour à sa hauteur. Merci aussi à l'équipe administrative, Christine Fivet et Marie-Annick Souchon, pour votre gentillesse.

Merci enfin à tous ceux dont je n'ai pas cité le nom…

Un merci tout particulier à Jenny Merlin, Florence Gosselin, Reem El Khatib, Lise Salsi et Laure Pasquini (ma seconde collègue de bureau), pour m'avoir soutenue durant mes phases intensives rédactionnelles et les moments difficiles de cette thèse, en particulier cette dernière année. Vous êtes devenues bien plus que des collègues, des amies. Un grand merci également à Renaud Gley, Haytham Alloul et Noémie Taquet pour toutes nos discussions et pour votre soutien ! Et merci aussi à l'équipe du vendredi, je n'oublierai pas le goût des croissants !! Vous allez tous me manquer !!! Merci à Jean-Marie Fischbach et Cristelle Cailleteau, notamment pour une certaine représentation de Roméo et Juliette revisitée… Je remercie

enfin sincèrement tous mes camarades thésards ou postdocs : Camille Rivard, Jamil Houhou, Hania Rida, Jean-Aimé Mbey, Florence-Anaïs Kauffer (Florence du LCPME), Christophe Rochette, Patrice Piriou, Alexandre Matinin, Agathe Duverger (malgré nos rendez-vous manqués…), Mathilde Grandjean, Virginie Derieke (la Canadienne), Jennifer Martin (fraîchement arrivée), Henriette Zangue, Guillaume Frappier, Catalina Avella.

Je tiens à remercier encore, tous mes amis pour votre soutien constant durant ces trois années de thèse : Gauthier T. et Hélène F. pour les sorties à Dusseldorf quand mon moral était au plus bas, Camille M. et Daniel M., notamment pour ce dernier week-end à Nantes qui a été beaucoup plus apaisant que certaines vacances, Audrey C. et Audrey K., qui ont vécu a peu près la même aventure à quelques dizaines ou centaines de kilomètres d'écart, Mélanie B. qui a suivi mes pérégrinations, Alexandre F., Anne-Claire S. qui est là depuis le début, Oana I., tu a été une très jolie rencontre, Yannick B., Elise M., Aurélie K. et tous les autres …

Merci aussi aux deux petites grenouilles, celle de la Règle de Quatre, et, surtout, celle de la prépa…

Je remercie Erwan Paineau pour son soutien, son aide, son écoute sans failles durant ces trois années de thèse. Nos conversations et nos fou-rires ont toujours été salvateurs. Sans toi, je n'y serais pas arrivée. Merci d'avoir été là et d'être encore là.

Enfin et surtout, je tiens à remercier ma famille, Papa, Maman, Jean-Frédéric et Jean-Yves. Il y aurait tellement à dire… Vous avez toujours été là, depuis le départ, bien avant ces trois années de thèse, sans vous, je n'en serais jamais arrivée là. Merci pour votre soutien indéfectible.

Marie-Eve

Sommaire

Introduction générale……..2

Chapitre 1 : Contexte bibliographique

I. Description du procédé de traitement des eaux usées……..7
I.1 Place des boues bactériennes dans ce procédé……...7
I.2 Mécanismes physico-chimiques de coagulation et floculation……..9
I.2.1 Coagulation…….9
I.2.2 Floculation……11
II. Impact de la structure des flocs sur la déshydratation de boues bactériennes……..14
II.1 Morphologie des flocs……14
II.2 Facteurs impactant la déshydratation des boues……16
II.2.1 Influence physico-chimique des EPS sur la constitution des flocs…….16
II.2.2 Impact du conditionnement sur la structure des flocs et leur résistance au cisaillement……...18
III. Floculation de cellules bactériennes de type Gram négatives par des molécules de polyéthylèneimine……22
III.1. Impact de la masse moléculaire de polyéthylèneimine sur la floculation de cellules bactériennes Gram négatives……22
III.2 Toxicité du polyéthylèneimine sur les cellules bactériennes de type Gram négatives.…24
IV. Axes d'étude……...26
Références bibliographiques……28

Chapitre 2 : Description du système et méthodes de caractérisation

I. Définition du système……45
I.1. Souche bactérienne Schewanella Oneidensis MR-1, de type Gram négative.……...45
I.1.1 Structure membranaire des bactéries Gram négatives……..45
I.1.2 Propriétés de surtructure de la souche utilisée…….47
I.1.3 Cultures bactériennes……...48
I.2. Floculants utilisés……...50
I.3. Préparation des suspensions floculées……51
II. Méthodes de caractérisation des suspensions floculées……...53
II.1 Mobilité électrophorétique…….53
II.2 Mesure de taille par granulométrie laser……55
II.3 Observations en microscopie électronique en transmission (MET)……...57
II.4 Mesures d'absorbance/relargage de cristal violet……...59
II.5 Mesures de temps de générations après traitement des bactéries au polyéthylèneimine...60
II.6 Microscopie à force atomique (AFM)……62
II.6.1 Description de la technique…….62
II.6.2 Imagerie……...64
II.6.3 Spectroscopie de force (nanoindentation)……65
II.7 Mesures rhéologiques…….68
II.7.1 Description de la technique…….68

II.7.2 Cisaillement simple ou écoulement……70
II.7.3 Cisaillement oscillatoire……..72
Références Bibliographiques……73

Chapitre 3 : Flocultation de Shewanella *Oneidensis* MR-1 par des polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol : Impact de la presence de surstructure et de la concentration en polymère

Polyethyleneimine-Mediated Flocculation of Shewanella oneidensis MR-1: Impacts of Cell Surface Appendage and Polymer Concentration……..81
ABSTRACT……..82
I. Introduction……83
II. Materials and methods……..86
II.1 Bacterial culture and cell conditioning……...86
II.2 Preparation of flocculated suspensions……..86
II.3 Electrophoretic mobility……87
II.4 Size measurements……88
II.5 Transmission electron microscopy……88
II.6 Atomic force microscopy……...89
III. Results……89
III.1 PEI-mediated flocculation of bacteria devoid of LPS O-antigen surface structure……..89
III.2 PEI-mediated flocculation of bacteria with LPS O-antigen decorated membrane……...92
IV. Discussion……...94
IV.1 PEI-mediated flocculation of bacteria devoid of LPS O-antigen surface structure……..94
IV.2 PEI-mediated flocculation of bacteria with LPS O-antigen decorated membrane……...96
V. Conclusions……..98
Acknowledgment……100
REFERENCES……101
Figure……..105
Supplementary data……111
Références bibliographiques……...120

Chapitre 4 : Influence de la masse moléculaire du polyéthylèneimine sur la floculation de cellules bactériennes présentant ou non des surstructures

I. Floculation des cellules bactériennes par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol……127
I.1 Etude des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures lipopolysaccharidiques……127
I.1.1 Résultats……..127
I.1.2 Observations……...130
I.1.3 Discussion……...133
I.2 Etude des cellules bactériennes présentant des surstructures lipopolysaccharidiques…..134
I.2.1 Résultats……..134
I.2.2 Observations……...138
I.2.3 Discussion……...141

II. Floculation des cellules bactériennes par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 600 g/mol……....143
II.1 Etude des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures lipopolysaccharidiques143
II.1.1 Résultats……143
II.1.2 Observations……..146
II.1.3 Discussion……147
II.2 Etude des cellules bactériennes présentant des surstructures lipopolysaccharidiques….149
II.2.1 Résultats……149
II.2.2 Observations……..152
II.2.3 Discussion……154
III. Synthèse……156
Références bibliographiques……...162

Chapitre 5 : Propriétés mécaniques et nanomécaniques des agrégats bactériens floculés par des polyéthylèneimine de hautes masses moléculaires

I. Etude des propriétés nanomécaniques des cellules et agrégats bactériens……..169
I.1. Propriétés nanomécaniques des bactéries, en présence ou absence de surstructure, avant traitement au PEI…….170
I.2. Propriétés nanomécaniques de cellules bactériennes et agrégats bactériens après traitement au PEI…….172
I.2.1 Cas de cellules bactériennes ne présentant pas de surstructure, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol……..172
I.2.2 Cas de cellules bactériennes portant des surstructures, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol……..175
I.2.3 Cas de cellules bactériennes ne portant pas de surstructure, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol……179
I.2.4 Cas de cellules bactériennes portant des surstructures, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol……180
II. Etudes des propriétés mécaniques des suspensions bactériennes floculées……...182
II.1.Etude des suspensions bactériennes non traitées et des solutions de polymères……..182
II.2. Cisaillement oscillatoire……..185
II.2.1 Etude des suspensions floculées par du polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol……185
II.2.2 Etude des suspensions floculées par du polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol……..190
II.3. Ecoulement……..192
III. Synthèse……199
Références bibliographiques……...202

Conclusion générale……207

Introduction générale

Le cadre général de cette thèse est le problème de la réduction de la teneur en eau des boues biologiques de station d'épuration. Ces boues présentent une siccité (ou teneur en matière sèche) de 30% environ. Ceci débouche sur deux inconvénients majeurs, à savoir, un volume important de déchets et les problèmes liés à leurs stockage et élimination, ainsi qu'une demande énergétique très élevée lors de leur incinération. C'est pour cette raison que l'objectif global de cette thèse est d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes pouvant participer à la retenue en eau dans ces boues. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration et de la masse moléculaire d'un polymère fréquemment utilisé pour le conditionnement des boues biologiques d'épuration, le polyéthylèneimine, sur la structure des flocs. Parmis les nombreux paramètres susceptibles d'influencer cette rétention en eau, la présence d'exopolymères bactériens ou surstructures membranaires est souvent cité. Un point focal de cette thèse est donc l'étude de l'interaction de ces surstructures avec le conditionnement en polyéthylèneimine.

L'originalité de cette étude réside dans le fait que nous avons « modélisé » les boues de stations d'épuration formant un système très complexe, par une souche bactérienne pure dont nous avons fait varier le paramètre « présence/absence de surstructure ». Cette simplification du système nous autorise à observer l'influence de chaque paramètre étudié.
Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les propriétés nanomécaniques des agrégats formés ainsi que la viscosité et les propriétés mécaniques des suspensions obtenues, préalablement soumises à une centrifugation, de manière à mimer le traitement subi en station d'épuration. Ce procédé nous autorise à corréler l'état de structure des flocs et leur comportement durant la déshydratation aux échelles macroscopique et nanométrique.

Le présent manuscrit s'articule de la façon suivante. Dans un premier chapitre, après avoir explicité la place des boues dans le procédé de traitement des eaux usées et rappelé les mécanismes de coagulation/floculation, nous allons développer l'impact de la structure des flocs bactériens (en particulier la présence d'exopolymères) et de la concentration du conditionnement sur la déshydratation des boues. Dans la dernière partie de ce chapitre, nous nous interrogerons sur l'impact de la masse moléculaire du polymère et de sa toxicité sur la floculation et l'intégrité des cellules bactériennes. Le second chapitre sera l'occasion de

présenter le système utilisé et les différentes techniques d'analyses mises en œuvre. Dans les chapitres trois et quatre, nous décrivons les modalités d'agrégation des cellules bactériennes par des polyéthylèneimines de masses moléculaires différentes, en fonction de la présence/absence de surstructure. Enfin, nous nous intéresserons dans le chapitre cinq, aux propriétés (nano)mécaniques des agrégats formés, et au comportement en écoulement de ces suspensions floculées par des polymères de hautes masses moléculaires.

Chapitre 1

Contexte bibliographique

Chapitre 1 : Contexte bibliographique

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord expliciter la place des boues de station d'épuration dans le procédé de traitement des eaux usées, puis décrire les procédés de coagulation et floculation intervenant des boues d'épuration. Nous allons ensuite nous intéresser à la composition de ces boues et aux facteurs intervenant dans leur déshydratation. Enfin, nous allons étudier l'impact d'un polymère cationique, le polyéthylèneimine, largement utilisé pour le conditionnement des boues, sur la floculation de cellules bactériennes.

I. Description du procédé de traitement des eaux usées

I.1 Place des boues bactériennes dans ce procédé

Les boues de station d'épuration sont générées à l'issue du traitement des eaux usées.
Ce traitement se divise en plusieurs étapes. Après avoir été débarrassées des éléments les plus grossiers par des traitements préliminaires (dégrillage, dessablage et déshuilage), les eaux usées subissent différents traitements biologiques et/ou physico-chimiques (Figure 1).

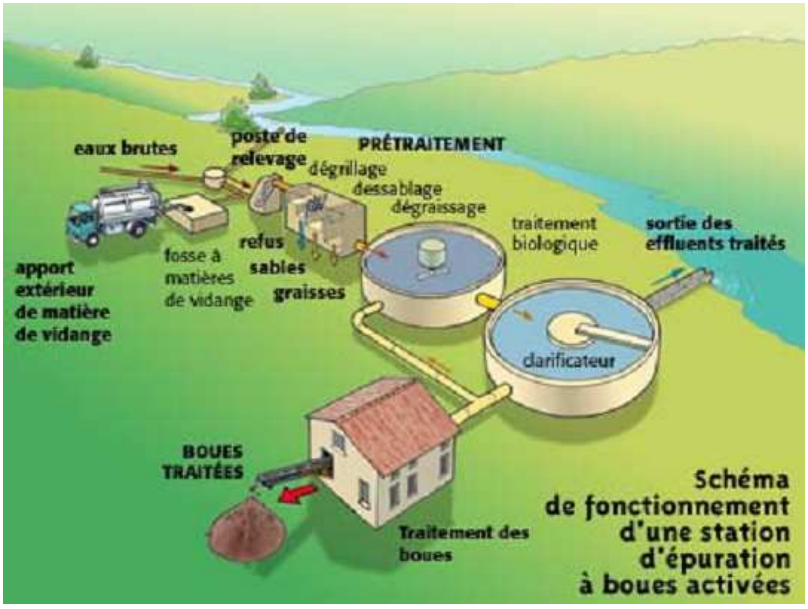


Figure 1 : Schéma du fonctionnement d'une station d'épuration (http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/f14.htm)

Dans le cas le plus général, en milieu tempéré, les eaux usées sont mises en contact avec des bactéries en alternance aérobiose/anaérobiose afin de faciliter la minéralisation de la matière organique, on parle alors de boues activées [1-3]. Les bactéries sont en collectées par décantation. Ce procédé est accompagné ou remplacé par un traitement physico-chimique lorsque les conditions (climatiques en particuliers) ne permettent pas une efficacité optimale du traitement biologique. Une étape de coagulation-floculation permet alors l'agrégation de la matière organique, il s'ensuit une étape de clarification. Celle-ci peut s'accompagner de deux phases d'homogénéisation permettant une optimisation de la clarification [4]. Le réactif employé est soit le chlorure ferrique associé à de la chaux [5] soit un polymère de poids moléculaire élevé [6]. Il s'agit de déstabiliser la suspension pour agréger les colloïdes qu'elle contient, principalement la matière organique, pour former des flocs facilement décantables. Ce procédé permet de retirer de l'ordre de 80% de la pollution colloïdale présente dans les eaux, d'origine minérale ou organique [7-8].

A l'issue d'un procédé incluant un traitement biologique, une partie des boues va être recyclée dans le circuit de traitement des eaux usées, tandis que l'autre partie sera traitée. Les boues sont alors épaissies (concentrées), le plus souvent par flottation, avant d'être conditionnées avec un coagulant (chlorure ferrique et chaux ou polymères cationiques de hautes masses moléculaires) [5-6]. Elles sont enfin déshydratées par centrifugation, filtre-bande, ou filtre-presse et soumises à des pressions allant jusqu'à 15 bars selon les procédés. Ces différentes étapes permettent d'amener les boues d'une siccité de 5% à une siccité de 30% environ. On récupère alors un gâteau de filtration composé majoritairement de matière organique d'origine bactérienne, bactéries, et des substances résiduelles de conditionnement.

Actuellement, plus d'un million de tonnes de boues (matière sèche) sont produites par an dans les stations d'épuration françaises. Cela représente une quantité totale de près de 4 millions de tonnes si l'on considère une siccité de 30% environ. Ce chiffre est en constante augmentation, ce qui pose d'importants problèmes de stockage et d'élimination de ce type de déchets. En effet, les boues ne peuvent être éliminées que par épandage ou incinération, la mise en décharge étant fortement réglementée (30% de siccité minimum). Comme les surfaces disponibles pour l'épandage n'augmentent pas, essentiellement pour des raisons sanitaires, une importante part des boues produites est incinérée. L'inconvénient majeur de cette solution est qu'une boue après déshydratation contient environ 70% d'eau. Or, il s'avère relativement coûteux d'un point de vue énergétique, d'incinérer un produit contenant majoritairement de

l'eau. Cependant, une augmentation de la siccité des boues pourrait permettre de les incinérer conjointement aux autres déchets ménagers.

Comme nous avons pu le voir, le procédé de coagulation/floculation joue un rôle majeur dans le traitement des eaux usées en induisant l'agrégation de particules organiques ou inorganiques. C'est pour cette raison que nous allons en développer les mécanismes ci-dessous.

I.2 Mécanismes physico-chimiques de coagulation et floculation

L'agrégation de particules colloïdales dans le traitement de l'eau se fait par ajout d'un réactif chimique réduisant les forces interparticulaires assurant la stabilité de la suspension. Une agitation conjointe permet d'optimiser la mise en contact de ces particules colloïdales par collision provoquant ainsi leur agrégation [8]. Dans le domaine du traitement de l'eau, la coagulation correspond au phénomène de déstabilisation de la suspension, tandis que la floculation désigne la collision des particules déstabilisées [9-10]. Pour autant, cette nomenclature ne préjuge en aucun cas des processus physico-chimiques engagés lors de cette étape. D'un point de vue physico-chimique, les termes de coagulation et floculation se réfèrent à la nature du réactif employé et aux mécanismes que nous allons détailler dans ce paragraphe.

I.2.1 Coagulation

Le terme coagulation fait référence au type d'agrégation obtenu par la déstabilisation d'une suspension colloïdale par un électrolyte. Le mécanisme mis en œuvre s'explique par la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) [11-12]. Cette théorie suggère que la stabilité d'une suspension colloïdale est le fruit de l'équilibre des interactions s'exerçant sur les particules qu'elle contient [13]. L'énergie d'interaction existant entre deux particules chargées correspond à la somme des forces d'attraction et de répulsion (Figure 2).
Les forces d'attraction sont essentiellement les forces de Van der Waals [14].

Les forces de répulsion ne dépendent que de l'extension de la double couche ionique induite par leur charge de surface effective. En effet, afin de compenser la charge portée par une

particule, et de conserver la neutralité électrique de la suspension, un arrangement spécifique des ions et contre-ions se met en place autour des particules. On parle de modèle de la double couche électrique ou modèle de Stern-Gouy-Chapman. Ce modèle décrit la distribution des ions en deux couches distinctes au voisinage d'une particule [15]. La couche interne, au contact de la particule est appelée couche de Stern. Elle est composée de contre-ions adsorbés à la surface de la particule. Il s'agit d'une couche associée à la particule, d'épaisseur faible (de l'ordre du rayon d'un contre-ion hydraté). La couche externe, ou couche diffuse, d'épaisseur plus importante, est composée de contre-ions et co-ions. La distribution des charges dans cette couche dépend des interactions électrostatiques existant à la surface de la particule et des mécanismes de diffusions (liés à l'agitation thermique du milieu). Cette seconde couche est directement liée à l'équilibre ionique qui se crée au sein de la suspension et qui détermine l'évolution du potentiel électrique en fonction de la distance à la particule. Par conséquent, ce dernier diminue à mesure que l'on s'éloigne de la particule jusqu'à s'annuler dans le milieu continu (soluté). Les forces de répulsion sont générées par l'interpénétration des doubles couches respectives de deux particules en approche.

La possibilité d'une coagulation dépend de l'importance relative des forces d'attraction et de répulsion [16]. Celle-ci dépend de la distance séparant les deux particules concernées. En effet, le potentiel d'attraction diminue avec la distance suivant une loi de puissance, tandis que le potentiel de répulsion dû à la double couche ionique diminue comme une exponentielle décroissante. Ainsi, lorsque deux particules sont "moyennement" éloignées, ce sont les interactions répulsives qui dominent. A l'inverse, lorsque la force ionique de la solution augmente, l'épaisseur de la couche diffuse diminue, on parle de compression de la double couche. Si la concentration en électrolyte est suffisante, les forces de répulsion diminuent, tandis que les forces d'attractions deviennent prépondérantes. Ainsi, la barrière énergétique diminue et les particules s'agrègent.

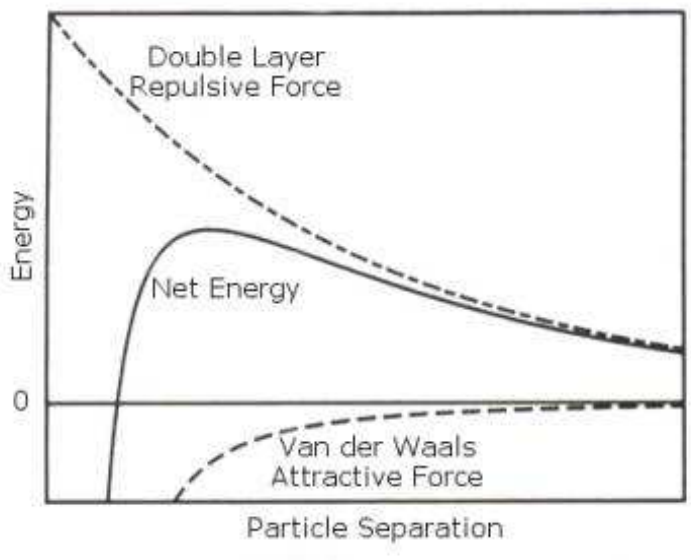


Figure 2 : Variation de l'énergie d'interaction conditionnant la destabilisation de suspensions colloïdales.

En traitement de l'eau, on se réfère à deux mécanismes de coagulation, la coagulation par ennoiement et la coagulation par neutralisation de charge. Dans le premier cas, la coagulation se fait par l'intermédiaire d'un sel métallique hydrolysable. Les particules en suspension sont ennoyées par (ou s'adsorbent sur) les hydroxydes précipités, produisant des flocs de taille importante. Ce mode de coagulation n'a lieu qu'en présence d'une forte concentration en sel métallique hydrolysable. La concentration critique de coagulation, qui correspond à la concentration à partir de laquelle on observe les premiers effets d'agrégation, est très peu dépendante de la concentration particulaire. De plus, ce type de mécanisme permet d'éviter la restabilisation de la suspension, même lorsque le sel est ajouté en excès [17].

La coagulation par neutralisation de charge présente, quant à elle, à la fois une concentration optimale d'agrégation et une concentration de restabilisation. Ces deux valeurs sont fortement influencées par la concentration en particules de la suspension. Enfin, en excès de coagulant, la charge de surface des particules s'inverse, ce qui provoque la restabilisation.

I.2.2 Floculation

Le terme floculation est utilisé lors de l'emploi comme réactif de macromolécules organiques. Dans ce cas, l'agrégation est gouvernée à la fois par la charge et la conformation du polymère en solution (conformation étendue ou compacte pouvant entraîner l'écrantage

des charges et variant avec la force ionique de la suspension), et est directement liée aux propriétés de masse et de charges du polymère. Il en résulte deux mécanismes conjoints, le pontage entre les particules colloïdales et la neutralisation des charges de celles-ci. Le premier a un rôle prédominant lors de l'emploi de polymère faiblement chargé [18] et le second, lorsque les particules à agréger et le polymère utilisé sont de charges opposées [19]. Ces mécanismes peuvent intervenir de façon singulière ou simultanément.

Le pontage interparticulaire est le résultat de l'adsorption du polymère à la surface des particules via des liaisons hydrogènes ou des liaisons électrostatiques. Le polymère utilisé porte autant de fonctions pouvant potentiellement interagir avec les particules colloïdales que le nombre de monomères dont il est composé. Ces fonctions constituent autant de points d'ancrage potentiels pour l'adsorption du polymère sur différentes particules colloïdales et la formation de pontage [18]. Ce mécanisme est uniquement dépendant de la taille du polymère utilisé et non de sa charge. Il est d'autant plus efficace pour les polymères de hautes masses moléculaires [20-22] et linéaires [23], la longueur de la chaîne déterminant le nombre de particules auxquelles le floculant s'adsorbe (Figure 3).

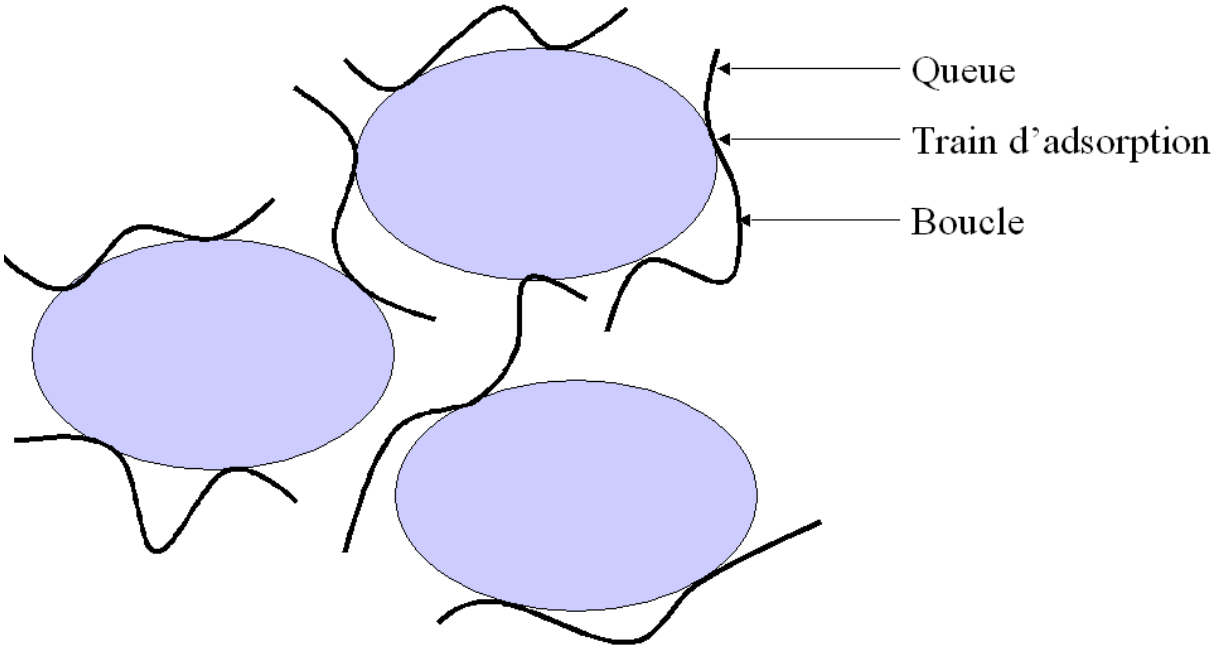


Figure 3 : Adsorption de chaînes polymériques à la surface de particules générant l'agrégation par pontage de celles-ci.

Il est possible de définir une concentration optimale de floculation. Dans ce cas, il s'agit de la concentration au-delà de laquelle les sites potentiels de fixation restés vacants se font suffisamment rares pour induire un degré de recouvrement tel que les chaînes polymériques s'excluent mutuellement. Ce phénomène diminue fortement la probabilité de pontage [24] et aboutit, en excès de polymère, à une restabilisation par exclusion de chaîne (encombrement stérique) [24-25].

La floculation par neutralisation de charges se fait par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les segments de polymère chargés et la surface des particules de charge opposée. Ce processus est peu dépendant des variations de longueur de chaîne du polymère, par contre sa charge, le pH et la force ionique de la suspension, jouent un rôle essentiel dans ce type d'agrégation. La concentration optimale de floculation correspond à la concentration pour laquelle on observe une neutralisation globale de la charge de la surface de la particule. Au-delà de cette concentration, l'excès de polymère induit une inversion de charge des particules, ce qui restabilise la suspension [19]. Le plus généralement, ce processus ne permet pas une neutralisation charge à charge des groupements fonctionnels de la particule, mais tend plutôt à une neutralisation globale de sa charge de surface, on parle de neutralisation par patch. La particule présente alors une surface hétérogène, montrant des régions fortement chargées en raison de la présence du polymère et d'autres présentant un déficit de charges [19, 26-27]. Il apparaît de fortes interactions électrostatiques entre régions de charge opposée sur les particules de la suspension [26]. La figure 4 schématise ces phénomènes.

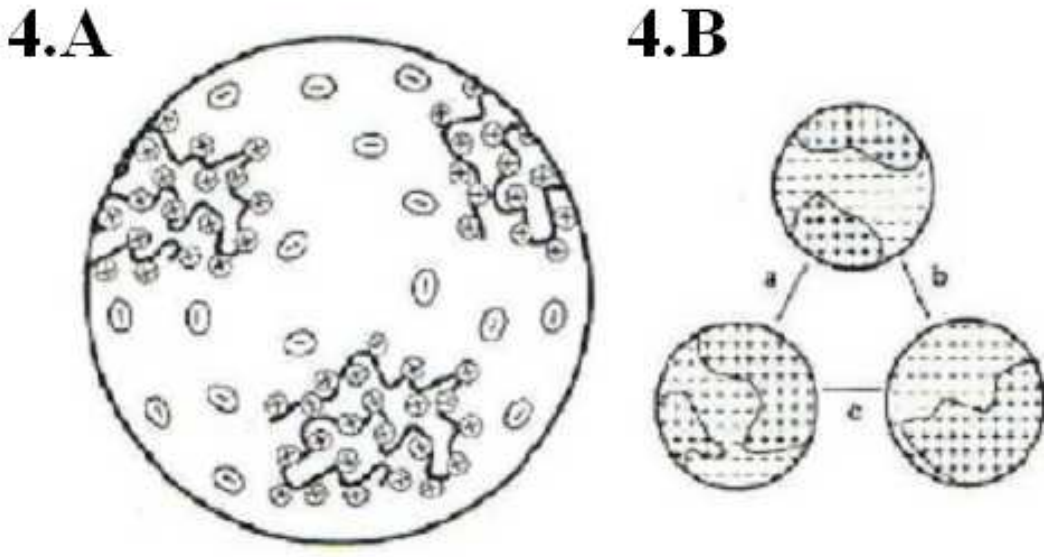


Figure 4 : Adsorption de chaînes de polymères cationiques sur une surface fortement chargée négativement (4.A), et interactions interparticulaires induites : a et b, répulsions; c, attraction (4.B) [26].

Ces deux phénomènes jouent donc un rôle primordial dans la clarification des eaux usées via la formation de flocs. C'est pour cette raison qu'après avoir rappelé la structure et la morphologie des boues de station d'épuration, nous nous sommes intéressés à leur impact sur la déshydratation des boues bactériennes.

II. Impact de la structure des flocs sur la déshydratation de boues bactériennes

II.1 Morphologie des flocs

Les boues bactériennes issues du traitement biologique des eaux usées constituent un matériau complexe composé à la fois de flocs bactériens de taille très variables [28] et de particules libres [3]. Cela s'explique en premier lieu par la diversité des souches bactériennes hébergées [29], mais également par l'hétérogénéité des flocs qui composent ces boues [2, 30-31]. Ces derniers sont constitués de divers microorganismes, microcolonies bactériennes [6], organisées en clusters [32]. Ils comprennent également une matrice de matière organique se composant principalement d'exopolysaccharides (EPS) [1, 28, 33], mais également de débris d'ADN, ARN et protéines [34-35]. De nombreuses études ont tenté de caractériser la structure externe des flocs en 2D [1-2] ou 3D par reconstruction graphique et modélisation [3, 36, 37]

microscopie confocale [31], diffusion de lumière [30] et s'accordent sur le fait qu'il existe d'importantes hétérogénéités dans la structure de ces flocs.

La variabilité du milieu a également un effet sur les souches bactériennes présentes dans les boues et sur la structure des flocs formés. Celle-ci génère une sélection naturelle entre les différentes souches bactériennes conditionnées par leur capacité à s'y adapter [38], ce qui explique que d'une station de traitement à l'autre, les boues produites puissent être de qualités différentes. Un effet de la répartition spatiale des nutriments à l'échelle de l'agrégat est d'orienter le développement des colonies bactériennes dans la direction où le substrat est le plus concentré [30], ce qui peut créer une asymétrie du floc. Enfin, les variations de composition du milieu peuvent jouer un rôle sur la taille et la stabilité des flocs. Une réduction des sulfates dans le milieu par des bactéries thioréductrices tend à altérer la stabilité des flocs, diminue les forces de cohésion de ces derniers jusqu'à la « défloculation » [34, 39]. On peut enfin noter que certains traitements peuvent promouvoir le développement puis la domination d'une souche par rapport aux autres. C'est notamment le cas de la croissance d'une population de bactéries fécales de type coliforme, durant l'étape de déshydratation [40].

D'une manière générale, on peut décrire la structure des flocs comme un consortium bactérien maintenu cohérent par la présence d'une matrice exopolymérique [1, 41]. Il a été constaté qu'une augmentation de la proportion d'EPS dans les flocs a pour effet d'augmenter leur taille, leur stabilité et diminue la dispersion de bactéries isolées [42] pouvant provenir de l'érosion des flocs [43, 44]. Les EPS ont donc un rôle capital dans le processus de formation des flocs bactériens, c'est pourquoi nous allons nous intéresser aux modalités avec lesquelles ils assurent leur cohésion. Compte tenu de la présence de charges négatives, les EPS sont à l'origine d'une forte concentration en cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+}. Le pontage de ces derniers avec les EPS (neutralisation de charge) assure en partie la stabilité et la rigidité des flocs formés [45]. Notons que toute diminution de concentration en Ca^{2+} provoque un relargage des EPS, ce qui altère la stabilité des flocs [34]. Cependant, il est très probable que la présence de ces cations au sein du floc induise l'apparition de fortes pressions osmotiques provoquant le piégeage de molécules d'eau dans les flocs [42, 46].

Les EPS jouent donc un double rôle dans la déshydratation des boues de station d'épuration. Tout d'abord, ils permettent de maintenir la forme agrégée des cellules bactériennes, améliorant ainsi l'efficacité de la déshydratation. Cependant, ils sont également à l'origine de

l'apparition de forces osmotiques ayant pour effet de piéger l'eau au sein du floc, limitant ainsi les potentialités de déshydratation. Dans le paragraphe suivant, nous allons donc étudier l'impact des EPS sur la déshydratation des boues activées, puis nous pencher sur l'action du conditionnement.

II.2 Facteurs impactant la déshydratation des boues

II.2.1 Influence physico-chimique des EPS sur la constitution des flocs

Les EPS peuvent être synthétisés biologiquement puis excrétés, provenir de la lyse bactérienne [32, 47] ou de l'adsorption de matière organique présente dans le milieu à la surface de flocs bactériens [47, 48]. Ces derniers affectent les caractéristiques physico-chimiques des boues et donc le processus de déshydratation [49] en modifiant la charge des flocs [50], leurs structure [51], sédimentation [48, 52, 53] et agrégation [54-59].

Suivant les stations étudiées, la nature des substances exopolymériques extraites est très différente [48, 57, 60] mais il a été montré que, d'une manière générale, les boues d'épuration sont chargées globalement négativement [61]. Ce paramètre est lié à leur composition chimique très hétérogène [47, 60]. En effet, les EPS sont à l'origine de la présence de nombreux groupes fonctionnels dans les flocs, en particulier des groupes amines, hydroxyles et carboxyles auxquels s'adsorbent ou se lient des molécules d'eau (hydratation) [62-64]. Cela provoque la dissociation et l'ionisation de ces groupes fonctionnels. C'est ce phénomène d'ionisation des groupes fonctionnels des EPS qui est à l'origine de la charge négative des boues [58, 65-66].

Des tests effectués sur des suspensions bactériennes au cours de la production d'EPS ont montrés qu'ils ont un réel impact sur la viscosité de la suspension lors de l'application de contraintes [67]. Après la diminution des contraintes, si elles ne contiennent que des EPS, les suspensions retrouvent leur viscosité initiale [68]. En contribuant à former une matrice permettant de lier les cellules entre elles [1, 69], les EPS améliorent donc la stabilité de l'édifice et sa résistance mécanique [42]. La figure 5 présente une micrographie montrant l'organisation des boues après déshydratation. Les suspensions floculées soumises aux contraintes liées à la déshydratation atteignent un point de gélification au-delà duquel les

interactions entre la matrice et les particules ne sont plus suffisantes pour résister à la pression. On assiste alors à un écroulement de la structure et une consolidation du matériau [70]. Cette action de stabilisation est liée aux forces osmotiques [71] induites par la présence des EPS. Cette pression est induite par les groupes fonctionnels et la présence des contre-ions qui leur sont liés [72, 73].

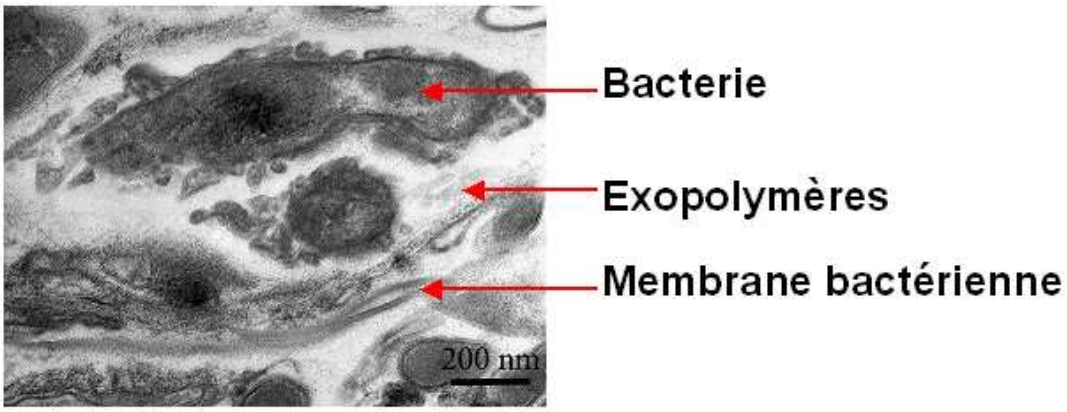


Figure 5 : Micrographie (Microscopie électronique en transmission) de boue de station d'épuration conditionnée, après déshydratation.

En général, la pression osmotique est décrite comme la force appliquée à une membrane semi-perméable (perméable au solvant et non au soluté) séparant un solvant pur, et ce même solvant en présence d'un soluté. L'addition du soluté provoque une diminution du potentiel chimique du solvant en diminuant sa fraction molaire. Ce dernier augmente lorsqu'on augmente la pression sur la solution. Finalement l'équilibre est atteint quand ce surcroît de pression compense la diminution du potentiel chimique [73], c'est-à-dire, concrètement, lorsque la concentration finale en soluté est la même des deux côtés de la membrane. Ainsi lorsqu'un soluté est ajouté dans un solvant, il provoque l'apparition d'une pression osmotique par rapport à la pression existant dans le solvant pur [73]. Dans le cas du système que nous étudions, la séparation soluté/solvant se fait par l'intermédiaire de liens polymériques formant une matrice semi-perméable physique. Le solvant s'écoule alors dans le gel ainsi formé et provoque l'apparition d'une pression sur ces liaisons, résistant au gonflement. La présence de contre-ions associés dans le gel participe à augmenter la pression osmotique observée. L'équilibre de Donnan n'est atteint que lorsque le potentiel chimique du sel est le même dans le gel et hors du gel [73]. C'est pourquoi, la présence d'EPS est à l'origine de la rétention d'eau liée. D'autres auteurs [74] caractérisent la pression osmotique comme l'intensité des interactions (électrostatiques et forces de Van der Waals) entre les particules (ici EPS et

bactéries). Quelle que soit la définition employée, on comprend aisément que cette pression s'oppose aux forces de compression appliquées aux boues de station d'épuration. Ce raisonnement s'illustre par le fait qu'une diminution de la pression osmotique liée au EPS (obtenue par l'intermédiaire d'une augmentation de la force ionique de la suspension) permet une augmentation de la siccité après déshydratation [75]. Ce même raisonnement explique également qu'une diminution de la proportion d'EPS dans les boues conduise à une augmentation de leur siccité après déshydratation [42]. En fait, la diminution de la résistance à la compression provoque un écroulement de la structure. On concentre donc la boue en augmentant la force ionique de la suspension [75].

Néanmoins, les EPS ne sont pas le seul facteur contrôlant la déshydratation des boues de station d'épuration. Le conditionnement joue également un rôle capital, dans la mesure où il détermine la taille des flocs et leur résistance au cisaillement.

II.2.2 Impact du conditionnement sur la structure des flocs et leur résistance au cisaillement

Comme nous venons de le voir, les boues issues du traitement des eaux usées présentent des propriétés très variables [76], ce qui en fait un matériel difficile à caractériser. Aussi, après déshydratation, cette variabilité se retrouve dans les résidus de ces boues et dans les gâteaux de filtration [77]. En réponse à cette hétérogénéité, le conditionnement est ajouté en excès ce qui permet d'homogénéiser les caractéristiques des boues [78]. Cette pratique est choisie car une sous-dose de polymère serait plus préjudiciable pour l'efficacité de la déshydratation [78].

Il existe de nombreux paramètres influençant la déshydratation des boues et leur viscosité, en particulier : la taille des flocs [79], la composition des boues [80], ses propriétés visco-élastiques (contrainte seuil, viscosité minimale sous écoulement) [81] et l'eau liée présente dans les flocs [82].

La rhéologie, étudiant le comportement des matériaux sous l'action de forces de déformation, est largement utilisée pour la caractérisation des boues de station d'épuration [83-88]. Cette méthode permet d'accéder à une caractérisation des interactions existant entre les particules

contenues par le matériau [89]. La fraction solide en suspension influence fortement la rhéologie des boues [84, 90]. Il est donc essentiel, à des fins de comparaison entre différents échantillons, de prendre en compte ces paramètres lors de la mise en place du protocole d'expérimentation. Le comportement en écoulement des boues étant non-newtonien, il n'est pas possible d'établir une relation linéaire entre les contraintes exercées sur les boues et leur réponse au cisaillement [80, 91]. Ce type d'étude a pour but de déterminer les propriétés visco-élastiques (viscosité initiale et sous contrainte) de ces suspensions floculées et d'améliorer le traitement des boues résiduelles [85] en optimisant le conditionnement (dose de polymère utilisée) et la déshydratation [77, 92]. Le conditionnement permet de faciliter la séparation fluide/solide en produisant un gâteau de filtration à haute proportion de solide et forte porosité [93], ce qui permet une déshydratation plus efficace [94]. De plus, le conditionnement améliore la résistance des flocs aux cisaillements (ou contraintes appliquées), ce qui évite l'érosion et le colmatage des filtres [93]. Le conditionnement forme une matrice rigide autour des flocs de boues activées auxquels il transmet la contrainte subie [5]. Les propriétés qui viennent d'être énoncées sont très liées mais peuvent correspondre à des doses différentes de polymère [85], il est donc nécessaire de définir les limites de la « dose optimale » permettant d'accéder aux résultats les plus probant. D'autre part, de nombreux auteurs ont montré que la vitesse de mélange lors de l'ajout du conditionnement joue un rôle important sur l'efficacité de la déshydratation [95-99]. La dose optimale de polymère correspondant à l'efficacité maximale de déshydratation dépend donc des contraintes pendant et après cisaillement, ainsi que de la neutralisation des charges exposées par les flocs. En effet, l'augmentation de la vitesse de cisaillement a pour effet d'éroder les flocs et d'exposer de nouvelles charges négatives. Ces dernières sont à l'origine d'une forte pression osmotique ayant pour effet de piéger de l'eau au sein des agrégats [98].

Dans la suite de ce paragraphe, la dénomination « dose optimale » correspond à la concentration optimale de floculation, pour laquelle la quasi-totalité des charges est neutralisée. Dans la mesure où le comportement rhéologique des boues ne diffère pas quelque soit le conditionnement, chlorure ferrique associé à de la chaux ou polymère cationique, nous allons nous limiter à la floculation induite par des polymères cationiques.

Il a été démontré que la réponse des boues au cisaillement [88] ainsi que la structure des flocs (en particulier la taille) [100-105] diffèrent en fonction de la dose de polymère. Trois cas de figure sont envisageables.

Lorsque la concentration en polymère correspond à la dose optimale, on observe une désagrégation suivie d'une réagrégation des flocs car il subsiste du polymère disponible en suspension [88]. C'est pour cette concentration que les flocs sont les plus résistants au cisaillement [106]. En effet, la charge des agrégats est neutralisée et un maximum de liens sont formés avec le polymère cationique, ce qui ne laisse libre qu'un minimum de sites de fixation [78], et permet la formation d'une matrice rigide [106]. On observe pour cette concentration une viscosité minimale, correspondant à un minimum de temps de filtration [85]. Örmeci [107] a démontré qu'il existait alors une relation linéaire entre la contrainte appliquée et la résistance au cisaillement.

Pour une dose inférieure à la dose optimale, il n'y a pas de refloculation car il y a trop peu de polymère pour former une matrice rigide autour des agrégats [88]. Une diminution de la taille des flocs (par rapport à la concentration optimale) a pour effet une diminution de la résistance au cisaillement [106].

Enfin, lorsque la dose est supérieure à la dose optimale, on observe une désagrégation suivie d'une réagrégation tant que l'excès de polymère n'est pas consommé [88]. On a alors une augmentation de la viscosité de la suspension [87] due à l'augmentation du nombre de liaisons entre les particules. Cependant, cette évolution est limitée par deux paramètres, la concentration en polymère [108-109] et la force de cisaillement appliquée [77]. En effet, bien qu'une dose de conditionnement supérieure à la dose optimale permette d'augmenter la résistance des boues au cisaillement [110], à partir d'une certaine concentration critique en polymère, les flocs atteignent une taille telle qu'ils se cassent ou ne se forment plus sous le cisaillement, entraînant une diminution de la résistance de la boue au cisaillement [109]. De plus, il a été montré qu'au-delà d'une certaine valeur limite de contrainte, il y a rupture des liens polymère/bactéries maintenant les flocs cohérents [110] ce qui produit une détérioration de la structure des flocs à grande échelle [77]. A partir de cette contrainte, la boue s'écoule de façon continue, il y a donc une diminution de sa viscosité [111]. Des changements de structure irréversibles s'opèrent au sein même des agrégats composant le matériau [92, 112]. L'énergie nécessaire à la rupture des flocs augmente suivant l'augmentation de la concentration en polymère [85-86, 88, 101, 113], ce qui met en évidence l'existence d'une matrice élastique qui augmente la résistance du floc au cisaillement [114-117] jusqu'à un point de rupture [85]. Les boues conditionnées ont donc une structure solide induite par les liens existants entre le conditionnement et les particules [117]. Aussi, même si l'augmentation

de la concentration en polymère renforce la matrice, lorsque les forces de cisaillement sont supérieures au point de rupture [95], on assiste à une diminution de l'efficacité de la déshydratation et à une diminution de la siccité finale [107]. En fait, la compression de ce type de suspensions floculées se fait en deux phases, tout d'abord le gâteau encaisse la pression jusqu'à ce qu'il soit suffisamment tassé puis, il y a érosion des flocs et consolidation de la matrice [118-121]. Notons que pour une même force de cisaillement, l'augmentation de la concentration en polymère est à l'origine d'une augmentation de viscosité initiale et donc de la résistance des flocs au cisaillement [85]. L'augmentation de la vitesse de cisaillement n'ayant pas d'impact sur l'évolution de la réponse des échantillons, c'est la concentration en polymère qui contrôle l'état du floc [88] et donc sa réponse au cisaillement. On peut donc en déduire que l'efficacité de déshydratation optimale est contrôlée par la concentration en polymère [120]. Il est nécessaire que la concentration en polymère produise une matrice suffisamment rigide pour que les flocs soient résistants au cisaillement, mais de taille limitée afin de ne pas s'éroder sous l'action des forces cisaillantes. Cela permet d'obtenir le gâteau contenant la plus haute porosité et la siccité la plus importante [95].

Ces différentes études apportent des réponses quant au comportement des boues lors de la déshydratation, en fonction de la concentration en polymère. Néanmoins, un paramètre n'a pas été pris en compte, à savoir, l'état d'intégrité des bactéries composant ces agrégats. Or il est très probable que ce paramètre joue un rôle important sur l'efficacité de la déshydratation des boues de station d'épuration. C'est pour cette raison que dans le paragraphe suivant, nous nous allons nous intéresser à l'impact du conditionnement par un polymère cationique fréquemment utilisé dans le traitement des boues de stations d'épuration, le polyéthylèneimine (PEI), sur la floculation de cellules bactériennes. En effet, suivant sa masse moléculaire, ce polymère peut ou non induire la floculation et présenter une toxicité plus ou moins importante pour les bactéries.

III. Floculation de cellules bactériennes de type Gram négatives par des molécules de polyéthylèneimine

III.1. Impact de la masse moléculaire de polyéthylèneimine sur la floculation de cellules bactériennes Gram négatives

Les cellules bactériennes sont chargées négativement du fait de l'ionisation des groupes carboxyles situés à la surface des membranes [121]. Cela explique le fait que la floculation ne puisse pas se faire en présence de polymères anioniques [122].
Notons qu'il n'existe que peu d'études rendant compte de la floculation de cellules bactériennes par des polymères de polyéthylèneimine. Ces dernières se basent sur un modèle proche du modèle physico-chimique de coagulation/floculation appliqué aux particules inorganiques (sphères dures), à la différence que le potentiel répulsif ne serait pas réduit par les contres ions de la double couche diffuse, mais par l'adsorption des molécules de polyélectrolytes [121] à la surface des bactéries.

Le polymère a potentiellement trois modes d'action différents [17, 121]:

- sa présence au sein de la double couche peut provoquer un écrantage du potentiel répulsif existant entre deux cellules,
- son adsorption sur un colloïde de charge opposée peut permettre de réduire l'énergie potentielle d'interaction entre deux cellules,
- la formation de pontages entre les cellules peut aboutir à la formation d'agrégats.

Les études mentionnées ci-dessous traitent de la floculation d'Escherichia *Coli* par des polymères de polyéthylèneimine de masses moléculaires variables (allant de 600 à 600 000 g/mol). Les Escherichia *Coli* sont des bactéries de types Gram négatives. Ces différentes études sont difficilement comparables dans la mesure où il est probable que la floculation bactérienne réponde à un ratio polymère/bactéries et que les concentrations bactériennes utilisées ne sont pas identiques. Néanmoins, certaines conclusions générales peuvent être tirées.

Dans un premier temps, il est important de préciser que les différentes études s'accordent à dire que suivant la masse moléculaire de PEI utilisé, les effets observés ne sont pas identiques.

Dixon et. al [122] montrent que l'efficacité de la floculation (concentration de floculation optimale) dépend du pH, c'est-à-dire de la charge et de l'ionisation du polymère. Quelle que soit la masse moléculaire de PEI utilisée, la floculation des cellules bactériennes est induite. La concentration optimale de floculation diminue à mesure que la masse moléculaire de polymère utilisé augmente. En fait, plus la masse moléculaire des polymères est importante (10000 à 100000 g/mol), plus les points d'ancrage potentiels sont nombreux. Le polymère a alors plus de probabilité de se lier avec plusieurs bactéries [122]. On peut également l'exprimer de la manière suivante, le taux de recouvrement de la surface des membranes bactériennes augmente de la même façon que la taille du polymère. Ainsi plus la taille du polymère est importante plus ce dernier aura la faculté de s'adsorber sur différentes membranes bactériennes [121]. Cette concentration optimale de floculation correspond à une taille maximale de flocs [123].

A mesure que l'on augmente la concentration en PEI, deux cas se présentent. Pour des polymères de poids moléculaire supérieurs à 2000 g/mol, au-delà d'une certaine concentration, on assiste à une restabilisation des suspensions bactériennes étudiées. Pour des poids moléculaires inférieurs (1900 g/mol [122] et 1800 g/mol [121]), aucune restabilisation n'est observée quelque soit la concentration de PEI. Cela peut s'expliquer par la faible taille des segments qui s'adsorberaient totalement sur les membranes bactériennes.

Dans le but d'évaluer l'efficacité de ce type de floculation, il est possible de mesurer le temps de filtration des suspensions floculées. Ce dernier varie en fonction de la taille du polymère utilisé. La filtration de suspensions floculées par des polymères de faibles poids moléculaires (<2000 g/mol) présente des temps de filtration plus importants que les polymères ayant des masses moléculaires supérieures et que des suspensions non-floculées [124]. L'efficacité de la filtration de suspensions floculées par ce type de polymère ne varie que très peu lorsque la concentration augmente [125].

Au dessus du seuil de 2000 g/mol, une réelle amélioration de l'efficacité de filtration (temps minimal) est constatée. Un temps optimal de filtration, correspondant à la concentration optimale de floculation est observé. Les temps de filtration les plus importants correspondent aux concentrations en polymère inférieures à la concentration optimale de floculation, et à des concentrations supérieures à la concentration de restabilisation de la suspension [121-122].

Pour une même concentration en polymère, l'évolution de l'efficacité de la filtration évolue de façon inverse à la masse moléculaire du PEI [123].

Une autre façon d'aborder ce problème est d'étudier la floculation d'homogénats bactériens par du PEI [126-127]. Les homogénats bactériens sont obtenus en soumettant les suspensions bactériennes à de hautes pression de l'ordre de 500 bar [127] et correspondent au produit de la lyse bactérienne. Ils contiennent des résidus d'origine cellulaire tels que des morceaux de membranes, des organites, du cytoplasme, et de l'ADN et de l'ARN. Ces études montrent qu'il est possible de précipiter et extraire de l'ADN et ARN par floculation avec du PEI. On peut noter que comme précédemment, les polymères de hautes masses moléculaires (10000 à 100000 g/mol) présentent une concentration optimum de floculation, pour laquelle un maximum de composants organiques sont floculés. Lorsque les suspensions sont mises en contact avec des concentrations de polymère en excès, on assiste a une restabilisation. Les polymères de faibles masse moléculaires (600 g/mol) permettent également une clarification efficace de l'eau (turbidité minimale) qui n'évolue pas à mesure que l'on en augmente la concentration. Ils n'induisent pas de restabilisation [126], ce qui s'explique de la même manière que précédemment, par la petite taille de la molécule.

Ces études prouvent que la concentration et la masse moléculaire des différents PEI utilisés ont un réel impact sur la floculation des suspensions bactériennes de type Gram négatif. Cependant, les interactions physico-chimiques et biologiques directes existant entre le PEI et la membrane bactérienne elle-même ne sont pas prises en compte. Pourtant, si on relie la concentration en polymère et la viabilité des cellules [123], on constate qu'au delà de la concentration optimale de floculation, le pourcentage de cellules viables diminue fortement. Le PEI étant connu comme une molécule fortement toxique pour les cellules bactériennes, nous nous sommes intéressés dans le paragraphe suivant, à son impact sur les membranes bactériennes.

III.2 Toxicité du polyéthylèneimine sur les cellules bactériennes de type Gram négatives

Le PEI est fréquemment utilisé en médecine pour perméabiliser les membranes des bactéries de type Gram négatives [128-129] et les rendre sensibles aux antibiotiques [130-132]. Il peut également être utilisé sous la forme de complexes PEI/ADN, où par diffusion à travers les

membranes cellulaires, il va permettre la transfection de certains gênes [133-134] ou de certaines nanoparticules inorganiques [135] (masse moléculaire < 2000 g/mol). En raison de sa forte toxicité [136], le PEI est également utilisé pour ses propriétés bactéricides. Il évite la formation de développements bactériens sur les surfaces sur lesquelles il est déposé [137], ainsi que celui de certains virus comme le virus Influenza [138]. Inclus dans une résine dentaire, il contribue à éviter la formation de caries [139]. Dans un autre domaine, appliqué sur des membranes de filtration, le PEI, en prévenant le développement de colonies bactériennes, évite le colmatage qu'elles pourraient causer [140].

La toxicité du PEI a un lien direct avec son action sur les LPS, qui constituent l'élément pathogène des membranes bactériennes, en évitant le développement de stratégies de résistance de la part des bactéries[141]. Il y a formation de complexes PEI-LPS [130], ce qui a pour effet d'éjecter les cations divalents [140, 142-143] dont le rôle est de stabiliser la membrane bactérienne [144]. Il en résulte une désorganisation irréversible de celle-ci [130] qui provoque un relargage des LPS, remplacés par de « simples » phospholipides qui n'assurent plus le rôle de perméabilité sélective des LPS [131]. Le réarangement de ces phospholipides est à l'origine de la formation d'interruptions (trous) nanométriques de la membrane cellulaire [145] autorisant la perte de cytoplasme vers le milieu extérieur [146].

La cytotoxicité du PEI s'exprime également au niveau des cellules eucaryotes. Les nombreuses fonctions amines primaires du PEI captent les protons, tamponnant ainsi le milieu environnant la cellule [147-149]. Ceci provoque un déficit en protons par rapport à la concentration présente dans le cytoplasme cellulaire et engendre l'apparition d'une certaine pression osmotique. Les pompes à protons ont comme fonction de base d'assurer un échange H^+/Cl^-,H_2O, permettant ainsi l'accumulation de protons (accepteur final d'électrons) dans le cytoplasme, et l'excrétion des molécules d'eau formées lors de la respiration cellulaire. Ces pompes répondent au stress provoqué par la diminution de la concentration en protons en fonctionnant de façon inverse. Il y a alors rejet de protons vers le milieu extérieur (captés par les fonctions amines du PEI) et entrée d'ions Cl^- et H_2O dans la cellule. Leur accumulation dans le cytoplasme est à l'origine de la rupture de l'endosome et donc de la lyse [150].
Cependant, il a été montré qu'une diminution de la masse moléculaire du PEI a pour effet d'en diminuer la toxicité [135].

IV. Axes d'étude

Comme nous avons pu le voir, la siccité des boues de station d'épuration est conditionnée par deux procédés : la coagulation/floculation de ces dernières, et la déshydratation en elle-même. C'est pourquoi, nous allons tenter de clarifier, dans ce travail, la portée de chacun de ces phénomènes, ainsi que leur interdépendance.

Les EPS jouent un rôle majeur dans les mécanismes de rétention d'eau, au sein des flocs. En effet, les charges négatives liées à leur présence génèrent un afflux de contre-ions de charge opposée, et donc une pression osmotique très élevée. Cette dernière est en partie à l'origine de la haute teneur en eau des boues après déshydratation. D'autre part, suivant les différentes concentrations en conditionnement ajoutées, la réponse au cisaillement et, de ce fait, l'efficacité de la déshydratation, sont variables. Cela est lié à la taille des flocs, mais également à la charge des agrégats. Lorsque ces derniers sont neutralisés, pour des doses de polymère correspondant à la concentration optimale de floculation, l'efficacité de la déshydratation est optimale. Cette concentration permet une taille des agrégats optimale, et une matrice formée par le polymère suffisamment rigide pour résister au cisaillement. Pour des concentrations en polymère trop faibles, les liens existants entre les particules sont en nombre insuffisant pour que les flocs résistent au cisaillement. Enfin, lorsque le polymère est ajouté en excès (c'est la majorité des cas), les flocs formés sont de taille trop importante et s'érodent sous cisaillement, ce qui a pour effet d'altérer l'efficacité de la déshydratation des boues.

Les études traitant de la viscosité des boues ne s'intéressent pas à l'état structural des flocs après conditionnement. Il a pourtant été démontré par les études biologiques que le PEI avait un effet fortement toxique sur les cellules bactériennes, pouvant aller jusqu'à la lyse. Cela nous a amené a nous interroger sur l'impact de celle-ci sur la structure interne des flocs et ses répercussions sur la déshydratation des boues bactériennes. Un autre paramètre pouvant intervenir dans ce processus est la masse moléculaire du PEI. Quelque soit la masse employée, le PEI induit la floculation bactérienne, mais au dessus d'un certain seuil, on n'observe pas de restabilisation. Il a été mentionné également que l'efficacité de la filtration dépendait de la masse moléculaire. Lorsque la masse du polymère est inférieure à 2000 g/mol, la filtration est moins efficace qu'en absence de conditionnement. Ainsi, après ce seuil, pour des concentrations identiques en PEI, une augmentation de la masse moléculaire est à

l'origine de temps de filtration supérieurs. Enfin, il a été démontré la même évolution lorsque le polymère est ajouté en excès. Il est peu probable que l'évolution de ces paramètres ne soit liée qu'à des phénomènes physico-chimiques (adsorption du polymère, interactions répulsives). La fonction bactéricide du PEI sur les membranes bactériennes impacte sans doute également la structure des agrégats, altérant ainsi l'efficacité de la filtration.

L'objectif de cette thèse étant de comprendre les mécanismes de déshydratation des boues de stations d'épuration en vue d'en augmenter la siccité, nous allons étudier un système « modèle » qui nous permettra de simuler les phénomènes physico-chimiques qui s'y déroulent. Ce système consiste à floculer des cellules bactériennes de souche pure (de concentration contrôlée) par des molécules de polyéthylèneimine de différentes masses moléculaires, et d'en faire varier la concentration. La souche bactérienne choisie a la particularité de produire ou non des LPS suivant sa température de culture. Après cette étape, ces suspensions floculées sont déshydratées par centrifugation puis soumises à des tests rhéologiques. Cela nous permet d'accéder à l'impact des LPS, de la concentration et de la masse moléculaire de PEI sur la floculation puis la déshydratation. Nous allons donc observer les mécanismes d'agrégation et de rétention d'eau dans les boues suivant des paramètres contrôlés que nous ferons varier, ce qui nous en donnera une meilleure compréhension.

Après avoir décrit le matériel et les méthodes d'analyses utilisées, ce manuscrit décrira, dans un premier temps, l'impact du PEI (60000 g/mol) sur la floculation de cellules bactériennes et leurs membranes, que celles-ci présentent ou non des LPS. Dans un second temps, nous nous intéresserons à l'effet de l'évolution de la masse moléculaire sur les mécanismes de floculation. Enfin, la troisième et dernière partie de ce travail sera consacrée à éclaircir l'influence de la structure des agrégats, la présence/absence de LPS et la masse moléculaire de PEI sur l'efficacité de la déshydratation. Enfin, nous conclurons sur les perspectives offertes par ce travail.

Références bibliographiques

[1] Jorand F. ; Zartarian F. ; Thomas F. ; Block J.C. ; Bottero J.Y. ; Villemin G. ; Urbain V. ; Manem J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research [en ligne]. 1995, 29 (7), 1639-1647; DOI 10.1016/S0043-1354/95

[2] Zartarian F. ; Mustin C. ; Bottero J.Y. ; Villemin G. ; Thomas F. ; Aillere, L. ; Champenois M. ; Grulois P. ; Mane, J. Spatial arrangement of the components of activated sludge flocs. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 30, 243-250

[3] Snidaro D ;, Zartarian F. ; Jorand F. ; Bottero J.-Y. ; Block J.-C. ; Manem, J. Characterization of activated sludge flocs structure. Water Science and Technology [en ligne]. 1997, 36, 313-320

[4] Siéliéchi J.M. ; Lartiges B.S. ; Kayem G.J. ; Hupont S. ; Frochot C. ; Thieme J. ; Ghanbaja J. ; d'Espinose de la Caillerie J.B. ; Barrès O. ; Kamga R. ; Levitz P. ; Michot L.J. Changes in humic acid conformation during coagulation with ferric chloride: Implications for drinking water treatment. Water Research [en ligne]. 2008, 42 (8-9), 2111-2123; DOI 10.1016/j.watres.2007.11.017

[5] Deneux-Mustin S. ; Lartiges B.S. ; Villemin G. ; Thomas F. ;Yvon J. ; Bersillon J.L. ; Snidaro S. Ferric Chloride and lime conditioning of activated sludges : an electron microscopic study on resin-embedded samples. Water Research [en ligne]. 2001, 35 (12), 3018-3024.

[6] Legrand V. ; Hourdet D. ; Audebert R. ; Snidaro D. Deswelling and flocculation of gel networks : Application to sludge dewatering. Water Research [en ligne]. 1998, 32, 3662-3672; DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00133-X

[7] Bersillon, J.L. ; Brown D.W. ; Fiessinger F. ; Hem J.D. Studies of hydroxyaluminum complexes in aqueous solution. Journal of Research US Geologic Survey [en ligne]. 1978, 6 (3), 325-337.

[8] Lefebvre E. ; Legube B. Iron(III) coagulation of humic substances extracted from surface waters : effect of pH and humic substances concentration. Water Research [en ligne]. 1990, 24 (5), 591-606.

[9] Hermia J. General principles of the treatment of industrial waste water. Techn.eau [en ligne]. 1974, 330, 33-41

[10] Fiessinger F. ; Bersillon J.L. Preparation of aluminium hydroxide polymers for water coagulation. Tribune du Cebedeau [en ligne]. 1977, 30 (399), 52-68.

[11] Derjaguin, B. On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobe sols. Transactions of the Faraday Society [en ligne]. 1940, 35, 203-215.

[12] Verwey E.J.W. Theory of stability of lyophobic colloids. Journal of Physical and Colloid Chemistry [en ligne]. 1947, 51 (3), 631-636.

[13] Everett, D.H. Electrostatic forces in chemistry [en ligne]. Journal of the Royal Institute of Chemistry. 1951, 75, 25-27.

[14] Dickinson E. ; Eriksson L. Particle flocculation by adsorbing polymers [en ligne]. Advances in Colloid and Interface Science 1991, 34 (C), 1-29.

[15] Hunter R.J. ; Wright H.J.L. The dependence of electrokinetic potential on concentration of electrolyte. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1971, 37 (3), 564-580

[16] Adamczyk Z.Particle adsorption and deposition: role of electrostatic interactions. Advances in Colloid and Interface Science [en ligne]. 2003, 100-102, 267-347.

[17] Stumm W. ; O'Melia C.R. Stoichiometry of coagulation. JAWWA [en ligne]. 1968, 60, 514-539.

[18] La Mer V.K. Coagulation symposium introduction. Journal of Colloid Science [en ligne]. 1964, 19 291.

[19] Gregory, J. Rates of flocculation of latex particles by cationic polymers. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1973, 42 (2), 448-456.

[20] Hogg R. The role of polymer adsorption kinetics in flocculation. Colloids and Surfaces
A [en ligne]. 1999,146 (1-3), 253-263.

[21] Hogg R. Flocculation and dewatering. International Journal of Mineral Processing [en ligne]. 2000, 58 (1-4), 223-236.

[22] Besra L. ; Sengupta D. K. ; Roy S. K. ; Ay P. Polymer adsorption: Its correlation with flocculation and dewatering of kaolin suspension in the presence and absence of surfactants. International Journal of Mineral Processing [en ligne]. 2002, 66 (1-4), 183-202.

[23] Dickinson E. ; Eriksson L. Particle flocculation by adsorbing polymers. Advances in Colloid and Interface Science [en ligne]. 1991, 34 (C), 1-29.

[24] Healy T.W. ; La Mer V.K. The adsorption-flocculation reactions of a polymer with an aqueous colloidal dispersion. Journal of Physical Chemistry [en ligne]. 1962, 66 (10), 1835-1838.

[25] Slater R.W. ; Kitchener J.A. Characteristics of flocculation of mineral suspensions by polymers. Discussions of the Faraday Society [en ligne]. 1966, 42, 267-275.

[26] Mabire, F. ; Audebert R. ; Quivoron C. Flocculation properties of some water-soluble cationic copolymers toward silica suspensions: A semiquantitative interpretation of the role of molecular weight and cationicity through a "patchwork" model. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1984, 97 (1), 120-136.

[27] Gregory, J. The effect of cationic polymers on the colloidal stability of latex particles. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1976, 55 (1), 35-44.

[28] Li D.H. ; Ganczarczyk J.J. Structure of activated sludge flocs. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 1990, 35 (1), 57-65.

[29] Bala Subramanian S. ; Yan, S. ; Tyagi R.D. ; Surampalli R.Y. Extracellular Polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge : Isolation, molecular identification, EPS characterisation and performance for sludge settling and dewatering. Water Research [en ligne]. 2010, 44, 2253-2266; DOI 10.1016/j.waters.2009.12.046

[30] Martins A.M.P. ; Picioreanu C. ; Heijnen J.J. ; Van Loosdrecht M.C.M. Three-dimensional dual-morphotype species modelling of activated sludge flocs. Environment Science and Technology [en ligne]. 2004, 38 (21), 5632-5641; DOI 10.1021/es0496591

[31] Schmid M. ; Thill A. ; Purkhold U. ; Walcher M. ; Bottero J.Y. ; Ginestet P. ; Nielsen P.H. ; Wuertz S. ; Wagner M. Characterization of acivated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy ans image analysis. Water Research [en ligne]. 2003, 37, 2043-2052.

[32] Wilén B.M. ; Jin B. ; Lant P. Impacts of structural characteristics on activated sludge floc stability. Water Research [en ligne]. 2003, 37 (15), 3632-3645.

[33] Keiding K. ; Nielsen P.H. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition. Water Research [en ligne]. 1997, 31 (7), 1665-1672.

[34] Frølund B. ; Palmgren R. ; Keiding K. ; Nielsen P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research [en ligne]. 1996, 30 (8), 1749-1758.

[35] Nishikawa S. ; Kuriyama M. Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge. Water Research [en ligne]. 1968, 2 (11), 811-812.

[36] Zartarian F. ; Mustin C. ; Villemin G. ; Ait-Ettager T. ; Thill A. ; Bottero J.Y. ; Mallet J.L. ; Snidaro D. Three-dimensional modeling of an activated sludge floc. Langmuir [en ligne]. 1997, 13 (1), 35-40.

[37] Chaignon V. ; Lartiges B.S. ; El Samrani A. ; Mustin C. Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (3), 676-684.

[38] Ayarza J.M. ; Guerrero L.D. ; Erijman L. Nonrandom assembly of bacterial populations in activated sludge flocs. Microbial Ecology [en ligne]. 2010 , 59 (3), 436-444.

[39] Nielsen P.H. ; Keiding K. Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. Water Research [en ligne]. 1998, 32 (2), 313-320.

[40] Qi Y. ; Dentel S.K. ; Herson D.S. Increases in fecal coliform bacteria resulting from centrifugal dewatering of digested biosolids. Water Research [en ligne]. 2007, 41 (3), 571-580.

[41] Lartiges B.S.; Deneux-Mustin S.; Villemin G.; Mustin C.; Barrès O.; Chamerois M.; Gerard B.; Babut M. Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine River. Water Research [en ligne]. 2001, 35 (3), 808-816; DOI 10.1016/S0043-1354(01)00003-3

[42] Mikkelsen L.H. ; Keiding K. Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (10), 2451-2462.

[43] Das D. ; Keinath T.M. ; Parker D.S. ; Wahlberg E.J. Floc breakup in activated sludge plants. Water Environment Research [en ligne]. 1993, 65 (2), 138-145.

[44] Mikkelsen L.H. ; Keiding K. Equilibrium aspects of the effects of shear and solids content on aggregate deflocculation. Advances in Colloid and Interface Science [en ligne]. 1999, 80 (2), 151-182.

[45] Klausen M.M. ; Thomsen T.R. ; Nielsen J.L. ; Mikkelsen L.H. ; Nielsen P.H. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. FEMS Microbiology Ecology [en ligne]. 2004, 50 (2), 123-132.

[46] Kuntz I.D. ; Kauzman W. Hydration of Proteins and Polypeptides. Advances in Protein Chemistry [en ligne]. 1974, 28 (C), 239-345.

[47] Morgan J.W. ; Forster C.F. ; Evison L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. Water Research [en ligne]. 1990, 24 (6), 743-750.

[48] Urbain V. ; Block J.C. ; Manem J. Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach. Water Research [en ligne]. 1993, 27 (5), 829-838.

[49] Kang S.M. ; Kishimoto M. ; Shioya S. ; Yoshida T. ; Suga K.I. Properties of extracellular polymer having an effect on expression of activated sludge. Journal of Fermentation and Bioengineering [en ligne]. 1990, 69 (2), 111-116.

[50] Horan N.J. ; Eccles C.R. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. Water Research [en ligne]. 1986, 20 (11), 1427-1432.

[51] Eriksson L. ; Härdin A.M. Settling properties of activated sludge related to floc structure. Water Science and Technology [en ligne]. 1984, 16 (10-11), 55-68.

[52] Forster C.F. Factors involved in the settlement of activated sludge-I; Nutrients and surface polymers. Water Research [en ligne]. 1985, 19 (10), 1259-1264.

[53] Goodwin J.A.S. ; Forster C.F. A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. Water Research [en ligne]. 1985, 19 (4), 527-533.

[54] Brown M.J. ; Lester J.N. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. Applied and Environmental Microbiology [en ligne]. 1980, 40 (2), 179-185.

[55] Rudd T. ; Sterritt R.M. ; Lester J.N. Extraction of extracellular polymers from activated sludge. Biotechnology Letters [en ligne]. 1983, 5 (5), 327-332.

[56] Barber J.B. ; Veenstra J.N. Evaluation of biological sludge properties influencing volume reduction. Journal of the Water Pollution Control Federation [en ligne]. 1986, 58 (2), 149-156.

[57] Eriksson L. ; Alm B. Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. Water Science and Technology [en ligne]. 1991, 24 (7), 21-28.

[58] Jia X.S. ; Furumai H. ; Fang H.H.P. Yields of biomass and extracellular polymers in four anaerobic sludges. Environmental Technology [en ligne]. 1996, 17 (3), 283-291.

[59] Laspidou C.S. ; Rittmann B.E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (11), 2711-2720.

[60] Frølund B. ; Palmgren R. ; Keiding K. ; Nielsen P.H. A comparative study of biopolymers from a conventional and an advanced activated sludge treatment plant. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 29 (7), 137-141.

[61] Elmitwalli T.A. ; Soellner J. ; de Keizer A. ; Bruning H. Zeeman G. ; Lettinga G. Biodegradability and change of physical characteristics of particles during anaerobic digestion of domestic sewage. Water Research [en ligne]. 2001, 35 (5), 1311-1317.

[62] Flemming H.C. ; Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. Water Science and Technology [en ligne]. 2001, 43 (6), 1-8.

[63] Poxon T.L. ; Darby J.L. Extracellular polyanions in digested sludge: Measurement and relationship to sludge dewaterability. Water Research [en ligne]. 1997, 31 (4), 749-758.

[64] Tenney M.W. ; Stumm W. Chemical flocculation of microorganisms in biological waste treatment. Journal - Water Pollution Control Federation [en ligne]. 1965, 37 (10), 1370-1388.

[65] Cloete T.E. ; Steyn P.L. A combined membrane filter-immunofluorescent technique for the in situ identification and enumeration of Acinetobacter in activated sludge. Water Research [en ligne]. 1988, 22 (8), 961-969.

[66] Sutherland I.W. Microbial exopolysaccharides -- their role in microbial adhesion in aqueous systems. Critical reviews in microbiology [en ligne]. 1983, 10 (2), 173-201.

[67] V. D. ; Cruz M. ; Marques R. ; Grandfils C. ; Gonçalves M.P. ; Oliveira R. ; Reis M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by Enterobacter sp. Carbohydrate Polymers [en ligne]. 2010, 81 (4), 758-764.

[68] Cruz M. ; FreitasF. ; Torres C.A.V. ; Reis M.A.M. ; Alves V. D. Influence of temperature on the rheological behaviour of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharides. International Journal of Biological Macromolecules [en ligne]. 2011, 48, 695-699.

[69] Higgins M.J. ; Novak J. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1997, 123 (5), 479-485.

[70] Buscall R. ; White L.R. The consolidation of concentrated suspensions. Part 1. - The theory of sedimentation. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactios 1: Physical Chemistry in Condensed Phases [en ligne]. 1987, 83 (3), 873-891.

[71] Keiding K. ; Rasmussen M.R. Osmotic effects in sludge dewatering. Advances in Environmental Research [en ligne]. 2003, 7 (3), 641-645.

[72] Keiding K. ; Wybrandt L. ; Nielsen P. Remember the water - A comment on EPS colligative properties. Water Science and Technology [en ligne]. 2001, 43 (6), 17-23.

[73] Curvers D. ; Usher S.P. ; Kilcullen A.R. ; Scales P.J. ; Saveyn H. ; Van der Meeren P. The influence of ionic strength and osmotic pressure on the dewatering behaviour of sewage sludge. Chemical Engineering Science [en ligne]. 2009, 64 (10), 2448-2454.

[74] Bowen W.R. ; Williams P. The osmotic pressure of electrostatically stabilized colloidal dispersions. Journal of Colloid and Interface Science [en ligne]. 1996, 184 (1), 241-250.

[75] Jean D.S. ; Lee D.J. Effects of salinity on expression dewatering of waste activated sludge. Journal of Colloid and Interface Science [en ligne]. 1999, 215 (2), 443-445.

[76] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Automatic control of polymer dose using the streaming current detector. Water Environment Research [en ligne]. 1998, 70 (5), 1005-1018.

[77] Dentel S.K. ; Abu-Orf M.M. ; Walker C.A. Optimization of slurry flocculation and dewatering based on electrokinetic and rheological phenomena. Chemical engineering journal [en ligne]. 2000, 80 (1-3), 65-72.

[78] Dentel S.K. ; Abu-Orf M.M. Laboratory and full-scale studies of liquid stream viscosity and streaming current for characterization and monitoring of dewaterability. Water Research [en ligne]. 1995, 29 (12), 2663-2672.

[79] Bache D.H. ; Papavasilopoulos E.N. Viscous behaviour of sludge centrate in response to polymer conditioning. Water Research [en ligne]. 2000, 34 (1), 354-358.

[80] Forster C.F. Sludge surfaces and their relation to the rheology of sewage sludge suspensions. Journal of chemical technology and biotechnology [en ligne]. 1982, 32 (8), 799-807.

[81] Guibaud G. ; Dollet P. ; Tixier N. ; Dagot C. ; Baudu M. Characterisation of the evolution of activated sludges using rheological measurements. Process Biochemistry [en ligne]. 2004, 39 (11), 1803-1810.

[82] Forster C.F. Bound water in sewage sludges and its relationship to sludge surfaces and slugde viscosities. Journal of Chemical Technology and Biotechnology [en ligne]. 1983, 33B (1), 76-84.

[83] Langer S.J. ; Klute R. ; Hahn H.H. Mechanisms of floc formation in sludge conditioning with polymers. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 30 (8 pt 8), 129-138.

[84] Slatter P.T. The rheological characterisation of sludges. Water Science and Technology [en ligne]. 1997, 36 (11), 9-18.

[85] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Rheology as tool for polymer dose assessment and control. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1999, 125 (12), 1133-1141.

[86] Abu-Orf M.M. ; Örmeci B. Measuring sludge network strength using rheology and relation to dewaterability, filtration, and thickening - Laboratory and full-scale experiments. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 2005, 131 (8), 1139-1146.

[87] Örmeci B. ; Abu-Orf M.M. Protocol to measure network strength of sludges and its implications for dewatering. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 2005, 131 (1), 80-85.

[88] Örmeci B. Optimization of a full-scale dewatering operation based on the rheological characteristics of wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2007, 41 (6), 1243-1252.

[89] Forster, C.F. The rheological and physico-chemical characteristics of sewage sludges. Enzyme and Microbial Technology [en ligne]. 2002, 30 (3), 340-345.

[90] Monteiro P.S. The influence of the anaerobic digestion process on the sewage sludges rheological behaviour. Water Science and Technology [en ligne]. 1997, 36 (11), 61-67.

[91] Dentel S.K. Evaluation and role of rheological properties in sludge management. Water Science and Technology [en ligne]. 1997, Volume 36 (11), 1-8.

[92] Yen P.-S. ; Chen L.C. ; Chien C.Y. ; Wu R.M. Network strength and dewaterability of flocculated activated sludge. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (3), 539-550.

[93] Marinetti M. ; Dentel S.K. ; Malpei F. ; Bonomo L. Assessment of rheological methods for a correlation to sludge filterability. Water Research [en ligne]. 2010, 44 (18), 5398-5406.

[94] Waite, T.D. Measurement and implications of floc structure in water and wastewater treatment. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [en ligne]. 1999, 151 (1-2), 27-41.

[95] Novak J.T. ; Predenville J.F. ; Sherrard J.H. Mixing intensity and polymer performance in sludge dewatering. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1988, 114 (1), 190-198.

[96] Novak J.T. ; Bandak N. Chemical conditioning and the resistance of sludges to shear. Journal of the Water Pollution Control Federation [en ligne]. 1989, 61 (3), 327-332.

[97] Novak J.T. ; Lynch D.P. The effect of shear on conditioning: Chemical requirements during mechanical sludge dewatering. Water Science and Technology [en ligne]. 1990, 22 (12), 117-124.

[98] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Polymer dose assessment using the streaming current detector. Water Environment Research [en ligne]. 1997, 69 (6), 1075-1085.

[99] Chu C.P. ; Lee D.J. ; Peng X.F. Structure of conditioned sludge flocs. Water Research [en ligne]. 2004, 38 (8), 2125-2134.

[100] Wu R.M. ; Lee D.J. ; Waite T.D. ; Guan J. Multilevel structure of sludge flocs. Journal of Colloid and Interface Science [en ligne]. 2002, 252 (2), 383-392.

[101] Langer S.J. ; Klute R. Hahn H.H. Mechanisms of floc formation in sludge conditioning with polymers. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 30 (8 pt 8), 129-138.

[102] Wu C.C. ; Huang C. ; Lee D.J. Effects of polymer dosage on alum sludge dewatering characteristics and physical properties. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [en ligne]. 1997, 122 (1-3), 89-96.

[103] Wen H.J. ; Liu C.I. ; Lee D.J. Size and density of flocculated sludge flocs. Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering [en ligne]. 1997, 32 (4), 1125-1137.

[104] Rattanakawin C. ; Hogg R. Aggregate size distributions in flocculation. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [en ligne]. 2001, 177 (2-3), 87-98.

[105] Zhao Y.Q. Correlations between floc physical properties and optimum polymer dosage in alum sludge conditioning and dewatering. Chemical Engineering Journal [en ligne]. 2003, 92 (1-3), 227-235.

[106] Wang Y.L. ; Dentel S.K. ; Mahmudov R. Transformation between flocs and aggregates in the conditioned sludge suspensions during a rotational test using a torque rheometer. Powder Technology [en ligne]. 2011, 208 (1), 189-194.

[107] Örmeci B. ; Ahmad A. Measurement of additional shear during sludge conditioning and dewatering. Water Research [en ligne]. 2009, 43 (13), 3249-3260.

[108] Ayol A. ; Dentel S.K. Enzymatic treatment effects on dewaterability of anaerobically digested biosolids-II: Laboratory characterizations of drainability and filterability. Process Biochemistry [en ligne]. 2005, 40 (7), 2435-2442.

[109] Örmeci B. ; Abu-Orf M.M. Using torque rheology for the identification of the optimum polymer dose and the best performing polymer. Journal of Residuals Science and Technology [en ligne]. 2006, 3 (4), 227-232.

[110] Merkel W. The flow characteristics of sewage sludge and other thick materials. Journal of Applied Physics [en ligne]. 1934, 5 (11), 355-361.

[111] Baudez J.C. About peak and loop in sludge rheograms. Journal of Environmental Management [en ligne]. 2006, 78 (3), 232-239.

[112] Chaari F. ; Racineux G. ; Poitou A. ; Chaouche M. Rheological behavior of sewage sludge and strain-induced dewatering. Rheologica Acta [en ligne]. 2003, 42 (3), 273-279.

[113] Campbell H.W. ; Crescuolo P.J. The use of rheology for sludge characterization. Water Science and Technology [en ligne]. 1982, 14 (6-7 /7), 475-489.

[114] Michaels A.S. ; Bolger C.J. The plastic flow behavior of flocculated kaolin suspensions. Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals [en ligne]. 1962, 1 (3), 153-162.

[115] Firth B.A. ; Hunter J.R. Flow properties of coagulated colloidal suspensions. I. Energy dissipation in the flow units. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1976, 57 (2), 248-256.

[116] Otsubo Y. ; Umeya K. Rheological properties of silica suspensions in polyacrylamide solutions. Journal of Rheology [en ligne]. 1984, 28 (2), 95-108.

[117] Chen B.H. ; Lee S.J. ; Lee D.J. Rheological characteristics of the cationic polyelectrolyte flocculated wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2005, 39 (18), 4429-4435.

[118] Reichmann B. ; Thomas J. Expression behaviour of fine particle suspensions and the consolidated cake strength. Powder Technology [en ligne]. 2001, 121 (2-3), 182-189.

[119] Novak J.T. ; Agerbaek M.L. ; Sorensen B.L. ; Hansen J.A. Conditioning, filtering, and expressing waste activated sludge. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1999, 125 (9), 816-824.

[120] Saveyn H. ; Curvers D. ; Thas O. ; van der Meeren P. Optimization of sewage sludge conditioning and pressure dewatering by statistical modelling. Water Research [en ligne]. 2008, 42 (4-5), 1061-1074.

[121] Treweek G.P.; Morgan J.J. Polymer flocculation of bacteria, the mechanism of E. Coli aggregation by polyethyleneimine. Journal of Colloids Interface Science [en ligne]. 1976, 60 (2), 258-273; ISSN 00219797

[122] Dixon J.K.; Zielyk M.W. Control of the bacterial content of water with synthetic polymeric flocculants. Environmental Science and Technology [en ligne]. 1969, 3 (6), 551-558 ; DOI 10.1021/es60029a004

[123] Verduzco-Luque C.E. ; Alp B. ; Stephens G.M. ; Marks G.H. Construction of biofilms with defined internal architecture using dielectrophoresis and flocculation. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 2003, 83 (1), 39-44.

[124] Zeleznik M.J. ; Segatta J.M. ; Ju L.K. Polyethyleneimine-induced flocculation and flotation of cyanobacterium Anabaena flos-aquae for gas vesicle production. Enzyme and Microbial Technology [en ligne]. 2002, 31 (7), 949-953.

[125] O'Mahony K. ; Freitag R. ; Dhote B. ; Hilbrig F. ; Müller P. ; Schumacher I. Capture of bacteria from fermentation broth by body feed filtration: A solved problem? Biotechnology Progress [en ligne]. 2006, 22 (2), 471-483.

[126] Salt D.E. ; Hay S. ; Thomas O.R.T. ; Hoare M. ; Dunnil P. Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polyethyleneimine: a study of several organisms and polymer molecular weights. Enzyme and Microbial. Technology [en ligne]. 1995, 17, 107-113; DOI 10.1016/0141-0229(94)00043-Q

[127] Cordes R.M.; Sims B.W.; Glatz C.E. Precipitation of Nucleic acids with poly(ethyleneimine). Biotechnology Progress [en ligne]. 1990, 6, 283-285; ISSN 87567938

[128] Helander I.M. ; Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial Permeabilization. Journal of Applied Microbiology [en ligne]. 2000, 88 (2), 213-219.

[129] McCullagh C. ; Robertson P.K.J. Effect of polyethylenimine, a cell permeabilizer, on the photosensitized destruction of algae by methylene blue and nuclear fast red. Photochemistry and Photobiology [en ligne]. 2006, 82 (6), 1662-1667.

[130] Helander I.M.; Alakomi H.L.; Latva-Kala K.; Koski P. Polyethyleneimine is an effective permealizer of gram-negative bacteria. Microbiology [en ligne]. 1997, 143, 3193-3199; ISSN 13500872

[131] Korycka-Machala M.; Ziolkowski A.; Rumijowska-Galewicz A.; Lisowska K.; Sedlaczek L. Polycations increase the permeability of Mycobacterium vaccae cell envelopes to hydrophobic compounds. Microbiology [en ligne]. 2001, 147, 2769-2781; ISSN 13500872

[132] Alakomi H.L.; Paananen A.; Suihko M.L.; Helander I.M.; Saarela M. Weakening effects of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodetection. Applied Environmental Microbiololgy [en ligne]. 2006, 72 (7), 4695-4703; DOI 10.1128/AEM.00142-06

[133] Godbey W.T. ; Wu K.K. ; Mikos A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. Journal of Controlled Release [en ligne]. 1999, 60 (2-3), 149-160.

[134] Densmore C.L. Polyethyleneimine-based gene therapy by inhalation. Expert Opinion on Biological Therapy [en ligne]. 3 (7), 2003, 1083-1092.

[135] Xia T. ; Kovochich M. ; Liong M. ; Meng H. ; Kabehie S. ; George S. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. ACS Nano [en ligne]. 2009, 3 (10), 3273-3286.

[136] Mortimer M. ; Kasemets K. ; Heinlaan M. ; Kurvet I. ; Kahru A. High throughput kinetic Vibrio fisheri bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticules. Toxicology In Vitro [en ligne]. 2008, 22, 1412-1417; DOI 10.1016/j.tiv.2008.02.011

[137] Pasquier N. ; Keul H. ; Heine E. ; Moeller M. From multifunctionalized poly(ethylene imine)s toward antimicrobial coatings. Biomacromolecules [en ligne]. 2007, 8 (9), 2874-2882.

[138] Haldar J. ; An D. ; de Cienfuegos L.A. ; Chen J. ; Klibanov A.M. Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [en ligne]. 2006, 103 (47), 17667-17671.

[139] Beyth N. ; Houri-Haddad Y. ; Baraness-Hadar L. ; Yudovin-Farber I. ; Domb A.J. ; Weiss E.I. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethyleneimine nanoparticucles. Biomaterials [en ligne]. 2008, 29, 4157-4163; DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.07.003

[140] Hilal N. ; Kochkodan V. ; Al-Khatib L. ; Levadna T. Surface modified polymeric to reduce (bio)fouling: a microbiological study using E. Coli. Desalinisation [en ligne]. 2004, 167, 293-300; DOI 10.1016/j.desal.2004.06.138

[141] Milović N.M. ; Wang J. ; Lewis K. ; Klibanov A.M. Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 2005, 90 (6), 715-722.

[142] Nian R. ; Tan L. ; Choe W.S. Polyethyleneimine-mediated chemical extraction of cytoplasmic his-tagged inclusion body proteins from Escherichia coli. Biotechnology Progress [en ligne]. 2008, 24, 417-425; DOI 10.1021/bp070304q

[143] Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiology Reviews [en ligne]. 1992, 56 (3), 395-411; ISSN 01460749

[144] Asbell M.A. ; Eagon R.G. The role of multivalent cations in the organization and structure of bacterial cell walls. Biochemical and Biophysical Research Communications [en ligne]. 1966, 22 (6), 664-671.

[145] Chen J. ; Hessler J.A. ; Putchakayala K. ; Panama B.K. ; Khan D.P. ; Hong S. ; Mullen D.G. ; DiMaggio S.C. ; Som A. ; Tew G.N. ; Lopatin A.N. ; Baker J.R. ; Banaszak Holl M.M. ; Orr B.G. Cationic nanoparticles

induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes. Journal of Physical Chemistry B [en ligne]. 2009, 113 (32), 11179-11185.

[146] Arrington S.A.; Zeleznik M.J.; Ott D.W.; Ju L.K. Effects of polyethyleneimine on cyanobacterium Anabaena flos-aquae during cell flocculation and flotation. Enzyme Microbiology Technology [en ligne]. 2003, 32, 290-293; DOI 10.1016/S0141-0229(02)00294-6

[147] Boussif O. ; Lezoualc'h F. ; Zanta M.A. ; Mergny M.D. ; Scherman D. ; Demeneix B. ; Behr J.P.A. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [en ligne]. 1995, 92 (16), 7297-7301.

[148] Xia T. ; Kovochich M. ; Liong M. ; Zink J.I. ; Nel A.E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. ACS Nano [en ligne]. 2008, 2 (1), 85-96.

[149] Yezhelyev M.V. ; Qi L. ; O'Regan R.M. ; Nie S. ; Gao X. Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging. Journal of the American Chemical Society [en ligne]. 2008, 130 (28), 9006-9012.

[150] Sonawane N.D. ; Thiagarajah J.R. ; Verkman A.S. Chloride concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl^- indicator. Evidence for chloride accumulation during acidification. Journal of Biological Chemistry [en ligne]. 2002, 277 (7), 5506-5513.

Chapitre 2

Description du système et méthodes de caractérisation

Chapitre 2 : Description du système et méthodes de caractérisation

I. Définition du système

En raison de la diversité des consortiums biologiques qu'elles contiennent [1], les boues de station d'épuration représentent un matériel d'étude complexe et hétérogène. Pour cette raison, nous avons choisi de les « modéliser » par des suspensions bactériennes de souches pures et de concentrations contrôlées, floculées par des polymères cationiques de masses moléculaires connues. Cela nous autorise à ne faire varier que certains paramètres prédéfinis (présence ou absence de surtructures membranaires et masse moléculaire du floculant) et à comparer leur influence sur la structure des flocs formés ainsi que leur impact sur la déshydratation.

I.1. Souche bactérienne Schewanella *Oneidensis* MR-1, de type Gram négative

I.1.1 Structure membranaire des bactéries Gram négatives

La dénomination de bactéries de type Gram négatives provient du résultat négatif du test de Gram. Ce test consiste à colorer les cellules bactériennes à tester, en laissant diffuser à travers les membranes, une molécule de petite taille, le cristal violet se fixant sur les composants cytoplasmiques (l'ajout de lugol permet la fixation de cette coloration interne). Il s'ensuit une étape de lavage à l'alcool qui permet la différentiation des deux types de bactéries. En effet, la paroi des bactéries Gram négatives, contenant peu de peptidoglycanes, permet à l'alcool de diffuser vers l'intérieur de la cellule et d'éliminer le cristal violet, ce qui provoque une décoloration de la cellule. Les bactéries Gram positif présentent une couche dense de peptydoglycanes, constituant une barrière à travers laquelle l'alcool ne peut diffuser, il n'y donc pas de décoloration. Afin de visualiser les bactéries Gram négatives, devenues transparentes, on les soumet à une seconde coloration à la fuchsine ou safranine qui diffuse à travers la membrane. C'est donc la différence de structure membranaire qui est à l'origine de cette classification [2].

Les bactéries Gram négatives sont constituées d'une double membrane (interne et externe) séparées par un espace périplasmique contenant la paroi, couche mince de peptidoglycanes.
Les membranes sont constituées d'une bicouche lipidique : phospholipides dont les « têtes » hydrophiles se trouvent à l'extérieur et les « queues » hydrophobes (ou lipophiles), à l'intérieur. C'est la mobilité de ces molécules les unes par rapport aux autres qui induit la fluidité de la bicouche lipidique. Ces membranes contiennent également d'autres types de protéines telles que les porines qui sont des protéines de transport permettant le passage de certaines molécules de taille trop importante pour avoir la capacité de diffuser à travers la bicouche lipidique. L'espace périplasmique a une fonction de stockage de nutriments et de synthèse de protéines.

La membrane externe est en contact étroit avec le milieu extérieur. Elle présente, dans la plupart des cas, un composé non protidique appelé lypopolysaccharide (LPS). Il s'agit d'un composé pouvant avoir une action pathogène. Il se décompose en trois parties, une partie lipidique, le lipide A, inclus dans la membrane bactérienne, un core et une partie polysaccharidique qui constitue la surstructure membranaire. Notons également que la membrane externe est liée à la couche de peptidoglycanes via la protéine de Braun. Précisons enfin que d'autres surstructures peuvent être synthétisées par les cellules bactériennes, de manière moins homogène et moins dense, telles que les flagelles (jouant un rôle dans la mobilité cellulaire) ou les pilis (structures protéiniques tubulaires intervenant notamment dans le processus de conjugaison bactérienne).

Il a été montré que ce type de membrane se comporte comme une barrière protectrice de faible perméabilité [3]. En effet, elle est perméable aux ions et à certaines molécules via les porines [4] mais imperméable aux constituants vitaux de la cellule comme les protéines présentes dans l'espace cytoplasmique. De plus, les LPS contribuent à empêcher la diffusion de molécules de taille importante dans l'espace périplasmique par l'encombrement stérique qu'ils provoquent. Une désorganisation de cette structure a pour effet direct d'augmenter la perméabilité de la membrane externe [5-7].

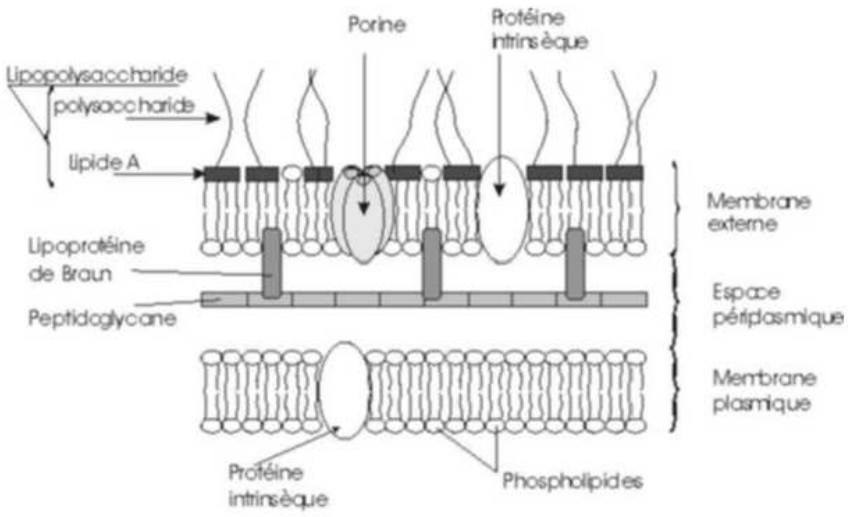


Figure 1 : Schéma d'une membrane de type Gram négative.

I.1.2 Propriétés de surtructure de la souche utilisée

Ces bactéries, Schewanella *Oneidensis* MR-1, ont été caractérisées pour la première fois en 1988 [8]. Il s'agit d'une bactérie de type Gram négative dont le génome a été totalement séquencé [9]. Ce sont des bacilles (bâtonnets) aérobies, anaérobies facultatives, organo-hétérotrophes, opportunistes. Elles se trouvent dans des environnements très variés tels que l'eau saumâtre ou l'eau douce, les sédiments, l'industrie agro-alimentaire et les intestins de certains mammifères dont l'homme [10]. D'autre part, ce type de bactérie présente la faculté de respirer certains métaux dont le fer, en utilisant comme couple d'accepteur d'électron Fe(II)/Fe(III) [11].

Cette souche a également la capacité de s'adapter à des conditions environnementales variables, notamment à des concentrations élevées en sel [12] et à des chocs thermiques [13] par, respectivement, un contrôle métabolique, ou un contrôle de la synthèse de certaines protéines membranaires, ce qui modifie entres autres, l'adhésion de ces cellules à leur substrat. Une étude des protéines membranaires produites suivant la température du milieu de vie a montré que la longueur de la partie polysaccharidique des LPS [14] était variable suivant la température de culture. Concrètement, les LPS sont divisés en trois segments : lipide A, core, et antigène O. Cette dernière partie, composée de polysaccharides, constitue la surstructure bactérienne étudiée. Deux températures de culture ont donc été choisies, 20°C et

30°C, permettant, respectivement, d'obtenir un antigène O de taille maximale (entre 30 et 50 nm) (Figure 2.A.1 et 2.B.1), ou une absence d'antigène O et donc de surtructure (Figure 2.A.2 et 2.B.2) [15]. Ce cas de figure nous permet de faire varier le paramètre présence ou absence de surstructure en évitant toute variabilité génétique qui pourrait conduire à une variabilité phénotypique.

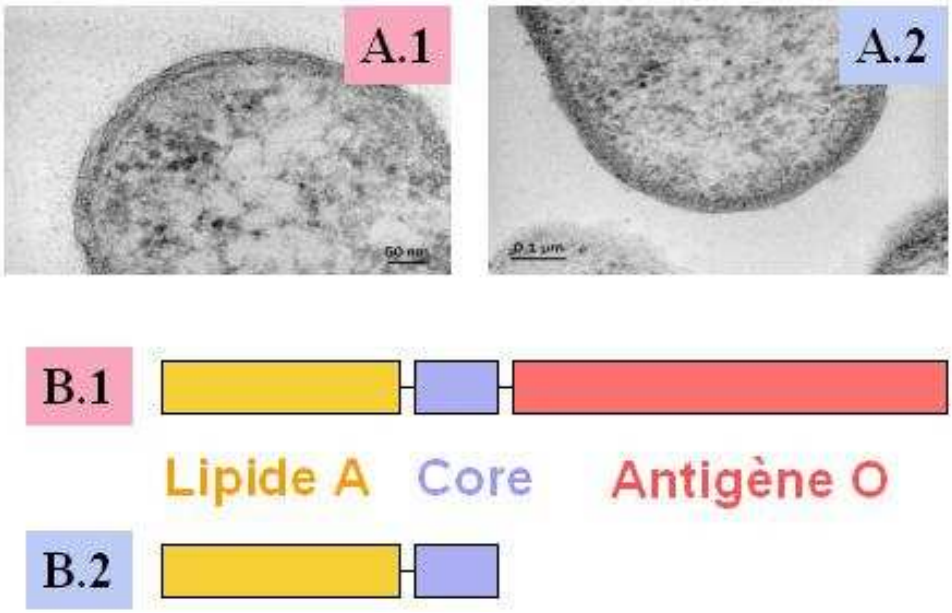


Figure 2 : Observations en microscopie électronique en transmission de Schewanella *Oneidensis* MR-1 A.1 présentant des LPS de longueur maximale (température de culture 20°C) et A.2 ne présentant pas de surtructure (température de culture 30°C) et structure des LPS associés, respectivement B.1 et B.2.

I.1.3 Cultures bactériennes

Toutes les cultures bactériennes ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie de l'Environnement (LCPME, Vandoeuvre lès Nancy), Nancy Université, avec l'aide de Dr Christophe Merlin.

La figure 2 résume le processus décrit ci-dessous.
Notons tout d'abord que toutes les étapes décrites ci-dessous sont effectuées en milieu stérile.
La souche bactérienne utilisée est stockée à –80°C, en cryotube, dans un tampon de stockage contenant 50 % de tampon bactérien (KH_2PO_4 (3 g/L), $NaHPO_4$ (7g/L), NaCl (4g/L), $MgSO_4.7\ H_2O$ (0.2 g/L)) et 50% de glycérol (100%).

Afin d'obtenir des colonies isolées et de vérifier ainsi l'absence de contamination, les bactéries sont inoculées en milieu Lysogenic-Broth (LB Broth, Miller, Difco™) gélosé (boite de Pétri) puis placées en étuve à 30°C pour une durée de trois jours. Les boites de Pétri ainsi inoculées sont conservées en chambre froide, à la température de 4°C pendant une durée maximale de trois jours. Les deux étapes suivantes sont réalisées dans un milieu LB liquide, dans des erlenmeyers, avec un rapport volumique constant de 1/5, sous une agitation contrôlée de 160 rpm, afin de conserver des conditions d'oxygénation identiques. L'inoculation dans le milieu liquide se fait par le prélèvement d'une colonie isolée sur la boite de Pétri. La suspension ainsi obtenue est placée en chambre chaude (30°C) pendant une durée de 24 heures. L'amplification de la culture se fait par prélèvement et inoculation au 1/100. Les suspensions sont alors placées dans des bains thermostatés pendant une durée de 12 à 16 heures, ce qui permet de porter la culture bactérienne en phase pseudo-stationnaire, à une température adaptée (respectivement 20 ou 30°C).

Les cultures cellulaires sont séparées de leur milieu nutritionnel par centrifugation à 5000 G pendant 15 minutes. Afin d'éliminer toutes traces d'élément nutritif, les cultures sont lavées deux fois par centrifugation pendant 15 minutes dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L (eau déionisée Millipore-MilliQ, 18.5 MΩ/cm). Pendant toutes les étapes de centrifugation, la température de culture des bactéries est maintenue constante.

Les bactéries sont finalement resuspendues dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L. La densité optique à 600 nm ($D.O._{600}$) est ajustée à 1 par spectrométrie (spectrophotomètre Safas Monaco, UV mC^2, Monaco), ce qui correspond à 10^9 bactéries/mL.

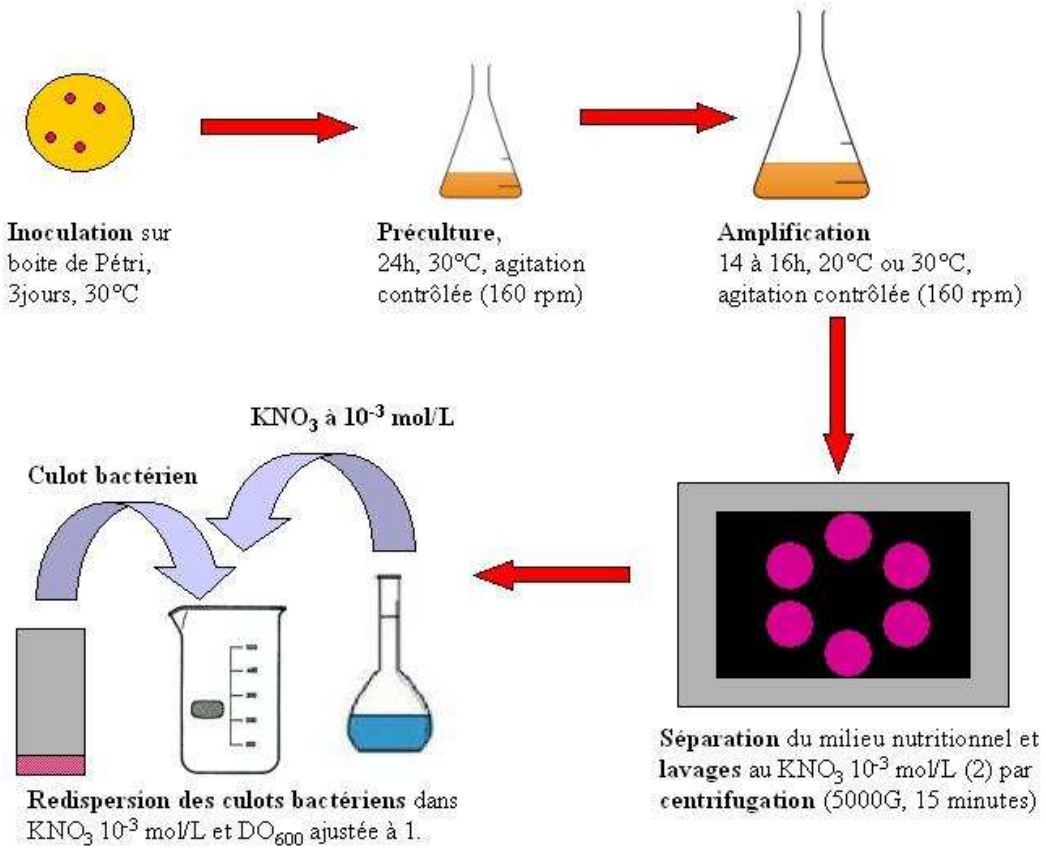


Figure 3 : Procédure de culture bactérienne.

I.2. Floculants utilisés

Le floculant utilisé, le polyéthylèneimine (PEI), est un polymère cationique fréquemment utilisé en station d'épuration dans le procédé de traitement de l'eau ou de déshydratation des boues biologiques d'épuration [16-17]. La formule générale de ce polymère est $-[CH_2-CH_2-NH]_n-$, avec n le nombre de monomères (Figure 4). Nous avons utilisé des PEI à chaîne ramifiée, présentant des amines primaires, secondaires et tertiaires. Afin de comprendre le comportement et le rôle de ce polymère dans la déstabilisation des suspensions bactériennes, nous avons étudié les effets de différentes masses moléculaires : 600, 60000 (Polyscience) et 750000 g/mol (Sigma-Aldrich).

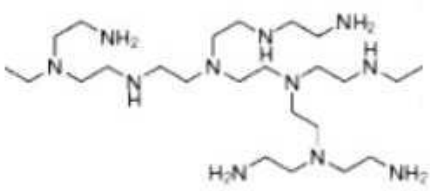


Figure 4 : Structure d'un polymère de PEI à chaîne ramifiée.

Le PEI est ajouté aux suspensions bactériennes à partir d'une solution mère de 10 g/L. Afin d'éviter l'hydrolyse du polymère, pouvant causer d'éventuels problèmes de reproductibilité, les solutions mères sont renouvelées avant chaque manipulation.

I.3. Préparation des suspensions floculées

Les tests de floculation sont réalisés à température ambiante.

La suspension bactérienne est divisée en aliquots de 100 mL placés dans des réacteurs en polymethylmethacrylate (PMMA) de 5 cm de diamètre, munis de 4 baffles (0.5 x 6 cm). Le floculant est injecté sous la surface de la suspension par une micropipette (Eppendorf). L'agitation est mécanique, homogène et assurée par l'intermédiaire d'une pale rectangulaire (0.5 x 2 cm) située à une profondeur de 2/3 sous la surface de la suspension (Figure 5.A). Le processus de mélange se divise en deux étapes : (i) une vitesse rapide de 250 rpm est appliquée durant trois minutes, puis (ii) une vitesse réduite de 60 rpm est utilisée pendant 46 minutes (Figure 5.B). L'alternance de ces deux vitesses d'homogénéisation permet une efficacité optimale de la floculation [18]. La suspension agrégée est placée en cône d'Imhoff pour une sédimentation d'une durée d'une heure, à l'issue de laquelle le volume de sédiment obtenu et la turbidité résiduelle du surnagent ($D.O._{600}$) seront mesurés.

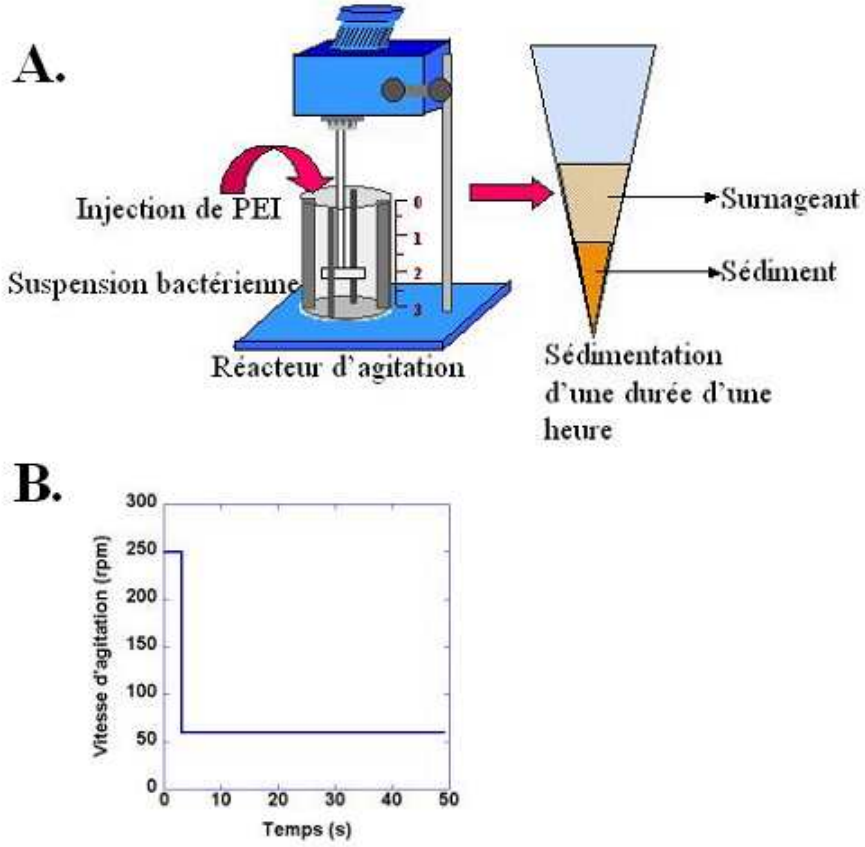


Figure 5 : Préparation des suspensions bactériennes floculées (5.A) et protocole d'agitation (5.B).

Des concentrations en PEI allant de 0 à 100 mg/L sont testées afin de déterminer la concentration optimale de floculation correspondant à chaque masse moléculaire et chaque type de bactérie (présentant ou non une surtructure). Cette dernière correspond à la concentration la plus faible en polymère pour laquelle les premiers sédiments apparaissent.

Les mesures de pH et conductivité sont effectuées durant la seconde phase d'homogénéisation. Dans le but d'éviter d'éventuelles restructurations des agrégats formés, les observations AFM et les mesures de tailles des agrégats sont effectuées directement à l'issue des deux périodes d'agitation. Enfin, les sédiments obtenus sont inclus en résine en vue d'effectuer des observations au microscope électronique en transmission. Les mesures de mobilité électrophorétique sont effectuées sur les agrégats encore en suspension dans le surnageant, ce qui permet d'éviter les dilutions. La figure 6 résume le processus employé pour la préparation des suspensions floculées et les méthodes de caractérisation associées.

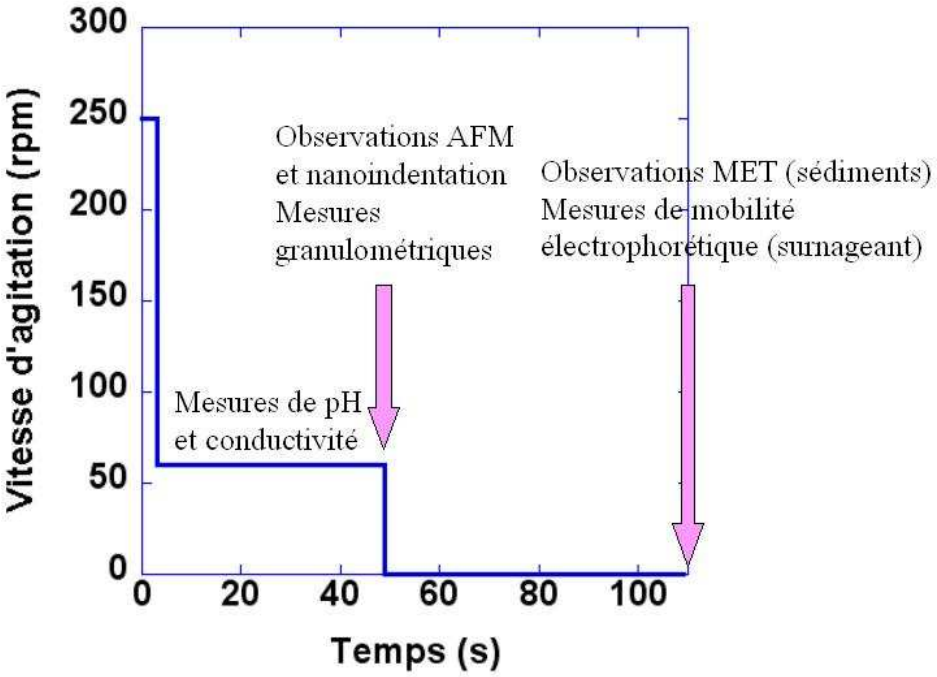


Figure 6 : Méthodes de caractérisation des suspensions bactériennes floculées.

II. Méthodes de caractérisation des suspensions floculées

II.1 Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique donne une estimation de la charge globale des agrégats et permet ainsi d'apprécier l'adsorption du floculant sur la membrane bactérienne et l'état d'intégrité de celle-ci.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un Zêtaphorémètre IV (CAD Instrumentations, France). Il s'agit d'une technique de microélectrophorèse permettant de mesurer la vitesse de déplacement d'une particule (ici des agrégats bactériens) dans un champ électrique. Expérimentalement, l'appareil de mesure se compose d'une cellule capillaire close à ses extrémités. Ces dernières sont chacune munies d'une électrode permettant l'application d'un champs électrique constant (800 V/m). Dans la couche attenante aux parois du capillaire, le champ électrique appliqué entraîne un déplacement du fluide contenant les particules (électroosmose). Cet écoulement se transmet de proche en proche aux couches de fluide concomitantes. Au seuil de la cellule, le débit étant nul (extrémités fermées), le fluide s'écoule en sens inverse au centre du capillaire. Il existe donc, au sein de cette cellule, 2 plans où la

vitesse d'écoulement du fluide est nulle, on parle de plans stationnaires (Figure 7). Dans ces plans, le mouvement des particules n'est dû qu'à leurs charges et permet d'accéder à leur mobilité électrophorétique. Concrètement, la position des particules est déterminée à partir de la réflexion d'un faisceau laser. Des images, enregistrées par une camera CCD (charge-coupled device) à des intervalles de temps fixes, permettent de déterminer la trajectoire des particules. La mobilité électrophorétique des particules est calculée par l'intermédiaire d'un logiciel (Zetaphorometer 4.30, CAD Instrumentation), à partir d'une centaine de trajectoires au minimum. Ce processus est répété trois fois.
Pour chaque échantillon testé le cycle précédent est répété trois fois de façon indépendante.

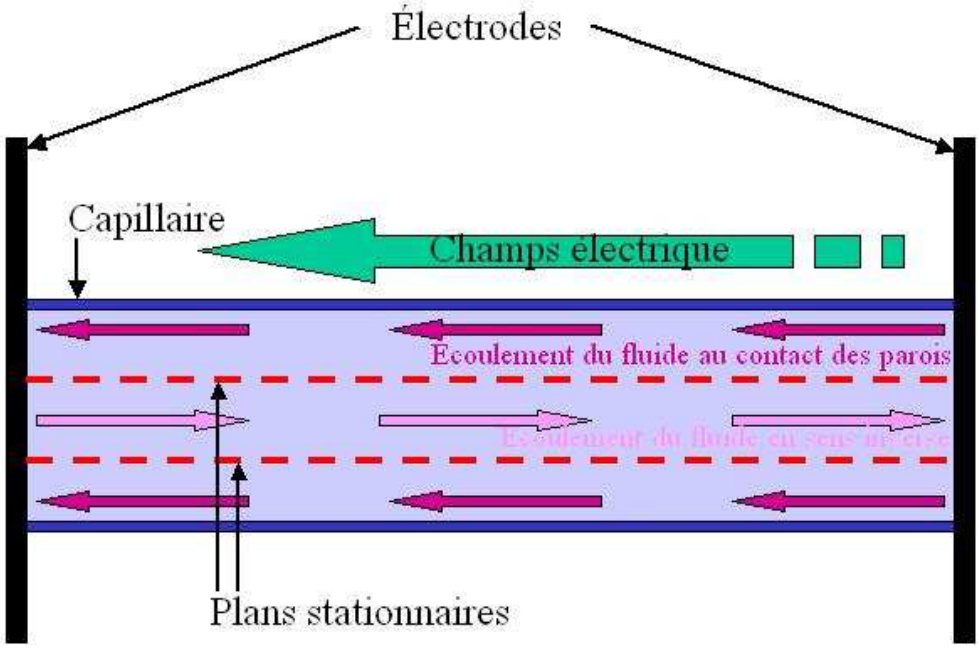


Figure 7 : Ecoulement du fluide sous champs électrique dans le capillaire de mesure.

La mesure est effectuée à partir du surnageant des suspensions floculées, qui est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur après une heure de sédimentation. Pour quelques échantillons, le surnageant est dilué dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L (pour ne pas modifier le fond ionique) afin d'éviter les phénomènes de diffusion multiple qui nuisent à la qualité des images.

II.2 Mesure de taille par granulométrie laser

Ces mesures ont pour but d'accéder à l'évolution de la taille des agrégats bactériens en fonction de la concentration de PEI.

Ces mesures sont réalisées avec un granulomètre Sympatec Helos. Il s'agit de mesurer la diffraction d'un faisceau laser sur les particules échantillonnées afin de déterminer leur taille. Le faisceau laser produit par une source Hélium-Néon (λ = 630 nm) traverse la cellule de mesure au sein de laquelle circule le fluide entraînant les particules (Figure 7). Celles-ci diffractent la lumière suivant un angle à peu près inversement proportionnel à leur diamètre. Les lumières diffractée et transmise sont dirigées par une lentille convergente vers un détecteur placé dans son plan focal (Figure 8). Suivant la taille des particules mesurées, on choisit une lentille de distance focale 5 mm permettant de mesurer une gamme de tailles comprise entre 0.25 et 87.5 µm, ou une lentille de distance focale 50 mm permettant de mesurer des tailles de particules comprises entre 0.5 à 875 µm.

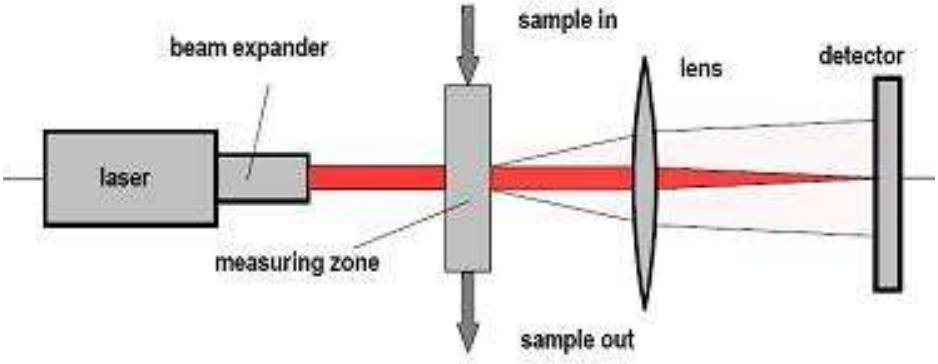


Figure 8 : Principe des mesures granulométriques (documentation granulomètre Sympatec Hélos BF. (à banc court)) .

Le diamètre des particules est calculé par le logiciel Windox Helos 3.4, en se basant sur la théorie de la diffraction de Fraunhoffer. On obtient alors des courbes de distribution en taille des particules (% volume) et de distribution cumulée (Figure 9) [19].

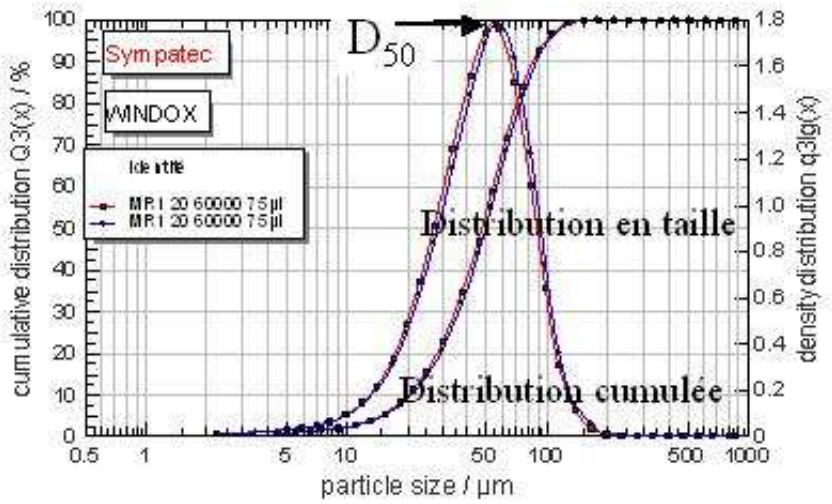


Figure 9 : Distribution en taille et cumulée du diamètre des particules.

Expérimentalement, l'échantillon est injecté dans une cuve de 450 mL contenant une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L jusqu'à atteindre une saturation optique approximative de 12%, ce qui évite les phénomènes de diffraction multiple qui fausseraient les diamètres mesurés. Les échantillons sont acheminés vers la cellule de mesure par le biais d'une pompe péristaltique à faible gradient de cisaillement afin de ne pas altérer la structure des agrégats. Précisons également qu'une agitation douce est assurée dans la cuve pour conserver l'homogénéité de la suspension. Chaque mesure est répétée deux fois.

Les mesures sont effectuées sur les échantillons dès la fin des deux cycles de mélange, avant la décantation, pour éviter d'éventuels artéfacts qui auraient pu être causés par des changements de structure des agrégats. Les tailles auxquelles nous faisons référence dans ce travail, correspondent au diamètre moyen D_{50}. Il s'agit de la valeur médiane à laquelle 50% des agrégats de la distribution granulométrique ont une taille inférieure.

II.3 Observations en microscopie électronique en transmission (MET)

Ces observations ont été réalisées au Service Commun de Microscopie Electronique et de Microsonde (SCMEM, Nancy-Université), sous la direction de Dr. Jafaar Ghanbaja. Elles ont permis d'observer la morphologie et la structure interne des agrégats bactériens ainsi que l'état d'intégrité des bactéries les composant.

Le microscope électronique en transmission (MET) utilisé est un modèle MET Phillips CM20 opérant avec une tension d'accélération de 200 kV. La figure 8 présente un schéma général des différents éléments d'un MET. Il se compose d'un canon à électrons produits par un filament LaB_6 dont la température est amenée à 1500°C, ce qui provoque l'émission d'électrons par effet Joule. L'ensemble de l'enceinte est maintenue sous vide (de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} Torr). Les électrons sont focalisés par un cylindre Wehnelt puis accélérés en passant du potentiel négatif de la cathode à celui positif de l'anode. Le faisceau est ensuite focalisé sur l'échantillon par un système de plusieurs lentilles électromagnétiques. A la suite du canon à électrons, deux condensateurs permettent à la fois de faire varier l'ouverture du faisceau et la densité de courant électronique sur l'échantillon (Figure 10). Une partie des électrons traverse l'échantillon, et forme l'image de l'objet observé. Celle-ci, par l'intermédiaire d'un système de projection composé de plusieurs lentilles (de diffraction, intermédiaire et de projection finale) est transférée et agrandie sur un écran fluorescent, un film photographique ou captée par une camera CCD. Un objectif permet la mise au point de l'image.

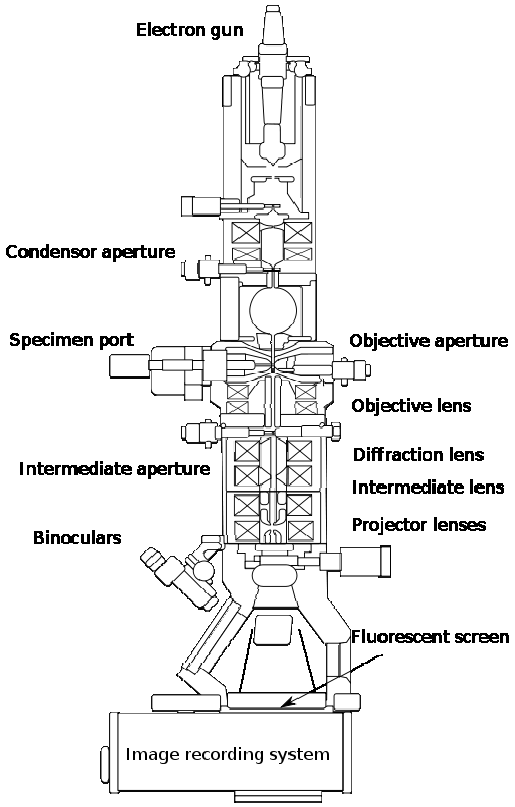


Figure 10 : Principe de fonctionnement d'un microscope électronique en transmission (http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy).

Les échantillons sont préparés de la façon suivante. Les sédiments sont récupérés après la sédimentation des suspensions floculées puis inclus dans une résine Epoxy hydrophobe (Kit Embed 812, Euromedex). Pour cela, nous utilisons un protocole classique décrit par Lartiges *et. al.* [20] Tout d'abord, les échantillons sont placés dans une solution de glutaraldéhyde (2.5%) pendant quatre heures. Cela permet de maintenir la cohésion des agrégats en fixant les groupes amines des protéines et de stopper une éventuelle évolution du système. Les échantillons sont ensuite placés dans une solution de tétroxyde d'osmium (2%) pour une durée d'une heure. Ce dernier, en se fixant à la matière organique, va avoir pour effet de rigidifier la structure de l'échantillon et d'y faire apparaître un contraste électronique en MET. Son mode d'action est de créer des ponts osmiés (-C-O-Os-O-C-) entre deux carbones voisins présentant une double liaison éthylénique (-CH=CH-). Après chacune de ces deux étapes, l'excès de réactif est éliminé par deux rinçages successifs à l'eau déminéralisée. Puis, les échantillons sont déshydratés par ajout d'acétone à des concentrations croissantes : 10, 20, 40 et 60% (v/v), pendant 5 minutes pour chacune d'entre elles, 80% (v/v) pendant 15 minutes, 2x90% (v/v) pendant 20 minutes et enfin 3x100% (v/v) pendant 20 minutes. Finalement, l'acétone est progressivement échangé avec les monomères de résine Epoxy (1/3 résine,

2/3 acétone ; 2/3 résine, 1/3 acétone ; 3/3 résine, l'échange pour chacune de ces étapes se faisant sur une durée de 12h). Après le dernier échange, les échantillons sont placés dans des moules en silicone et la résine est polymérisée dans une étuve à 60°C pendant 12h.
Les échantillons ainsi inclus en résine sont coupés en sections ultrafines, de l'ordre de 100 nm, par un ultramicrotome (ultra-cut E, Reichert-Jung). Dans le but d'améliorer la résolution de la matière organique, ces sections sont contrastées par de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb [21], puis sont placées sur des grilles de cuivre (Grille E.M. Sciences-Cat N°71150).
Pour qualifier de manière systématique les dommages subis par les bactéries au contact du PEI, un comptage a été effectué sur un minimum d'une centaines de bactéries par échantillon.

II.4 Mesures d'absorbance/relargage de cristal violet

Ces mesures nous permettent d'accéder, de façon qualitative, à une estimation de la perméabilité des membranes bactériennes après qu'elles aient été mises en contact avec le PEI.

La suspension bactérienne de DO_{600} ajustée à 1, est divisée en aliquots de 1 mL avant tout contact avec le PEI. Les aliquots sont centrifugés à 13000 G pendant trois minutes, puis redispersés dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L et de cristal violet 0.1 g/L pendant une heure. Le cristal violet (Figure 11) est une molécule de petite taille, comprenant plusieurs cycles aromatiques, qui diffuse à travers les membranes des bactéries de type Gram Négatif. Les échantillons sont lavés par centrifugation (13 000 G, 3 min) puis redispersés dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L. A l'issue de chaque centrifugation, l'absorbance du surnageant à 540 nm est mesurée. L'opération est répétée jusqu'à ce que le taux de cristal violet relargué dans le surnagent soit négligeable. Dans ce cas, les bactéries ayant absorbé le cristal violet sont mises en contact avec le PEI à des concentrations comprises entre 0-100 mg/L. Après une durée de 49 minutes (équivalent au temps de formation des agrégats bactériens pendant les étapes d'agitation lors de la préparation des suspensions floculées), les échantillons sont centrifugés une dernière fois (13000 G, 3 minutes), puis l'absorbance du surnageant (540 nm) est mesurée. Dans chaque batch, un échantillon témoin est mis en contact avec de l'acide acétique (0.1 g/L), ce qui provoque une lyse bactérienne totale et donc, un relargage de la

totalité du cristal violet absorbé. On peut estimer la quantité de cristal violet relarguée à partir du rapport des absorbances mesurées dans les surnageants des suspensions mises en contact avec le PEI et de celle traitée par l'acide acétique.

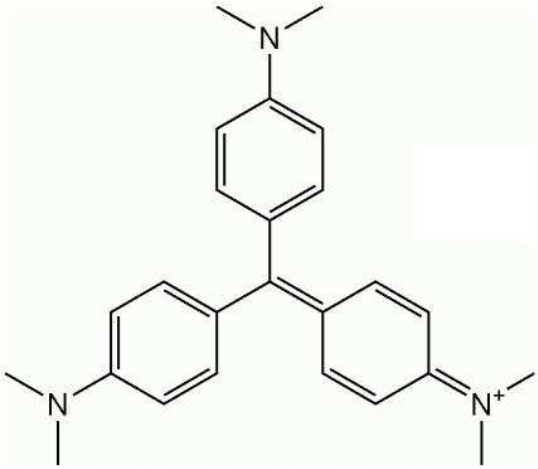


Figure 11 : Molécule de cristal violet.

II.5 Mesures de temps de générations après traitement des bactéries au polyéthylèneimine

Il s'agit d'estimer la toxicité du PEI, ou son pouvoir bactéricide par le biais de mesures des temps de génération d'une colonie bactérienne. Cela correspond au temps nécessaire pour obtenir le doublement d'une population bactérienne.

Des aliquots de 1mL de suspension bactérienne en phase stationnaire sont placés dans des erlenmeyers contenant 50 mL de milieu nutritionnel LB, avec un rapport volumique de 1/5 afin d'assurer un taux d'oxygénation constant et d'uniformiser le développement des populations bactériennes. A t=0, le PEI est ajouté de façon à obtenir un panel de concentrations comprises entre 0 et 100 mg/L. La densité optique de la suspension est alors mesurée toutes les 10 minutes. Lors de ces mesures, nous avons pris garde à soustraire l'apport du milieu nutritionnel et à diluer la suspension au dixième lorsque la densité optique mesurée atteignait 0.8 afin de ne pas créer d'interférences pouvant altérer la précision de la mesure.

La croissance d'une population bactérienne suit une loi exponentielle et s'exprime ainsi :

$$N = \exp(kt)$$

avec N, le nombre de bactéries présentes en suspension, k, une constante correspondant à la vitesse de développement de la population, exprimé en $minute^{-1}$ et t, le temps de développement de la population exprimé en minute.

Le doublement d'une population bactérienne s'exprime donc de la façon suivante :

$$2N = \exp(kt_2)$$

avec t_2 le temps nécessaire pour obtenir une population de 2N bactéries.

En faisant le rapport des deux expressions précédentes, on obtient :

$$2 = \exp(k(t_2-t))$$

Le temps de génération (T_G.) d'une population bactérienne ou temps de doublement répond donc à l'équation suivante :

$$T_G = t_2-t = \ln(2)/k$$

Le coefficient k (exprimé en min^{-1}) s'obtient à l'aide d'une régression linéaire effectuée à partir des courbes de densité optique en fonction des temps de mesure. Il reste alors à calculer le temps de génération.

Cette opération a été répétée pour chaque concentration en polymère et nous a permis de tracer les courbes de temps de génération en fonction de la concentration en PEI.

Notons que, même si ces résultats sont à manipuler avec précaution en raison des interactions potentielles pouvant avoir lieu entre le PEI et le milieu nutritionnel bactérien, il nous permet tout de même d'accéder à une estimation de la toxicité du PEI suivant sa masse moléculaire et suivant la présence ou l'absence de surstructures sur les membranes bactériennes.

II.6 Microscopie à force atomique (AFM)

Les mesures ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie de l'Environnement (Villers lès Nancy), Nancy Université, sous la direction de Dr. Grégory Francius.

Pour effectuer ces analyses, et afin d'éviter une dégradation éventuelle des échantillons (agrégats), ces derniers ont été étudiés dès la fin des deux périodes d'agitation, sans décantation préalable.

II.6.1 Description de la technique

L'AFM est une technique de microscopie, dite à sonde locale, c'est-à-dire basée sur la mesure des interactions entre une pointe nanométrique et la surface d'un échantillon. Cela permet de caractériser et cartographier les propriétés physicochimiques et mécaniques des échantillons à l'échelle nanométrique.

L'AFM utilisé est de modèle MFP3D-BIO (Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany). Un scanneur piezo-électrique portant la cellule de mesures contenant l'échantillon, assure son déplacement dans les trois dimensions de l'espace (x, y, z), alors que la pointe nanométrique utilisée est fixée à un support électronique appelé « holder ». Les pointes, tout comme les leviers qui les supportent, sont constituées de nitrure de silicium. Les leviers sont généralement triangulaires (en forme de V) ou droit (barre) alors que les pointes sont de forme tétraédrique (MLCT-AUNM, Veeco Instruments SAS, Dourdan, France). L'ensemble levier/pointe est couramment appelé « cantilever » ou microlevier, il peut être assimilé à un système ressort de constante de raideur k_c.
Le principe de la mesure repose sur un système de détection laser associé à la pointe. Quand celle-ci est mise en contact avec l'échantillon et balaie sa surface par déplacements latéraux du scanneur piezo-électrique (qui permet également de contrôler la distance pointe – échantillon), des forces d'interaction apparaissent au voisinage du contact avec l'échantillon. Il en résulte alors une déflexion du microlevier. A partir du système de détection du laser focalisé sur le microlevier, chaque déformation de ce dernier est mesurée. L'intensité lumineuse du signal reçu par le photodétecteur est convertie en signal électrique et est

enregistrée, tout comme la position du scanneur piezoélectrique. La conversion de ces données, via le logiciel de contrôle, nous permet de mesurer les courbes de force ainsi que topographie de la surface étudiée (figure 12).

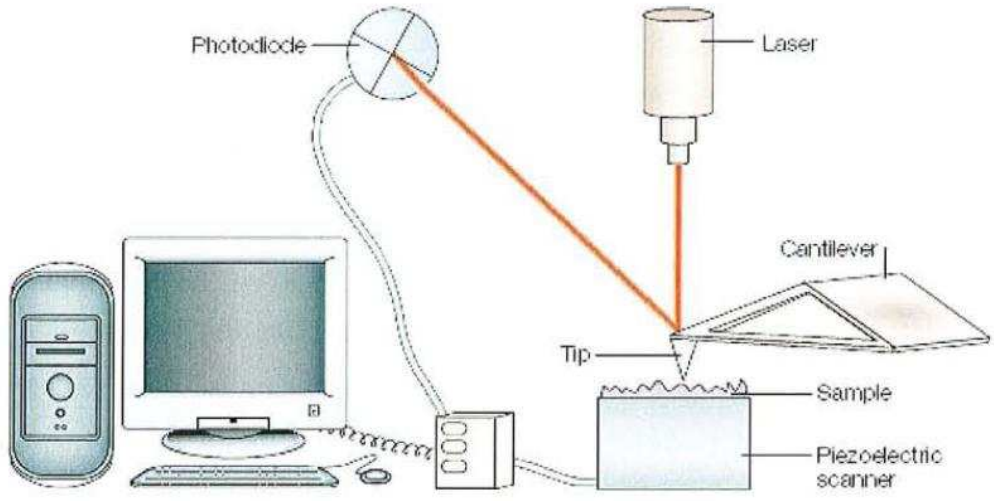


Figure 12 : Montage d'un microscope à force atomique. [22 - 23]

Avant chaque analyse, la géométrie de la pointe est systématiquement contrôlée sur un support nanostructuré (TGT1, NT-MTD Compagny, Moscow, Russia). Il est également nécessaire, de calibrer chaque nouveau microlevier utilisé en mesurant sa constante de raideur k_c (de l'ordre of ~10.4 ± 1.7 pN nm^{-1}), par la méthode de calibration thermique [24]. Cette méthode, aussi appelée méthode de « fluctuation thermique », consiste à mesurer l'évolution de la déflexion du levier au repos et à y relier la constante de raideur du levier :

$$K \langle z^2 \rangle = k_B T$$

où k_B représente la constante de Boltzman, T la température absolue, $\langle z^2 \rangle$ la moyenne des carrés des positions du microlevier par rapport à sa position moyenne prise comme référence ($\langle z \rangle = 0$) , et *K* une constante proportionnelle à la constante de raideur du ressort. On obtient la valeur de $\langle z^2 \rangle$ en mesurant l'aire du pic caractéristique de la fluctuation thermique du microlevier.

La constante de raideur (k_c) du microlevier peut s'écrire de la façon suivante :

$$k_c = c\, K$$

où c est un coefficient constant propre à la géométrie et au type de microlevier utilisé.
Finalement, la constante de raideur (k_c) du microlevier s'exprime de la façon suivante :

$$k_c = \frac{c\, k_B T}{\langle z^2 \rangle}$$

II.6.2 Imagerie

Cette technique a pour but d'acquérir une cartographie en trois dimensions de la topographie de la surface parcourue. Elle a été utilisée de façon complémentaire aux observations MET. Cela nous a permis de nous assurer que les lésions observées sur les agrégats en microscopie électronique n'étaient pas liées à une fragilisation voire un endommagement provenant du traitement nécessaire à l'inclusion en résine. Nous avons ainsi pu observer de manière directe la surface des agrégats.

Il existe différents modes d'imagerie AFM, chacun conditionné par des cycles approche-retrait de l'échantillon :

- le mode contact, utilisé dans ce travail, basé sur les interactions répulsives apparaissant à l'approche de la surface à analyser. Ce mode consiste à mettre en contact l'échantillon et la pointe AFM. Cette dernière est alors repoussée, provoquant la déflexion du microlevier auquel elle est solidaire. La force appliquée à l'échantillon par le microlevier (et donc la déflexion) est maintenue constante par un contrôle rétroactif.
- le mode contact intermittent ou mode tapping, basé sur une vibration constante du microlevier dont l'amplitude diminue au contact de la surface à analyser.
- le mode non-contact, basé sur les forces d'attraction apparaissant entre la pointe et la surface de l'échantillon. Les mesures sont basées soit sur la déviation soit sur l'amplitude des oscillations du microlevier lors de l'approche de l'échantillon. Ce dernier mode est très peu utilisé en raison de la faiblesse des interactions attractives (nécessité d'un bruit de fond très faible et risque d'interaction avec une couche nanométrique d'eau et d'éventuels micropolluants).

La préparation des échantillons se fait par adsorption des particules étudiées (bactéries et agrégats) sur des plaques de verre. Le temps de dépôt est de 20 minutes. La plaque est alors rincée à l'eau déminéralisée, puis légèrement séchée avec un faible débit d'air comprimé afin de ne pas assécher les bactéries. Les analyses se font à l'air, ce qui permet d'avoir une meilleure résolution lors de l'acquisition de l'image.
Le mode utilisé présente l'inconvénient de dégrader les échantillons fragiles, notamment par l'arrachage des particules par la pointe AFM lors du balayage de la surface de l'échantillon. Des polymères tels que le PEI à forte masse moléculaire peuvent être utilisés pour améliorer la fixation des bactéries et éviter ce type de désagrément. Cependant, dans la mesure où ce type de polymères est déjà utilisé pour la floculation des bactéries, nous avons choisi de ne pas utiliser ce type de procédé.

II.6.3 Spectroscopie de force (nanoindentation)

Les données ont été traitées grâce à un programme développé conjointement au LEM, LCPME et au CRAN, permettant d'automatiser l'analyse et la modélisation des courbes force issues d'imagerie force-volume obtenues pour des échantillons biologiques.

Cette technique nous a permis de quantifier la rigidité des parois bactériennes et agrégats après traitement au PEI. Les paramètres observés sont le module d'Young, la constante de raideur et la pression de turgescence.

Lorsque le levier entre en contact avec l'échantillon, un cycle mécanique de charge-décharge est appliqué localement au matériel observé, dont la réponse élastique est mesurée par l'intermédiaire de la déformation du levier. Ainsi, il est possible d'acquérir une cartographie topographique et mécanique de l'échantillon à l'échelle nanométrique. Il s'agit donc de caractériser de façon très locale (~100 nm^2) l'action mécanique de la pointe en appliquant une certaine force sur l'échantillon. Les paramètres nanomécaniques des particules testées sont déduits à partir de la déflexion du levier, de la force qui lui est appliquée, et de la profondeur de l'indentation. Par l'intermédiaire d'un logiciel, cela permet d'obtenir pour chaque point de mesure, une courbe de force en fonction de la distance d'indentation.
Deux cas se présentent, soit l'échantillon à analyser est de type rigide et non-adhérent, soit il s'agit d'un échantillon à interface polymérique complexe, du type des échantillons étudiés

dans ce travail. Dans le premier cas, les déflexions mesurées pour les cycles approche-retrait sont linéaires et superposables, car il n'y a pas d'interaction avec la pointe. Dans le second cas, les forces répulsives subies à l'approche de l'échantillon par la céramique piezoélectrique (jusqu'au contact avec la pointe) provoquent une augmentation de la déflexion du levier de façon successivement linéaire et non-linéaire car la couche polymérique molle tend à absorber préalablement une partie de la déformation. Lors du retrait de l'échantillon, il existe des forces d'adhésion entre la pointe et l'échantillon et la déflexion est prolongée, atteignant un minimum inférieur au point de contact. Le comportement n'est plus linéaire et ne se superpose plus au cycle d'approche.

Dans ce travail, nous n'avons utilisé que les courbes en approche, nous donnant accès à l'élasticité de la cellule via le module d'Young, à la constante de raideur et à la pression de turgescence des particules observées. Les courbes de retrait, quant à elles, nous auraient donné accès aux forces de viscosité ou d'adhésion.

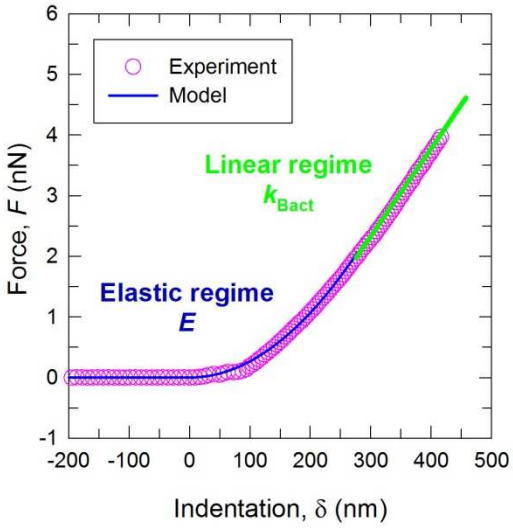


Figure 13 :Modélisation mathématique d'une courbe de force réalisée sur une bactérie.

Les courbes d'approche comprennent une partie non linéaire et une partie linéaire (figure 13). Le régime non linéaire va nous permettre d'extraire le module d'Young, E, suivant le modèle de Hertz. Ce modèle met en évidence la relation existant entre la contrainte dans la zone de contact en fonction de la force normale appliquée, des rayons de courbure et du module d'Young. Les forces d'interaction F_{Hertz} (converties à partir de la tension appliquée à la céramique piezoélectrique pour approcher l'échantillon), s'expriment donc en fonction de la

nanoindentation δ (donnée par la position du levier), c'est à dire de la déformation de la cellule bactérienne :

$$F_{Hertz} = \frac{2\,E \tan(\alpha)}{\pi\,(1-\nu^2)}\,\delta^2$$

Où ν représente le coefficient de Poisson (0.5 en milieu incompressible) et α le demi-angle de la pointe (35°, valeur fournie par le fabricant).
La valeur du module d'Young obtenue pour les cellules bactériennes est en moyenne de l'ordre de 100 kPa [25].

Enfin, le régime linéaire, est utilisé afin de déterminer la constante de raideur des bactéries à analyser, k_{cell}. Cette dernière est donnée par la loi de Hooke qui permet de relier la force appliquée, F_{Hooke} , au déplacement linéaire provoqué. Dans ce cas, la constante de raideur sera donnée par la pente de la courbe :

$$F_{Hooke} = k_{cell}\,\delta$$

Les constantes de raideur sont de l'ordre de 10^{-2}, 10^{-3} N/m [11] Notons que ce paramètre est en relation directe avec la pression de turgescence [26-27].

Contrairement à l'imagerie, ces analyses sont effectuées en milieux liquide.
En raison de la force d'adhésion trop faible entre les particules et la plaque de verre, il est impossible d'acquérir les données souhaitées par simple adsorption car nous sommes confrontés à l'arrachage des particules par la pointe AFM. Pour remédier à cela, il est nécessaire d'employer un film polymérique permettant une fixation plus étroite des bactéries sur leur support. Un film de PEI, polymère cationique, de masse moléculaire 750 000 g/mol, a été déposé sur les plaques de verre, assurant la fixation des agrégats chargés négativement. Pour les agrégats chargés positivement, il a été nécessaire de compléter ce film par un polymère anionique, le polystyrène sulfonate (PSS). Le temps de dépôt de chacun de ces polymères puis de l'échantillon est de 30 minutes. Entre chacune de ces étapes, les échantillons sont rincés à l'eau déminéralisée puis la cellule est finalement immergée dans une solution de KNO_3 10^{-3} mol/L.

II.7 Mesures rhéologiques

Ces mesures ont été réalisées au Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée (Vandoeuvre lès Nancy), Nancy Université, avec l'aide de Pr Christophe Baravian.

II.7.1 Description de la technique

Les propriétés rhéologiques des échantillons de suspensions bactériennes floculées sont étudiées de façon complémentaire aux mesures de spectroscopie de force de la section précédente. Tandis que l'AFM offre la possibilité de caractériser les propriétés nanomécaniques des échantillons à l'échelle locale, les mesures rhéologiques permettent d'accéder directement aux propriétés mécaniques de l'échantillon à l'échelle macroscopique. Pour cela, il s'agit de caractériser les interactions apparaissant entre les différentes particules composant la structure étudiée lors de l'application d'une contrainte, et pouvant intervenir dans l'écoulement du matériau.

Les mesures rhéologiques ont pour but d'établir le lien existant entre les contraintes appliquées au système et les déformations qui en résultent par l'intermédiaire de l'équation rhéologique d'état du matériau. Pour cela, il est possible de soumettre les échantillons à deux types de déformation : le cisaillement simple en écoulement laminaire ou le cisaillement oscillatoire qui sont détaillés plus bas.
Les mesures sont effectuées à 25°C sur un rhéomètre AR2000 (TA Instruments) équipé d'un système Peltier et d'une géométrie cône-plan. Les échantillons sont placées à la spatule entre le plateau du rhéomètre et le cône de révolution tronqué de la géométrie. Le cône utilisé est de diamètre 20 mm, présente une troncature de 14 µm et un angle α de 0°30'' (Figure 14).

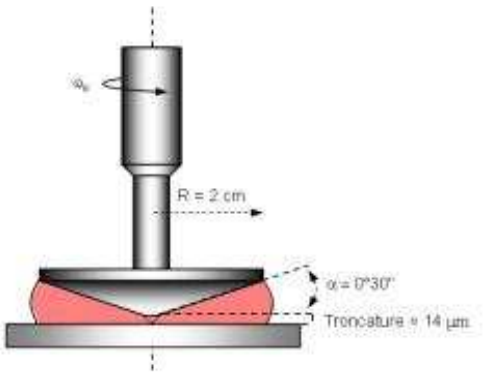


Figure 14 : Schéma de la géométrie cône-plan.

Cette configuration permet d'atteindre des gradients de cisaillements élevés, i.e. 5000 s^{-1}. Le cisaillement est transmis à l'échantillon de façon laminaire, par rotation du cône de vitesse ω_0, le plateau demeurant fixe.

Il a été démontré que pour des angles cônes/plan inférieurs à 5° (ici α = 0°30''), le gradient $\dot{\gamma}$ et la contrainte σ de cisaillement sont constants dans tout l'espace occupé par l'échantillon entre le cône et le plan et s'expriment par les relations suivantes :

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega_0}{\tan\alpha} \text{ et } \sigma = \frac{3M}{2\pi R_3}$$

où M représente la mesure du couple de rotation ($N.m^{-1}$), ω_0, la vitesse angulaire ($rad.s^{-1}$) imposée et *R*, le rayon du cône (m).

Afin de pouvoir comparer les données de viscoélasticité entre elles, il est nécessaire de se placer à fraction volumique constante. C'est pourquoi les suspensions floculées sont récupérées directement après les deux étapes de mélange et centrifugées à la vitesse de 20000 G pendant une durée de 15 minutes. Ce traitement peut, de surcroît, être comparable à celui subi par les boues bactériennes lors de la déshydratation et nous permet donc de nous replacer dans le même contexte. Des mesures de masses sèches ont été effectuées pour chacun des échantillons analysés.

La procédure utilisée comprend trois cycles :

- oscillation de 0.1 à 50 Hz, avec un temps de mise à l'équilibre d'une minute pour chaque mesure,

- écoulement (montée) 0.1 à 5000 s^{-1}, chaque mesure est séparée par un palier de 10 secondes.

Tous les échantillons étudiés ont ainsi subi la même « histoire » et sont donc comparables entre eux.

II.7.2 Cisaillement simple ou écoulement

Cela consiste à transmettre à l'échantillon, par l'intermédiaire de la rotation du cône par rapport au stator (qui reste fixe), un mouvement laminaire de cisaillement. Ce mouvement doit en principe induire une structuration du matériau en couches adjacentes, infiniment minces. Les différentes couches glissent ainsi les unes par rapport aux autres, sans transfert de matière ni variation de volume. Des forces de frottement tangentielles apparaissent à l'interface de ces différentes couches, en réponse au mouvement imposé. Ce mouvement relatif des couches les unes par rapport aux autres permet d'obtenir en tout point de l'échantillon une vitesse de cisaillement et une contrainte de cisaillement. La mesure consiste donc à imposer à l'échantillon une certaine vitesse de cisaillement (dépendant de la vitesse angulaire ω) et à en enregistrer la réponse en terme de résistance à l'écoulement (couple de rotation M).

La vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (shear rate) correspond à la variation de déplacement d'une couche laminaire par rapport à une autre, rapportée au temps de la déformation. Il s'agit une vitesse de déplacement, ou gradient de vitesse, exprimée en s^{-1}. Les mouvements relatifs des couches les unes par rapport aux autres sont alors à l'origine de l'apparition de forces de cisaillement tangentielles liées au frottement entre les couches. Ce sont ces forces, qui, ramenées à l'unité de surface, donnent l'accès à la contrainte de cisaillement σ (shear stress), exprimées en Pa.

L'obtention de ces deux paramètres permet de tracer les courbes (rhéogrammes) de l'évolution de la viscosité dynamique en fonction de la contrainte de cisaillement (pression et température constantes). La viscosité dynamique, ou viscosité apparente η (Pa.s), s'obtient comme le rapport de proportionnalité entre la vitesse $\dot{\gamma}$ et la contrainte de cisaillement :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$$

Il s'agit de l'équation rhéologique d'état du matériau, qui caractérise la relation existant entre les grandeurs dynamiques, responsables du mouvement, et les grandeurs cinématiques, qui le décrivent. Ces paramètres dépendent des propriétés viscoélastiques et de la nature du matériau analysé.

Il existe une contrainte d'écoulement critique notée σ_c, appelée également seuil d'écoulement ou d'élasticité, à partir de laquelle le matériau s'écoule. L'interprétation la plus communément admise revient à supposer que le matériau considéré possède, au repos, une structure tridimensionnelle rigide et que le seuil d'écoulement correspond à la force nécessaire pour vaincre les forces de cohésion et provoquer l'écoulement. Le second paramètre auquel nous prêterons attention est la viscosité à gradient de cisaillement infini, η_∞, correspondant à la viscosité minimale atteinte pour un cisaillement infini (Figure 13).

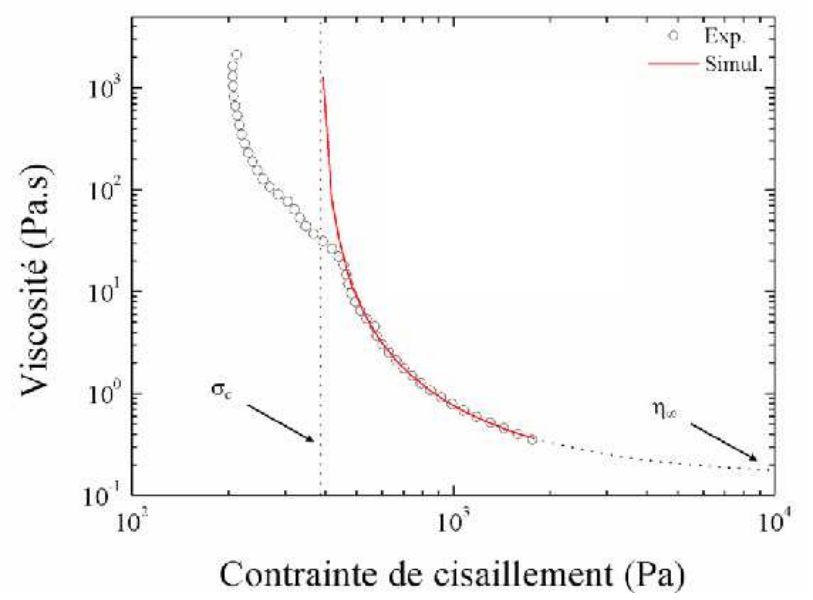


Figure 15 : Rhéogramme présentant la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement.

Afin d'extraire ces paramètres, nous avons modélisé la courbe décrite par les données expérimentales par le modèle de sphères dures [28-29] (courbe rouge, figure 15) que nous allons décrire au chapitre 5.

II.7.3 Cisaillement oscillatoire

Ce type de mesure a pour but de caractériser le comportement viscoélastique du matériau étudié. Pour cela, on le soumet à des déformations sinusoïdales de pulsation ω. Il existe un seuil critique au-delà duquel la déformation de l'échantillon n'est plus linéaire, on parle alors de déformation critique γ_c. Afin de rester dans le régime linéaire de viscoélasticité, les déformations imposées au matériau sont de faible amplitude. La déformation $\gamma(t)$ et la contrainte $\sigma(t)$ obtenues s'expriment de la façon suivante :

$$\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{i(\omega t+\delta)}$$

où γ_0, σ_0 sont les amplitudes maximales de la déformation et de la contrainte, ω correspond à la pulsation (ou fréquence radiale, rad.s^{-1}) et δ représente le déphasage de la contrainte par rapport à la déformation. La pulsation ω est directement reliée à la fréquence ν ($\omega = 2\pi\nu$).

Il existe un coefficient complexe pouvant lier ces deux paramètres, le module de rigidité complexe $G^*(\omega)$ propre à chaque matériau. On peut alors écrire l'équation linéaire de la viscoélasticité :

$$\sigma(t) = G^*(\omega)\gamma(t)$$

En combinant les expressions de la déformation $\gamma(t)$ et la contrainte $\sigma(t)$, on obtient :

$$G^*(\omega) = \frac{\gamma_0 e^{i\sigma}}{\sigma_0} = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

Les propriétés viscoélastiques du matériau sont décrites par G'(ω) et G''(ω), qui sont respectivement ses modules élastique (ou de conservation) et visqueux (ou de dissipation). La comparaison de ces deux termes (réel et imaginaire) permet de caractériser l'état solide ou liquide du matériau.

Références Bibliographiques

[1] Bala Subramanian S.; Yan, S.; Tyagi R.D.; Surampalli, R.Y. Extracellular Polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterisation and performance for sludge settling and dewatering. *Water Res.* **2010**, 44, 2253-2266; DOI 10.1016/j.waters.2009.12.046

[2] Beveridge T.J. ; Davies J.A. Cellular responses of Bacillus subtilis and Escherichia coli to the Gram stain. Journal of Bacteriology [en ligne]. 1983, 156 (2), 846-858.

[3] Nikaido H.; Outermembrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy [en ligne]. 1989, 33 (11), 1831-1836; ISSN 00664804

[4] Cowan S.W. ; Schirmer T. ; Rummel G. ; Steiert M. ; Ghosh R. ; Pauptit R.A. ; Jansonius J.N. ; Rosenbusch J.P. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. Nature [en ligne]. 1992, 358 (6389), 727-733.

[5] Nikaido H. Restoring permeability barrier function of outer membrane. Chemitry and Biology [en ligne]. 2005, 12, 507-514; DOI 10.1016/j.chembiol.2005.05.01

[6] Ruiz N. ; Falcone B. ; Kahne D. ; Silhavy T.J. Chemical conditionality : A genetic strategy to probe organelle assembly. Cell [en ligne]. 2005, 121 (2), 307-317.

[7] Wu T. ; Malinverni J. ; Ruiz N. ; Kim S. ; Silhavy T.J. ; Kahne D. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in Escherichia coli. Cell [en ligne]. 2005, 121 (2), 235-245.

[8] Myers C.R.; Nealson K.H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science [en ligne]. 1988, 240, 1319–1321; ISSN 00368075

[9] Venkateswaran K. ; Moser D.P. ; Dollhopf M.E. ; Lies D.P. ; Saffarini D.A. ; Mac Gregor B.J. ; Ringelberg D.B. ; White D.C. ; Nishijima M. ; Sano H. ; Burghardt J. ; Stackebrandt E. ; Nealson K. H. Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensis sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology [en ligne]. 1999, 49, 705-724.

[10] Pagniez H. ; Berche P. Opportunistic infections caused by Shewanella, new emergent bacteria | Les infections à Shewanella, un pathogène opportuniste émergent. Medecine et Maladies Infectieuses [en ligne]. 2005, 35 (4), 186-191.

[11] Pitts K.E. ; Dobbin P.S. ; Reyes-Ramirez F. ; Thomson A.J. ; Richardson D.J. Characterization of the Shewanella oneidensis MR-1 decaheme cytochrome MtrA: Expression in Escherichia coli confers the ability to reduce soluble FE(III) chelates. Journal of Biological Chemistry [en ligne]. 2003, 278 (30), 27758-27765.

[12] Liu Y. ; Gao W. ; Wang Y. ; Wu L. ; Liu X. ; Yan T. ; Alm E. ; Arkin A. ; Thompson D.K. ; Fields M.W. ; Zhou J. Transcriptome analysis of Shewanella oneidensis MR-1 in response to elevated salt conditions. Journal of Bacteriology [en ligne]. 2005, 187 (7), 2501-2507.

[13] Gao H. ; Yang Z.K. ; Liu X. ; Thompson D.K. ; Zhou J. Global transcriptome analysis of the heat shock response of Shewanella oneidensis. Journal of Bacteriology [en ligne]. 2004, 186 (22), 7796-7803.

[14] Vinogradov E. ; Korenevsky A. ; Beveridge T.J. The structure of the rough-type lipopolysaccharide from Shewanella oneidensis MR-1, containing 8-amino-8-deoxy-Kdo and an open-chain form of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose. Carbohydrate Research [en ligne]. 2003, 338 (19), 1991-1997.

[15] Korenevski A.A. ; Vinogradov E. ; Gorbi Y. ; Beveridge T.J. Characterisation of the lipopolysaccharides and capsules of Shewanella spp. Applied Environmental Microbiology [en ligne]. 2002, 68 (9), 4653-4657; DOI 10.1128/AEM.68.9.4653-4657.2002

[16] Dixon J.K.; Zielyk M.W. Control of the bacterial content of water with synthetic polymeric flocculants. *Environ. Sci. Technol.* **1969**, 3 (6), 551-558 ; DOI 10.1021/es60029a004

[17] Treweek G.P.; Morgan J.J. Polymer flocculation of bacteria, the mechanism of E. Coli aggregation by polyethyleneimine. *J. Colloids Interface Sci*. **1976**, 60 (2), 258-273; ISSN 00219797

[18] Siéliéchi J.M.; Lartiges B.S.; Kayem G.J.; Hupont S.; Frochot C.; Thieme J.; Ghanbaja J.; d'Espinose de la Caillerie J.B.; Barrès O.; Kamga R.; Levitz P.; Michot L.J. Changes in humic acid conformation during coagulation with ferric chloride: Implications for drinking water treatment. Water Res. 2008, 42 (8-9), 2111-2123; DOI 10.1016/j.watres.2007.11.017

[19] Chaignon V.; Lartiges B.S.; El Samrani A.; Mustin C. Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Res.* **2002**, 36, 676-684; DOI 10.1016/S0043-1354(01)00266-4

[20] Lartiges B.S.; Deneux-Mustin S.; Villemin G.; Mustin C.; Barrès O.; Chamerois M.; Gerard B.; Babut M. Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine River. *Water Res.* **2001**, 35 (3), 808-816; DOI 10.1016/S0043-1354(01)00003-3

[21] Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **1963**, 17, 208-211; ISSN: 00219525

[22] Dufrêne Y. F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol*. **2002,** 184**,** 5205-5213

[23] Dufrêne, Y. F. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature Reviews*, **2004,** 2, 451-460

[24] Vadillo-Rodrigues V.; Busscher H. J.; Norde W.; De Vries J.; Dijkstra R. J. B.; Stokroos I.; van der Mei H. C. Comparision of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70 (9), 5441-5446; DOI: 10.1128/AEM.70.9.5441-5446.2004

[25] Gaboriaud F.; Dague E.; Bailet S.; Jorand F.. Duval J.F.L.; Thomas F. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. *Colloids and Surfaces B : Biointerface*, **2006**, 52, 108-116

[26] Yao X.; Walter J.; Burke S.; Stewart S.; Jericho M. H.; Pink D.; Hunter R.;
Beveridge T. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **2002,** 23**,** 213-230

[27] Amoldi M.; Bâuerlein E.; Radmacher M.; Sackmann E.; Boulbitch A. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys. Rev. E.*, **2000,** 62, 1034-1044

[28] Berli C.L.A.; D. Quemada Rheological modeling of microgel suspensions involving solid-liquid transition. *Langmuir*, **2000**, 16, 7968-7974.

[29] Baravian C.; Vantelon D.; Thomas F. Rheological determination of interaction potential energy for aqueous clay suspensions. *Langmuir*, **2003**, 19, 8109-8114.

Chapitre 3

Floculation de Shewanella Oneidensis MR-1 par des polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol : Impact de la presence de surstructure et de la concentration en polymère

Chapitre 3 : Flocultation de Shewanella Oneidensis MR-1 par des polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol : Impact de la presence de surstructure et de la concentration en polymère

L'objectif de ce chapitre est de déterminer l'impact de la concentration en polyéthylèneimine sur la structure des agrégats bactériens. Comme nous venons de le voir dans la littérature, le polyéthylèneimine est une molécule hautement toxique pour les cellules bactériennes [1-3] et peut aller jusqu'à induire une lyse pour les concentrations les plus élevées [4-7]. Aussi, même si ce paramètre n'est pas pris en compte lors des études physico-chimiques de déstabilisation de suspensions bactériennes [8-12], il est très probable que cet effet lytique joue un rôle important sur l'état des bactéries agrégées (intègres ou lysées). Or, il a été démontré que la concentration en polymère, conditionnant la résistance aux contraintes des agrégats bactériens [13-20], est un facteur essentiel durant le processus de déshydratation des boues de station d'épuration. On peut alors proposer l'hypothèse que cette propriété trouve son origine dans l'état de structuration des agrégats. Un second facteur influe sur la déshydratation des boues, il s'agit des surstructures exopolymériques [21-26]. En effet, il a été prouvé que, par leur présence, ces surstructures participent à maintenir les flocs bactériens cohérents car elles sont à l'origine de la présence de cations compensateurs de charges au sein des agrégats [27-31]. Ces cations ont pour effet d'augmenter la pression osmotique intra-agrégats, ce qui provoque la rétention de molécules d'eau [26, 32], altérant vraisemblablement l'efficacité du processus de déshydratation des boues d'épuration. Etant donnée la diversité [33-35] des structures exoppolymériques, nous avons choisi de nous limiter à l'étude des lipopolysaccharides. Ainsi, la souche bactérienne que nous avons choisie nous a permis de travailler en présence et absence de surtructures polysaccharidiques [36].

Cette étude a été réalisée avec un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol, utilisé pour le traitement des boues bactériennes dans certaines stations d'épuration. Différentes techniques d'analyse ont été mises en œuvre pour caractériser l'état des flocs bactériens obtenus. Comme nous l'avons décrit au chapitre 2, les suspensions bactériennes de concentrations contrôlées ont été mises en contact avec des concentrations variables de polyéthylèneimine (de 0 à 100 mg/L). Cela nous a permis de déterminer la concentration optimale de floculation (concentration en polyéthylèneimine la plus faible possible permettant d'obtenir l'élimination la plus complète des bactéries) et la concentration de

« restabilisation », si celle-ci se produit. Nous avons effectué des mesures de mobilité électrophorétique et de granulométrie afin d'estimer, respectivement, la charge de surface et la taille des agrégats. Ces données ont été corrélées aux mesures de conductivité et de pH effectuées lors des jar-tests, dans le but d'affiner notre compréhension de l'influence du polymère sur l'agrégation des cellules et la lyse bactérienne. Enfin, des observations en microscopie électronique en transmission et en microscopie à force atomique ont été réalisées afin de confirmer les hypothèses formulées à partir des analyses physico-chimiques. Soulignons enfin que les observations en microscopie à force atomique ont été effectuées à l'air, sans traitement préalable des lames au polyéthylèneimine utilisé habituellement pour améliorer la fixation des particules. Cela aurait été à même de modifier l'état des agrégats bactériens et aurait pu altérer notre compréhension du système observé. Enfin, la présence des altérations observées en microscopie à force atomique implique qu'elles ne sont pas liées au traitement d'inclusion en résine nécessaire pour les observations en microscopie électronique en transmission.

Le principal résultat de ce chapitre est de montrer qu'il existe deux types d'agrégation dépendant la concentration en polyéthylèneimine. Pour de faibles concentration (<20 mg/L), il y a agrégation de cellules bactériennes intègres. Lorsque la concentration en polymère augmente fortement, on observe ce que nous avons défini comme étant une agrégation secondaire, intervenant postérieurement à la lyse bactérienne. Les agrégats sont alors constitués de résidus colloïdaux membranaires et intracellulaires. Il apparaît donc clairement que les agrégats formés sont de natures différentes suivant la concentration en polyéthylèneimine. Conjointement, cette étude a permis de montrer que les surstructures membranaires permettent de retarder l'action directe du polymère sur les membranes bactériennes en agissant comme une barrière protectrice. Cela permet aux bactéries portant des surstructures membranaires de résister à des concentrations en polyéthylèneimine plus importantes.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous forme d'article accepté par Water Research (Elsevier) : **Polyethyleneimine-Mediated Flocculation of *Shewanella oneidensis* MR-1: Impacts of Cell Surface Appendage and Polymer Concentration, Krapf *et al*., 2012**, 46, 1838-1846.

Polyethyleneimine-Mediated Flocculation of *Shewanella oneidensis* MR-1: Impacts of Cell Surface Appendage and Polymer Concentration

Marie-Eve M. Krapf, [*1, a] Bruno S. Lartiges,[1,2,b] Christophe Merlin,[3, c] Grégory Francius,[3, d]

Jaafar Ghanbaja,[4, e] Jérôme F.L. Duval[1, f]

[1] Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy Université, CNRS UMR7569, B.P. 40, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[2] University of Toulouse (Paul Sabatier), Geosciences Environment Toulouse, UMR CNRS/UPS/IRD 5563, 14 Av E. Belin, 31400 Toulouse, France (Present address)

[3] Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy Université, CNRS UMR7564, 405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France.

[4] Laboratoire de Microscopie Electronique, Université Henri-Poincaré (Nancy I), BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex France.

[a] marie-eve.krapf@ensg.inpl-nancy.fr

[b] bruno.lartiges@lmtg.obs-mip.fr

[c] christophe.merlin@pharma.uhp-nancy.fr

[d] gregory.francius@lcpme.cnrs-nancy.fr

[e] jaafar.ghanbaja@scmem.uhp-nancy.fr

[f] jerome.duval@ensg.inpl-nancy.fr

[*] Corresponding author

phone : +33 3 83 59 62 64; fax : +33 3 83 59 62 55

ABSTRACT

In wastewater treatment plants, optimizing bacterial flocculation and bacterial sludge dewatering requires a detailed understanding of the concommitant biological and physico-chemical processes governing the action of flocculating agent on living cells. Here we investigate the interactions between polyethyleneimine (PEI, 60000 g/mol) and *Shewanella oneidensis* MR-1 lacking or not the lipopolysaccharide (LPS) O-antigen surface structure. Flocculation tests were performed on bacteria with/without LPS O-antigen after being exposed to 0-100 mg/L PEI concentrations. Measurements of electrophoretic mobility and bacterial aggregates size were complemented by transmission electron micrographs and atomic force microscopy images. While low PEI concentrations (< 20 mg/L) lead to flocculation of both bare and LPS O-antigen-decorated bacterial strains, the lysis of bacterial membranes occurred at larger polymer concentrations for the latter, which highlights the protective role of LPS O-antigen against harmful PEI-mediated membrane alterations. Depending on polymer concentration, two types of bacterial aggregates are identified: one that solely integrates bacterial cells, and another that includes both cells and cell residues resulting from lysis (membrane and/or LPS fragments, and inner cell content materials). The latter is expected to significantly contribute to water entrapping in sludge and thus lower dewatering process efficiency.

Keywords: Flocculation - Polyethyleneimine - Bacteria - *Shewanella oneidensis* MR-1 - Lysis - Permeabilization

I. Introduction

The polyethyleneimine (PEI) macromolecule is used in numerous applications, ranging from coagulation/flocculation of bacterial wastewater sludge (Legrand et al., 1998) to permeabilization of gram-negative bacteria membranes (Alakomi et al., 2006) leading to bacterial lysis (Beyth et al., 2008). In municipal wastewater treatment plants, the activated sludge process consists in the use of bacterial flocs for digesting the wastewater organic matter. After the settling of those aggregates to yield the clarified water, most of the bacterial sludge is recycled to biological treatment processes, while the remaining sludge is conditioned with the addition of high molecular weight polymers such as PEI, and/or ferric chloride and lime (Deneux-Mustin et al., 2001). The procedure, that is followed by a mechanical dewatering step, results in the final collection of a bacterial cake containing at best about 70% water. Such a high water content leads to severe difficulties in terms of storage, and sludge biological post-treatment (incineration). In order to optimize the efficiency of dewatering procedure and reduce water content in bacterial sludge, detailed knowledge on the necessarily coupled biological and physico-chemical action modes of PEI on living bacterial cells is critically needed.

Bacterial communities in sludge wastewater are highly diversified and stucturally organized in aggregates (Bourrain et al., 1999; Martins et al., 2004; Chaignon et al., 2002). Several studies pointed out that extracellular polymeric substances (EPS) produced by bacteria act as ligands between cells, which maintains a mechanical cohesion of the bacterial consortium (Jorand et al., 1995; Keiding and Nielsen, 1996). The presence of negative charges carried by the EPS (*i.e.* extra-cellular polysaccharides including lipopolysaccharide (LPS)) favors the binding of multivalent counter-ions that, in turn, bridge EPS chains belonging to adjacent cells, thus ensuring a given stability and strength of the formed flocs. These ions may further lead to an increase of the overall osmotic pressure of the system and thus to the trapping of

interstitial water, which lowers dewatering treatment efficiency (Mikkelsen and Keiding, 1998; Curvers et al., 2009). In addition, the presence of extracellular polymeric substances seems to significantly impact sludge dewatering because EPS play a key role in controlling the erosion of bacterial flocs under shear flow conditions (Mikkelsen and Keiding, 1998). The amount of added flocculent is another important factor which impacts wastewater sludge dewatering. With increasing flocculent concentration, dewatering process is first improved before reaching a maximal efficiency (Marinetti et al., 2010). Waite suggested that increasing the concentration of high molecular weight cationic polymer in bacterial suspensions, results in an increase of floc size and an enhancement of dewatering efficiency (Waite, 2006). He further underlined that for some critical state of floc compactness, water cannot flow through pores of flocs anymore, but instead has to bypass the floc structure. Depending on the size of the bacterial aggregates, this can significantly lower the efficiency of dewatering process.

Although the types of associations between the flocculent and the sludge remain unclear, the aforementioned study suggests that there is some optimal floc size, reached for an optimal dose of polymeric flocculating agent, that leads to the best dewatering yield. Such dose, corresponding to an ‘ideal coagulation state’ in terms of dewatering, is not well-defined. The major reason for this is the critical lack of knowledge on the nature of / coupling between the bio-physico-chemical processes that determine the destabilization mechanisms of bacterial suspensions and the aggregates state after exposure to cationic polymers such as PEI. Many studies attempted to characterize flocs with the help of structure modelling and concept of fractal dimension (Martin et al., 2004; Chaignon et al., 2002; Guan et al., 1998) but few focus on the very action of polymeric flocculating agent on bacterial sludge. In addition, the alterations of bacterial membranes after contact with PEI and the corresponding impact on flocculation processes are hardly considered (Vaara, 1992; Nian et al., 2008). Nikaido (1989) showed that the LPS structure at the periphery of bacterial membranes exhibits a low

permeability, thus acting as a protective barrier against potentially harmful (macro)molecules. Any disturbance in LPS organization was further shown to affect the overall bacterial permeability (Nikaido, 2005). The binding of PEI to LPS leads to a release of stabilizing counter-ions (Vaara, 1992; Nian et al., 2008), which, in turn, results in a disorganization and possible removal of LPS fragments. This is accompanied by a reordering of phospholipids that come in replacement of removed LPS (Mikkelsen and Keiding, 2002), which explains how PEI causes membrane permeabilization, and possible cellular material release (Arrington et al., 2008). All these elements unambiguously question the validity of studies where bacteria are viewed as hard (impermeable), stable inert particles when in contact to PEI. In that respect, interpretations of electrokinetic data on bacterial cells according to hard sphere models are necessarily approximate (Duval ans Gaboriaud, 2010) and so are interpretations of PEI-cell electrostatic interactions according to standard DLVO theory (Duval et al., 2011). After PEI conditioning, the bacterial membranes may not remain intact, some inner bacterial materials may be released to the outer solution, thus resulting in major deviations from oversimplified theoretical DLVO predictions (Mikkelsen and Keiding, 2002). Finally, the effects of EPS on the flocculation of LPS-coated gram negative bacteria remain poorly known.

In this study, we investigate the mechanisms governing the destabilization of bacterial suspensions after addition of PEI (molecular weight 60000 g/mol). The analysis is carried out for *Shewanella oneidensis* MR-1 (Myers and Nealson, 1988), that have the particularity to produce various lengths of LPS O-antigen depending on its temperature of growth (Korenevski et al., 2002. We have chosen two growth temperatures, resulting in the maximal (20°C) and minimal (30°C) length of produced LPS. This strategy allows us to work with cells of identical genotype but different phenotypes in terms of surface structure. The work aims at elucidating the effects of PEI on bacterial membrane, subsequent bacterial

flocculation, and structure of formed flocs for strains exhibiting or lacking the LPS O-antigen surface structure. The analysis is based on systematic measurements of electrophoretic mobility and size of PEI-bacterial aggregates over a large range of PEI concentrations, and it is complemented by TEM and AFM images of flocs.

II. Materials and methods

II.1 Bacterial culture and cell conditionning

Shewanella oneidensis MR-1 (Myers and Nealson, 1988) was cultured at 20°C or 30°C for 14 to 16 hours in Lysogenic-Broth (LB Broth, Miller, Difco™), under agitation (160 rpm), in Erlenmeyer flasks with a volume filling ratio of 1 to 5 so as to maintain identical oxygenation conditions. Bacterial cells were harvested in stationary phase and washed twice in 10^{-3} mol/L KNO_3 solution (prepared in deionised water, Millipore-MilliQ, 18.5 MΩ/cm) by centrifugation (15 min, 5000 G). At each stage of the preparation, the bacteria suspensions were kept at their corresponding growth temperature (i.e. 20°C and 30°C respectively). Finally, samples were resuspended in 10^{-3} mol/L KNO_3 solution, and the optical density at 600 nm was adjusted to 1 (ca. 10^9 cells/mL).

Shewanella oneidensis MR-1 was selected because it produces varying length of LPS O-antigen depending on growth temperature (Korenevski et al., 2002). At 30°C, the produced LPS chains do not include the O-antigen part whereas at 20°C, the length of O-antigen is maximal (between 30 nm and 50 nm) (Supplementary data, Figures A-B). It is recalled that LPS consists of 3 distinct parts: lipide A, core and O-antigen that decorates the membrane.

II.2 Preparation of flocculated suspensions

Flocculation tests were carried out at room temperature, in 100 mL polymethylmethacrylate (PMMA) reactors (5 cm diameter) fitted with 4 PMMA baffles (0.5 x 6 cm).

Polyethyleneimine (PEI) (60000 g/mol, purchased from Polyscience Europe GmbH) was used as a flocculating agent. Various PEI concentrations (0-100 mg/L) were tested (batch experiments). The suspensions were then mixed using a rectangular blade located at one-third of the reactor height from the bottom. The mixing procedure consisted of two steps: a fast stirring stage, 250 rpm for 3 minutes, followed by a slow stirring stage, 60 rpm for 46 minutes. Conductivity and pH measurements were monitored during mixing and AFM observations were made straightaway after this mixing step. Finally, suspensions were settled in graduated Imhoff cones for 1 hour. The residual turbidity (or optical density) of the supernatant was measured spectrometrically at 600 nm on tenfold diluted samples in 10^{-3} mol/L KNO_3. Sedimented materials were collected after the settling of the suspensions and were then analysed by TEM. The integrity of cell membranes after exposure to PEI was evaluated from crystal violet adsorption/release experiments, as detailed in Supplementary data.

II.3 Electrophoretic mobility

Electrophoretic mobility measurements were performed for the supernatants containing unsettled bacterial flocs using a Zetaphoremeter IV (CAD Instrumentations, France). The cells in the supernatant were first diluted in 10^{-3} mol/L KNO_3 solution in order to carry out electrokinetic measurements at fixed ionic strength over the whole range of PEI concentrations. Electrophoretic mobilities of bacterial aggregates were determined from the reflection of a laser beam and particle trajectories tracked with a charge-coupled device camera. Recorded images were then processed (Zetaphorometer 4.30, CAD Instrumentation) to calculate mobility from the displacement of particles subjected to a constant direct-current electric field (800 V/m). Three cycles were recorded to carry out at least 100 measurements of

aggregate mobility for each PEI concentration investigated. Three independent assays were performed according to the aforementioned procedure.

II.4 Size measurements

The fact that size of bacterial aggregates was measured before the settling avoided artifacts due to possible change in aggregate structure. The measurements were performed with a Sympatec Helos particle size analyser using the Fraunhoffer approximation. Suspensions were diluted in 10^{-3} mol/L KNO_3 solution and gentle stirring allowed an homogenisation of suspensions before they were brought to the analysis cell through a peristaltic pump. For each experiment, duplicate measurements were performed. The reported sizes refer to the diameter of hard spheres equivalent to those of the targeted aggregates in terms of diffracted light intensity (Chaigon et al., 2002).

II.5 Transmission electron microscopy

The settled aggregates were embedded in an epoxy resin for observation using a Philips CM20 transmission electron microscope operating at 80kV acceleration voltage. To that end, a classical inclusion procedure was adopted (Lartiges et al., 2001). The cohesion of bacterial aggregates was ensured by the addition of 2% glutaraldehyde for 4 hours. Aggregates were then contrasted in 2% osmium tetroxyde solution for 1 hour. Between each step of preparation, the excess of reactive was removed by washing. Then, samples were dehydrated upon successive additions of acetone at final concentrations of 10, 20, 40and 60% (v/v), with 5 min delay between each step, and then at concentrations 80% (15 min), 90% (2x20 min) and finally 100% (v/v) (3x20 min). Subsequently, the acetone was gradually exchanged with epoxy resin monomers (Kit Embed 812, Euromedex). Finally, the samples were placed in molds, and resin monomers were polymerized at 60°C for 12 hours. The resin-embedded

samples were cut in ultrathin sections (1 µm) using an ultramicrotome (ultra-cut E, Reichert-Jung). These sections were then stained with uranyl acetate and lead citrate to enhance resolution of organic matter (Reynolds, 1963) before positioning on copper grids. To properly address the damages of bacterial membranes caused by PEI, analysis was performed on at least 100 bacteria.

II.6 Atomic force microscopy

Before the sedimentation step, the bacterial aggregates were deposited onto glass slides. After 20 minutes, the surface coated with aggregates was washed with Milli-Q water. The samples were then immediately transferred into the AFM cell and AFM images were recorded in air atmosphere using an MFP3D-BIO instrument operating in contact mode (Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany). Silicon nitride cantilevers of conical shape (MLCT-AUNM, Veeco Instruments SAS, Dourdan, France) were used, and their spring constants, denoted as *k*, were determined following thermal calibration method (Vadillo-Rodrigues et al., 2004), providing *k* values of ~10.4 ± 1.7 pN nm^{-1}. Prior to any experiment, the geometry of the AFM tip was systematically controlled using a commercial grid for 3-D visualization (TGT1, NT-MTD Compagny, Moscow, Russia) and curvature of the tip in its extremity was found to lie in the range ~20 to 50 nm.

III. Results

III.1 PEI-mediated flocculation of bacteria devoid of LPS O-antigen surface structure

For PEI concentration ranging from 0 to 17.5 mg/L (regime A1, Figure 1A), optical density of the supernatant decreases from 1.2 to 0.2, and particle size increases up to ~25-30 µm. These trends typically reflect a PEI-mediated aggregation of the bacteria considered in this section. When increasing PEI concentration from 17.5 mg/L to 40 mg/L (regime A2, Figure

1A), optical density rises up to 1.1, a value comparable to that measured before addition of PEI, and aggregates size clearly decreases down to 15 µm. Finally (regime A3, Figure 1A), for PEI concentrations above 40 mg/L, optical density drops to ~0.2 whereas the size of aggregates increases again to *circa* 30 µm, which highlights a second aggregation stage.

The electrokinetic measurements performed on bacteria devoid of LPS O-antigen are reported in Figure 1B as a function of PEI concentration. Similarly to Figure 1A, the three regimes A1-A2-A3 can be clearly distinguished. Indeed, electrophoretic mobility remains roughly constant in regime A1 (~ - 0.6 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}) and then decreases (in magnitude) to ~ 0 at the onset of regime A2. This is explained by a gradual neutralization of negative charges carried by bacterial particles (isolated cells and/or aggregates) following adsorption of PEI (cationic polymer). For further increase of PEI concentration (regime A2 to regime A3), the mobility increases in magnitude to finally reach a constant value of ~ - 0.4 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1} in regime A3. This suggests the presence of negatively charged bacteria and/or bacterial aggregates in the medium at this high PEI concentration. Measurements of the suspension pH and conductivity (Figure 1C) as a function of PEI concentration provide qualitative information on the permeabilization state and integrity of bacterial membranes. In details, pH continuously increases for polymer concentration corresponding to regime A1 and A2. Comparison with pH data obtained in the absence of bacteria (Supplementary data, Figure C) demonstrates that pH is solely determined by PEI when added in concentrations larger than 40 mg/L. For lower polymer content in solution, PEI is adsorbed onto the bacterial membranes and bacterial residues, thereby leading to a lower pH as compared to that for situation where bacteria are absent. Quantitative inspection of conductivity data measured as a function of PEI concentration in the presence and absence of bacteria (Figure 1C and Supplementary data, Figure D, respectively) further suggests that interactions between PEI and bacteria/bacterial aggregates result in the release of ions and/or charge carriers (*e.g.* cell residues) possibly

originating from deterioration of cell membranes. This result, that is supported by AFM and TEM images discussed below, is confirmed by crystal violet absorbance/release tests. A three-fold increase of crystal violet amount in the supernatant within the regime A2 of polymer concentration (Supplementary data, Figure E), pictures a significant permeabilization of bacterial membranes.

Figure 2 shows typical images obtained by TEM (panels A1.a, A2.a, A3a) and AFM (panels A1.b, A2.b, A3.b) for bacterial aggregates formed after exposure of bacteria to PEI in regimes A1, A2 and A3. For PEI concentrations corresponding to regime A1 (≤ 17.5 mg/L), both AFM and TEM (panels A1.a,b) suggest that bacterial cells are organized in aggregates where the membrane structure of constituting bacteria do not appear significantly damaged. Nevertheless, protruding spherical vesicules of about 200 nm in diameter may be clearly identified on the outer bacterial membranes (see red squares indicated in Figures 2A1.a and 2A1.b). The fact that those vesicules are visible in both AFM and TEM images attest that they are not the result of resin-embedding artifacts. Detailed observations reveal that ~30% of the bacteria within the aggregates exhibit such vesicules at their outer periphery. Upon a further increase in PEI concentration (regime A2, Figures 2A2.a and 2A2.b), bacteria remain organized in aggregates form, the aspect of which considerably differs from that in regime A1: aggregates are more compact and the identification of individual bacteria within a given aggregate becomes difficult. Severe damages of the bacterial membranes now confer the aggregates a puffy appearance. TEM micrographs point out the presence of spherically wrapped cell envelope residues (50 to 100 nm in diameter) located at the outermost regime of the bacterial aggregates (see red squares in Figure 2A2.a). 75% of the aggregated cells show this type of membrane damage. Finally, for sufficiently high PEI concentrations (> 40 mg/L, regime A3), it becomes impossible to distinguish individual cells within a given aggregate (Figure 2A3.b). Aggregates now appear much more inflated than in regime A2 and numerous

cell material residues may be observed (Figure 2A3.b). In addition, long filamenteous structures, possibly associated with fragments of released cytoplasm (see Figure 2A3.a), are identified and suggest that the bacterial lysis is now complete.

III.2 PEI-mediated flocculation of bacteria with LPS O-antigen decorated membrane

The dependence of optical density, size, electrophoretic mobility, pH and conductivity on PEI concentration are depicted in Figure 3 for suspensions of bacteria that exhibit LPS O-antigen surface appendage. This figure constitutes the pendant of Figure 1 discussed in the previous section for bacteria devoid of LPS-O antigen surface structure. Three regimes of PEI concentration that correspond to peculiar evolutions (discussed below) of the aforementioned parameters with increasing PEI concentration can be distinguished B1 (≤ 20 mg/L), B2 (20 mg/L < PEI concentration ≤ 60 mg/L) and B3 (PEI concentration ≥ 60 mg/L), respectively.

B1 represents the regime where bacterial aggregation takes place, as judged from the decrease of the optical density from 1.1 to 0.2 and the increase of aggregate size up to ~80 µm for PEI concentration ~20 mg/L (Figure 3A). Upon further increase in PEI concentration (regime B2), the optical density remains approximately constant (around 0.2) before slightly increasing to 0.4 at 60 mg/L PEI concentration. Aggregate size (Figure 3A) abruptly drops to ~40 µm for a ~20 mg/L PEI concentration and does not significantly vary with further increase in PEI content within regime B2. Finally, for PEI concentrations higher than 60 mg/L (regime B3), the optical density is constant and sharply drops to a 0.2 value at the highest PEI concentration investigated. Moreover, the size of aggregates decreases to about 25 µm. Regarding electrokinetics (Figure 3B), the electrophoretic mobility dramatically increases (in magnitude) from ~ - 0.5 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1} to - 2 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1} for an increase in PEI concentration from 0 to 20 mg/L (regime B1). This indicates that the bacterial aggregates carry an apparent volume charge density that becomes increasingly negative upon the addition

of cationic PEI up to a concentration of 20 mg/L. Above a PEI concentration of 20 mg/L, the aggregate mobility dramatically decreases in magnitude (regime B2) and even changes sign at 60 mg/L before stabilizing around zero for PEI concentration in the 60-80 mg/L range. This suggests neutralization of negatively charged groups located within/at the surface of bacterial aggregates following PEI adsorption.

Membrane permeability experiments (Supplementary data, Figure E) measured by the release of intracellular crystal violet in the supernatant of bacterial suspensions slightly increases from 5 to 10 % within the regime B1 of PEI concentration, and further increases up to ~16% for PEI content ~30 mg/L. The absorbance then levels off or even slightly decreases with further increase of PEI concentration. The release of crystal violet for PEI concentration in the range 0-30 mg/L, reflects a significant permeabilization of the cell membranes. This permeabilisation goes in pair with the release of ions and/or charged cell residues that contribute to an increase in conductivity (Figure 3C), which is further supported by conductivity measurements carried out in the absence of bacteria (Supplementary data, Figure D). Finally, similarly to the situation for O-antigen-free bacteria, the adsorption of PEI onto outer bacterial membrane and/or LPS-O antigen appendage results to a lower pH (Supplementary data, Figure C) as compared to that of solutions where bacteria are absent. For excess of PEI, suspensions with or without bacteria have similar pH values.

Figure 4 presents typical TEM and AFM observations of PEI-mediated aggregates of bacteria exhibiting (before introduction of PEI) LPS-O antigen surface structure in regimes B1 (panels B1a,b), B2 (panels B3a,b) and B3 (panels B3a,b). In agreement with the results discussed above (Figure 3A), Figures 4B1.a and 4B1.b underline the presence of bacterial aggregates for PEI concentrations lower than 20 mg/L (regime B1). Closer examination of TEM micrographs reveals that about 75% of bacteria exhibit superficial damages that take the form of protruding membrane residues (red squares in Figure 4B1.a). One may further note

the presence of spherical outgrowths (~200 nm in diameter, Figure 4B1.b) at the surface of bacterial aggregates. Some of these residues may be clearly identified at the glass surface that supports the aggregates. With increasing PEI concentration to 60 mg/L (regime B2), TEM and AFM observations (Figures 4B2.a and 4B2.b, respectively) still display bacterial aggregates but the damages of cell membranes are now amplified (see red squares in panels 4B2.a,b), both in number and in severity. About 50 to 70% of the bacterial cells now present at their outer periphery a dramatic loss of membrane integrity visible as spherical nodules leading to membrane breaking. For PEI concentrations above 60 mg/L (regime B3), the aspect of bacterial aggregates is significantly different as compared to that at lower PEI concentrations. Indeed, the previously mentioned spherical outgrowths at the cell membrane have evolved to large asperities (see red square in Figure 4B3.a), and for some of the bacteria, an entire loss of the cytoplasmic content is recognizable as a rough thin film on the AFM glass slide (see red square in panel 4B3.b), that likely consists of released cell materials. The analysis of TEM micrographs indicates that more than 60% of the bacteria exhibit membrane breakup/perforation events and release of their inner cytoplasmic content.

IV. Discussion

IV.1 PEI-mediated flocculation of bacteria devoid of LPS O-antigen surface structure

The dependence of optical density, aggregate size, electrophoretic mobility, pH and conductivity on PEI concentration (Figure 1) clearly demonstrates the succession of three distinct regimes for the formation of bacterial aggregates upon gradual addition of PEI. For PEI concentrations lower than 17.5 mg/L, bacterial cells are present in the form of aggregates and cell membranes do not display severe damages. The occurrence of bacterial aggregation at such PEI concentrations is fully consistent with the corresponding dramatic decrease (in magnitude) of the electrophoretic mobility measured for the aggregates. Indeed, this decrease

indicates that the negative bacterial charges are gradually neutralized by adsorbed (and positively charged) PEI chains at the bacterial surfaces, thus leading to a decrease of the interparticular repulsive interactions that favor aggregation *via e.g.* the formation of PEI bridges. For larger PEI concentrations (17.5-40 mg/L), the electrophoretic mobility remains, at first, close to a zero value and then increases in magnitude for PEI concentration in the 30-40 mg/L range (regime A2, Figure 1B). A zero electrophoretic mobility indicates that the neutralization of bacterial charges is complete. The important coverage of bacterial surfaces by PEI chains likely leads to (i) increased repulsive interactions between bacterial aggregates, and (ii) a decrease in probability for a free PEI chain to bind PEI-uncoated bacterial membranes. In turn, these processes are sufficient to prevent further growth and sedimentation of aggregrates, in line with data of Figures 1A and 1B. The increase in aggregate mobility (in magnitude) for PEI concentrations around 30-40 mg/L necessarily implies the beginning of a bacterial lysis *via* the deterioration of the membranes after interaction with PEI. In turn, the overall electroneutrality of bacterial flocs surface is no longer achieved and the mobility of these flocs and that of released cell residues become negative. In line with this erosion, the liberation of inner cell residues concurs with the observed increase in conductivity and solution pH. In the third and last regime of PEI concentrations (>40 mg/L), a second aggregation step occurs, as indicated by a decrease in optical density and increase in aggregate size (Figure 1C). For such PEI concentrations, bacterial lysis is significant, leading to a drastic disruption of bacterial membrane, thus inducing the release of a substantial amount of inner cell material, as supported by TEM and AFM imaging (Figures 2A3.a,b). A increase in pH (in the absence of PEI) would not lead to cell lysis or permeation but, instead, would induce a change in the state of the polymer fringe (Gaboriaud et al., 2008). Indeed, due to a modification of the charge carried by the peripheral structure of the cell, polymer swelling would take place. As shown by Dague et al. (2006) for

bacteria of similar type than the ones used in our study, an increase in pH leads to an increase of the magnitude of cell electrophoretic mobility. For basic pH (values between 8 and 11), electrophoretic mobility reaches approximately – 2.8 10^{-8} and – 3.8 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}, respectively for bacteria covered by polymeric shell and devoid of polymer surface appendage. Comparatively, at similar pH values, we obtained electrophoretic mobility values close to zero, meaning that the very effect of PEI on bacterial membrane is observed. In agreement with previous literature (Salt et al., 1995; Cordes et al., 1990) that evidences the possible aggregation of RNA, DNA or organits *via* binding with PEI, the second aggregation of interest here is probably that of released bacterial cell materials and wrapped membranes (clearly observable in Figures 2A3.a,b). Those newly formed aggregates probably adsorb onto surfaces of already present bacterial aggregates, *via* PEI-mediated bridges, leading to an increase of size, to a decrease in optical density or, equivalently, to sedimentation.

IV.2 PEI-mediated flocculation of bacteria with LPS O-antigen decorated membrane

Similarly to the case of bacteria devoid of LPS O-Antigen, the aggregation of cells with LPS O-antigen surface appendage takes place at low PEI concentrations (regime B1, 0-20 mg/L). However, the aggregate size of about 80 µm at 20 mg/L PEI concentration is about three times larger than that of aggregates consisting of bare bacteria at similar PEI concentration. The propensity of bacteria with LPS-O-antigen outer membrane to form larger aggregates might be explained by the associated steric hindrance of PEI chains to adsorb onto LPS decorated-membranes and by their ensuing larger availability for binding neighboring particles. The biocolloidal residues observed on AFM and TEM images (spherical outgrowths, Figure 4B1.a,b) likely originate from the complexation of LPS O-antigen appendages with PEI and the subsequent release of those structures in the solution and on the surface of the AFM glass slide. Because LPS appendages contribute to the screening of

negative charges carried by bacterial outer membranes (see details in Gaboriaud et al. (2008) and Clements et al. (2008)), the elimination, even partial, of LPS O-antigen from the bacterial surface by the PEI at sufficiently high concentration (Figure 4B1.a,b), leads to an enhanced exposition of negative membrane surface charges to the outer solution, which is consistent with the observed increase (in magnitude) of aggregate electrophoretic mobility (Figure 3B). With increasing PEI concentrations up to 60 mg/L, the aggregation of bacteria with LPS O-antigen decorated-membranes occurs according to a mechanism similar to that invoked for bacteria without LPS O-antigen. Namely, PEI adsorbs onto the bare bacterial membranes (from which LPS O-antigen has been removed), which leads to a neutralization of negative bacterial surface charges, to a lowering of interparticular electrostatic energy barrier and to aggregation. This process results in 40 µm aggregate size which is comparable to that of aggregates consisting of bacteria free of LPS-O antigen within regime A2 of polymer concentration (Figure 1A). The decrease in aggregate size from ~80 µm down to ~40 µm when increasing PEI concentration from ~20 to 60 mg/L (Figure 3A) can be directly related to the evolved nature of the bacterial surface within this range of polymer concentration, passing from fully to partially LPS-covered membranes (with the limit of membranes free of LPS). In addition, the release of LPS O-antigen within regimes B1 and B2 induces superficial damages that weaken and permeabilize free LPS O-antigen membranes, thus contributing to a conductivity increase and a significant release of crystal violet (Supplementary information, Figure E). The main difference between cell lysis and permeation is related to membrane integrity. Permeation renders possible exchanges (for example, ions or nutriments) between cell cytoplasm and external environment, through the cell membrane. This explains why crystal violet release is more significant than for the case of bare bacteria. Observed damages are shaped as spherical vesicules which are reminiscent of those resulting of a stress applied on the LPS membrane, as described by Schooling and Beveridge (2006). Finally, for PEI

concentrations larger than 60 mg/L, the bacteria suffer from severe damages that ultimately lead to entire cell lysis. The corresponding increase in optical density is due to the corresponding release in the medium of cell residues and of their PEI-mediated aggregated forms. These biocolloidal residues bound to most of the macromolecules, thus avoiding large bacterial aggregates to form. This explains in fine why there is only a slight increase in optical density at large PEI concentrations as compared to that observed for the nude bacteria situation where all introduced PEI macromolecules are available for cell binding and thus forming large aggregates. As a matter of fact, the PEI chains bound to cell residues become less available for contributing to bacterial cells aggregation.

V. Conclusions

As a conclusion, Figure 5 provides a schematic illustration of the various processes discussed above that govern the PEI-mediated aggregation of LPS O-antigen free bacteria and that of bacteria exhibiting such surface appendage. The results evidence a major impact of bacterial surface surstructure on aggregation. In particular, lower amounts of PEI are needed to flocculate bacterial cells decorated by LPS O-antigen as compared to the situation observed for bare bacteria. The steric hindrance encountered by PEI chains in the vicinity of LPS decorated-bacteria prevents the cationic polymer from significantly adsorbing onto the cell surfaces and instead promotes the interactions between PEI-free bacterial outer membrane *via* the formation of interbacterial polymer bridges. In contrast, PEI readily adsorbs onto individual bacterial membranes devoid of LPS O-antigen barrier, thereby lowering their probability to bind *via* the polymer bridges. Another aspect is the difference between the PEI amounts required for lysis of bacteria with and without LPS O-antigen. Lysis of the latter is complete for all bacteria observed with a 40 mg/L PEI concentration whereas only 60% of LPS O-antigen decorated cells are lysed after exposure to 60 mg/L PEI. This reflects the

protective role played by LPS O-antigen against harmfulaction of PEI. Indeed, PEI reacts first with a significant amount of LPS O-Antigen surface structures to permeabilize and fragilize the cell membranes and then contribute to an efficient lysis of the so-become bare cell membranes. Evidence of such role played by LPS is the observation of similar aggregation processes for bacteria that are devoid of LPS O-antigen and those that lack this appendage after preliminary action of PEI.

The current study highlights the complexity of the mixed physico-chemical and biological processes that must be considered for appropriately understanding the aggregation processes as they occur *e.g.* in wastewater sludge treatment. In that respect, special attention is here devoted to identifying the toxic impact of flocculating polymer agent on bacterial surface structures that exhibit or not LPS O-antigen appendage, and the resulting consequences for cell aggregation. In wastewater sludge treatement, the flocculating agent is ususally added in excess as compared to the content of bacteria. Our study demonstrates that such procedure likely leads to full cell lysis, which, in turn, increases the dispersion of biocolloidal residues thoughout the medium and potentially diminishes dewatering efficiency. Possible alternatives for avoiding such failure in wastewater sludge treatment would be a careful control and optimization of flocculating agent concentration in order to reach conditions of bacterial flocculation without massive and undesirable cell lysis. An abacus could be constructed in order to correlate sludge organic content with optimal flocculent dose. Organic content could then be measured via the use of spectrometry techniques, and flocculent concentration subsequently adjusted. Further investigations are surely needed, in particular viscosity measurement and mechanical characterisation of bacterial/PEI aggregates would inform on the relationship between aggregate structures and easiness in dewatering processes. Moreover, an adjustment of PEI concentration to lowest possible values leading to cell lysis would make the water treatment plant avoid the use of PEI excess, which is environmentally unfriendly

and expensive. Because bacterial sludge composition is highly variable from one treatment plant to another, it is necessary that previously mentioned abacus are constructed for each plant.In a forthcoming publication, the here-reported analysis will be complemented by the investigation of impacts of PEI molecular weight on bacterial cell aggregation processes. In addition, rheological and nanomechanical analyses (Polyakov et al., 2011) carried out on our model bacteria with and without LPS O-antigen will be given in order to achieve a local, quantitative understanding of the impacts of PEI and cell surface appendage on the water retention properties of bacterial sludge.

Acknowledgment

M-E.M. K. and J.F.L.D. thank Yves Waldvogel from the Laboratoire Environnement et Minéralurgie (Vandoeuvre-lès-Nancy, France) for his assistance in electrokinetic experiments and size measurements.

Supplementary data

Details on (i) the surface structure of free and decorated LPS O-antigen *Shewanella Oneidensis* MR-1 bacteria (Figures A, B), (ii) crystal violet adsorption/release experiments, (iii) the effect of PEI on pH and conductivity of KNO_3 electrolyte solution in the absence of bacteria (Figure C and D), (iv) the extent of crystal violet release with varying PEI concentration for both bacteria analysed in this study (Figure E). This material is available free of charge via the Internet at http://sciencedirect.com.

REFERENCES

Alakomi, H.L., Paananen, A., Suihko, M.L., Helander, I.M., Saarela, M., 2006**.** Weakening effects of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodetection. Applied Environmental. Microbiology 72 (7), 4695-4703.

Arrington, S.A., Zeleznik, M.J., Ott, D.W., Ju, L.K., 2003**.** Effects of polyethyleneimine on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* during cell flocculation and flotation. Enzyme Microbial Technology 32, 290-293.

Beyth, N., Houri-Haddad, Y., Baraness-Hadar, L., Yudovin-Farber, I., Domb, A.J., Weiss, E.I., 2008**.** Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethyleneimine nanoparticucles. Biomaterials 29, 4157-4163.

Bourrain, M., Achouak, W., Urbain, V., Heulin, T., 1999**.** DNA extraction from activated sludges. Current Microbiology 38, 315-319.

Chaignon, V., Lartiges, B.S., El Samrani, A., Mustin, C., 2002**.** Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. Water Research 36.

Clements, A., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Farn, J.L., Jenney, A.W., Lithgow, T., Wijburg, O.L.C., Hartland, E.L., Strugnell, R.A., 2008**.** The major surface-associated saccharides of Klebsiella pneumoniae contribute to host cell association. *PloS ONE* 3 (11), e3817.

Cordes, R.M., Sims, B.W., Glatz, C.E., 1990**.** Precipitation of Nucleic acids with poly(ethyleneimine). Biotechnology Progress 6, 283-285.

Curvers, D., Usher, S.P., Kilcullen, A.R., Scales, P.J., Saveyn, H., Van der Meeren, P., 2009**.** The influence of ionic strength and osmotic pressure on the dewatering behaviour of sewage sludge. Chemical Engineering Science 64 (10), 2448-2454.

Dague, E., Duval, J.F.L., Jorand, F., Thomas, F., Gaboriaud F., 2006. Probing Surface Structures of Shewanella spp. by Microelectrophoresis. Biophysical Journal. 90, 2612–2621.

Deneux-Mustin, S., Lartiges, B.S., Villemin, G., Thomas, F., Yvon, J., Bersillon, J.L., Snidaro, D., 2001**.** Ferric chloride and lime conditionning of activated sludges: an electron microscopic study on resin-embedded samples. Water Research 35 (12), 3018-3024.

Duval, J.F.L., Gaboriaud, F., 2010**.** Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. Current Opinion in Colloid and Interface Science 15, 184-195.

Duval, J.F.L., Merlin, J., Anantha, P., 2011**.** Electrostatic interactions between soft diffuse multi-layered (bio)particles: beyond Debye-Hückel approximation and Deryagin formulation. Physical Chemistry Chemical Physics 13, 1037-1053.

Gaboriaud, F., Gee, M.L., Strugnell, R., Duval, J.F.L., 2008**.** Coupled electrostatic, hydrodynamic and mechanical properties of bacterial interfaces in aqueous media. Langmuir 24, 10988-10995.

Guan, J., Waite, T.D., Amal, R., 1998**.** Rapid structure characterisation of bacterial aggregates. Environmental Science Technology 32, 3735-3742.

Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J., 1995**.** Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research 29 (7), 1639-1647.

Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: effects of ionic composition. Water Research 31 (7), 1665-1672.

Korenevski, A.A., Vinogradov, E., Gorbi, Y., Beveridge, T.J., 2002. Characterisation of the lipopolysaccharides and capsules of *Shewanella* spp. Applied Environmental Microbiology 68 (9), 4653-4657.

Lartiges, B.S., Deneux-Mustin, S., Villemin, G., Mustin, C., Barrès, O., Chamerois, M., Gerard, B., Babut, M., 2001. Composition, structure and size distribution of suspended particulates from the Rhine River. Water Research 35 (3), 808-816.

Legrand, V., Hourdet, D., Audebert, R., Snidaro, D., 1998. Deswelling and flocculation of gel networks : Application to sludge dewatering. Water Research 32, 3662-3672.

Marinetti, M., Dentel, S.K., Malpei, F., Bonomo, L., 2010**.** Assessment of rheological methods for a correlation to sludge filterability. Water Research 44, 5398-5406.

Martins, A.M.P., Picioreanu, C., Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004**.** Three-dimensional dual-morphotype species modelling of activated sludge flocs. Environmental Science Technology 38 (21), 5632-5641.

Mikkelsen, L.H., Keiding, K., 2002**.** Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. Water Research 36, 2451-2462.

Myers, C.R., Nealson, K.H., 1988**.** Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. Science 240, 1319–1321.

Nian, R., Tan, L., Choe, W.S., 2008**.** Polyethyleneimine-mediated chemical extraction of cytoplasmic his-tagged inclusion body proteins from *Escherichia coli.* Biotechnology Progress 24, 417-425.

Nikaido, H., 1989**.** Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy 33 (11), 1831-1836.

Nikaido, H., 2005**.** Restring permeability barrier function of outer membrane. Chemistry Biology. 12, 507-514.

Polyakov, P., Soussen, C., Duan, J., Duval, J.F.L., Brie, D., Francius, G., 2011**.** Automated force volume image processing for biological samples. PloS ONE 6 (4), e18887.

Reynolds, E., 1963**.** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17, 208-211.

Salt, D.E., Hay, S., Thomas, O.R.T., Hoare, M., Dunnil, P., 1995**.** Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polyethyleneimine: a study of several organisms and polymer molecular weights. Enzyme and Microbial Technology 17, 107-113.

Schooling, S. R., Beveridge, T. J., 2006**.** Membrane vesicles : an overlooked component of the matrices of biofilms. Journal of Bacteriology 188 (16), 5945-5947.

Vaara, M., 1992**.** Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiology Reviews 56 (3), 395-411.

Vadillo-Rodrigues, V., Busscher, H. J., Norde, W., De Vries, J., Dijkstra, R. J. B., Stokroos, I., van der Mei, H. C., 2004**.** Comparision of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. Applied Environmental Microbiology 70 (9), 5441-5446.

Waite, T.D., **1999.** Measurement and implications of flocs structure in water and wastewater treatment. Colloids Surface 151, 27-41.

Figure

Figure 1. Dependence of **A)** optical density and aggregates size, **B)** optical density and electrophoretic mobility (μ); **C)** pH and conductivity, on concentration of PEI added to the solution initially containing isolated free LPS O-antigen bacteria.

Figure 2. Typical TEM and AFM observations (three panels at the top and bottom, respectively) of free LPS O-antigen bacteria flocculated with **A1.a)** 17.5 mg/L, **A2.a)** 37.5 mg/L and **A3.a)** 90 mg/L PEI, and with **A1.b)** 2.5 mg/L, **A2.b)** 35 mg/L and **A3.b)** 100 mg/L PEI. TEM and AFM observations were performed on at least 100 cells and 10-20 cells, respectively.

Figure 3. Dependence of **A)** optical density and aggregates size, **B)** optical density and electrophoretic mobility (μ); **C)** pH and conductivity, on concentration of PEI added to solution initially containing LPS O-antigen decorated bacteria.

Figure 4. Typical TEM and AFM observations (three panels at the top and bottom, respectively) of LPS O-antigen decorated-bacteria flocculated with **B1.a)** 5 mg/L, **B2.a)** 20 mg/L and **B3.a)** 90 mg/L PEI, and with **B1.b)** 5 mg/L, **B2.b)** 35 mg/L and **B3.b)** 90 mg/L PEI. TEM and AFM observations were performed on at least 100 cells and 10-20 cells, respectively.

Figure 5. Schematic illustrations of the 3 aggregation regimes for free LPS O-antigen bacteria upon increase of PEI concentration: **A1)** aggregation, **A2)** lysis and flocs erosion and **A3)** aggregation of cell residues. Schematic illustrations of aggregation regimes for LPS O-antigen decorated bacteria : **B1)** aggregation, release of LPS O-antigen surface appendage, **B2)** PEI-mediated binding of neighboring LPS O-antigen free bacterial membranes and **B3)** lysis.

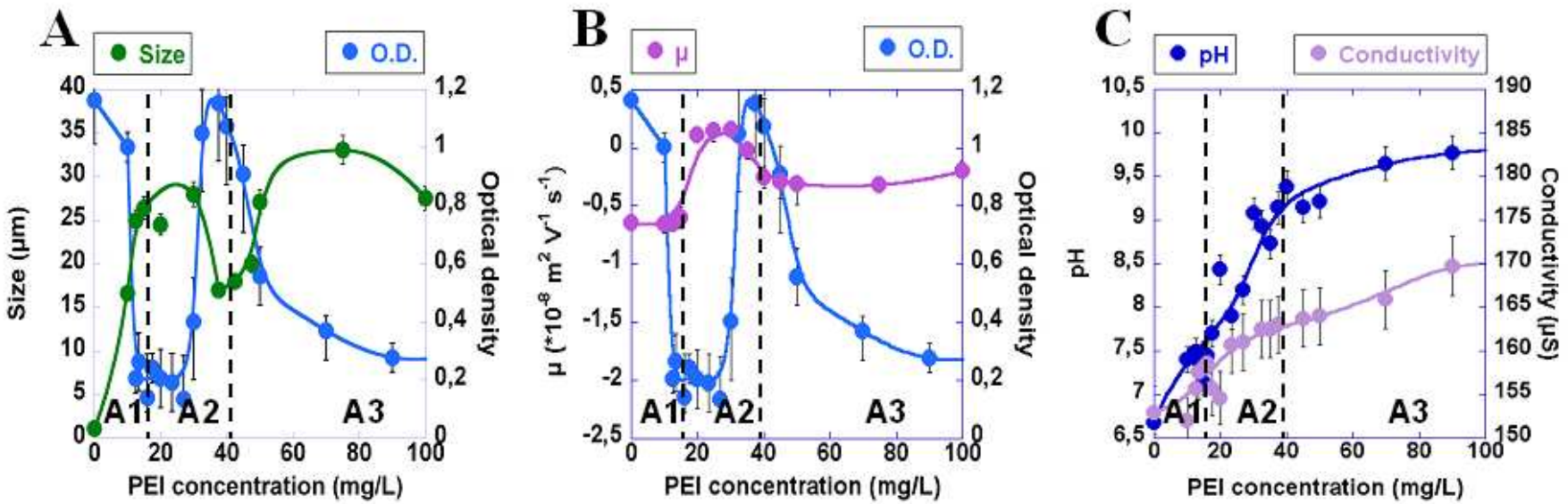


Figure 1 : Dependence of A) **optical density and aggregates size,** B) **optical density and electrophoretic mobility (µ);** C) **pH and conductivity, on concentration of PEI added to the solution initially containing isolated free LPS O-antigen bacteria.**

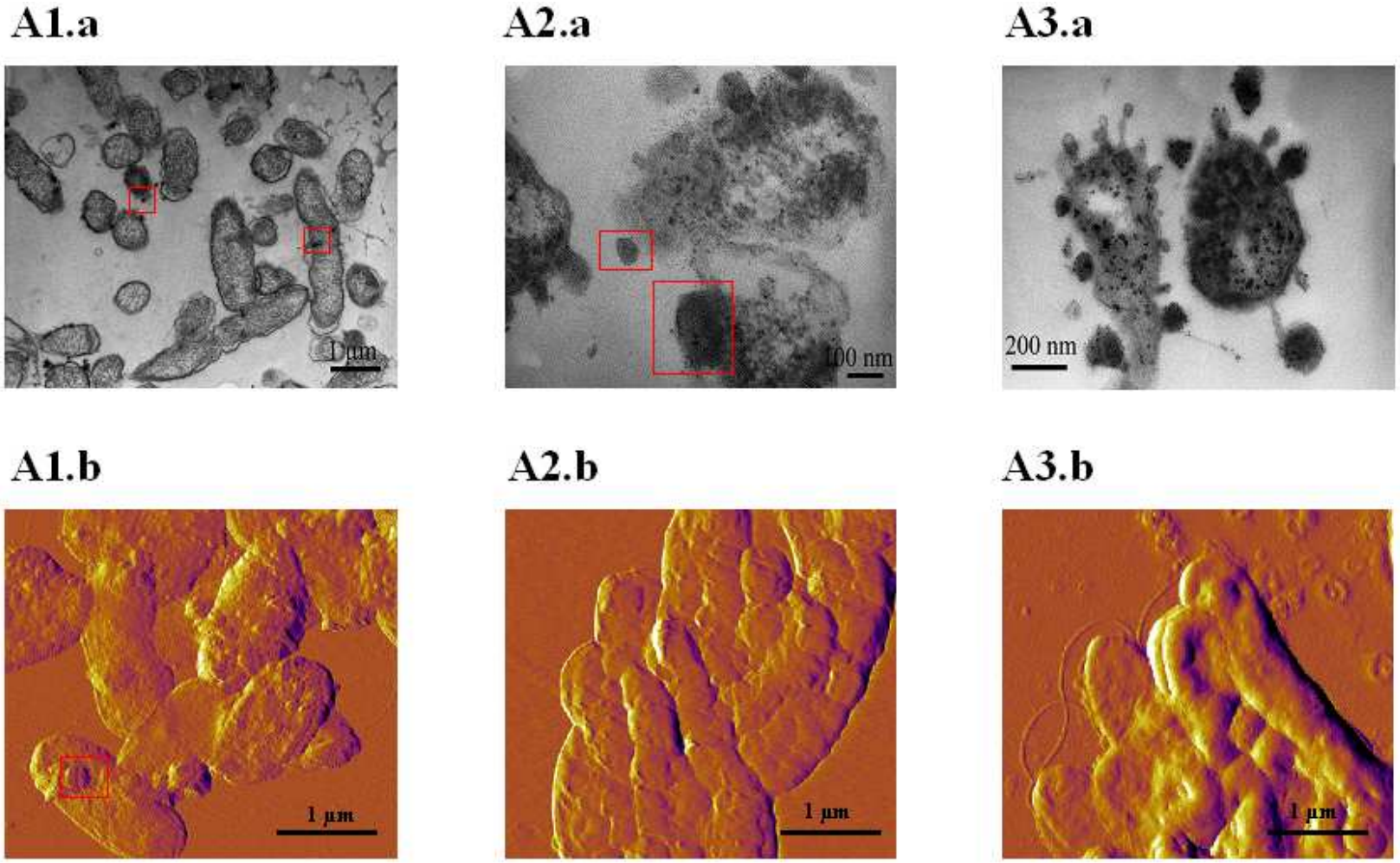


Figure 2 : Typical TEM and AFM observations (three panels at the top and bottom, respectively) of free LPS O-antigen bacteria flocculated with A1.a) **17.5 mg/L,** A2.a) **37.5 mg/L and** A3.a) **90 mg/L PEI, and with** A1.b) **2.5 mg/L,** A2.b) **35 mg/L and** A3.b) **100 mg/L PEI. TEM and AFM observations were performed on at least 100 cells and 10-20 cells, respectively.**

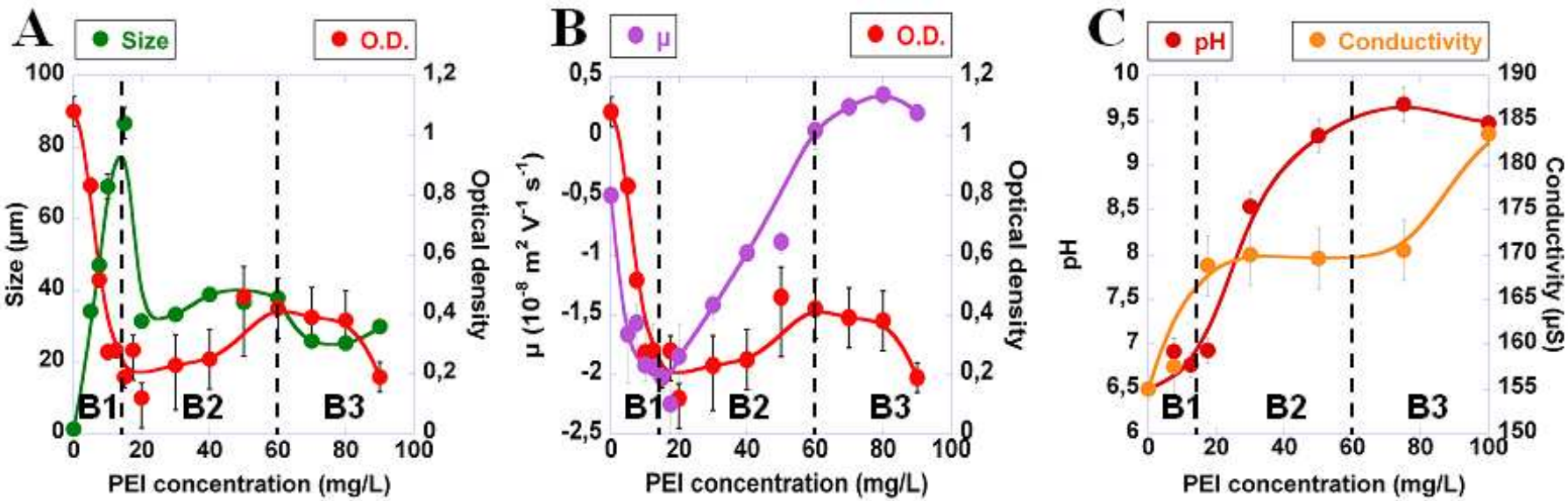


Figure 3 : Dependence of A) **optical density and aggregates size,** B) **optical density and electrophoretic mobility (µ);** C) **pH and conductivity, on concentration of PEI added to solution initially containing LPS O-antigen decorated bacteria.**

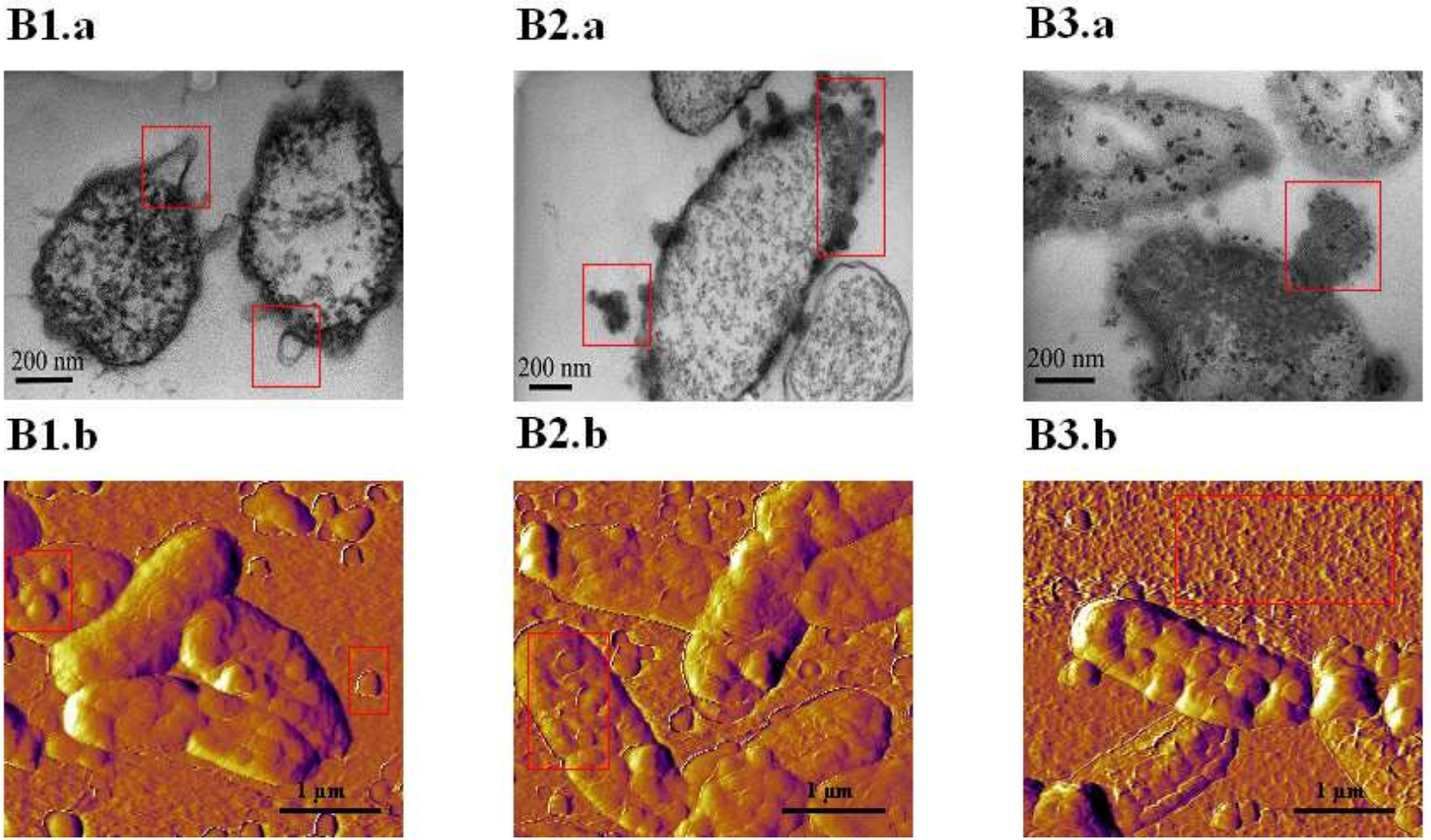


Figure 4 : Typical TEM and AFM observations (three panels at the top and bottom, respectively) of LPS O-antigen decorated-bacteria flocculated with B1.a) **5 mg/L,** B2.a) **20 mg/L and** B3.a) **90 mg/L PEI, and with** B1.b) **5 mg/L,** B2.b) **35 mg/L and** B3.b) **90 mg/L PEI. TEM and AFM observations were performed on at least 100 cells and 10-20 cells, respectively.**

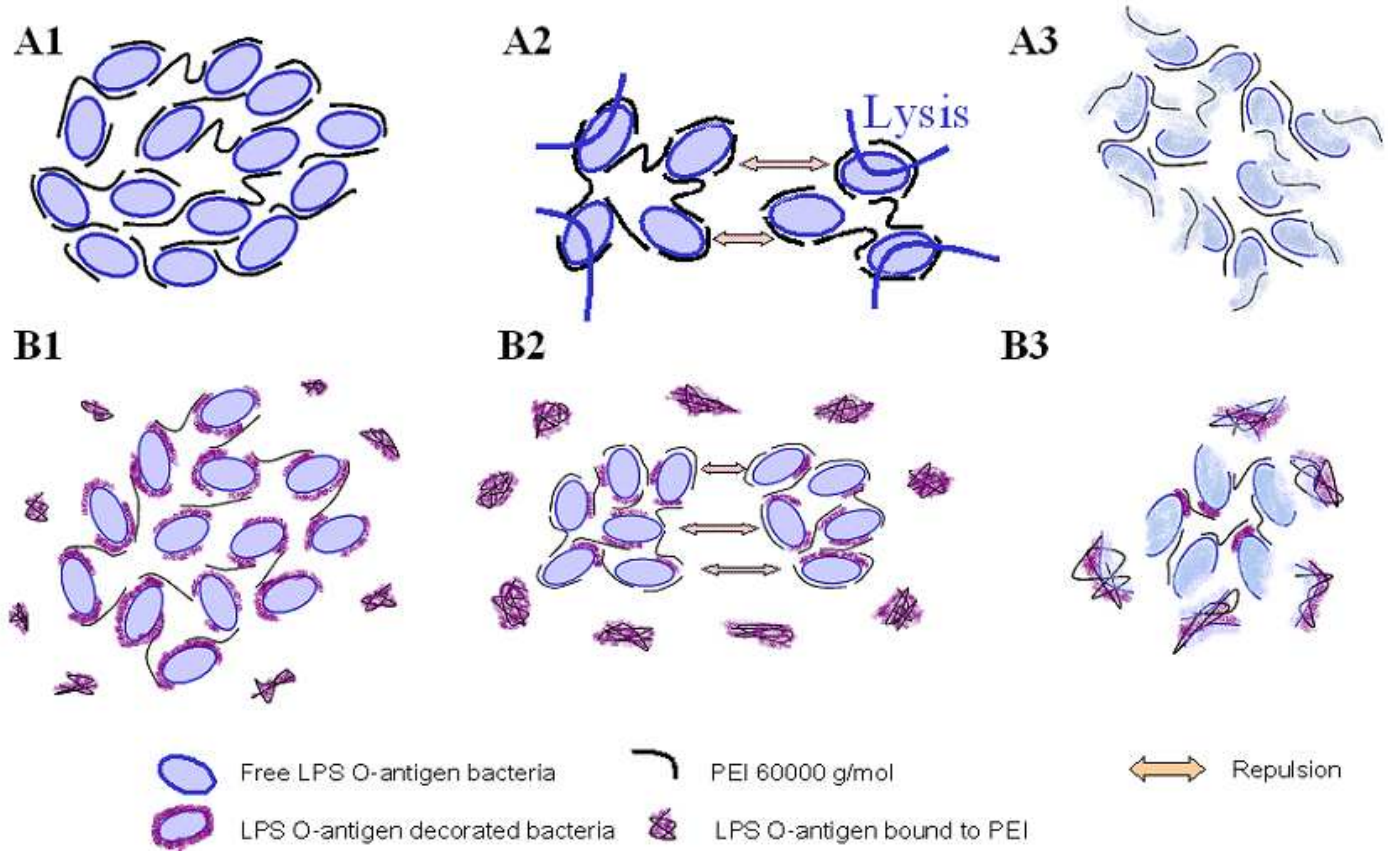


Figure 5 : Schematic illustrations of the 3 aggregation regimes for free LPS O-antigen bacteria upon increase of PEI concentration: A1) **aggregation,** A2) **lysis and flocs erosion and** A3) **aggregation of cell residues. Schematic illustrations of aggregation regimes for LPS O-antigen decorated bacteria :** B1) **aggregation, release of LPS O-antigen surface appendage,** B2) **PEI-mediated binding of neighboring LPS O-antigen free bacterial membranes and** B3) **lysis.**

Supplementary data

Polyethyleneimine-Mediated Flocculation of *Shewanella oneidensis* MR-1 : Impacts of Cell Surface Appendage and Polymer Concentration

Marie-Eve M. Krapf, [*1, a] Bruno S. Lartiges,[1,2,b] Christophe Merlin,[3, c] Grégory Francius,[3, d]

Jaafar Ghanbaja,[4, e] Jérôme F.L. Duval[1, f]

[1] Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy Université, CNRS UMR7569, B.P. 40, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[2] University of Toulouse (Paul Sabatier), Geosciences Environment Toulouse, UMR CNRS/UPS/IRD 5563, 14 Av E. Belin, 31400 Toulouse, France (Present address)

[3] Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy Université, CNRS UMR7564, 405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France.

[4] Laboratoire de Microscopie Electronique, Université Henri-Poincaré (Nancy I), BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex France.

[a] marie-eve.krapf@ensg.inpl-nancy.fr

[b] bruno.lartiges@lmtg.obs-mip.fr

[c] christophe.merlin@pharma.uhp-nancy.fr

[d] gregory.francius@lcpme.cnrs-nancy.fr

[e] jaafar.ghanbaja@scmem.uhp-nancy.fr

[f] jerome.duval@ensg.inpl-nancy.fr

[*] Corresponding author

phone : +33 3 83 59 62 64; fax : +33 3 83 59 62 55

Number of pages : 6
Number of figures : 5

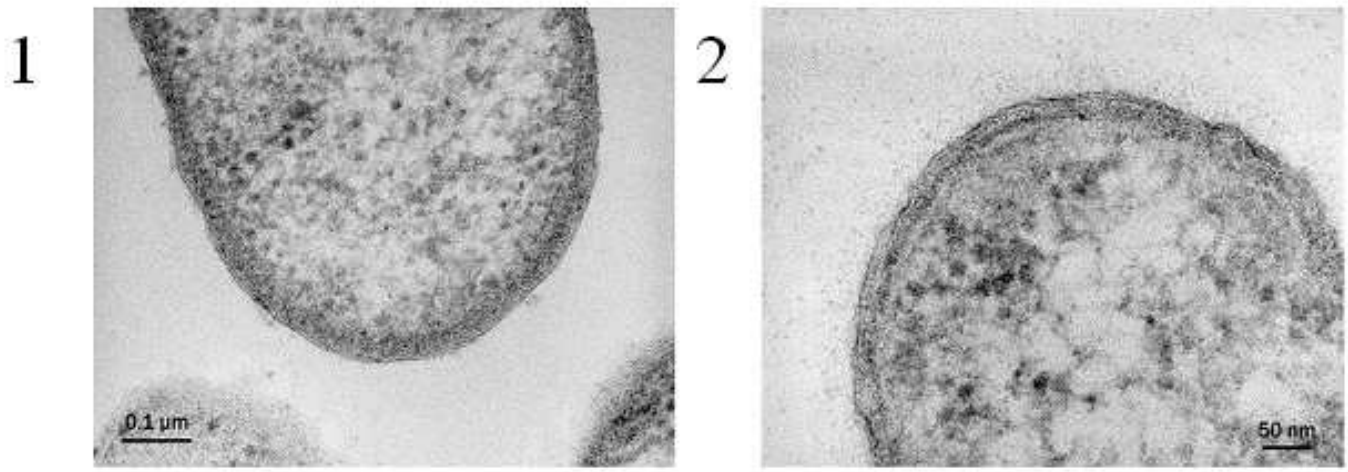


Figure A. Observations by transmission electron microscopy of 1) free and 2) decorated LPS O-antigen *Shewanella oneidensis* MR-1 bacteria grown at 30 and 20°C respectively.

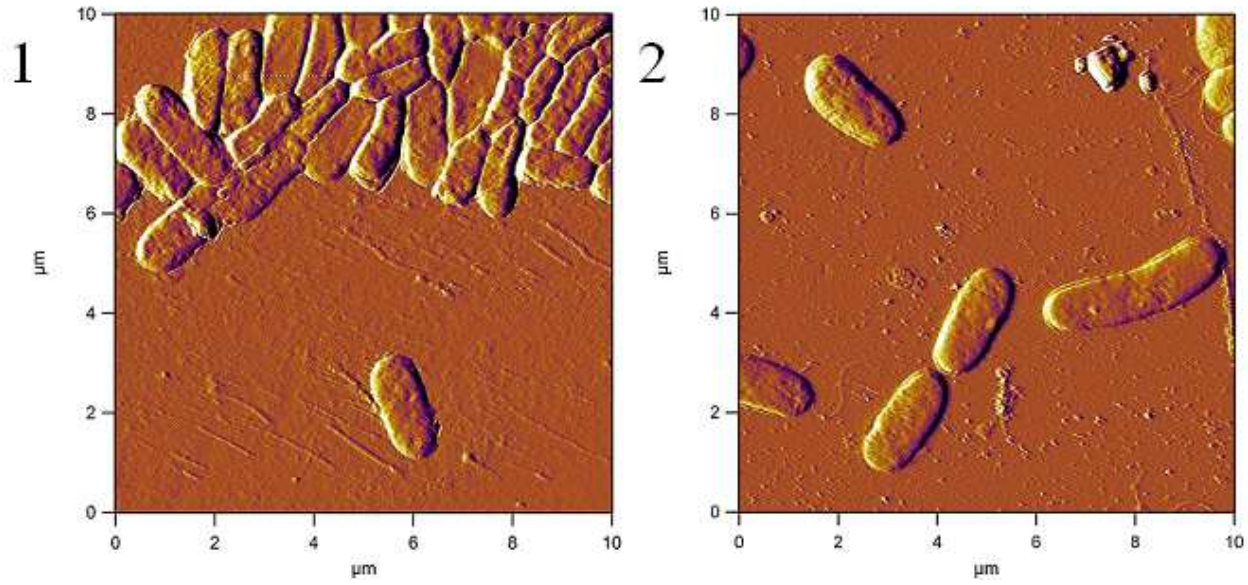


Figure B. Observations by atomic force microscopy (under air condition) of 1) free and 2) decorated LPS O-antigen *Shewanella Oneidensis* MR-1 bacteria.

CRYSTAL VIOLET RELEASE EXPERIMENTS

The aim of this experiments was to characterize bacterial membrane permeability.

1 mL aliquots of bacterial suspension at an OD_{600} of 1 were mixed with crystal violet (0.1 g/L), for 1 hour. Bacterial suspensions were then washed several times by alterning centrifugation at 13000 g for 3 minutes and dispersion in a fresh 1 mM KNO_3 solution. After each centrifugation, the supernatant absorbance was measured by spectrophotometry (540 nm) till the amount of violet crystal released by the bacteria became negligible. The bacterial suspensions were then redispersed in 1 mM KNO_3 solution before the addition of PEI at a given concentration in the range 0-100 mg/L. After a delay of 49 minutes, a final centrifugation (13000 g for 3 minutes) was performed and the absorbance of supernatant was measured. A 100% release of crystal violet was obtained by lysing crystal violet stained bacteria with acetic acid. The amount of violet crystal released by PEI-treated bacteria was estimated from the ratio of the absorbances measured in the supernatant of PEI-treated and acetic acid-treated bacterial suspensions. This method allows us to provide a rough estimate of the permeabilization of the bacterial membranes considered in our study.

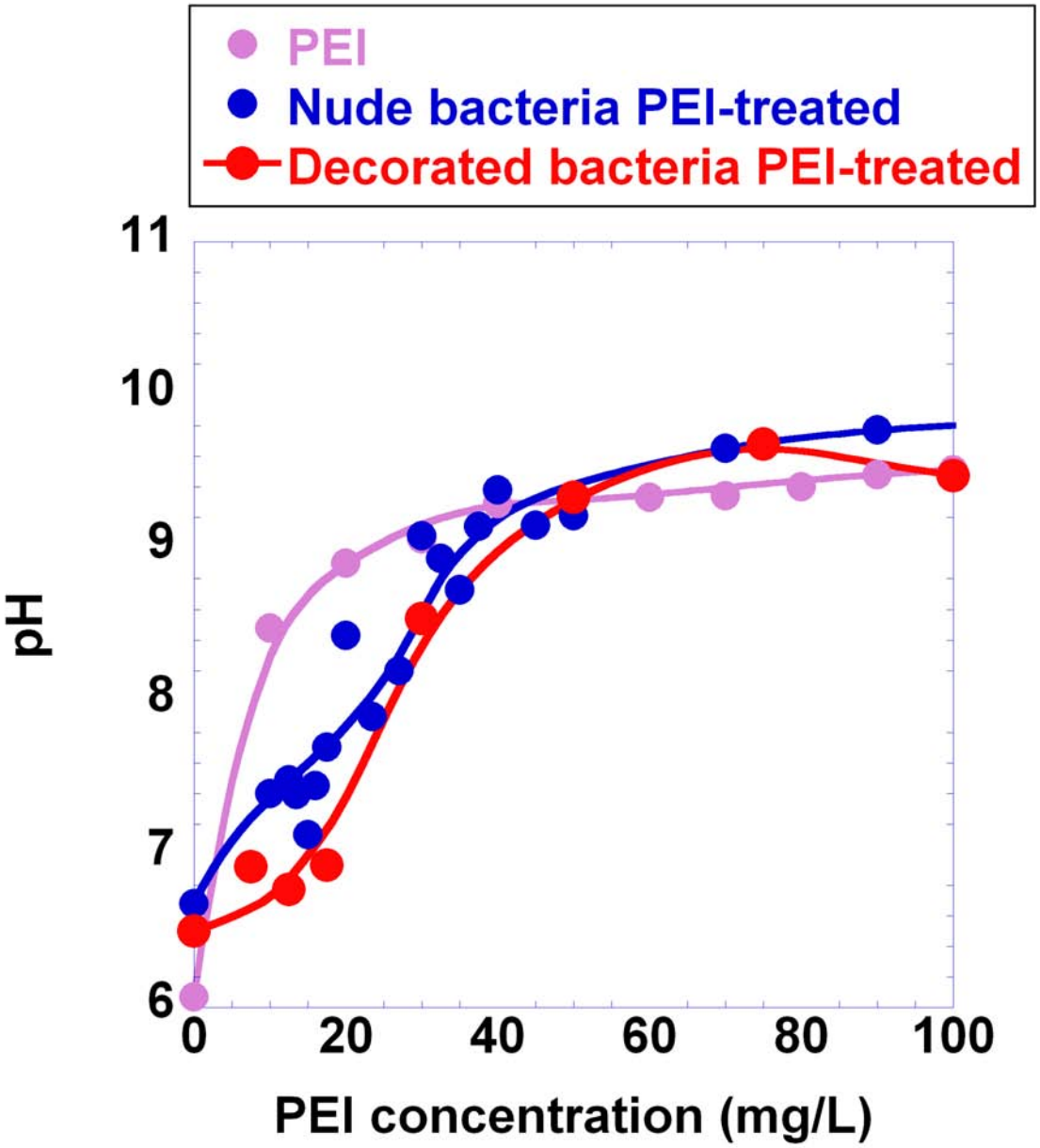


Figure C. Dependence of pH on PEI concentration in 1 mM KNO_3 solution in the presence/absence of bacteria presenting or not LPS O antigen.

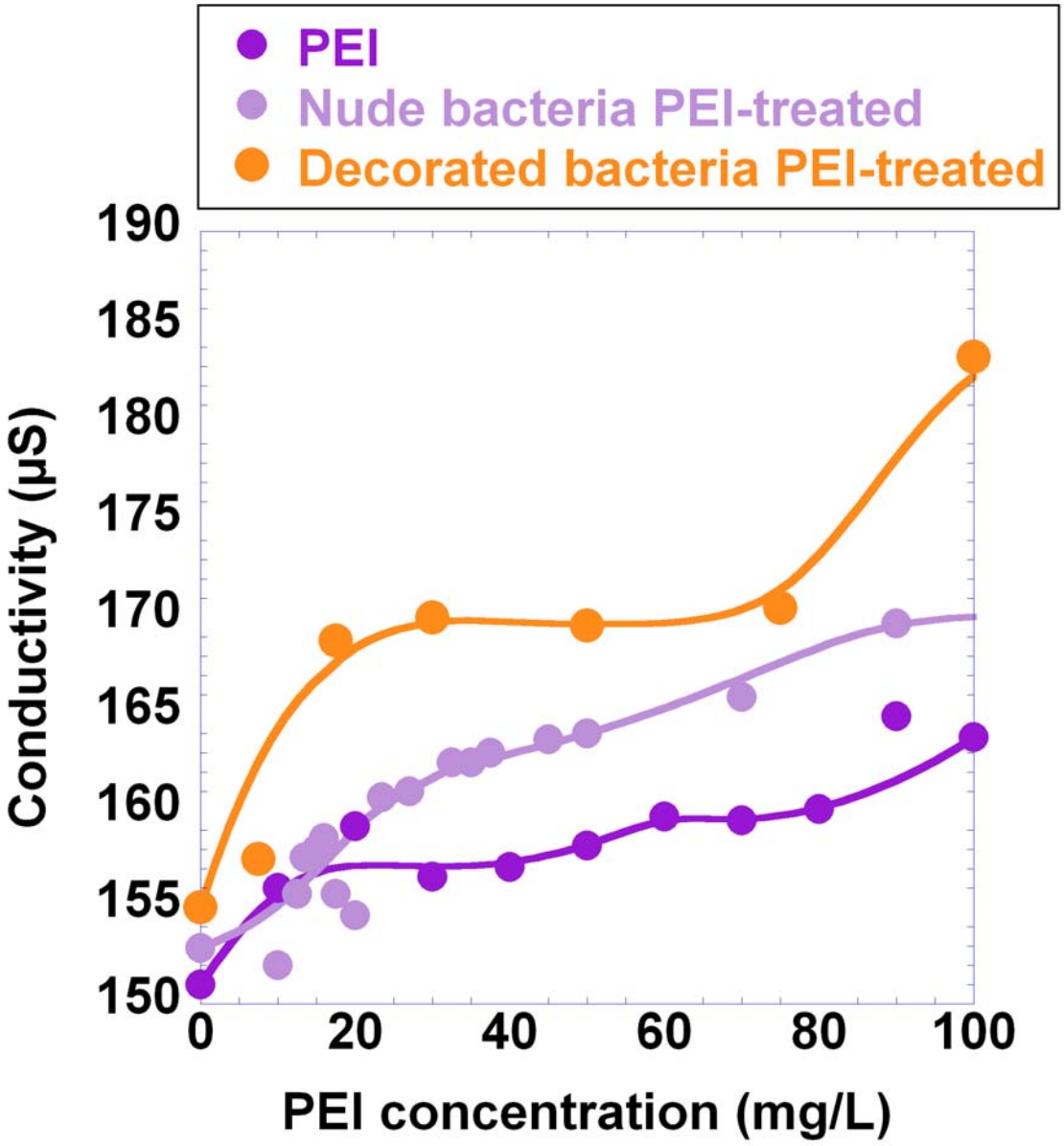


Figure D. Dependence of conductivity on PEI concentration in 1 mM KNO_3 solution in the presence/absence of bacteria presenting or not LPS O-antigen.

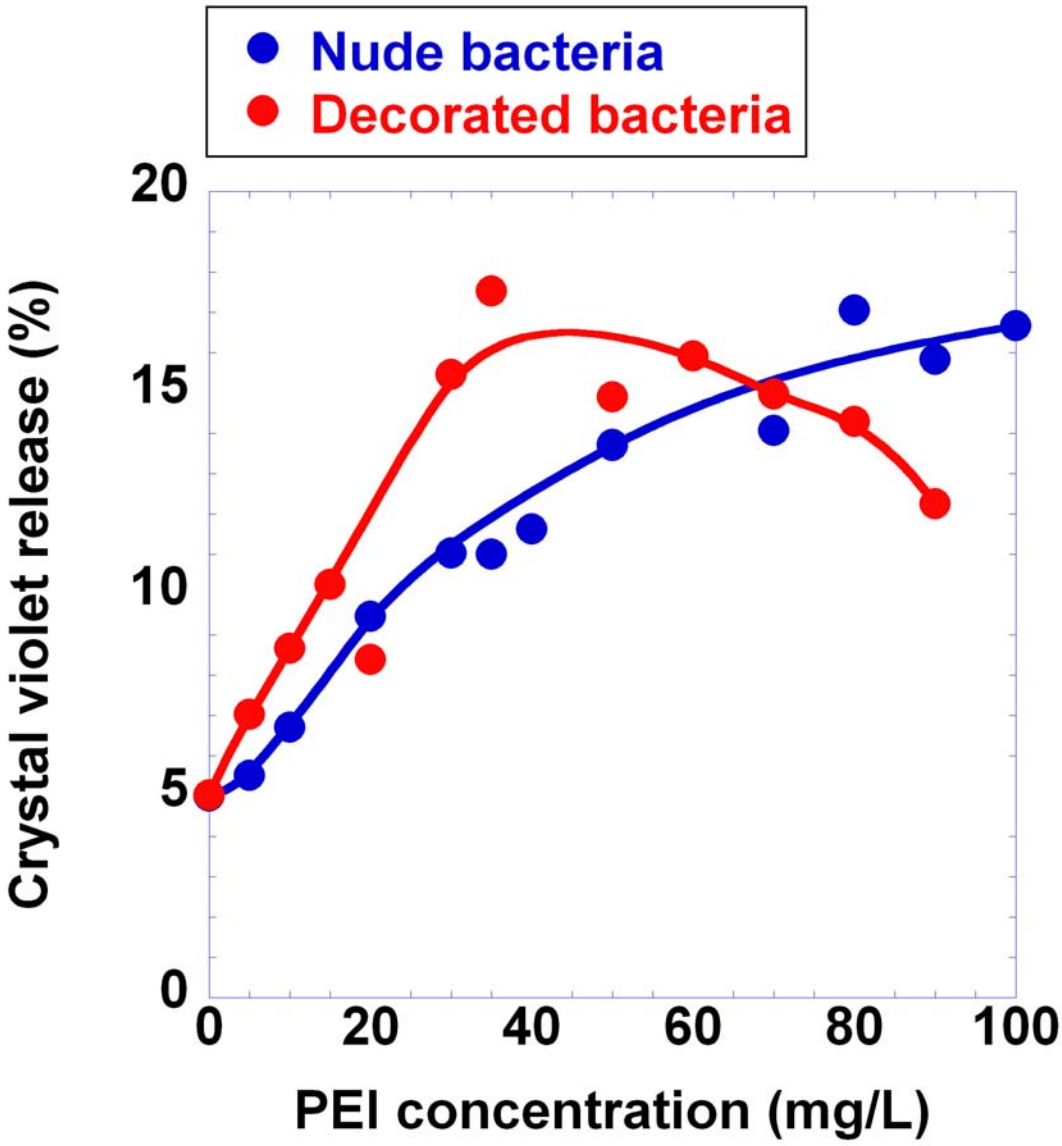


Figure E. Dependence of crystal violet release on PEI concentration for a suspension containing free or decorated LPS O-antigen *Shewanella oneidensis* MR-1 bacteria.

Complément concernant la floculation des cellules bactériennes par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol

La figure 1 présente l'évolution du temps nécessaire au doublement de la population bactérienne, appelé aussi temps de génération, pour les deux types de bactéries étudiées, en fonction de la concentration en $PEI_{60000g/mol}$.

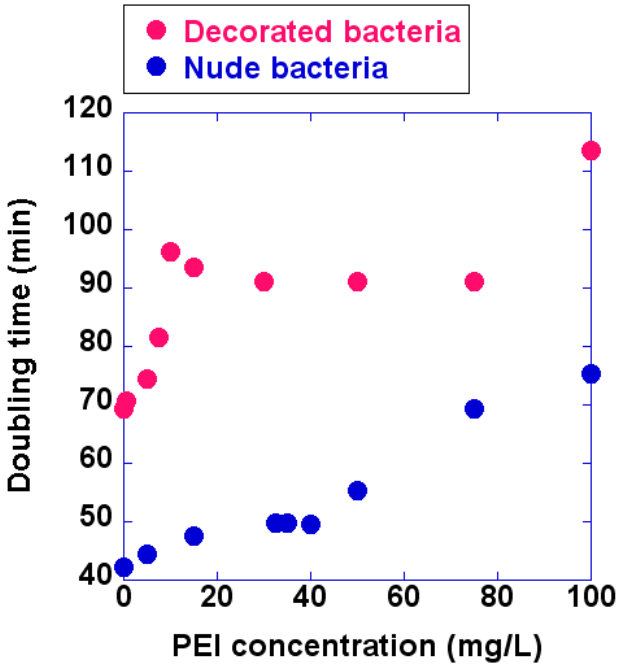


Figure 6 : Evolution du temps de génération des populations bactériennes présentant ou non des surstructures polysaccharidiques en fonction de la concentration en $PEI_{60000g/mol}$.

Cette figure montre que le temps de génération augmente de 42 minutes (temps initial) à 48 minutes pour une concentration de 17.5 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$ pour les bactéries ne présentant pas de surstructure, ce qui représente une augmentation d'environ 15% de la valeur initiale. Ce temps de génération reste stable à des valeurs de 50 minutes environ jusqu'à une concentration de 40 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$, puis augmente jusqu'à 70 minutes, ce qui représente une augmentation de plus de 50% de par rapport à la valeur initiale. Notons que le décalage en ordonnées à l'origine provient de la différence des températures de culture, 20°C pour les bactéries présentant des surstructures lipopolysaccharidiques et 30°C pour les bactéries ne produisant pas de surstructure.

L'évolution du temps de génération des bactéries présentant la partie antigène O du lipopolysaccharide (AgO-LPS) est légèrement différente. On constate une augmentation très importante du temps de génération pour des concentrations en $PEI_{60000g/mol}$ inférieures à celles observées précédemment. En effet, il passe de 70 (temps initial) à 95 minutes environ quand la concentration en $PEI_{60000g/mol}$ atteint 15 mg/L, ce qui représente une augmentation d'environ 40% de sa valeur initiale. La valeur du taux de génération se stabilise à 90 minutes avant d'atteindre 110 minutes en présence d'une concentration en $PEI_{60000g/mol}$ de 100 mg/L.

En comparant ces résultats à ceux obtenus au chapitre précédent, on constate que l'évolution du temps de génération confirme et complémente les interprétations que nous avions faites concernant le comportement des bactéries en agrégation suivant la concentration en $PEI_{60000g/mol}$. En effet, entre 0 et environ 35 mg/L $PEI_{60000g/mol}$, la faible augmentation du temps de génération des bactéries ne présentant pas de surstructure montre que celles-ci n'ont pas subies d'altérations majeures. La stabilité du temps de génération entre 35 et 40 mg/L, souligne le fait qu'il y ait adsorption du polymère sur les membranes, précédant l'érosion des agrégats. Enfin, la franche augmentation observée au-delà de 40 mg/L montre clairement le début de la lyse bactérienne.

Concernant les bactéries présentant des surstructures, l'augmentation du temps de génération dès les plus faibles concentrations montre que, bien qu'il n'y a pas de lyse bactérienne (comme l'avons montré dans le chapitre précédent), le $PEI_{60000g/mol}$ présente une grande toxicité pour ce type de bactéries. Le relargage des LPS par complexation avec ce polymère affecte fortement la membrane cellulaire au point de limiter les divisions des cellules bactériennes. Dans la mesure où, comme l'ont montré plusieurs études microbiologiques antérieures [1-2 ; 37-38], le relargage des LPS est à l'origine d'un accroissement de la perméabilité membranaire, il peut paraître logique que l'afflux d'éléments (ioniques entre autres) non-nécessaire ou la fuite de substrat essentiel engendrent des difficultés à ce que le métabolisme cellulaire fonctionne de façon appropriée. Enfin, l'augmentation du temps de génération pour une concentration en $PEI_{60000g/mol}$ de 80-100 mg/L montre que de telles concentrations sont probablement à l'origine de la lyse d'une partie importante de la population bactérienne.

En conclusion, cette étude montre que selon la présence ou l'absence de surstructures bactériennes, les modalités de l'agrégation des cellules diffèrent.

Lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructures, l'agrégation est induite par le polyéthylèneimine pour des concentrations de l'ordre de 20 mg/L de polyéthylèneimine. Une restabilisation se produit lorsque la concentration en polymère atteint environ 40 mg/L. Celle-ci correspond à une lyse bactérienne induite par le polymère. La concentration en polymère est alors trop faible pour former, avec les résidus colloïdaux ainsi libérés, des agrégats de taille suffisamment importante pour qu'il y ait décantation. Aussi, une augmentation de la concentration en polyéthylèneimine permet de former des agrégats de taille suffisante pour décanter. Ainsi, on parle d'une agrégation secondaire, car les agrégats ne sont non plus formés de bactéries intègres, mais de résidus bactériens colloïdaux.

Lorsque les bactéries présentent des surstructures exopolymériques, l'agrégation a lieu dès 5 mg/L de polymère, en raison de l'encombrement stérique provoqué par les lypopolysaccharides. Conjointement, des complexes lypopolysaccharides/polyéthylèneimine se forment, provoquant un relargage des surstructures. Lorsque la concentration en polymère augmente (entre 40 et 60 mg/L), ce dernier s'adsorbe directement sur la membrane cellulaire. Il y a finalement lyse bactérienne, comme nous l'avions observé dans le cas précédent. La restabilisation n'apparaît pas aussi nettement car la concentration en polymère est, à ce stade (au delà de 60 mg/L), suffisante pour agréger les résidus colloïdaux libéré par la lyse cellulaire en flocs de taille suffisante pour qu'il y ait décantation.

Finalement, on peut affirmer que, qu'il y ait ou non présence de surstructures, l'excès de polymère provoque une lyse cellulaire et donc la formation d'agrégats de nature différente. Par contre, celle-ci apparaît pour des concentrations en polymère plus importante lorsque les surstructures lypopolysaccharidiques sont présentes, ce qui montre qu'elles forment une barrière protectrice contre les effets nocifs du polyéthylèneimine sur les membranes cellulaires.

Dans les chapitres suivants, nous allons nous intéresser aux modalités d'agrégation induites par des polymères de polyéthylèneimine de tailles variables, puis à l'impact de la structure interne des agrégats sur la déshydratation des boues bactériennes.

Références bibliographiques

[1] Helander I.M.; Alakomi H.L.; Latva-Kala K.; Koski P. Polyethyleneimine is an effective permealizer of gram-negative bacteria. Microbiology [en ligne]. 1997, 143, 3193-3199; ISSN 13500872

[2] Korycka-Machala M.; Ziolkowski A.; Rumijowska-Galewicz A.; Lisowska K.; Sedlaczek L. Polycations increase the permeability of Mycobacterium vaccae cell envelopes to hydrophobic compounds. Microbiology [en ligne]. 2001, 147, 2769-2781; ISSN 13500872

[3] Alakomi H.L.; Paananen A.; Suihko M.L.; Helander I.M.; Saarela M. Weakening effects of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodetection. Applied Environmental Microbiololgy [en ligne]. 2006, 72 (7), 4695-4703; DOI 10.1128/AEM.00142-06

[4] Mortimer M. ; Kasemets K. ; Heinlaan M. ; Kurvet I. ; Kahru A. High throughput kinetic Vibrio fisheri bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticules. Toxicology In Vitro [en ligne]. 2008, 22, 1412-1417; DOI 10.1016/j.tiv.2008.02.011

[5] Pasquier N. ; Keul H. ; Heine E. ; Moeller M. From multifunctionalized poly(ethylene imine)s toward antimicrobial coatings. Biomacromolecules [en ligne]. 2007, 8 (9), 2874-2882.

[6] Beyth N. ; Houri-Haddad Y. ; Baraness-Hadar L. ; Yudovin-Farber I. ; Domb A.J. ; Weiss E.I. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethyleneimine nanoparticucles. Biomaterials [en ligne]. 2008, 29, 4157-4163; DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.07.003

[7] Hilal N. ; Kochkodan V. ; Al-Khatib L. ; Levadna T. Surface modified polymeric to reduce (bio)fouling: a microbiological study using E. Coli. Desalinisation [en ligne]. 2004, 167, 293-300; DOI 10.1016/j.desal.2004.06.138

[8] Treweek G.P.; Morgan J.J. Polymer flocculation of bacteria, the mechanism of E. Coli aggregation by polyethyleneimine. Journal of Colloids Interface Science [en ligne]. 1976, 60 (2), 258-273; ISSN 00219797

[9] Dixon J.K.; Zielyk M.W. Control of the bacterial content of water with synthetic polymeric flocculants. Environmental Science and Technology [en ligne]. 1969, 3 (6), 551-558 ; DOI 10.1021/es60029a004

[10] Verduzco-Luque C.E. ; Alp B. ; Stephens G.M. ; Marks G.H. Construction of biofilms with defined internal architecture using dielectrophoresis and flocculation. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 2003, 83 (1), 39-44.

[11] O'Mahony K. ; Freitag R. ; Dhote B. ; Hilbrig F. ; Müller P. ; Schumacher I. Capture of bacteria from fermentation broth by body feed filtration: A solved problem? Biotechnology Progress [en ligne]. 2006, 22 (2), 471-483.

[12] Zeleznik M.J. ; Segatta J.M. ; Ju L.K. Polyethyleneimine-induced flocculation and flotation of cyanobacterium Anabaena flos-aquae for gas vesicle production. Enzyme and Microbial Technology [en ligne]. 2002, 31 (7), 949-953.

[13] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Rheology as tool for polymer dose assessment and control. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1999, 125 (12), 1133-1141.

[14] Abu-Orf M.M. ; Örmeci B. Measuring sludge network strength using rheology and relation to dewaterability, filtration, and thickening - Laboratory and full-scale experiments. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 2005, 131 (8), 1139-1146.

[15] Örmeci B. Optimization of a full-scale dewatering operation based on the rheological characteristics of wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2007, 41 (6), 1243-1252.

[16] Dentel S.K. ; Abu-Orf M.M. ; Walker C.A. Optimization of slurry flocculation and dewatering based on electrokinetic and rheological phenomena. Chemical engineering journal [en ligne]. 2000, 80 (1-3), 65-72.

[17] Langer S.J. ; Klute R. Hahn H.H. Mechanisms of floc formation in sludge conditioning with polymers. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 30 (8 pt 8), 129-138.

[18] Wang Y.L. ; Dentel S.K. ; Mahmudov R. Transformation between flocs and aggregates in the conditioned sludge suspensions during a rotational test using a torque rheometer. Powder Technology [en ligne]. 2011, 208 (1), 189-194.

[19] Örmeci B. ; Ahmad A. Measurement of additional shear during sludge conditioning and dewatering. Water Research [en ligne]. 2009, 43 (13), 3249-3260.

[20] Campbell H.W. ; Crescuolo P.J. The use of rheology for sludge characterization. Water Science and Technology [en ligne]. 1982, 14 (6-7 /7), 475-489.

[21] V. D. ; Cruz M. ; Marques R. ; Grandfils C. ; Gonçalves M.P. ; Oliveira R. ; Reis M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by Enterobacter sp. Carbohydrate Polymers [en ligne]. 2010, 81 (4), 758-764.

[22] Buscall R. ; White L.R. The consolidation of concentrated suspensions. Part 1. - The theory of sedimentation. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactios 1: Physical Chemistry in Condensed Phases [en ligne]. 1987, 83 (3), 873-891.

[23] Keiding K. ; Rasmussen M.R. Osmotic effects in sludge dewatering. Advances in Environmental Research [en ligne]. 2003, 7 (3), 641-645.

[24] Keiding K. ; Wybrandt L. ; Nielsen P. Remember the water - A comment on EPS colligative properties. Water Science and Technology [en ligne]. 2001, 43 (6), 17-23.

[25] Curvers D. ; Usher S.P. ; Kilcullen A.R. ; Scales P.J. ; Saveyn H. ; Van der Meeren P. The influence of ionic strength and osmotic pressure on the dewatering behaviour of sewage sludge. Chemical Engineering Science [en ligne]. 2009, 64 (10), 2448-2454.

[26] Mikkelsen L.H. ; Keiding K. Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (10), 2451-2462.

[27] Jorand F. ; Zartarian F. ; Thomas F. ; Block J.C. ; Bottero J.Y. ; Villemin G. ; Urbain V. ; Manem J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research [en ligne]. 1995, 29 (7), 1639-1647; DOI 10.1016/S0043-1354/95

[28] Li D.H. ; Ganczarczyk J.J. Structure of activated sludge flocs. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 1990, 35 (1), 57-65.

[29] Keiding K. ; Nielsen P.H. Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition. Water Research [en ligne]. 1997, 31 (7), 1665-1672.

[30] Frølund B. ; Palmgren R. ; Keiding K. ; Nielsen P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research [en ligne]. 1996, 30 (8), 1749-1758.

[31] Klausen M.M. ; Thomsen T.R. ; Nielsen J.L. ; Mikkelsen L.H. ; Nielsen P.H. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. FEMS Microbiology Ecology [en ligne]. 2004, 50 (2), 123-132.

[32] Kuntz I.D. ; Kauzman W. Hydration of Proteins and Polypeptides. Advances in Protein Chemistry [en ligne]. 1974, 28 (C), 239-345.

[33] Urbain V. ; Block J.C. ; Manem J. Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach. Water Research [en ligne]. 1993, 27 (5), 829-838.

[34] Eriksson L. ; Alm B. Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated sludge properties. Water Science and Technology [en ligne]. 1991, 24 (7), 21-28.

[35] Frølund B. ; Palmgren R. ; Keiding K. ; Nielsen P.H. A comparative study of biopolymers from a conventional and an advanced activated sludge treatment plant. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 29 (7), 137-141.

[36] Korenevski A.A. ; Vinogradov E. ; Gorbi Y. ; Beveridge T.J. Characterisation of the lipopolysaccharides and capsules of Shewanella spp. Applied Environmental Microbiology [en ligne]. 2002, 68 (9), 4653-4657; DOI 10.1128/AEM.68.9.4653-4657.2002

[37] Chen J. ; Hessler J.A. ; Putchakayala K. ; Panama B.K. ; Khan D.P. ; Hong S. ; Mullen D.G. ; DiMaggio S.C. ; Som A. ; Tew G.N. ; Lopatin A.N. ; Baker J.R. ; Banaszak Holl M.M. ; Orr B.G. Cationic nanoparticles induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes. Journal of Physical Chemistry B [en ligne]. 2009, 113 (32), 11179-11185.

[38] Arrington S.A.; Zeleznik M.J.; Ott D.W.; Ju L.K. Effects of polyethyleneimine on cyanobacterium Anabaena flos-aquae during cell flocculation and flotation. Enzyme Microbiology Technology [en ligne]. 2003, 32, 290-293; DOI 10.1016/S0141-0229(02)00294-6

Chapitre 4

Influence de la masse moléculaire du polyéthylèneimine sur la floculation de cellules bactériennes présentant ou non des surstructures

Chapitre 4 : Influence de la masse moléculaire du polyéthylèneimine sur la floculation de cellules bactériennes présentant ou non des surstructures

Dans la suite de ce travail, nous allons utiliser les abréviations suivantes :

- polyéthylèneimine de masse moléculaire 600 g/mol : $PEI_{600g/mol}$,
- polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol : $PEI_{60000g/mol}$,
- polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol : $PEI_{750000g/mol}$.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'influence de la masse moléculaire du PEI sur le mécanisme de floculation des bactéries Schewanella *Oneidensis* MR-1 présentant ou non des surstructures. Deux polymères sont étudiés. Le premier présente une masse moléculaire inférieure à celui étudié dans le chapitre précédant, 600 g/mol, et est largement utilisé en médecine pour la transfection de gènes et ses propriétés de diffusion intracellulaires liées à sa faible taille [1-3]. Le second polymère, de masse moléculaire très élevée, 750000g/mol, intervient fréquemment dans le conditionnement des boues d'épuration [4]. Pour chacun de ces polymères, nous allons évaluer l'impact des surstructures membranaires sur la floculation bactérienne.

I. Floculation des cellules bactériennes par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol

I.1 Etude des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures lipopolysaccharidiques

I.1.1 Résultats

Les graphiques présentés dans la figure 1 décrivent l'évolution de la densité optique du surnageant (ce qui correspond à la turbidité), de la mobilité électrophorétique (Figure 1.A), de la taille des agrégats (Figure 1.B), du pH (Figure 1.C) et de la conductivité (Figure 1.D) en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$. L'évolution de ces différents paramètres nous

conduit à différencier deux domaines de concentrations suivant que la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ soit inférieure ou supérieure à 5 mg/L, domaines que nous avons respectivement nommés C1 et C2.

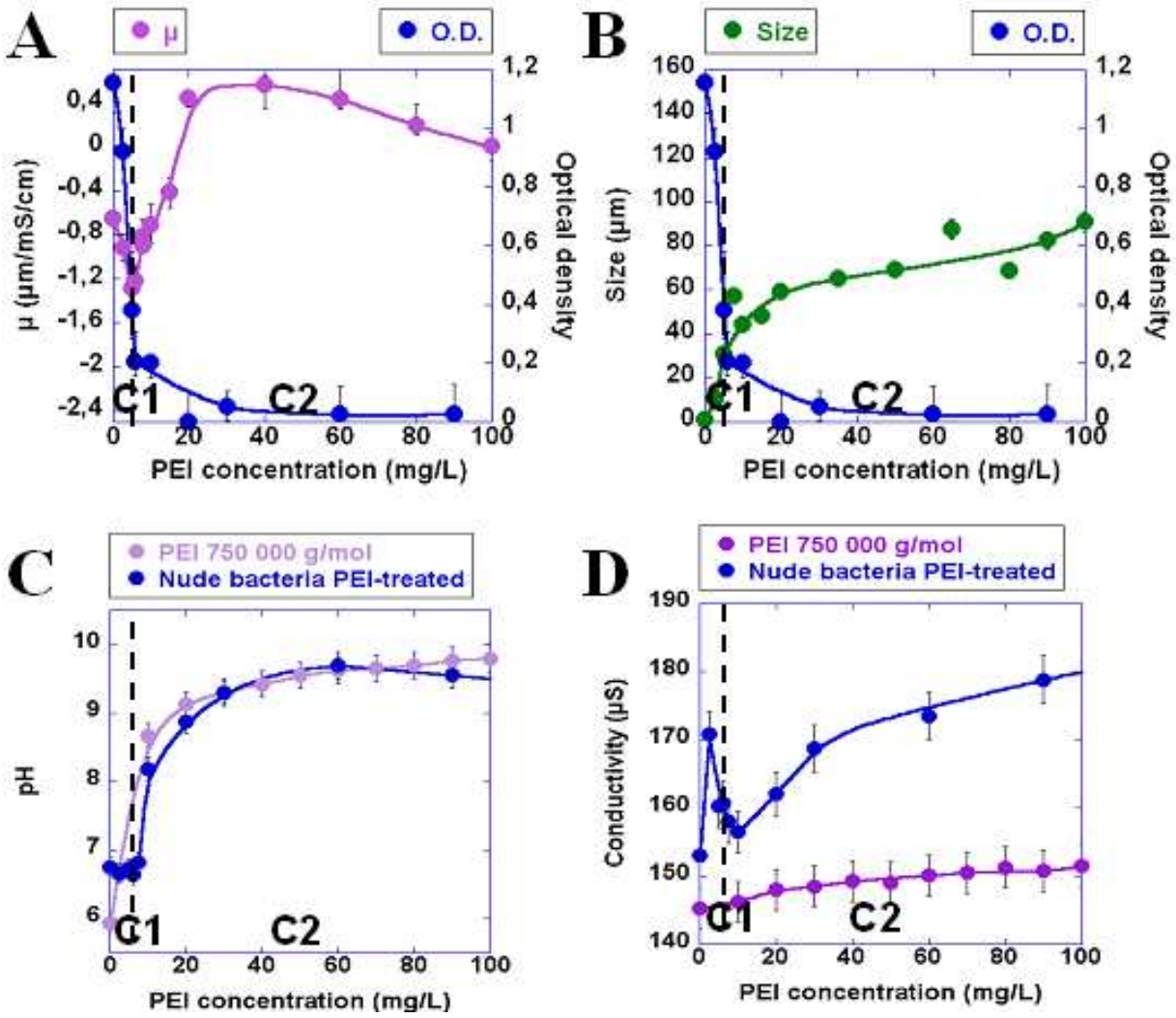


Figure 1 : Evolution de A. la densité optique (O.D.) et de la mobilité électrophorétique (μ), B. de la densité optique (O.D.) et de la taille des particules, C. du pH et D. de la conductivité d'une suspension de bactéries ne présentant pas de surstructures, floculée et d'une solution ne contenant que du polymère, en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ (mg/L).

Le domaine C1 est caractérisé par une diminution de la densité optique et une augmentation de la taille des particules (Figures 1.A et 1.B). Conjointement à ces phénomènes, on observe un pic de mobilité électrophorétique en valeur négative (Figure 1.A) ainsi qu'un pic de conductivité à 170 µS (Figure 1.D), tandis que la valeur du pH de la suspension reste proche de sa valeur initiale de 6.8 (Figure 1.C).

On peut noter que les mesures de pH et de conductivité de ce polymère effectuées en l'absence de cellules bactériennes (Figure 1.C et 1.D) donnent des valeurs nettement différentes de celles obtenues pour la suspension bactérienne traitée au $PEI_{750000g/mol}$. Les valeurs de pH sont supérieures, 7.8 pour 5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ contre 6.8 pour les bactéries traitées avec la même concentration. A l'inverse, les valeurs de conductivité de ce polymère en solution sont très inférieures : 145 µS pour la solution ne contenant que du $PEI_{750000g/mol}$ et 160 à 170 µS pour la suspension traitée. Cela démontre que ce sont bien les interactions s'opérant entre les cellules bactériennes et le polymère qui sont à l'origine de l'évolution de ces paramètres et non, le polymère uniquement.

Lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ dépasse les 5 mg/L, la densité optique reste stable, à des valeurs proches de 0 (Figure 1.A). La taille des agrégats augmente faiblement et de manière constante, de 60 à 80 µm environ (Figure 1.B). On assiste également à une importante augmentation de la mobilité électrophorétique dont le signe s'inverse, 0.4 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$ pour une concentration d'environ 30 mg/L, suivie d'une légère diminution, jusqu'à atteindre la neutralité pour 100 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 1.A). Enfin, la conductivité augmente d'environ 155 à 180 µS pour les concentrations en $PEI_{750000g/mol}$ les plus élevées (60 à 100 mg/L) et le pH connaît une hausse très importante entre 5 et 30 mg/L de polymère, puis se stabilise à la valeur de 9.5 (Figure 1.C).

La figure 2 présente l'évolution de la quantité de cristal violet relargué en solution et du temps nécessaire au doublement de la population bactérienne, en fonction de la quantité de $PEI_{750000g/mol}$ au contact de la suspension.

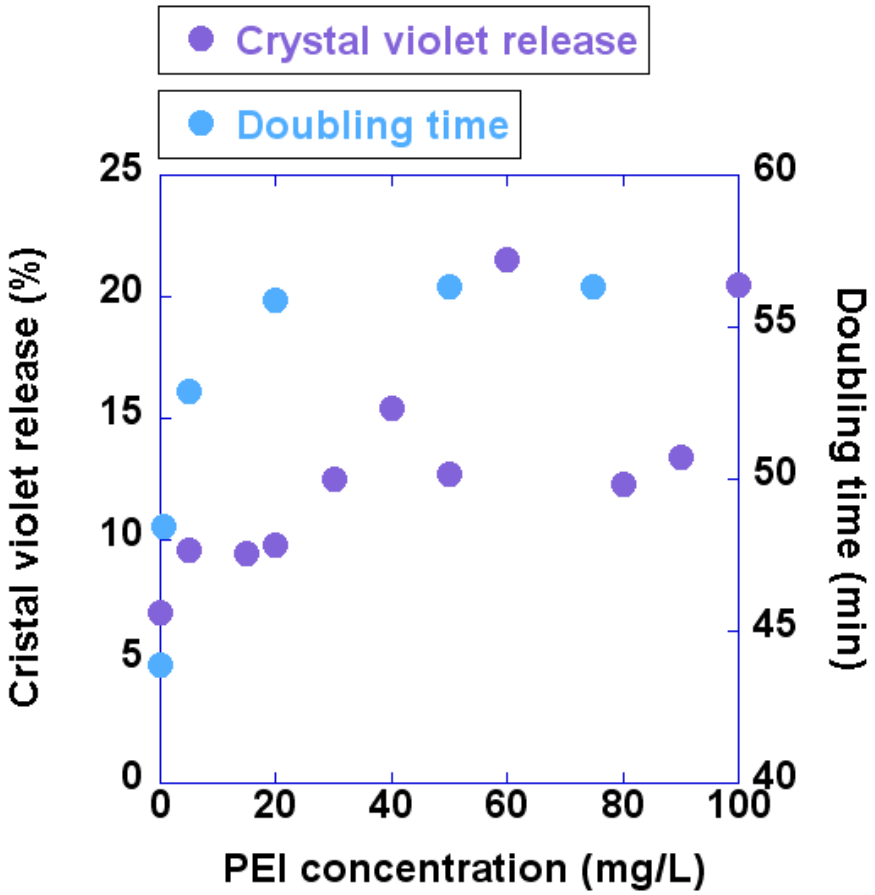


Figure 2 : Evolution du taux de relargage de cristal violet et du temps de génération de la population bactérienne ne présentant pas de surstructures polymériques en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$.

Bien que ces méthodes d'analyse ne soient pas suffisamment précises pour déceler finement les mécanismes et les interactions se produisant entre les membranes bactériennes et les macromolécules de $PEI_{750000g/mol}$, celles-ci nous autorisent néanmoins à évaluer l'état d'intégrité des cellules bactériennes. Le temps de génération augmente de 44 à 53 minutes lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ atteint 5 mg/L avant de se stabiliser à 56 minutes dès 20 mg/L de polymère. De la même manière, le taux de relargage de cristal violet atteint 10% dès 5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, puis augmentent jusqu'à des valeurs comprises entre 13 et 20% dès une concentration en $PEI_{750000g/mol}$ de 30 mg/L.

I.1.2 Observations

La figure 3 présente les observations des agrégats bactériens en microscopie à force atomique (AFM) (Figure 3.C1.a et 3.C2.a) et en microscopie électronique en transmission (MET)

(Figure 3.C1.b et 3.C2.b). Notons que le fait que ces observations présentent le même type d'altération prouve que les dommages observés en MET ne sont pas liés à des artéfacts provenant du traitement subi lors de l'inclusion en résine des échantillons.

Lorsque la concentration est comprise dans le domaine C1, respectivement 2.5 et 5 mg/L pour les observations MET (Figure 3.C1.b) et AFM (Figure 3.C1.a), les bactéries présentent d'importantes altérations membranaires. En effet, sur les observations en MET, les membranes apparaissent comme étirées, distendues (Figure 3.C1.b). On voit également des morceaux de membranes arrachés (encadré rouge 1, Figure 3.C1.b), et des halos correspondant à des fuites de matériel cytoplasmique (encadré rouge 2, Figure 3.C1.b) dues à des altérations membranaires. Sur les observations en AFM (Figure 3.C1.a), les membranes bactériennes sont altérées, paraissent rugueuses et présentent de nombreuses boursouflures, d'une taille d'environ 200 nm. On peut observer la présence de résidus cellulaires (encadrés rouges, Figure 3.C1.a). A titre de comparaison, les bactéries non traitées avec du $PEI_{750000g/mol}$ présentent des membranes lisses (Figures 3.C0.a et 3.C0.b).

Lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est supérieure à 5 mg/L, les observations MET (20 mg/L) ne montrent plus de cellules bactériennes intègres (Figure 3.C2.b). On observe des membranes enroulées sur elles-mêmes (encadré rouge 1, Figure 3.C2.b), ainsi que des bactéries vidées de leur contenu cytoplasmique. Des halos correspondant au contenu cytoplasmique des bactéries sont visibles sur l'encadré rouge 2, figure 3.C2.b. Sur les observations AFM (30 mg/L), des agrégats bactériens sont visibles, mais les corps cellulaires sont difficilement identifiables (Figure 3.C2.a). Ces agrégats sont en fait composés de résidus cellulaires dont certains apparaissent de manière isolée sur l'échantillon (encadré rouge, Figure 3.C2.a).

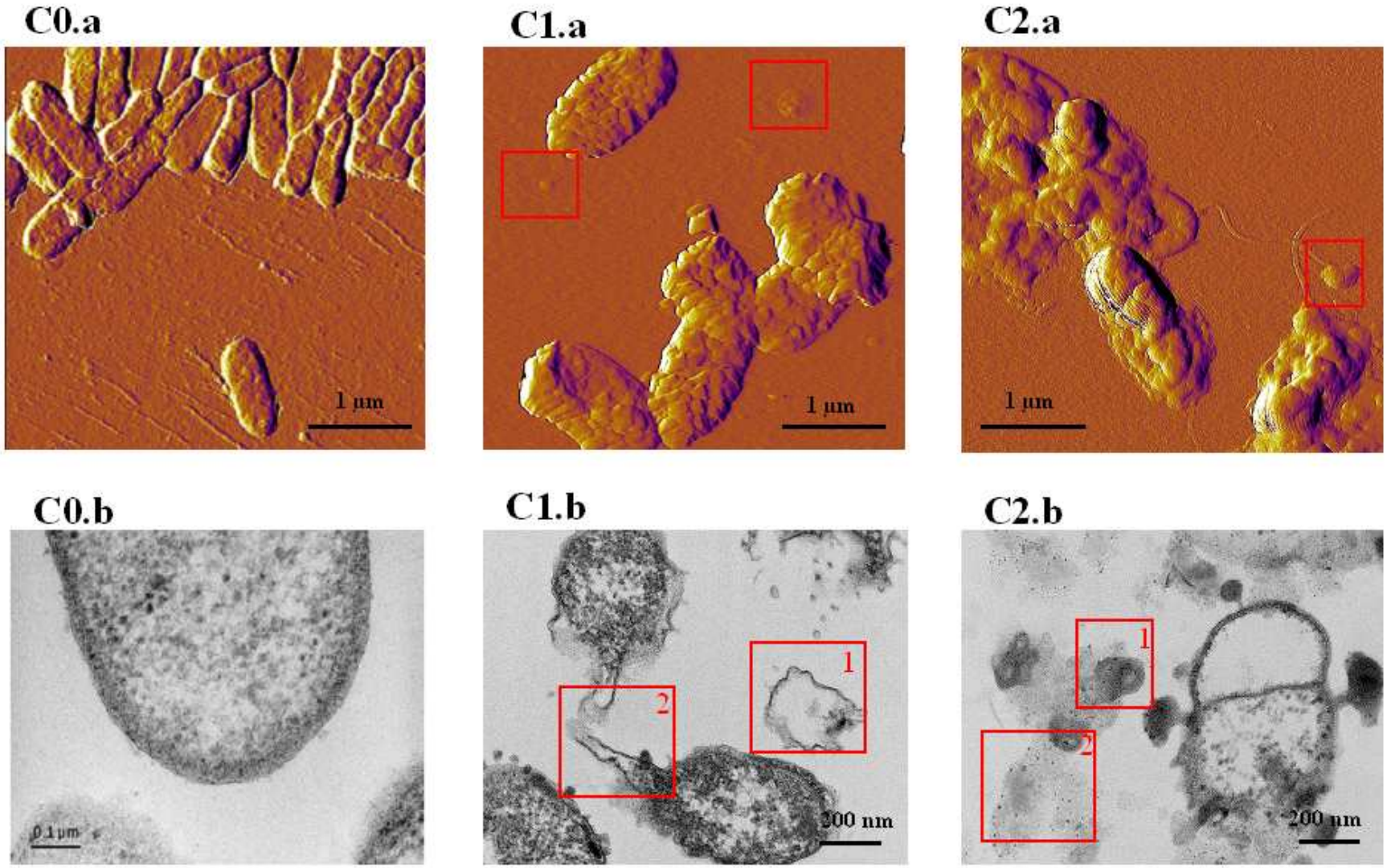


Figure 3 : Observations AFM de bactéries C0.a. à l'état initial, en présence de C1.a 5 et C2.a 20 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ et MET de bactéries C0.b à l'état initiale, en présence de C1.b 2.5 mg/L et C2.b 30 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$.

I.1.3 Discussion

La figure 4 résume les mécanismes d'altération et d'agrégation observés.

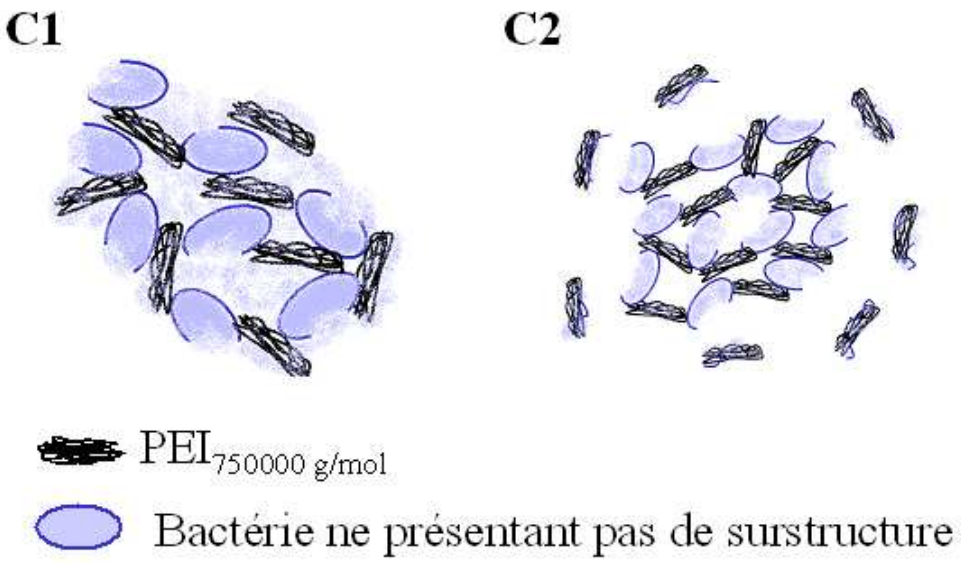


Figure 4 : Schéma décrivant l'action du $PEI_{750000g/mol}$ pour les domaines de concentration C1. 0 – 5 mg/L et C2. 5 – 100 mg/L.

Dans le premier domaine de concentration, entre 0 et 5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, la diminution de la densité optique (Figure 1.A) corrélée à l'augmentation de la taille des particules (Figure 1.B) montrent clairement qu'il y a agrégation des cellules bactériennes, comme le confirment les observations effectuées en MET (Figure 3.C1.b) et AFM (Figure 3.C1.a). Le pic en valeur négative de la mobilité électrophorétique (Figure 1.A) témoigne du fait qu'il y a une libération de matériel cytoplasmique chargé négativement dans le milieu. Le pic de conductivité (Figure 1.D) démontre que le polymère est présent en trop faible concentration pour compenser cet afflux. De plus, l'augmentation du taux de relargage de cristal violet atteste l'hypothèse de l'altération/perméabilisation des membranes bactériennes conduisant à un début d'érosion des agrégats (Figure 4.C1). Ce sont ces altérations que nous observons sur les images MET et AFM en figure 3.C1.b et 3.C1.a. Un comptage effectué à partir des observations MET montre qu'environ 90% des bactéries ont subi d'important dommages membranaires. En effet, la toxicité du polymère pour les cellules bactériennes est soulignée par une hausse importante du temps de génération. Notons que la stabilité du pH à des valeurs proches de la valeur initiale (Figure 1.C) démontre que les molécules de $PEI_{750000g/mol}$ sont

mobilisées par l'adsorption sur les membranes bactériennes et n'influent d'aucune façon sur le pH de la suspension.

Lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est supérieure à 5 mg/L, il y a toujours formation de flocs bactériens, comme le confirme la densité optique proche de 0 (Figure 1.A) et l'augmentation de la taille des agrégats (Figure 1.B). La croissance constante de la conductivité (Figure 1.D) et du taux de cristal violet libéré dénote une perméabilisation des membranes conduisant à un afflux d'ions dans la suspension. Cela montre que la lyse bactérienne s'intensifie ainsi que l'érosion des agrégats (Figure 4.C2), comme nous avons pu le constater sur les observations MET et AFM (Figure 3.C2.b et 3.C2.a). Par ailleurs, le comptage réalisé à partir des images MET permet de constater que la totalité des bactéries ont été lysées. Le fait que la mobilité électrophorétique augmente (Figure 1.A) jusqu'à la neutralité montre qu'il y adsorption progressive du polymère sur les agrégats bactériens, ce qui permet d'en neutraliser les charges négatives. Enfin, la forte augmentation du pH (Figure 1.C) nous permet de dire que le polymère est en excès par rapport aux cellules bactériennes et qu'il subsiste donc des molécules de $PEI_{750000g/mol}$ en solution, contrôlant le pH de la suspension.

I.2 Etude des cellules bactériennes présentant des surstructures lipopolysaccharidiques

I.2.1 Résultats

La figure 5 présente l'évolution de la densité optique du surnagent et de la mobilité électrophorétique (Figure 5.A), de la taille des agrégats (Figure 5.B), du pH (Figure 5.C) et de la conductivité (Figure 5.D) en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$.
Dans ce cas également, les corrélations que nous avons pu établir entre l'évolution de ces différents paramètres nous permettent de distinguer différents domaines de concentrations correspondant à une succession d'étapes d'agrégation des cellules bactériennes par le $PEI_{750000g/mol}$. Ces domaines sont désignés de la façon suivante : D1, D2 et D3 et correspondent respectivement aux concentrations en $PEI_{750000g/mol}$ suivantes : 0-7, 7-10 et 10-100 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$.

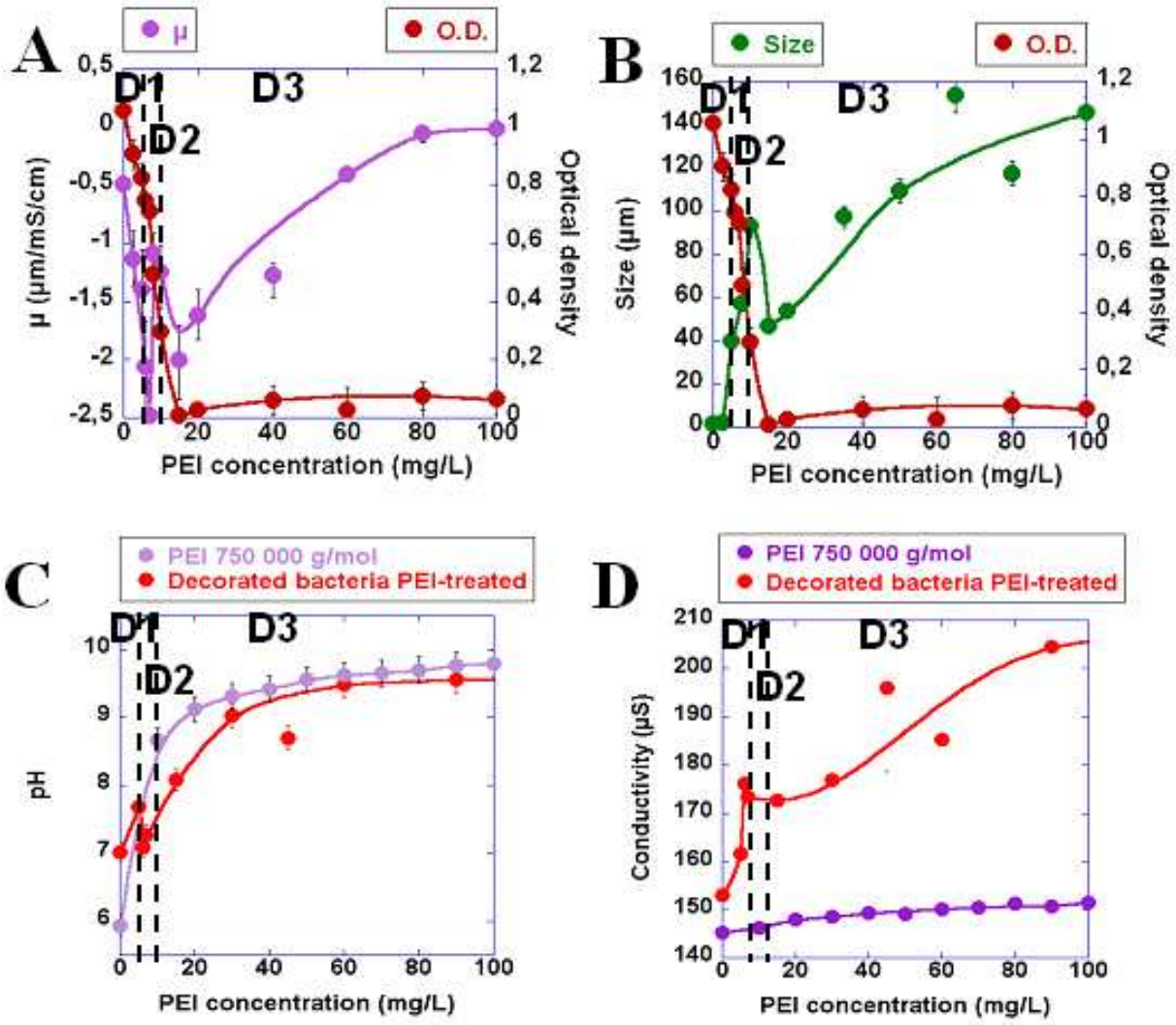


Figure 5 : Evolution de A. la densité optique (O.D.) et de la mobilité électrophorétique (μ), B. de la densité optique (O.D.) et de la taille des particules, C. du pH et D. de la conductivité d'une suspension de bactéries présentant une surstructure polysaccharidique, floculée et d'une solution ne contenant que du polymère, en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ (mg/L).

Pour des concentrations comprises entre 0 et 7 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, on observe une diminution de densité optique, atteignant environ 0.4 (Figure 5.A) parallèlement à une augmentation de la taille des particules jusqu'à 40 µm environ (Figure 5.B). De plus, l'évolution de la mobilité électrophorétique marque un pic en valeur négative (-2.5 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, Figure 5.A) corrélée à une légère augmentation de pH, qui passe d'une valeur de 7 à 7.8 (Figure 5.C). Enfin, on note une hausse de la conductivité jusqu'à 175 µS (Figure 5.D).

Lorsque l'on se trouve dans le domaine de concentrations en $PEI_{750000g/mol}$ correspondant à D2, la densité optique continue de diminuer (0.3, Figure 5.A), tandis que la taille des particules marque un pic à environ 100 µm (Figure 5.B). La mobilité électrophorétique augmente jusqu'à une valeur de 1.1 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$ (Figure 5.A), et de manière antithétique, le

pH connaît une diminution jusqu'à la valeur d'environ 7 (Figure 5.C). Néanmoins, la conductivité reste stable à 175 µS environ (Figure 5.D).

Enfin, pour des concentrations supérieures à 10 mg/L, la densité optique se stabilise à des valeurs proches de 0 (Figure 5.A). La taille des particules, après avoir chutée à environ 40 µm pour une concentration de 15 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, augmente de manière continue et atteint une taille moyenne d'environ 150 µm (Figure 5.B). De la même manière, après avoir diminuée à -2 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, la mobilité électrophorétique augmente et se stabilise aux alentours de la neutralité aux environs de 80 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 5.A). Le pH et la conductivité augmentent également de façon monotone pour atteindre respectivement les valeurs de 9 et 200 µS environ (Figure 5.C et 5.D). Notons tout d'abord que les valeurs de conductivité sont nettement supérieures à celles obtenues pour une solution contenant uniquement du $PEI_{750000g/mol}$. De plus, le pH atteint la valeur de 9 pour une concentration en polymère de 40 mg/L. Cette même valeur est atteinte dès 20 mg/L lorsque la solution ne contient que du $PEI_{750000g/mol}$.

La figure 6 présente l'évolution de la quantité de cristal violet relargué et du temps de génération, en fonction de la quantité de PEI au contact de la suspension.

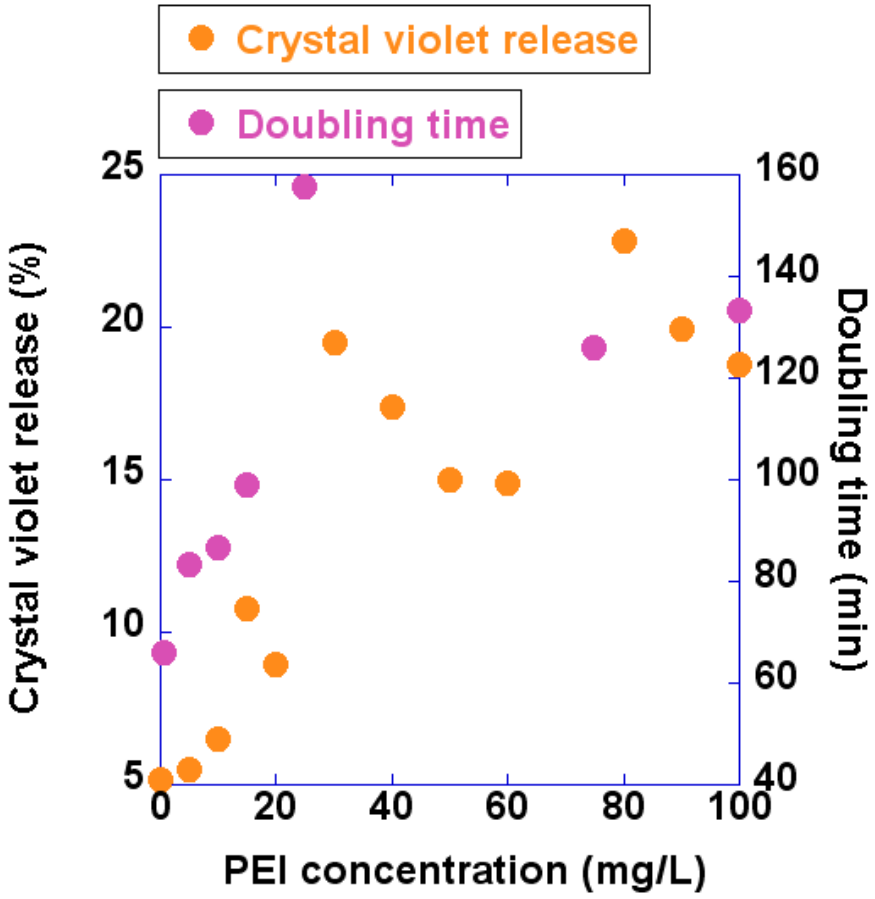


Figure 6 : Evolution du taux de relargage de cristal violet et du temps de génération d'une population bactérienne présentant des surstructures polysaccharidiques en fonction de la concentration en $PEI_{750000g/mol}$.

Comme on peut le voir sur cette figure, le temps de génération augmente très fortement dès les plus faibles concentrations en $PEI_{750000g/mol}$. En effet, on constate une augmentation de 65 minutes pour une suspension ne contenant pas de $PEI_{750000g/mol}$ à 100 minutes pour une suspension contenant 20 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, ce qui constitue une augmentation d'environ 40% de la valeur initiale. Finalement, lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ dépasse 30 mg/L, le temps de génération atteint, voir surpasse les 130 minutes, soit environ trois fois sa valeur initiale. Le taux de relargage de cristal violet reste faible et proche de sa valeur initiale lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est comprise entre 0 et 15 mg/L, puis augmente fortement entre 15 et 30 mg/L et se stabilise à une valeur moyenne de 20% environ.

I.2.2 Observations

La Figure 7 représente les observations MET (Figure 7.a) et AFM (Figure 7.b) des bactéries présentant la partie antigène O du lypopolysaccharide (AgO-LPS) à l'état initial.

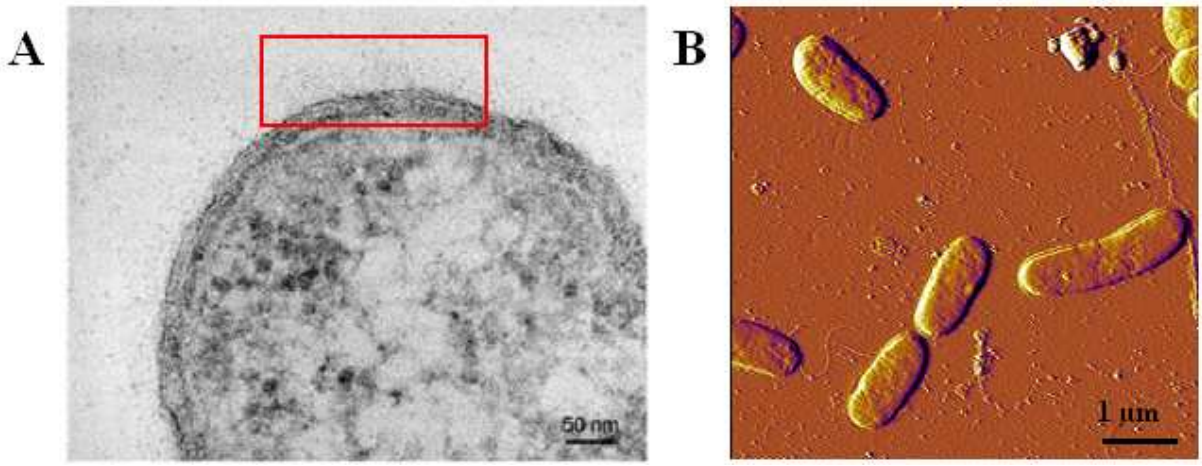


Figure 7 : Observations A. MET et B. AFM de bactéries présentant des surstructures à l'état natif.

Les observations effectuées en AFM et MET (Figure 8) de ces agrégats bactériens pour les trois domaines de concentrations définis ci-dessus sont présentées respectivement par les figures 8.D1.a, 8.D3.aa, 8.D3.ab et 8.D1.b, 8.D2.b, 8.D3.b.

Pour une concentration de 5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (domaine D1), on observe des agrégats de cellules bactériennes dont les membranes sont partiellement altérées. Les clichés MET (Figure 8.D1.b) montrent qu'environ 50% des cellules bactériennes présentent des membranes « plissées » (encadré rouge 1, Figure 8.D1.b), distendues et parfois discontinues (encadré rouge 2, Figure 8.D1.b). Cela souligne le fait qu'elles ont subi des altérations (dans le cas de bactéries à l'état natif, les membranes sont « lisses » et continues (Figure 7.a et 7.b)). Les surtructures membranaires (AgO-LPS) visibles en microscopie électronique sur des bactéries non traitées (encadré rouge, Figure 7.a), ne sont plus apparentes. En AFM (Figure 8.D1.a), on constate que les membranes cellulaires présentent une certaine rugosité, par rapport aux échantillons de contrôle non traités (Figure 7.b). De plus, on peut voir des structures résiduelles autour du corps bactérien (encadré rouge, Figure 8.D1.a).

Lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est de 8 mg/L (domaine D2), bien que les bactéries sont toujours organisées en agrégats, on peut constater, sur les micrographies, que les

dommages cellulaires sont plus importants (Figure 8.D2.b). On observe toujours des bactéries présentant des membranes plissées, discontinues. Certaines d'entre elles portent des structures résiduelles pouvant correspondre à du matériel intracellulaire excrété (encadré rouge 1, Figure 8.D2.b). D'autres membranes paraissent vidées de leur contenu cytoplasmique. Notons qu'un comptage nous a permis d'estimer à environ 60 %, la proportion de bactéries ayant subi des dommages irréversibles. De plus, des halos correspondant vraisemblablement à des organites cytoplasmiques relargués (encadré rouge 2, Figure 8.D2.b) sont présents sur les coupes observées.

Nous avons réalisé des observations AFM pour une concentration de 30 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 8.D3.aa), comprise dans le domaine D3. On observe des cellules bactériennes organisées en agrégats. Les membranes de ces cellules présentent une certaine rugosité témoignant d'une altération liée à la présence du polymère. Certaines bactéries ont un relief très faible, de l'ordre de 50 nm, ce qui laisse penser qu'elles se sont vidées de leur cytoplasme (encadré rouge 1, Figure 8.D3.aa). Enfin, on distingue des structures correspondant à des résidus bactériens sur les membranes bactériennes et à la surface de la plaque verre (encadré rouge 2, Figure 8.D3.aa).

Enfin, les images AFM (Figure 8.D3.ab) et MET (Figure 8.D3.b), pour des concentrations respectives en $PEI_{750000g/mol}$ de 90 et 100 mg/L, permettent d'observer des agrégats au sein desquels les cellules bactériennes sont difficilement identifiables. La totalité des bactéries a été lysée. En MET, les agrégats se présentent sous la forme de membranes bactériennes et corps ou organites intracellulaires formant probablement des complexes avec les molécules de $PEI_{750000g/mol}$. En AFM, on distingue ce qui semble être des enveloppes bactériennes en phase de se vider de leur contenu cytoplasmique.

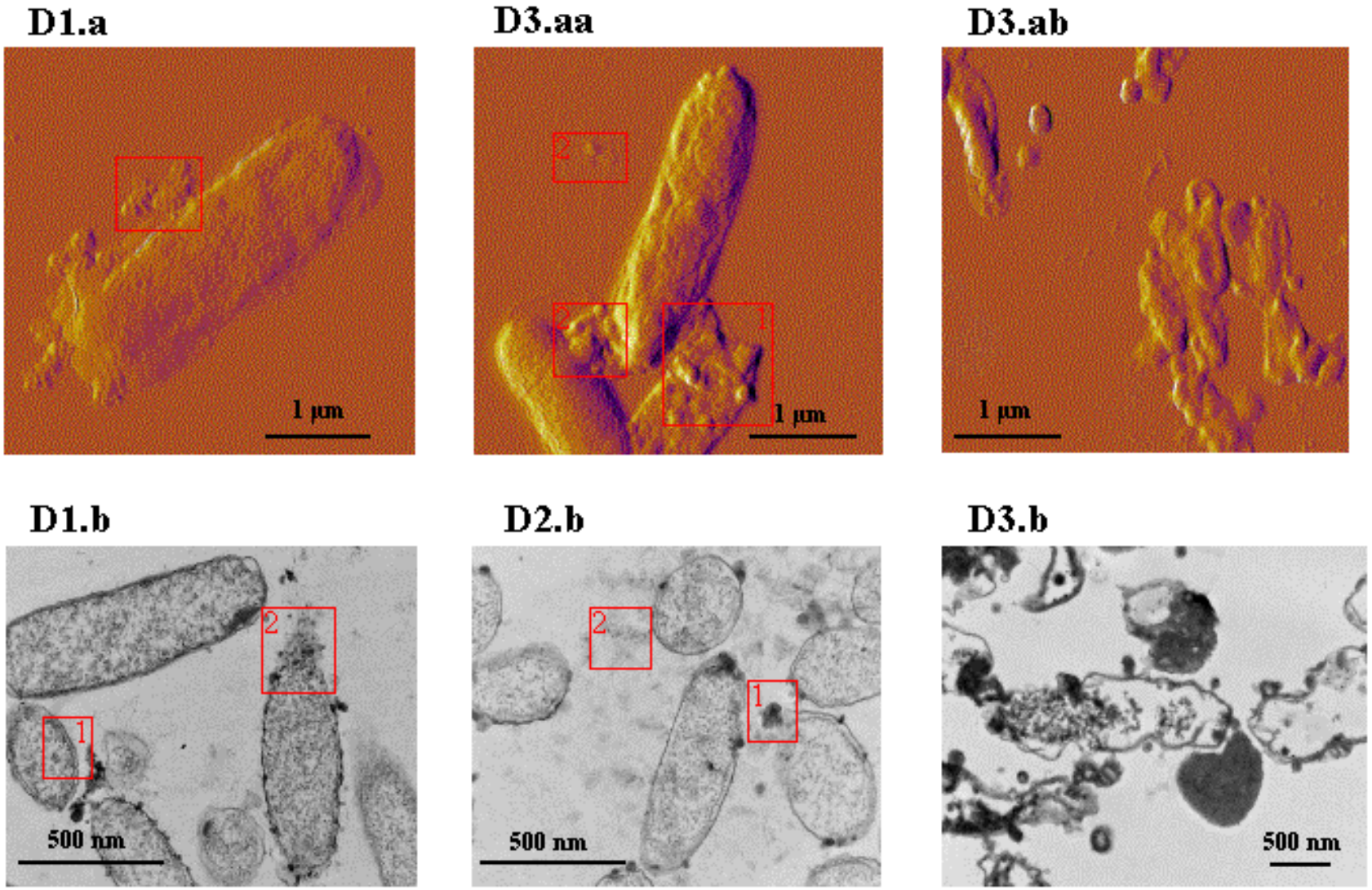


Figure 8 : Observations AFM de bactéries en présence de D1.a. 5, D3.aa. 30 et D3.ab 90 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ et MET de bactéries en présence de D1.b. 5, D2.b. 8 et D3.b 100 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$.

I.2.3 Discussion

Tout d'abord, on peut noter que quelle que soit la concentration en $PEI_{750000g/mol}$, il y a agrégation des cellules bactériennes, comme le montre la densité optique proche de zéro (Figure 5.A) et la taille des particules (Figure 5.B) qui augmente jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres dès les plus faibles concentrations en $PEI_{750000g/mol}$, sachant que la taille unitaire des bactéries est de l'ordre de 2 µm.

La figure 9 résume les mécanismes de l'agrégation par du $PEI_{750000g/mol}$ pour chacun des domaines de concentration définis plus tôt.

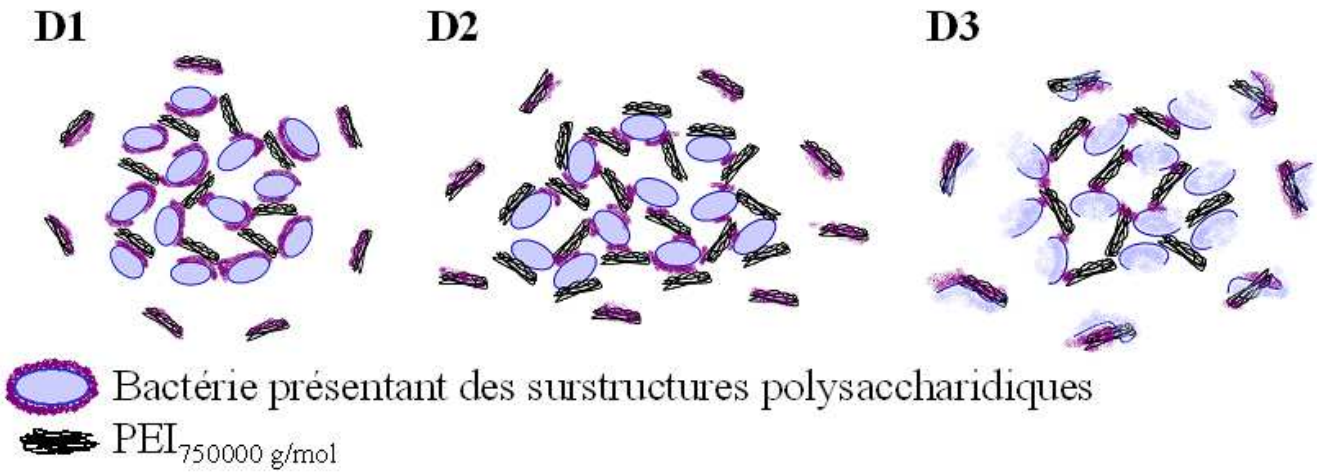


Figure 9 : Schéma décrivant l'action du $PEI_{750000g/mol}$ pour les domaines de concentration D1. 0 – 7 mg/L, D2. 7 – 10 mg/L et D3. 10 – 100 mg/L.

Lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est comprise entre 0 et 7 mg/L, de la même manière que lors de l'agrégation de ce type de cellules par un $PEI_{60000g/mol}$, les charges négatives des membranes bactériennes sont mises à nu, comme l'indique la chute de la mobilité électrophorétique (Figure 5.A). Celle-ci s'explique par la formation de complexes AgO-LPS/$PEI_{750000g/mol}$ provoquant le relargage des LPS qui ne masquent plus les charges négatives portées par les agrégats/bactéries (Figure 9.D1). La taille et la charge globale du $PEI_{750000g/mol}$ sont telles que les LPS ne suffisent pas à neutraliser le polymère, ce qui se traduit par une hausse de pH. De plus, l'augmentation quasi-immédiate du temps de génération (Figure 6) prouve que le relargage des LPS induit des altérations importantes des cellules bactériennes, comme nous avons pu le voir précédemment. Cette hypothèse est validée par les observations effectuées en MET et AFM (Figure 8.D1.a et 8.D1.b), sur lesquelles il est visible que même si

les membranes bactériennes sont endommagées, les bactéries n'ont pas pour autant subi de lyse. Enfin, l'augmentation de la conductivité (Figure 5.D) provient majoritairement des complexes AgO-LPS/$PEI_{750000g/mol}$ en solution, mais également de la perméabilité des membranes (dont le relargage des LPS est à l'origine). Cependant, la contribution de cette dernière composante reste limitée, ce qui est montré par une très faible augmentation du taux de libération de cristal violet (Figure 6).

Si la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est comprise entre 7 et 10 mg/L, le fait que la mobilité électrophorétique augmente (Figure 5.A) prouve qu'il y a adsorption du polymère sur les membranes bactériennes mises à nu, et donc neutralisation de la charge des agrégats. Le comptage effectué d'après les observations MET nous permet d'estimer à 60% le taux de bactéries ayant subi des dommages irréversibles. Précisons que, dans la mesure où l'observation se fait à partir d'une coupe, les bactéries apparaissant intègres sont susceptibles de porter des arrachement n'apparaissant pas sur la section. Certaines d'entre elles se trouvent vidées de leur cytoplasme. Cette information, associée à l'augmentation forte du taux de génération et à la légère hausse du taux de libération du cristal violet (Figure 6), nous permet de dire que l'altération des membranes s'intensifie, ce qui conduit à la libération de matériel intracellulaire dans le milieu extérieur. La concentration de ces résidus est alors suffisamment importante pour neutraliser la charge des complexes AgO-LPS/$PEI_{750000g/mol}$, ce qui explique la chute de pH (Figure 5.C), ainsi que la stabilité de la conductivité pour ce domaine (Figure 5.D). Enfin, on peut noter que les agrégats atteignent une taille maximale d'environ 100 µm (Figure 5.B), très supérieure à celle obtenue pour des bactéries ne présentant pas de surstructure. Ce comportement est induit par l'encombrement stérique provoqué à la fois par la présence de certaines parties AgO-LPS subsistant sur les membranes et par la taille du $PEI_{750000g/mol}$ qui ne peut s'adsorber entièrement à la surface des bactéries (Figure 9.D2).

Finalement, lorsque la concentration en $PEI_{750000g/mol}$ est supérieure à10 mg/L, l'adsorption de $PEI_{750000g/mol}$ provoque une rupture des membranes bactériennes conduisant à un afflux de matériel intracellulaire dans la suspension. Cette hypothèse est confirmée par la seconde chute de mobilité électrophorétique (Figure 5.A) associée à une forte augmentation du taux de libération du cristal violet (Figure 6). De la même manière que lors de la floculation par le même polymère de bactéries ne présentant pas de surstructure, il y a érosion des flocs. De plus, la diminution de la taille des agrégats pour une concentration de 15 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 5.B) montre qu'il y a rupture des membranes bactériennes dépourvues

de LPS avant que leur neutralisation soit totale. Ce phénomène est également souligné par une croissance conjointe de la conductivité (Figure 5.D) et du taux de libération du cristal violet (Figure 6).

Si la concentration en polymère augmente au-delà de 15 mg/L, un second stade d'agrégation survient (Figure 9.D3), souligné par une nouvelle augmentation de la taille des agrégats (Figure 5.B). Le pH atteint la valeur de 9 pour une concentration en $PEI_{750000g/mol}$ de 40 mg/L (Figure 5.C), on peut donc dire qu'à partir de cette concentration le polymère détermine le pH de la suspension et n'est plus neutralisé par l'afflux de matériel intracellulaire chargé négativement. L'augmentation de la mobilité électrophorétique, qui atteint la neutralité pour 80 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 5.A), nous permet de dire que le polymère s'adsorbe progressivement à la surface des agrégats de matériel intracellulaire, neutralisant ainsi leur charge de surface. Enfin, l'apparition puis l'intensification de cette lyse bactérienne est confirmée à la fois par l'augmentation du taux de génération et par les images AFM prises à 30 et 90 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$ (Figure 8.D2.a et 8.D3.a). Les observations MET (Figure 8.D3.b) nous autorisent à dire que pour une concentration de 100 mg/L, la totalité des bactéries est lysée. Ces dernières attestent également du fait que le second stade d'altération correspond en fait à une altération de matériel et résidus intracellulaire libérés lors de la lyse.

II. Floculation des cellules bactériennes par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 600 g/mol

II.1 Etude des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures lipopolysaccharidiques

II.1.1 Résultats

Les graphiques présentés en figure 10 montrent l'évolution de la densité optique du surnagent ainsi que de la mobilité électrophorétique (Figure 10.A), de la taille des agrégats (Figure 10.B), du pH (Figure 10.C) et de la conductivité (Figure 10.D) en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$.

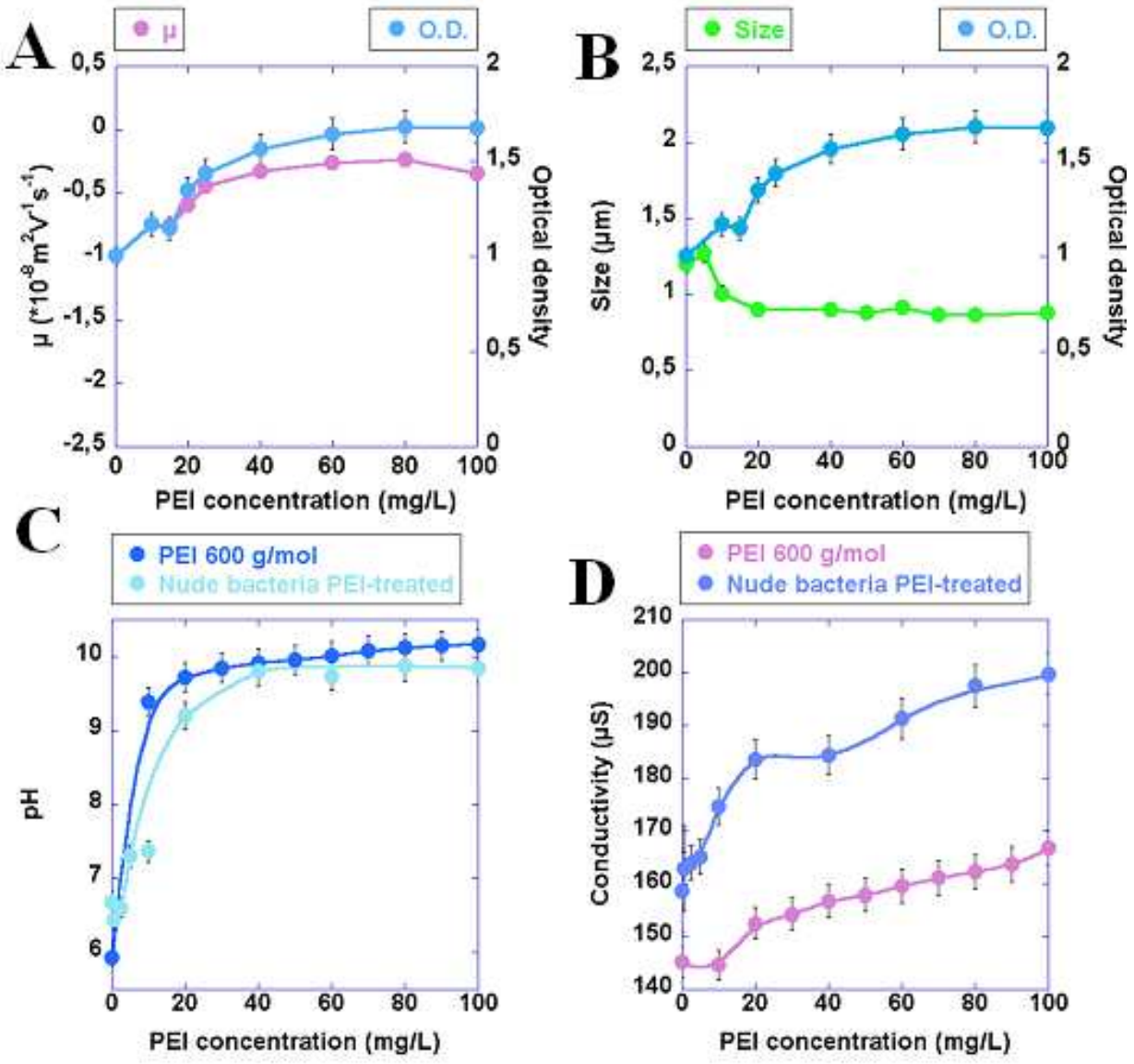


Figure 10 : Evolution de A. la densité optique (O.D.) et de la mobilité électrophorétique (μ), B. de la densité optique (O.D.) et de la taille des particules, C. du pH et D. de la conductivité d'une suspension de bactéries ne présentant pas de surstructure polysaccharidique, floculée et d'une solution ne contenant que du polymère, en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$ (mg/L).

La densité optique augmente relativement rapidement, puis se stabilise à la valeur de 1.7 environ à partir de la concentration de 20 mg/L de $PEI_{600g/mol}$ (Figure 10.A). De la même manière, la taille moyenne des particules diminue de 1.2 à 0.8 µm, puis se stabilise (Figure 10.B), tandis que la mobilité électrophorétique passe d'une valeur de $–0.8\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$ à $–0.5\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$, pour finalement atteindre $–0.4\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$ (Figure 10.A). La valeur du pH s'accroît fortement jusqu'à la valeur de 9 pour une concentration de 20 mg/L de $PEI_{600g/mol}$, puis reste constante à la valeur de 9.8. Cette valeur est légèrement inférieure à celle d'une solution ne contenant que du $PEI_{600g/mol}$, qui est de 10.5 (Figure 10.C). Enfin, la

conductivité évolue de façon croissante, jusqu'à la valeur de 200 µS environ pour 100 mg/L de $PEI_{600g/mol}$, ce qui est nettement supérieur à la valeur atteinte en l'absence de cellules bactériennes (Figure 10.D).

La figure 11 présente l'évolution du temps de génération et du taux de relargage de cristal violet en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$.

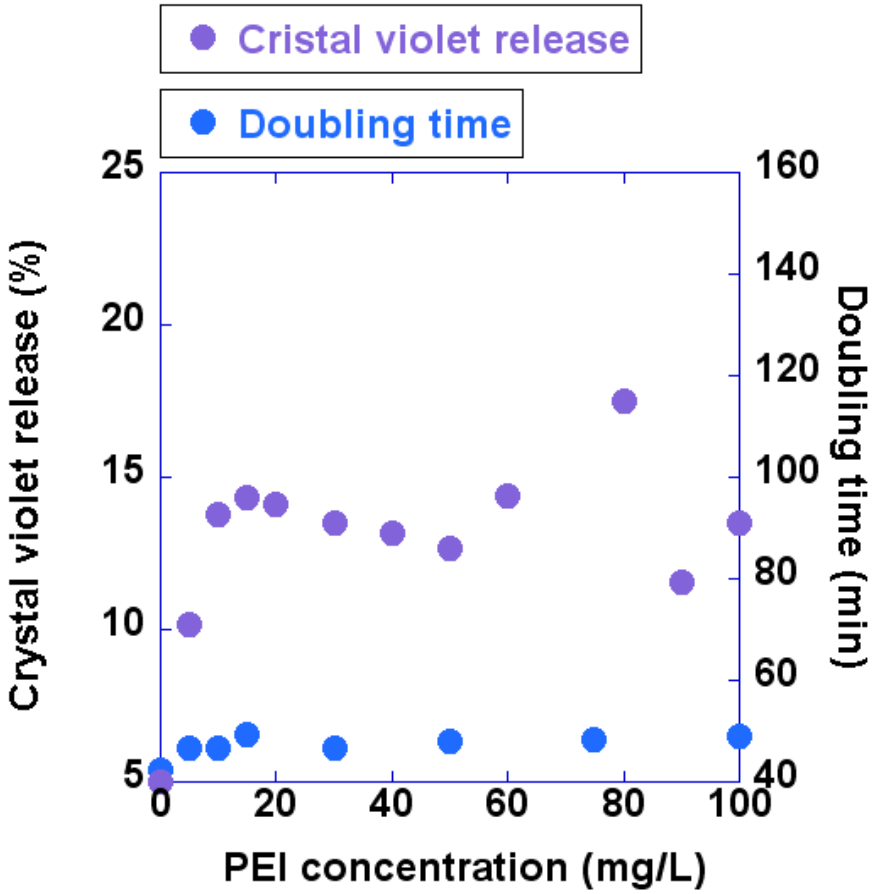


Figure 11 : Evolution du taux de relargage de cristal violet et du temps de génération d'une population bactérienne ne présentant pas de surstructure polysaccharidique en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$.

Dès une concentration de 10 mg/L de $PEI_{600g/mol}$, les mesures d'absorbance permettent de constater que 15% environ du cristal violet est relargué, contre 5% lorsque les cellules bactériennes ne sont pas traitées. Pour les concentrations supérieures, le taux de relargage de cristal violet a une valeur moyenne de 14%. Le taux de génération n'évolue que faiblement, en passant de 42 minutes pour les bactéries natives, à 49 minutes dès une concentration en polymère de 17.5 mg/L de polymère.

II.1.2 Observations

Les observations effectuées en AFM et MET des agrégats bactériens conditionnés au $PEI_{600g/mol}$ sont présentées en figure 12.

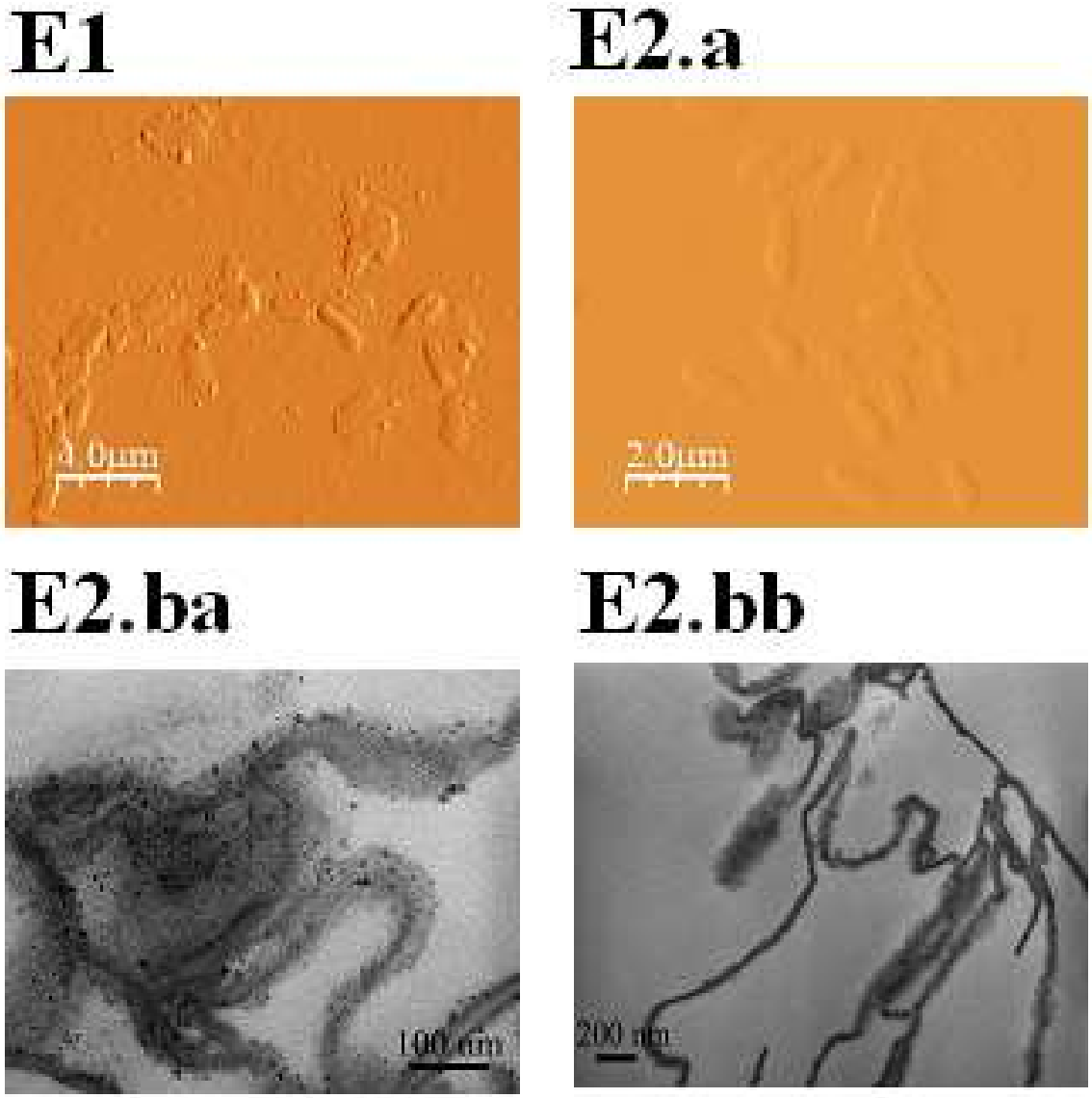


Figure 12 : Observations de bactéries ne présentant pas de surtructures en présence de E1. 20, et E2.a. 100 mg/L de $PEI_{600g/mol}$ et MET de bactéries en présence de E2.ba et E2.bb 100 mg/L de $PEI_{600g/mol}$.

Tout d'abord, notons qu'en raison de l'absence de sédimentation des agrégats, il a été difficile, pour certaines concentrations, de récupérer suffisamment de matériel pour effectuer les inclusions en résine. Pour cette raison, les inclusions que nous avons effectuées pour des concentrations inférieures à 100 mg/L ne sont pas exploitables.

Les observations AFM réalisées pour la concentration de 20 mg/L de $PEI_{600g/mol}$ (Figure 12.E1) montrent des cellules bactériennes isolées. Dans la mesure où la taille des particules mesurée ne dépasse pas le micron, le fait que les bactéries paraissent agrégées est probablement lié au dépôt et au séchage sur la plaque de verre. On observe également des structures circulaires pouvant provenir d'une altération des membranes. Néanmoins, on peut noter que la majorité des cellules bactériennes présentent des membranes lisses, et n'ont donc pas subi de dommages majeurs.

Pour une concentration en $PEI_{600g/mol}$ de 100 mg/L, les tailles des bactéries observées en AFM (Figure 12.E2.a) (0.8 µm, en moyenne), sont nettement inférieures à la taille moyenne des bactéries non traitées (1.2 µm). De plus, les membranes bactériennes sont rugueuses, ce qui montre qu'elles ont été altérées par le contact avec le $PEI_{600g/mol}$. D'autre part, on observe des cellules bactériennes de reliefs très faibles, ce qui laisse penser qu'elles se sont vidées de leur cytoplasme. En outre, les clichés MET (Figures 12.E2.ba et 12.E2.bb) ne permettent pas d'observer de bactéries intègres. On observe des structures filamenteuses, entourées d'un halo granuleux correspondant vraisemblablement à des membranes bactériennes, et leur contenu cytoplasmique. Etant donné que ces structures ne sont pas visibles sur les observations AFM, il est probable qu'il s'agisse d'artefacts dû au traitement d'inclusion en résine.

II.1.3 Discussion

La figure 13 présente le schéma de l'action du $PEI_{600g/mol}$ sur les membranes des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures.

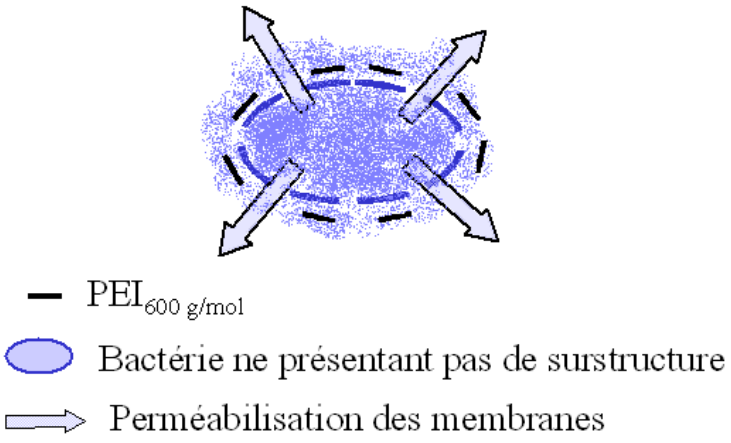


Figure 13 : Schéma décrivant l'action du $PEI_{600g/mol}$.

Tout d'abord, et contrairement aux résultats obtenus précédemment, l'augmentation de la concentration en $PEI_{600g/mol}$ provoque une augmentation de la densité optique associée à une diminution de la taille des particules (Figures 10.A et B). Il apparaît donc clairement qu'il n'y a pas d'agrégation. Cette hypothèse est vérifiée grâce aux observations effectuées en AFM (Figures 12.E1 et 12.E2.a). En effet, il y a adsorption du polymère sur les membranes bactériennes. Cependant, en raison de sa taille trop faible, le $PEI_{600g/mol}$ n'a pas la faculté de former des pontages entre plusieurs bactéries. Cette interprétation est soutenue par une faible augmentation de la mobilité électrophorétique (Figure 10.A), il n'y a donc pas de neutralisation des membranes bactériennes. Le $PEI_{600g/mol}$ se fixe sur les membranes bactériennes sans parvenir à en neutraliser à neutraliser totalement les charges de surface. Cette adsorption a pour effet de perméabiliser les membranes bactériennes (Figure 13), comme le montre les augmentations de la conductivité (Figure 10.D) et du taux de relargage de cristal violet (Figure 11). Cela explique également la diminution de la taille des particules (Figure 10.B).

Au delà de 20 mg/L de $PEI_{600g/mol}$, le pH de la suspension se stabilise à des valeurs très proches de la solution ne contenant que du polymère (Figure 10.C). En corrélant cette information au fait que les autres paramètres étudiés (taille des particules (Figure 10.B), mobilité électrophorétique (Figure 10.A) et densité optique (Figure 10.A)), se stabilisent après 20 mg/L, on peut en déduire que cette concentration est caractéristique du terme de la fixation du polymère sur les membranes bactériennes. Cela correspond vraisemblablement à un taux de fixation maximale du $PEI_{600g/mol}$ sur les membranes bactériennes, aussi, le polymère ajouté en excès reste alors en solution. L'hypothèse d'une lyse bactérienne, comme auraient pu le

laisser penser les observations MET (Figure 12.E2.ba et 12.E2.bb), peut être éliminée. En effet, outre les images AFM (Figures 12.E1 et 12.E2.a), le taux de génération presque constant (Figure 11) prouve que, malgré les dommages subis, les cellules bactériennes restent viables. Les membranes désorganisées observées en MET sont le fruit du traitement subi par les bactéries lors de l'inclusion en résine. La perméabilisation des membranes induite par le polymère ne leur a pas permis de résister aux forces osmotiques liées à la déshydratation à l'acétone.

II.2 Etude des cellules bactériennes présentant des surstructures lipopolysaccharidiques

II.2.1 Résultats

La figure 14 présente l'évolution de la densité optique du surnagent et de la mobilité électrophorétique (Figure 14.A), de la taille des agrégats (Figure 14.B), du pH (Figure 14.C) et de la conductivité (Figure 14.D) en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$.

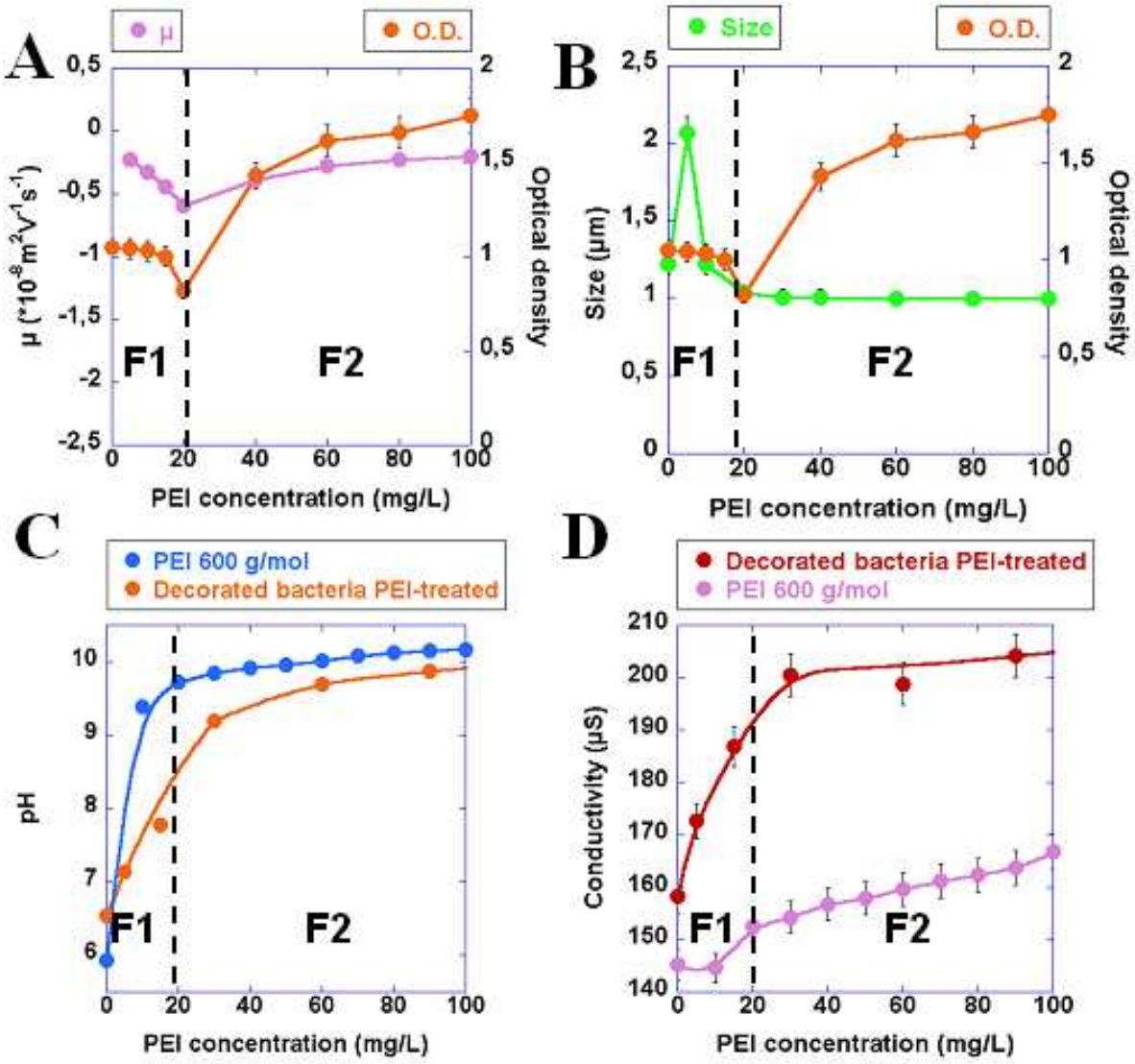


Figure 14 : Evolution de A. la densité optique (O.D.) et de la mobilité électrophorétique (μ), B. de la densité optique (O.D.) et de la taille des particules, C. du pH et D. de la conductivité d'une suspension de bactéries présentant des surstructures polysaccharidiques, floculée et d'une solution ne contenant que du polymère, en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$ (mg/L).

En effectuant des corrélations entre les différents paramètres étudiés, on observe deux domaines de concentrations correspondant à deux étapes d'altération et d'agrégation des cellules bactériennes. Ces domaines, respectivement nommés F1 et F2, correspondent à des concentrations en polymère inférieures ou supérieures à 20 mg/L.

Lorsque la concentration ajoutée est comprise dans le domaine F1, on peut voir sur la figure 14.B, que contrairement aux résultats obtenus précédemment pour ce polymère, la densité optique diminue légèrement, jusqu'à 0.8, tandis que la taille des agrégats marque un pic en atteignant 2 µm (après plusieurs répétitions de cette mesure). On constate, en parallèle, une diminution de la mobilité électrophorétique, atteignant la valeur de $-0.6\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$ (Figure

14.A). Le pH présente des valeurs inférieures à celles que nous avions observées précédemment pour le même polymère, il atteint 8.5 (Figure 14.C). A titre de comparaison, lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructures et pour une concentration en $PEI_{600g/mol}$ similaire, la valeur de pH est d'environ 9.2 environ. Enfin, la conductivité connaît une forte augmentation jusqu'à 190 µS environ (Figure 14.D).

Lorsque la concentration en polymère est supérieure à 20 mg/L (domaine F2), on observe une augmentation de la densité optique qui se stabilise à la valeur de 1.7 environ (Figure 14.A), tandis que la taille des particules diminue et se stabilise à la valeur de 1 µm (Figure 14.B). La mobilité électrophorétique augmente et se stabilise à la valeur d'environ $-0.3\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$ (Figure 14.A). Le pH reste légèrement inférieur aux valeurs obtenues lorsque la solution ne contient pas de bactéries et se stabilise à la valeur de 9.5 environ (Figure 14.C). La conductivité se stabilise en moyenne à 200 µS (Figure 14.D).

La figure 15 présente l'évolution du temps de génération et relargage de cristal violet pour des cellules bactériennes présentant la partie AgO-LPS en contact avec le $PEI_{600g/mol}$.

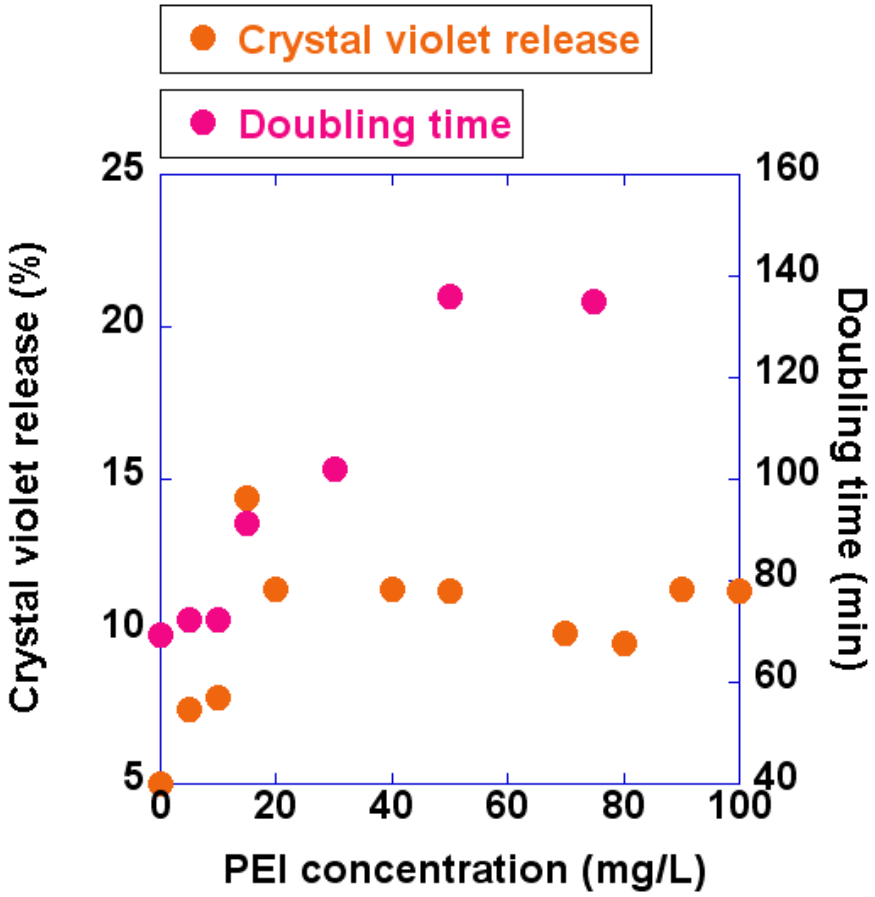


Figure 15 : Evolution du taux de relargage de cristal violet et du temps de génération d'une population bactérienne présentant des surstructures polysaccharidiques en fonction de la concentration en $PEI_{600g/mol}$.

On peut voir sur cette figure que le taux de génération reste constant à environ 70 minutes jusqu'à la concentration de 15 mg/L, puis augmente jusqu'à se stabiliser à environ 100 minutes. Les mesures d'absorbance permettent d'observer une augmentation du taux de relargage de cristal violet, jusqu'à environ 10%. Ce dernier atteint alors une relative stabilité au delà de 20 mg/L de $PEI_{600g/mol}$.

II.2.2 Observations

La figure 16 présente les observations AFM et MET pour les deux domaines prédéfinis. Notons que dans la mesure où il n'y a pas eu sédimentation, il ne nous a pas été possible

d'obtenir des inclusions en résines exploitables pour des concentrations en $PEI_{600g/mol}$ inférieures à 100 mg/L.

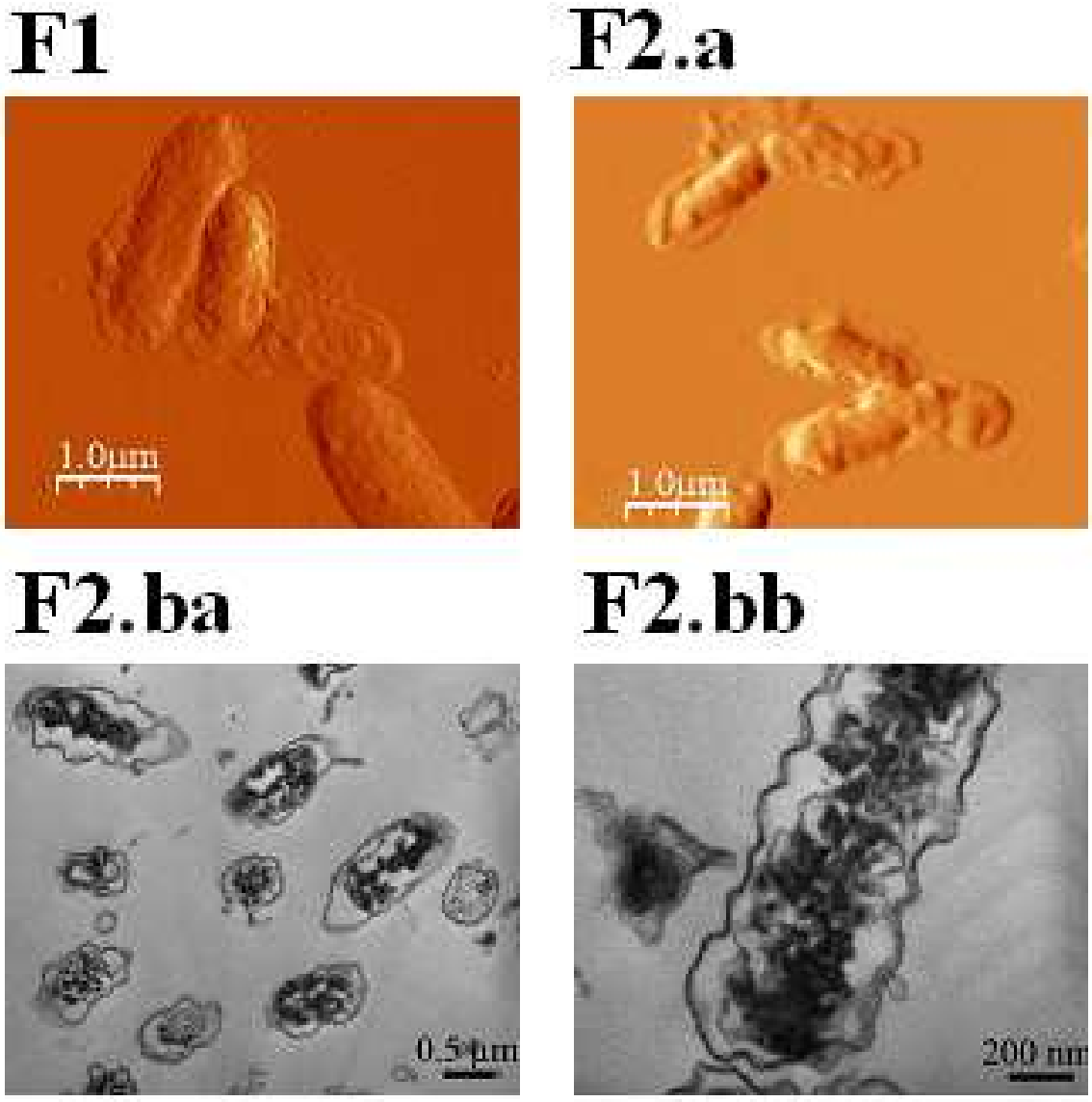


Figure 16 : Observations AFM de bactéries présentant des surstructures en présence de F1. 20, et F2.a. 100 mg/L de $PEI_{600g/mol}$ et MET de bactéries en présence de F2.ba et F2.bb 100 mg/L de $PEI_{600g/mol}$.

Pour une concentration de 20 mg/L (Figure 16.F1), on observe des structures résiduelles, semblables à celles observées pour le $PEI_{750000g/mol}$, pouvant provenir d'une altération membranaire. De la même manière, on peut également souligner que les membranes bactériennes présentent une forte rugosité et présente des nodules sphériques et structures résiduelles d'une taille de 50 à 200 nm.

Lorsque la concentration en polymère atteint 100 mg/L (Figures 16.F2.a, 16.F2.ba et 16.F2.bb), on constate que, sans pour autant qu'il y ait lyse bactérienne, les membranes exhibent d'importantes altération. En effet, on observe à présent, des structures résiduelles entourant totalement les membranes bactériennes. De plus, les membranes présentent une rugosité très importante. En MET, on observe des bactéries dont les membranes sont certes plissées, mais toujours fermées. Par comparaison avec les échantillons précédents, on peut dire que les membranes bactériennes ont montré une résistance plus importante aux pressions osmotiques lors de la déshydratation.

II.2.3 Discussion

La figure 17 représente schématiquement l'action du $PEI_{600g/mol}$ pour les domaines de concentration F1 et F2.

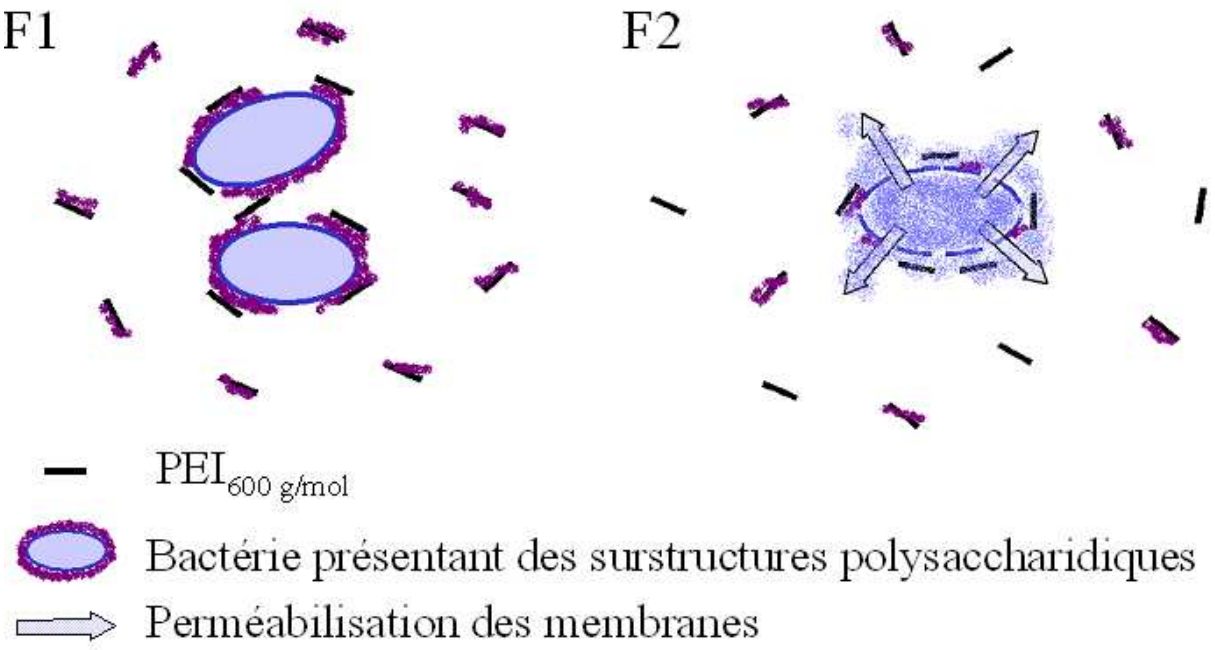


Figure 17 : Schéma décrivant l'action du $PEI_{600g/mol}$ pour les domaines de concentration F1. 0 – 20 mg/L et F2. 20 – 100 mg/L.

Lorsqu'on se situe dans le domaine de concentration F1, la diminution de la densité optique (Figure 14.A) et le fait que la taille des particules augmente légèrement jusqu'à 2 µm (Figure 14.B) laisse penser à une amorce d'agrégation. L'occurrence de ce mécanisme malgré la faible taille du $PEI_{600g/mol}$ peut s'expliquer par l'encombrement stérique provoqué par la

présence de la partie AgO-LPS (Figure 17.F1). Cependant, toujours en raison de la faible taille du polymère, il n'est pas possible de lier plus de quelques bactéries entre elles, ce qui explique que l'on obtienne pas d'agrégats ayant de taille supérieure à 2 µm. L'adsorption de ce polymère sur les membranes bactériennes induit la formation de complexes LPS/$PEI_{600g/mol}$ et le relargage des surtructures polysaccharidiques qui ne masquent plus les charges négatives portées par la membrane bactérienne, ce qui provoque une diminution de mobilité électrophorétique (Figure 14.A). Ce relargage est également à l'origine d'une augmentation de la perméabilité membranaire, comme le montre l'augmentation de la conductivité et du taux de libération de cristal violet. Le fait que le pH augmente plus faiblement que dans le cas précédent soutient l'hypothèse que les molécules de $PEI_{600g/mol}$ sont effectivement neutralisées par la présence des LPS (Figure 14.C). Pour autant et comme le soulignent les observations AFM (Figure 16.F1) et les mesures de temps de génération des populations bactériennes et de relargage de cristal violet (Figure 15), ce relargage n'a pas pour autant un effet toxique voir lytique sur les bactéries.

Si la concentration en $PEI_{600g/mol}$ est supérieure à 20 mg/L (domaine F2), les bactéries sont dépourvues de la majorité de leurs surtructures, ce qui explique que les différents paramètres pris en compte suivent la même évolution que lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructures. L'augmentation de la densité optique (Figure 14.A) et la diminution de la taille des particules (Figure 14.B) prouvent qu'il n'y a plus d'agrégation, la taille du polymère étant trop faible pour former des pontages entre les bactéries. En effet, les molécules de $PEI_{600g/mol}$ s'adsorbent sur les membranes mises à nues, ce qui est clairement montré par l'augmentation de la mobilité électrophorétique (Figure 14.A) qui se rapproche ainsi de la neutralité. Ces contacts direct avec les membranes bactériennes ont un effet toxique, comme le montre l'augmentation du temps de génération (Figure 15), et a pour effet de perméabiliser les membranes (Figure 17.F2), ce qui explique l'augmentation de conductivité (Figure 14.D) et du taux de libération du cristal violet (Figure 15). Cependant, l'ajout de polymère, même en excès (Figure 14.C), ne conduit pas directement à une lyse bactérienne, comme le prouvent sur les observations MET et AFM (Figure 16.F2.a 16.F2.ba et 16.F2.bb).

III. Synthèse

Dans cette partie, nous allons recouper les différents mécanismes d'agrégation et d'altération observés afin d'acquérir une vision synthétique de l'impact de la masse moléculaire du PEI et de la présence de surstructures sur l'agrégation et l'intégrité des membranes bactériennes.

Tout d'abord, ces polymères peuvent être divisés en deux catégories. Le $PEI_{600g/mol}$ ne permet pas d'obtenir des agrégats de taille suffisamment importante pour être décantables. On n'observe pas, dans ce cas, de clarification de l'eau. La seconde catégorie comprend les $PEI_{60000g/mol}$ et $PEI_{750000g/mol}$ qui induisent la formation d'agrégats de taille importante (de l'ordre de plusieurs dizaines de microns) pouvant décanter et permettant d'obtenir une eau claire.

Les résultats obtenus pour le $PEI_{600g/mol}$ sont en désaccord avec ceux observés dans la littérature, pour lesquels une floculation est observée [5]. Cela est probablement lié au fait que les concentrations bactériennes avec lesquelles nous avons travaillées sont nettement inférieures, et que donc le ratio bactéries/polymère en est modifié. D'un point de vue expérimental, ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la taille de ce polymère est trop faible pour former des liaisons par pontages entre bactéries, d'où l'absence d'agrégation. Le polymère se fixe sur les membranes bactériennes par neutralisation de charges et probablement formation de liaisons covalentes. Dans le cas où les bactéries présentent des surstructures, celles-ci sont au préalable relarguées par formation de complexes avec le polymère (jusqu'à la concentration de 20 mg/L). Ce mécanisme a été décrit au chapitre 1 [6-8]. On peut noter que ce polymère ne présente pas une forte toxicité pour les cellules bactériennes, ce qui est en accord avec les études évoquant l'utilisation de ce polymère avec des masses moléculaires équivalentes pour la transfection de gènes [1-2] ou la perméabilisation [9-10] des membranes bactériennes visant à sensibiliser les bactéries à certains antibiotiques [11-13], ou encore pour permettre la pénétration de particules inorganiques [3].

Nous allons maintenant nous intéresser aux deux polymères de masses molaires supérieures, qui induisent chacun la floculation des cellules bactériennes, ce qui est en accord avec la littérature [5 ; 14-15].

Le $PEI_{60000g/mol}$ provoque l'agrégation des cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures (pour environ 17.5 mg/L). A mesure que sa concentration augmente, on observe une érosion des agrégats et une lyse des cellules, se traduisant par une restabilisation (pour environ 37.5 – 40 mg/L), comme cela a pu être observé par Treweek *et al.* [14] et Dixon *et al.* [5]. Enfin, il y a agrégation du matériel intracellulaire lors d'un second stade d'agrégation. Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Salt *et al.* [16] et Cordes *et al.* [17] qui ont démontré qu'il était possible de floculer du matériel intracellulaire par des polymères de polyéthylèneimine. Lorsque les bactéries présentent des surstructures, il y a conjointement formation d'agrégats bactériens et relargage de ces surstructures par complexation avec le polymère (entre 0 et 20 mg/L). Ainsi, une augmentation de la concentration en $PEI_{60000g/mol}$ conduit à une perméabilisation des membranes bactériennes [6-8], puis à une lyse (au delà de 60 mg/L). Dans ce cas, la restabilisation n'est pas marquée par une augmentation de la densité optique comparable à celle observée lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructures car la concentration en polymère est assez élevée pour que le second stade d'agrégation produise immédiatement des agrégats de taille suffisante pour décanter. La restabilisation correspond, en fait, à la concentration en polymère pour laquelle la quantité de polymère fixée sur les membranes bactériennes est maximale, et conduit à une lyse cellulaire.

Lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructures, le $PEI_{750000g/mol}$ induit des altérations irréversibles conduisant à une lyse bactérienne quasi-immédiate. Il s'en suit une agrégation du matériel intracellulaire ainsi relargué (pour des concentrations supérieures à 5 mg/L). Lorsque les surstructures sont présentes à la surface des membranes bactériennes, comme pour le $PEI_{60000g/mol}$, il y a conjointement agrégation et relargage des surstructures (de 0 à 7 mg/L). Lorsque la membrane bactérienne mise à nue est accessible et qu'il y a fixation du $PEI_{750000g/mol}$, la toxicité du polymère est telle qu'elle ne permet pas d'aboutir à une neutralisation totale de la charge des agrégats, car il y a, au préalable, rupture des membranes bactériennes (à partir d'une concentration de 10 mg/L). A partir de ce point, les phénomènes d'agrégation des bactéries dépourvues de leurs surstructures se superposent à ceux observés pour des bactéries ne présentant pas de surstructures. En raison des faibles concentrations bactériennes auxquelles nous avons travaillé, nous n'avons pu observer de restabilisation, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature [5 ; 14 ; 17,].

La figure 18 représente l'évolution de la densité optique pour le $PEI_{60000g/mol}$ et le $PEI_{750000g/mol}$ pour les deux types de membranes bactériennes étudiées.

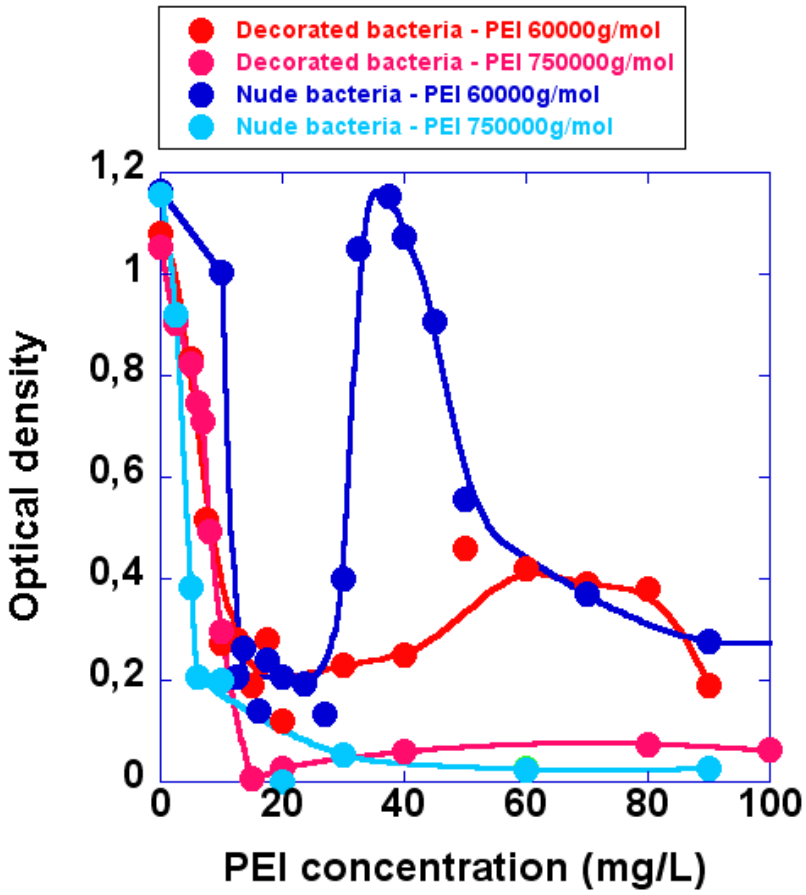


Figure 18 : Evolution de la densité optique pour les masses moléculaires 60000 et 750000 g/mol en présence et en absence de surstructures membranaires.

Le tableau 1 présente la taille maximale des particules et la concentration optimale de floculation en fonction de la masse moléculaire et de la présence ou l'absence de surstructure.

	Masse Moléculaire	Taille maximale des particules (µm)	Concentration optimale de traitement (mg/L)
Sans AgO-LPS	60 000 g/mol	35	17.5
	750 000 g/mol	100	5
Avec AgO-LPS	60 000 g/mol	60 – 80	15
	750 000 g/mol	160	15

Tableau 1 : Taille maximale des particules et concentration optimale de floculation en fonction de la masse moléculaire de PEI et du type de membranes bactériennes.

En comparant les résultats synthétisés ci-dessus, on peut, en premier lieu, affirmer qu'une augmentation de la masse moléculaire produit une augmentation de la toxicité du polymère sur les cellules bactériennes, quelque soit le type de membrane étudié, ce qui confirme les propriétés bactéricides observées pour cette gamme de masses moléculaires [8 ; 18-21]

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe un optimum de taille correspondant à l'optimum de floculation lorsque les bactéries portent des surstructures, ce qui correspond à ce qui a été montré par Verduzco-Luque *et al.* [15].De plus, les agrégats formés par le $PEI_{750000g/mol}$ sont de taille largement supérieure à ceux formés lorsque l'agrégation est induite par le $PEI_{60000g/mol}$ (Tableau 1). En effet, la taille de ce polymère est telle qu'en raison de l'encombrement stérique provoqué, celui-ci ne peut s'adsorber entièrement sur la membrane bactérienne. Cela favorise sa fixation à d'autres cellules bactériennes et peut générer des tensions sur la membrane bactérienne, probablement à l'origine de la lyse. Pour la même raison, on peut également souligner que malgré l'érosion des agrégats et la libération d'une forte concentration de particules colloïdales dans le milieu, aucune restabilisation n'est observée.

Lorsque les membranes ne portent pas de surstructure, la concentration optimale de floculation obtenue avec le $PEI_{750000g/mol}$ est inférieure à celle obtenue avec le $PEI_{60000g/mol}$ (Tableau 1 et Figure 18), ce qui est en accord avec les phénomènes observés dans la littérature [5 ; 14]. A l'inverse, en présence de surstructure, on n'observe pas de différence notable de la concentration optimale de floculation suivant la masse moléculaire du polymère (Tableau 1 et

Figure 18). Aussi, l'encombrement stérique provoqué par la présence des surstructures permet de former des agrégats de taille suffisamment importante pour qu'il y ait décantation, sans que la taille du polymère n'ait d'influence, aux faibles concentrations bactériennes auxquelles nous avons travaillé.

Ce travail nous a permis de montrer que l'effet lytique effectif du PEI a une réelle influence sur la structure des agrégats et des bactéries qui le composent. Ce dernier peut être relié aux variations de l'efficacité de filtration suivant la masse moléculaire et la concentration en PEI observées par d'autres auteurs. En effet, lorsque la masse moléculaire du polymère est inférieure à 2000 g/mol, l'efficacité de filtration est inférieure à celle obtenue pour des suspensions non coagulées et ne varie que faiblement lorsque la concentration en polymère augmente [22-23]. Cela peut être dû au relargage de matériel cytoplasmique, et au fait que ce dernier peut provoquer l'apparition de forces osmotiques s'opposant à l'écoulement de l'eau. Lorsque la masse moléculaire du polymère augmente, un optimum d'efficacité de filtration apparaît, correspondant à la concentration optimale de floculation, tandis que les concentrations inférieures à celles-ci ou supérieures à la concentration de restabilisation présentent les temps de filtration les plus longs [5 ; 14]. Dans le premier cas, cette faible efficacité de filtration est due à la présence de bactéries isolées, et peut être également aux propriétés mécaniques de ces agrégats, dont la matrice polymérique est trop faible [24-25]. Dans le second cas, cela peut s'expliquer par l'état lysé des cellules bactériennes, à l'origine de forces osmotiques et répulsives importantes. Verduzco-Luque *et al.* [15] a mis en évidence le fait que, pour une même concentration, à mesure que l'on augmente la masse moléculaire du polymère, l'efficacité de filtration diminue. En effet, comme la toxicité du polymère augmente conjointement à sa masse moléculaire, l'état de lyse des cellules bactériennes sera plus prononcé pour un polymère de masse moléculaire plus élevé, nuisant ainsi à l'efficacité de filtration.

En conclusion, la figure 19 présente un récapitulatif des différents mécanismes d'agrégation décrits précédemment. On peut remarquer également que dès lors que les LPS sont relargués, les phénomènes d'agrégation sont semblables pour les deux bactéries étudiées, ainsi la présence des surstructures induit un décalage vers des concentrations plus importantes. En fait, la présence des surstructures a pour effet de retarder l'action lytique du PEI sur les cellules bactériennes. Il apparaît donc clairement que les surstructures membranaires ont un rôle de protection contre les agressions liées à la toxicité du PEI.

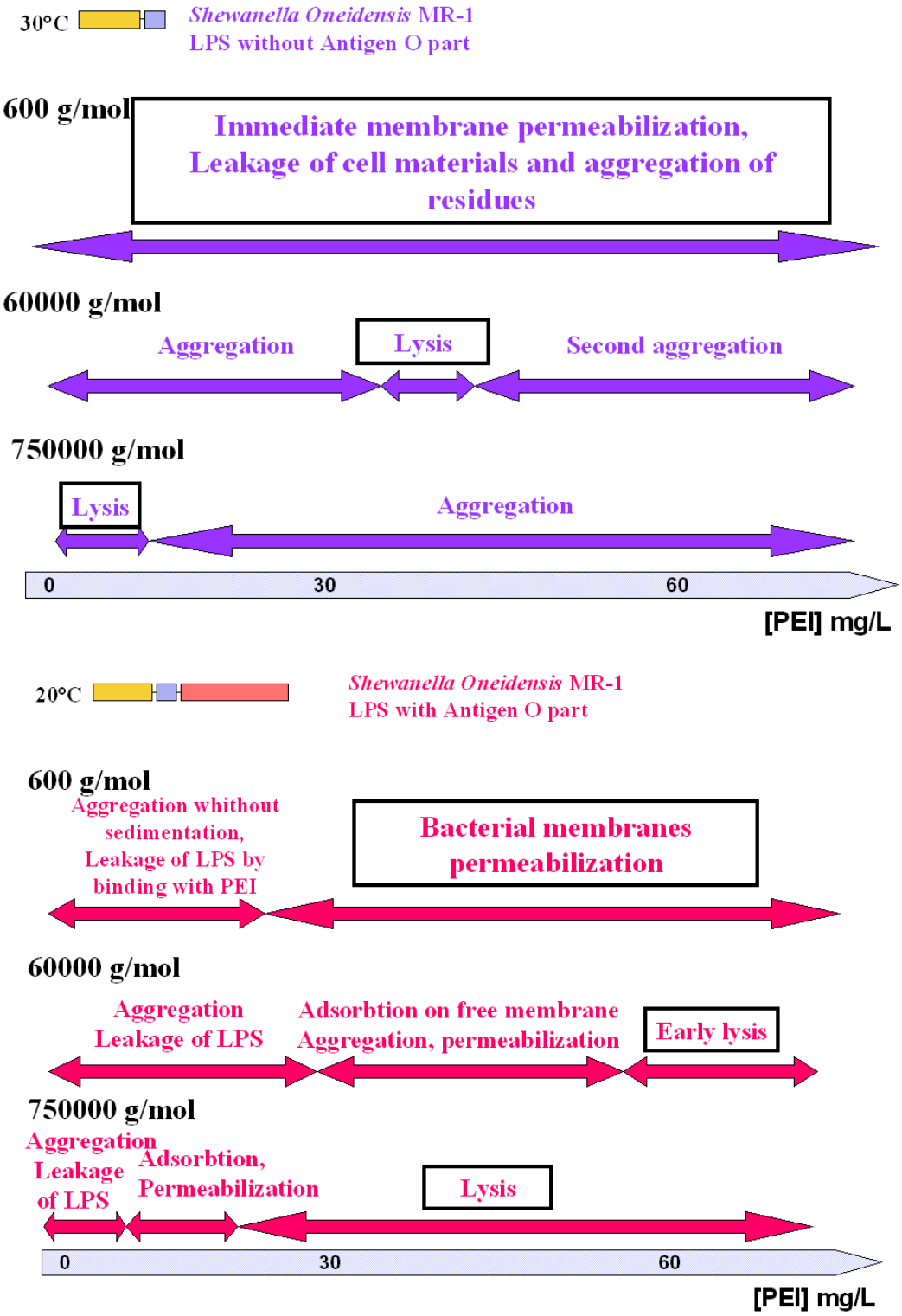


Figure 19 : Mécanismes d'agrégation et concentration en polymère en fonction de la masse moléculaire du PEI et de la présence/absence de surstructure.

Références bibliographiques

[1] Godbey W.T. ; Wu K.K. ; Mikos A.G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. Journal of Controlled Release [en ligne]. 1999, 60 (2-3), 149-160.

[2] Densmore C.L. Polyethyleneimine-based gene therapy by inhalation. Expert Opinion on Biological Therapy [en ligne]. 3 (7), 2003, 1083-1092.

[3] Xia T. ; Kovochich M. ; Liong M. ; Meng H. ; Kabehie S. ; George S. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. ACS Nano [en ligne]. 2009, 3 (10), 3273-3286.

[4] Legrand V. ; Hourdet D. ; Audebert R. ; Snidaro D. Deswelling and flocculation of gel networks : Application to sludge dewatering. Water Research [en ligne]. 1998, 32, 3662-3672; DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00133-X

[5] Dixon J.K.; Zielyk M.W. Control of the bacterial content of water with synthetic polymeric flocculants. Environmental Science and Technology [en ligne]. 1969, 3 (6), 551-558 ; DOI 10.1021/es60029a004

[6] Hilal N. ; Kochkodan V. ; Al-Khatib L. ; Levadna T. Surface modified polymeric to reduce (bio)fouling: a microbiological study using E. Coli. Desalinisation [en ligne]. 2004, 167, 293-300; DOI 10.1016/j.desal.2004.06.138

[7] Nian R. ; Tan L. ; Choe W.S. Polyethyleneimine-mediated chemical extraction of cytoplasmic his-tagged inclusion body proteins from Escherichia coli. Biotechnology Progress [en ligne]. 2008, 24, 417-425; DOI 10.1021/bp070304q

[8] Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiology Reviews [en ligne]. 1992, 56 (3), 395-411; ISSN 01460749

[9] Helander I.M. ; Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial Permeabilization. Journal of Applied Microbiology [en ligne]. 2000, 88 (2), 213-219.

[10] McCullagh C. ; Robertson P.K.J. Effect of polyethylenimine, a cell permeabilizer, on the photosensitized destruction of algae by methylene blue and nuclear fast red. Photochemistry and Photobiology [en ligne]. 2006, 82 (6), 1662-1667.

[11] Helander I.M.; Alakomi H.L.; Latva-Kala K.; Koski P. Polyethyleneimine is an effective permealizer of gram-negative bacteria. Microbiology [en ligne]. 1997, 143, 3193-3199; ISSN 13500872

[12] Korycka-Machala M.; Ziolkowski A.; Rumijowska-Galewicz A.; Lisowska K.; Sedlaczek L. Polycations increase the permeability of Mycobacterium vaccae cell envelopes to hydrophobic compounds. Microbiology [en ligne]. 2001, 147, 2769-2781; ISSN 13500872

[13] Alakomi H.L.; Paananen A.; Suihko M.L.; Helander I.M.; Saarela M. Weakening effects of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodetection. Applied Environmental Microbiololgy [en ligne]. 2006, 72 (7), 4695-4703; DOI 10.1128/AEM.00142-06

[14] Treweek G.P.; Morgan J.J. Polymer flocculation of bacteria, the mechanism of E. Coli aggregation by polyethyleneimine. Journal of Colloids Interface Science [en ligne]. 1976, 60 (2), 258-273; ISSN 00219797

[15] Verduzco-Luque C.E. ; Alp B. ; Stephens G.M. ; Marks G.H. Construction of biofilms with defined internal architecture using dielectrophoresis and flocculation. Biotechnology and Bioengineering [en ligne]. 2003, 83 (1), 39-44.

[16] Salt D.E. ; Hay S. ; Thomas O.R.T. ; Hoare M. ; Dunnil P. Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polyethyleneimine: a study of several organisms and polymer molecular weights. Enzyme and Microbial. Technology [en ligne]. 1995, 17, 107-113; DOI 10.1016/0141-0229(94)00043-Q

[17] Cordes R.M.; Sims B.W.; Glatz C.E. Precipitation of Nucleic acids with poly(ethyleneimine). Biotechnology Progress [en ligne]. 1990, 6, 283-285; ISSN 87567938

[18] Mortimer M. ; Kasemets K. ; Heinlaan M. ; Kurvet I. ; Kahru A. High throughput kinetic Vibrio fisheri bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticules. Toxicology In Vitro [en ligne]. 2008, 22, 1412-1417; DOI 10.1016/j.tiv.2008.02.011

[19] Pasquier N. ; Keul H. ; Heine E. ; Moeller M. From multifunctionalized poly(ethylene imine)s toward antimicrobial coatings. Biomacromolecules [en ligne]. 2007, 8 (9), 2874-2882.

[20] Haldar J. ; An D. ; de Cienfuegos L.A. ; Chen J. ; Klibanov A.M. Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [en ligne]. 2006, 103 (47), 17667-17671.

[21] Beyth N. ; Houri-Haddad Y. ; Baraness-Hadar L. ; Yudovin-Farber I. ; Domb A.J. ; Weiss E.I. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethyleneimine nanoparticucles. Biomaterials [en ligne]. 2008, 29, 4157-4163; DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.07.003

[22] Zeleznik M.J. ; Segatta J.M. ; Ju L.K. Polyethyleneimine-induced flocculation and flotation of cyanobacterium Anabaena flos-aquae for gas vesicle production. Enzyme and Microbial Technology [en ligne]. 2002, 31 (7), 949-953.

[23] O'Mahony K. ; Freitag R. ; Dhote B. ; Hilbrig F. ; Müller P. ; Schumacher I. Capture of bacteria from fermentation broth by body feed filtration: A solved problem? Biotechnology Progress [en ligne]. 2006, 22 (2), 471-483.

[24] Wang Y.L. ; Dentel S.K. ; Mahmudov R. Transformation between flocs and aggregates in the conditioned sludge suspensions during a rotational test using a torque rheometer. Powder Technology [en ligne]. 2011, 208 (1), 189-194.

[25] Örmeci B. Optimization of a full-scale dewatering operation based on the rheological characteristics of wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2007, 41 (6), 1243-1252.

Chapitre 5

Propriétés mécaniques et nanomécaniques des agrégats bactériens floculés par des polyéthylèneimine de hautes masses moléculaires

Chapitre 5 : Propriétés mécaniques et nanomécaniques des agrégats bactériens floculés par des polyéthylèneimine de hautes masses moléculaires

Dans ce chapitre, nous allons étudier les propriétés mécaniques et nanomécaniques des agrégats bactériens de Schewanella *Oneidensis* MR-1 floculés par des polyéthylèneimines de masses 60000 et 750000 g/mol. Le polyéthylèneimine de masse moléculaire 600 g/mol n'est pas étudié dans ce chapitre. Nous nous intéresserons ici à l'influence des surstructures membranaires et de la masse du polymère sur la résistance (nano)mécanique des agrégats bactériens.

Dans un premier temps, nous allons étudier les propriétés nanomécaniques des agrégats par spectroscopie de force, puis, le comportement rhéologique des suspensions bactériennes partiellement déshydratées par centrifugation nous donnera accès à l'élasticité et à la viscosité des échantillons.

I. Etude des propriétés nanomécaniques des cellules et agrégats bactériens

Dans cette partie, trois paramètres sont étudiés : le module d'Young (kPa), la constante de raideur (N/m) et la pression de turgescence (kPa).

Le module d'Young ou module d'élasticité, E, nous permet d'estimer les propriétés élastiques des membranes bactériennes et des agrégats de cellules obtenus après traitement au PEI. Plus la valeur de ce paramètre est importante, plus la membrane bactérienne est rigide.

La constante de raideur, K, correspond à la résistance à la déformation de l'échantillon. Une augmentation de cette dernière se traduit par une augmentation de la force à appliquer pour obtenir une déformation donnée (par exemple sur la membrane bactérienne).

La pression de turgescence, P_{turg}, correspond à la pression interne exercée par le cytoplasme sur la paroi cellulaire. Elle est proportionnelle à la constante de raideur.

Une diminution de celle-ci est observée lorsque les cellules se trouvent en milieu isotonique (concentration du milieu extérieur équivalente à la concentration intracellulaire) ou hypertonique (concentration du milieu extérieur supérieure à la concentration intracellulaire): on parle alors de cellules flasques.

Les données de spectroscopie de force correspondent à la cartographie nanométrique d'une surface de 16*16 ou 32*32 pixels² selon les cas, ce qui correspond respectivement à des zones de 500*500 nm² et 5000*5000 nm². Dans la mesure où l'acquisition des données et leur traitement ont demandé un temps considérable, compte tenu des aléas liés à ce type de matériel biologique, ces mesures n'ont pu être répétées que 3 fois par échantillon en moyenne. Les analyses sont effectuées sur une zone significative de la membrane bactérienne, c'est-à-dire au centre de la bactérie, ce qui exclu les bords pouvant être à l'origine d'artéfacts de mesure. A l'exception des cas où la concentration en PEI était trop élevée et générait non seulement une lyse bactérienne mais aussi une agrégation de matériel intracellulaire, nous avons travaillé sur des bactéries isolées. Les courbes de force ainsi obtenues sont analysées, modélisées de façon indépendante, ce qui nous permet d'obtenir la répartition statistique de chacun des paramètres étudiés [1].

I.1. Propriétés nanomécaniques des bactéries, en présence ou absence de surstructure, avant traitement au PEI

On peut voir que les membranes nues sont en moyenne deux fois plus rigides que celles présentant des surstructures (figures 1.B et 2.B). Cela est en accord avec les résultats selon lesquels plus la frange polymérique confère à la membrane bactérienne une plus grande souplesse [2-3]. La constante de raideur (figures 1.C et 2.C) et la pression de turgescence (figures 1.D et 2.D) sont du même ordre de grandeur, car il s'agit de la même souche bactérienne à la même force ionique, la seule différence ici étant la présence/absence de surstructure.

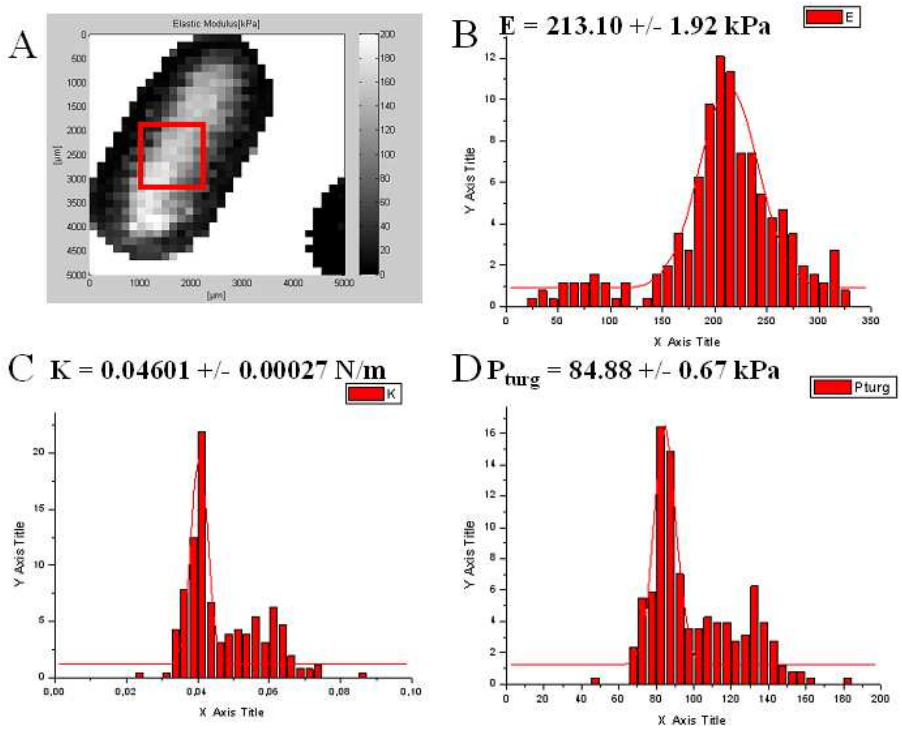


Figure 1 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes ne présentant pas de surstructures, non traitées au PEI : A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

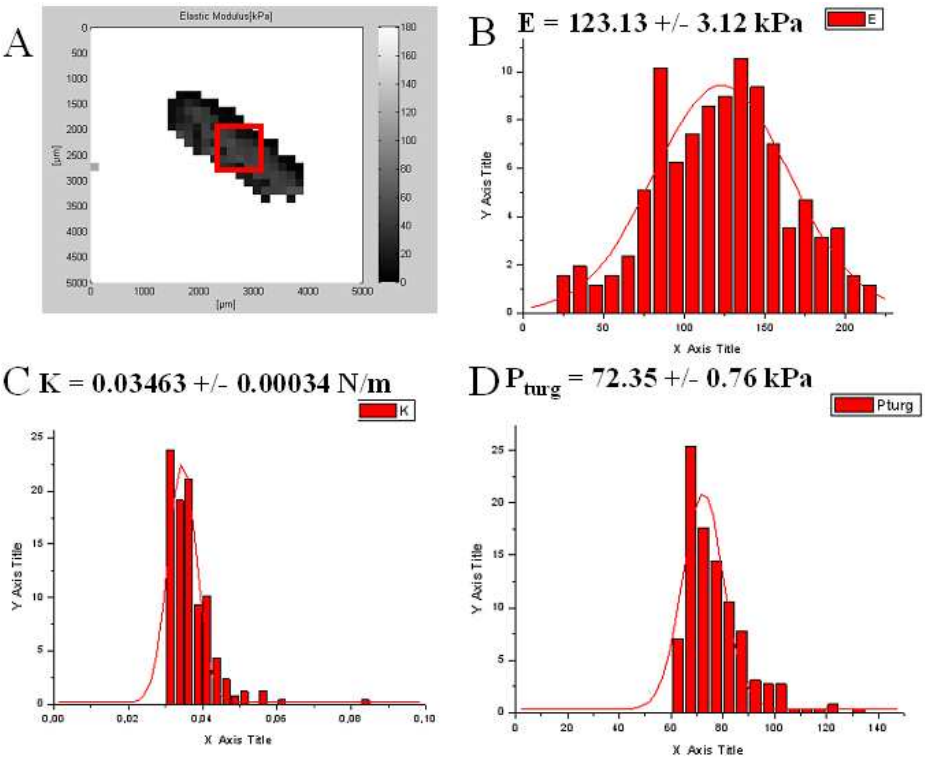


Figure 2 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes portant des surstructures, non traitées au PEI : A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

I.2. Propriétés nanomécaniques de cellules bactériennes et agrégats bactériens après traitement au PEI

I.2.1 Cas de cellules bactériennes ne présentant pas de surstructure, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol

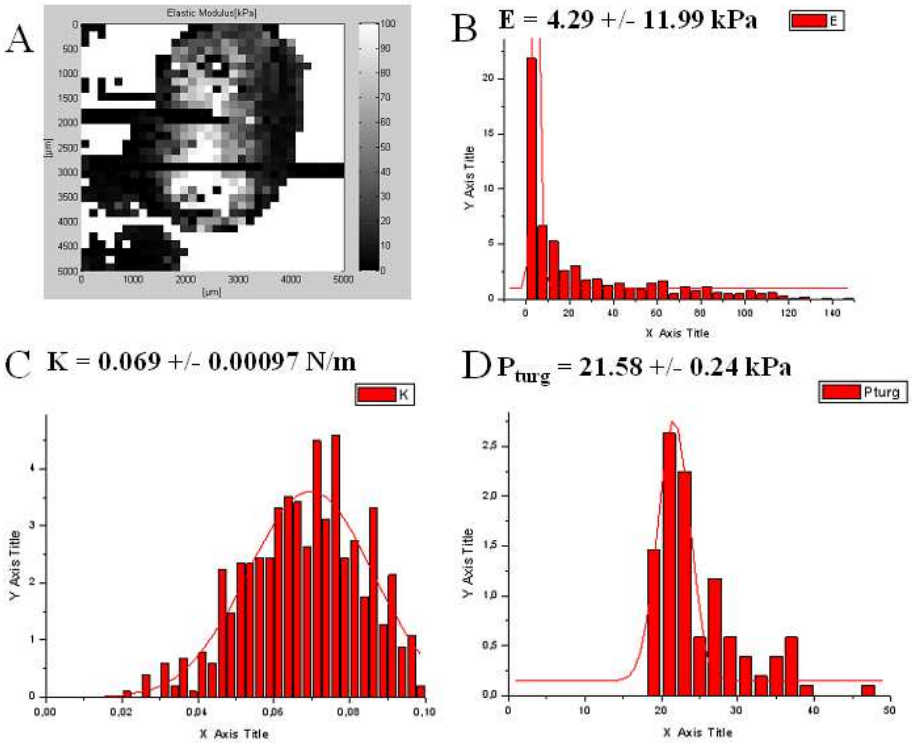


Figure 3 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes à membranes nues, traitées avec 5 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

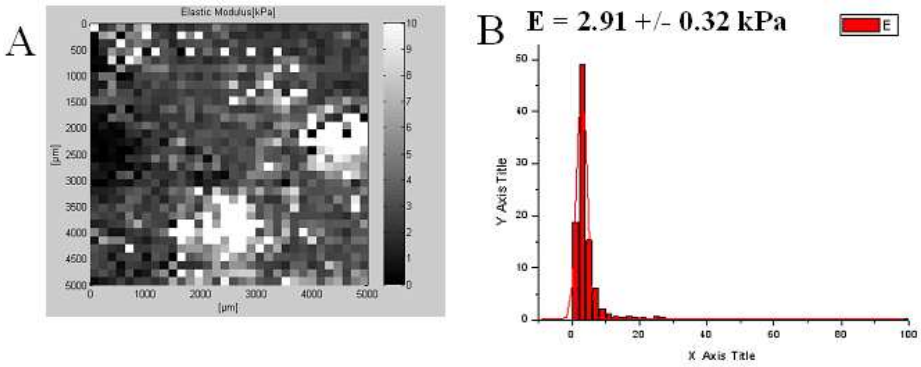


Figure 4 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes à membranes nues, traitées avec 60 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

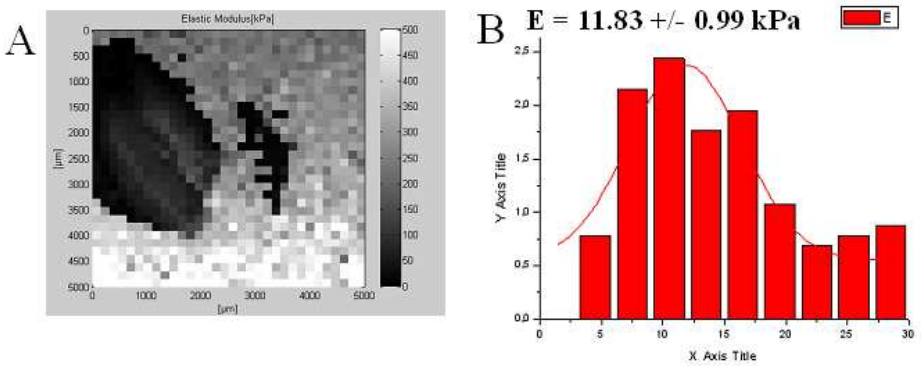


Figure 5 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes à membranes nues, traitées avec 100 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

Pour une meilleure lisibilité, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1.

Concentration en $PEI_{60000g/mol}$ (mg/L)	0	5	60	100
E (kPa)	213.10 +/- 1.92	4.29 +/- 11.99	2.91 +/- 0.32	11.83 +/- 0.99
K (N/m)	0.04061 +/ 0.00027	0.0069 +/- 0.00097	/	/
P_{turg} (kPa)	84.88 +/- 0.67	21.58 +/- 0.24	/	/

Tableau 1 : Module d'Young (E), constante de raideur (K) et pression de turgescence (P_{turg}) pour des cellules ou agrégats bactériens ne présentant pas de surstructures, floculés par du $PEI_{60000g/mol}$.

L'absence de données dans ce tableau (/) correspond aux échantillons pour lesquels les valeurs mesurées de constante de raideur sont inférieures ou égales à celles de la pointe AFM. Etant donné que la pression de turgescence dépend de la constante de raideur, cette donnée n'a pas de signification physique.

Tout d'abord, on constate que dès les plus faibles valeurs de concentrations de $PEI_{60000g/mol}$, 5 mg/L (figure 3.B), le module d'Young chute de façon très importante, jusqu'à environ 3 kPa pour 60 mg/L (figure 4.B). Enfin, on observe une légère hausse à environ 12 kPa, pour 100 mg/L de polymère (figure 5.B).

La constante de raideur et la pression de turgescence suivent la même évolution que le module d'Young, c'est-à-dire qu'elles connaissent une forte diminution dès 5 mg/L de

polymère et atteignent respectivement 0.007 N/m et 25 kPa (figures 3.C et 3.D). Au delà de cette concentration en polymère, il n'est plus possible d'obtenir de valeurs pour la constante de raideur.

Dans un premier temps, la diminution du module d'Young, de la constante de raideur et de la pression de turgescence dès les concentrations les plus faibles prouve qu'il y a un réel impact du polymère sur les membranes induisant leur fragilisation. L'intégration du polymère dans la membrane bactérienne en augmente la fluidité. D'un point de vue biologique, cette augmentation de la souplesse membranaire a pour effet d'altérer les divisions cellulaires, ce qui explique l'augmentation du temps de génération que nous avons vue au chapitre 3. La mesure, quand elle est possible, de la constante de raideur et de la pression de turgescence atteste que même si les bactéries sont fortement endommagées, elles ne sont pas lysées pour autant.

Pour la concentration de 60 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$, les agrégats bactériens sont très souples, comme le montre la faible valeur du module d'Young (3 kPa environ). Cela s'explique par le fait que pour des concentrations supérieures ou égales à 40 mg/L, ce type de bactérie est lysé. De plus, la pression de turgescence et la constante de raideur de la membrane bactérienne ne sont plus mesurables. En effet, les cellules bactériennes ont subi une lyse, les agrégats sont donc constitués de matériel intracellulaire relargué. La constante de raideur, dépendant de la pression intracellulaire exercée par le cytoplasme et la pression de turgescence correspondant à la pression interne exercée sur la membrane, ne sont donc plus mesurables. Enfin, pour une concentration égale à 100 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$, le module d'Young montre une légère hausse de sa valeur. Cela provient de la fixation du polymère sur les agrégats de résidus intracellulaires, formant ainsi une matrice rigide s'opposant à la déformation de l'agrégat.

I.2.2 Cas de cellules bactériennes portant des surstructures, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol

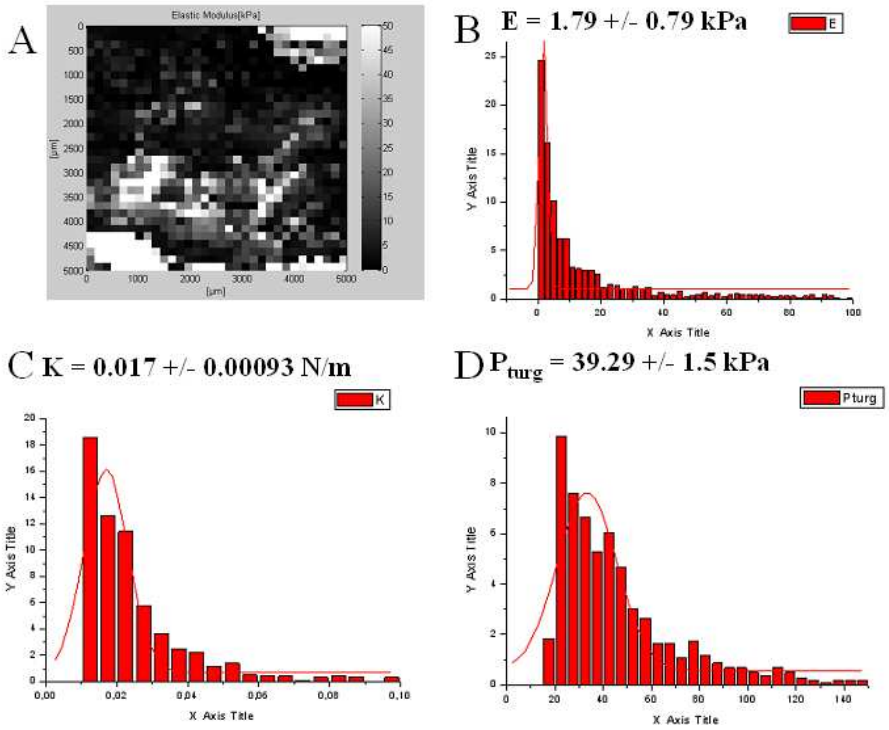


Figure 6 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, traitées avec 5 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

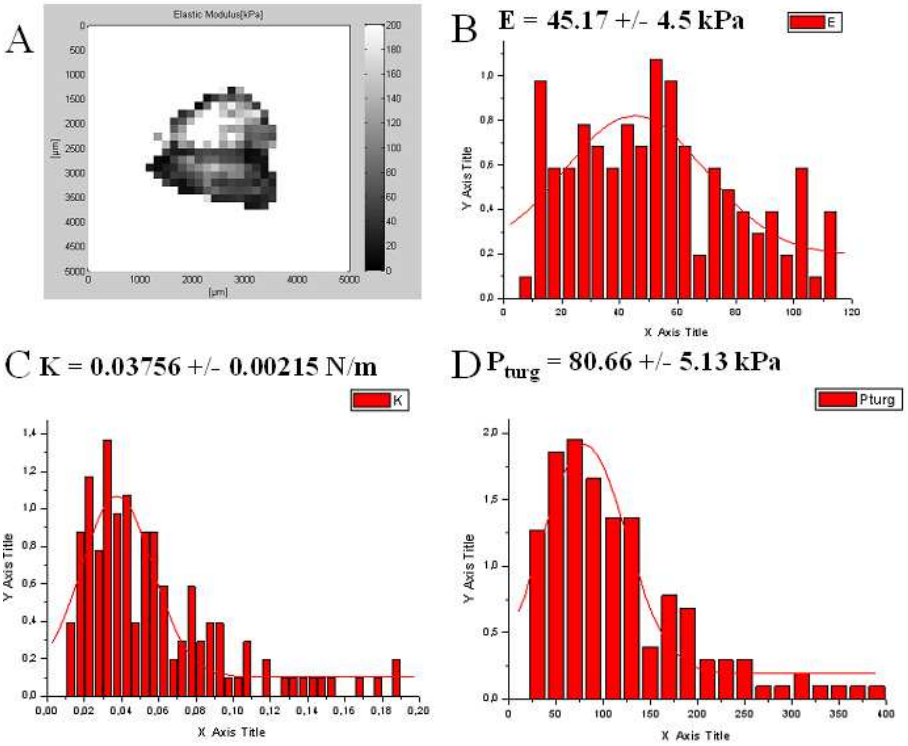


Figure 7 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, de mobilité électrophorétique -0.65 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, traitées avec 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

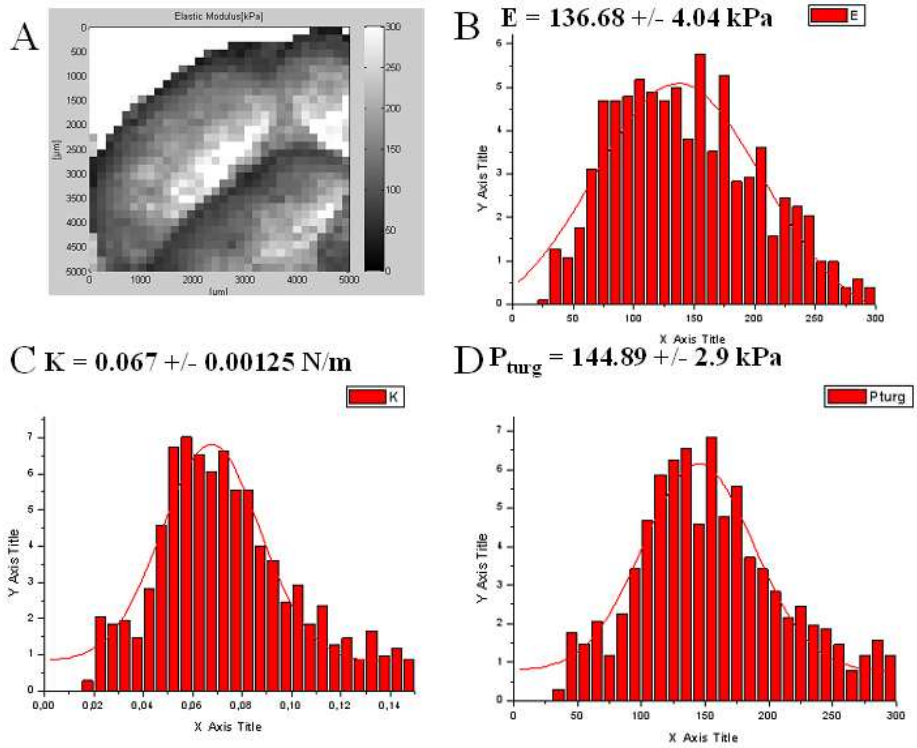


Figure 8 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, de mobilité électrophorétique –3.5 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, traitées avec 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

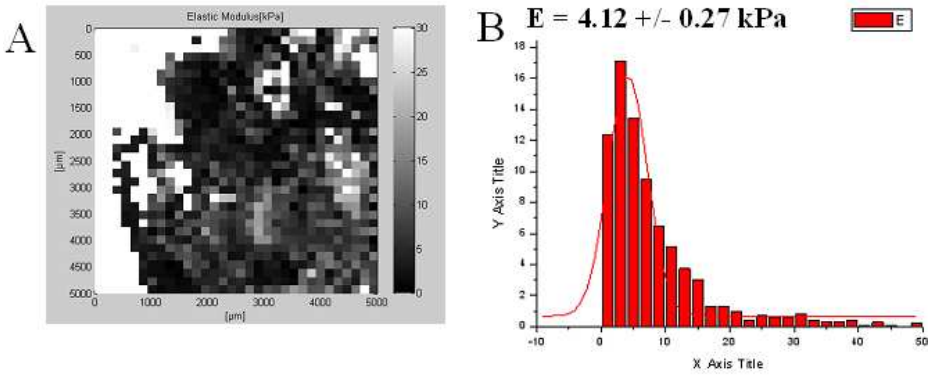


Figure 9 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, traitées avec 100 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

Le tableau 2 résume les précédents résultats.

Concentration en $PEI_{60000g/mol}$ (mg/L)	0	5	35	100
E (kPa)	123.13 +/- 3.12	1.79 +/- 0.12	45.17 +/- 4.5 136.68 +/- 4.04	4.12 +/- 0.27
K (N/m)	0.03463 +/- 0.00034	0.017 +/- 0.00093	0.03756 +/- 0.00215 0.067 +/- 0.00125	/
P_{turg}(kPa)	72.35 +/- 0.76	33.29 +/- 1.5	80.66 +/- 5.13 144.96 +/- 2.9	/

Tableau 2 : Module d'Young (E), constante de raideur (K) et pression de turgescence (P_{turg}) pour des cellules ou agrégats bactériens présentant des surstructures, floculés par du $PEI_{60000g/mol}$.

En premier lieu, on note que les valeurs de modules d'Young sont très basses dès l'ajout de 5 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$ (figure 6.B). Cependant, les valeurs de constantes de raideur et pression de turgescence restent supérieures aux valeurs obtenues pour le cas précédent (figures 6.C et 6.D). Lorsque la concentration en polymère atteint 35 mg/L, suivant les échantillons étudiés, on observe que les valeurs se répartissent autour de deux modes : E = 45 kPa, K = 0.037 N/m, P_{turg} = 80 kPa et E = 136 kPa, K = 0.067 N/m, P_{turg} = 145 kPa (figures 7 et 8). Enfin, lorsque la concentration en polymère atteint 100 mg/L, le module d'Young est de 4 kPa environ (figure 9.B), tandis que la constante de raideur et la pression de turgescence ne sont plus mesurables.

Ces résultats peuvent s'interpréter de la façon suivante. Pour les concentrations de 5 et 35 mg/L de polymère, la mesure du module d'Young montre que les membranes bactériennes présentent une forte sensibilité à l'action du $PEI_{60000g/mol}$. Le relargage des surstructures, remplacées par de « simples » phospholipides au niveau de la membrane cellulaire, a un réel impact en terme d'élasticité, et implique une fragilisation de la membrane. De la même manière que précédemment, le relargage des surstructures et l'altération membranaire qui en résulte sont probablement à l'origine de l'importante augmentation du temps de génération observée au chapitre 3.

Les valeurs multiples obtenues pour la concentration de 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$ correspondent à des hétérogénéités membranaires. En effet, il est possible que la totalité des surstructures n'ait pas été relarguée, et que le polymère ne soit pas fixé uniformément sur les membranes bactériennes. Ces hétérogénéités peuvent trouver leur origine dans le fait qu'il existe deux populations bactériennes dans les suspensions de cellules bactériennes produisant des surstructures. La première, largement majoritaire présente une mobilité électrophorétique de l'ordre de $-0.65\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$ et la seconde, minoritaire, de mobilité électrophorétique très faible, d'environ $-3.5\ 10^{-8}\ m^2\ V^{-1}S^{-1}$. Afin de mieux comprendre ce phénomène, de plus amples investigations seraient nécessaires. Néanmoins, on peut en conclure que certaines zones présentent une sensibilité moindre à l'action du polymère (élasticité proche de sa valeur initiale). Les valeurs de la constante de raideur et de la pression de turgescence, supérieures à la valeur initiale, peuvent s'expliquer par le fait que le polymère, formant une matrice autour des cellules bactériennes, constitue un milieu concentré et génère des forces osmotiques provoquant une reconcentration du cytoplasme.

Lorsque la concentration en $PEI_{60000g/mol}$ atteint 100 mg/L, la totalité de la population bactérienne est lysée. Comme pour le cas des bactéries ne présentant pas de surstructures, l'élasticité atteint des valeurs très faibles, et la constante de raideur et la pression de turgescence ne sont plus mesurables.

I.2.3 Cas de cellules bactériennes ne portant pas de surstructure, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol

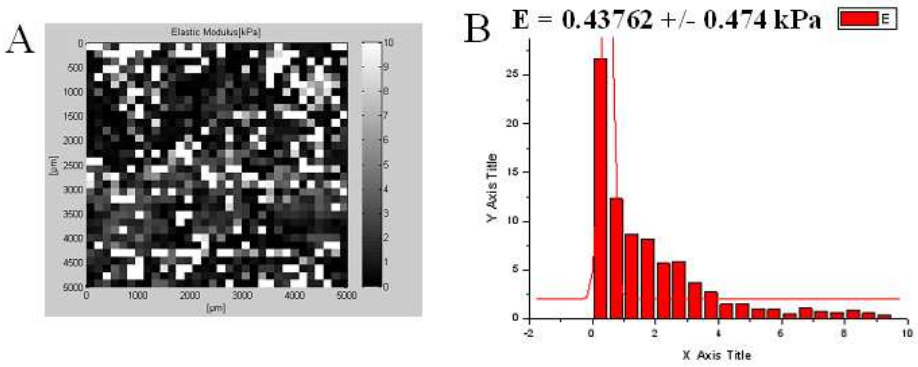


Figure 10 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes à membranes nues, traitées avec 2.5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

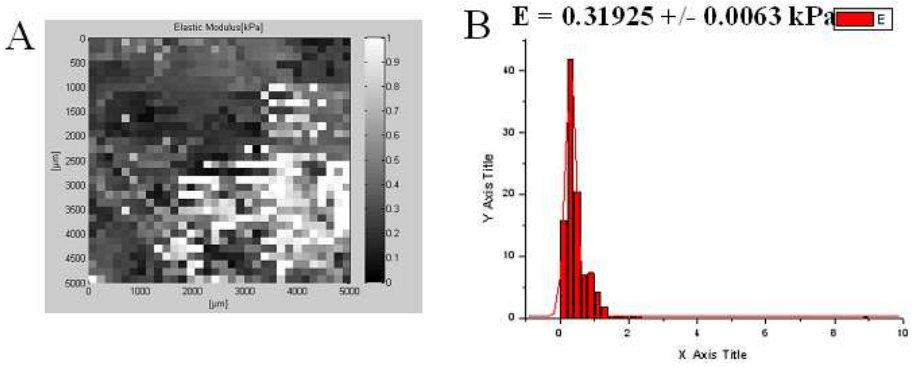


Figure 11 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes à membranes nues, traitées avec 40 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

Le tableau 3 présente les résultats obtenus lors de la floculation de cellule bactériennes ne portant pas de surstructure par du $PEI_{750000g/mol}$.

Concentration en $PEI_{750000g/mol}$ (mg/L)	0	2.5	40
E (kPa)	213.10 +/- 1.92	0.43762 +/- 0.474	0.31925 +/- 0.00638
K (N/m)	0.04061 +/- 0.00027	/	/
P_{turg}(kPa)	84.88 +/- 0.67	/	/

Tableau 3 : Module d'Young (E), constante de raideur (K) et pression de turgescence (P_{turg}) pour des cellules ou agrégats bactériens ne présentant pas de surstructures, floculés par du $PEI_{750000g/mol}$.

Comme on peut le voir dans le tableau 3, dès 2.5 mg/L de polymère, les cellules sont très affectées en termes d'élasticité (figure 10.B et 11.B), la constante de raideur et la pression de turgescence n'étant pas mesurables. Cela s'explique par le fait que le $PEI_{750000g/mol}$ provoque une lyse immédiate de ce type de cellules bactériennes. Ainsi, on ne mesure pas l'élasticité d'une cellule bactérienne mais du matériel intracellulaire qui a été relargué puis réagrégé par le polymère. Cela est en accord avec les conclusions du chapitre 4, et notamment avec la forte augmentation du temps de doublement de la population bactérienne et de l'augmentation de la perméabilité membranaire.

I.2.4 Cas de cellules bactériennes portant des surstructures, floculées par un polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol

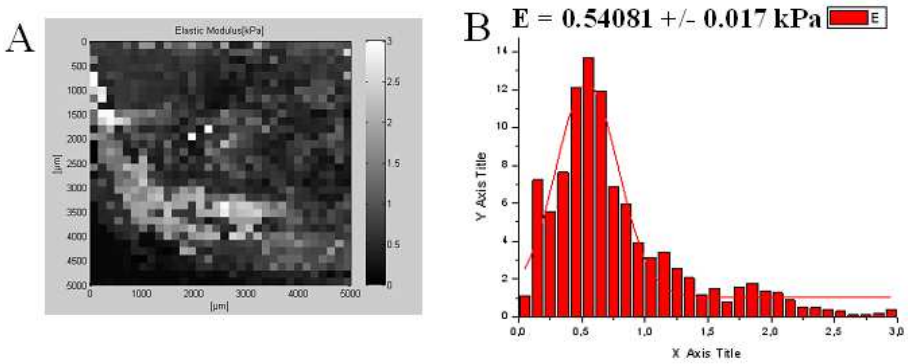


Figure 12 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, traitées avec 5 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

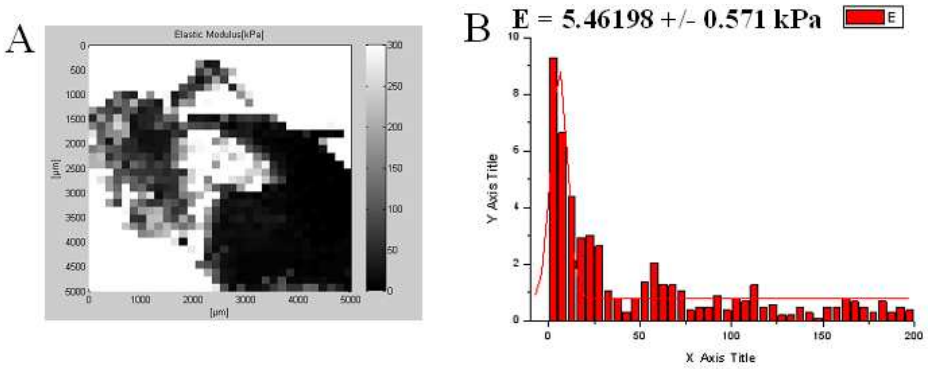


Figure 13 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, de mobilité électrophorétique -0.65 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, traitées avec 10 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young.

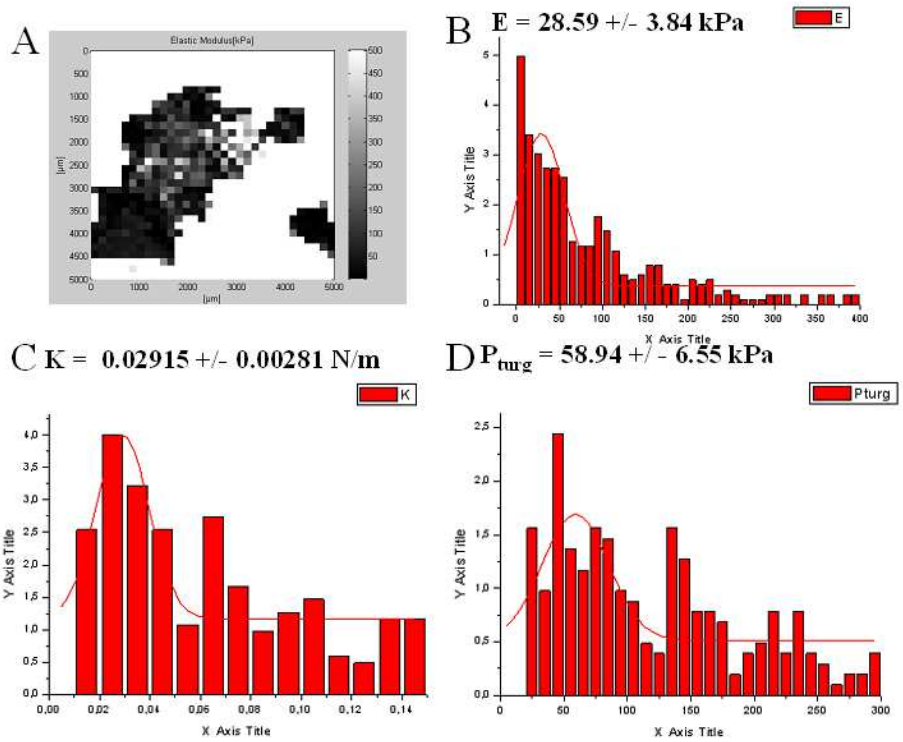


Figure 14 : Caractérisation nanomécanique de cellules bactériennes présentant des surstructures, de mobilité électrophorétique -3.5 10^{-8} m^2 $V^{-1}S^{-1}$, traitées avec 10 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$: A. Représentation de la distribution statistique du module d'Young, histogrammes de fréquence B. du module d'Young, C. de la constante de raideur et D. de la pression de turgescence.

Le tableau 4 résume les résultats présentés par les figures 2, 12, 13 et 14.

Concentration en $PEI_{750000g/mol}$ (mg/L)	0	5	10
E (kPa)	123.13 +/- 3.12	0.54081 +/- 0;017	5.46198 +/- 0.571 28.59 +/- 3.84
K (N/m)	0.03463 +/- 0.00034	/	/ 0.02915 +/- 0.00281
P_{turg}(kPa)	72.35 +/- 0.76	/	/ 58.94 +/ - 6.55

Tableau 4 : Module d'Young (E), constante de raideur (K) et pression de turgescence (P_{turg}) pour des cellules ou agrégats bactériens présentant des surstructures, floculés par du $PEI_{750000g/mol}$.

Tout d'abord, on peut voir que l'élasticité des cellules est fortement altérée dès 5 mg/L de polymère (figure 12.B). Pour cette même concentration, la constante de raideur et la pression de turgescence ne sont pas mesurables. De plus, de la même manière que lors de la floculation de ce type de cellules bactériennes par des $PEI_{60000g/mol}$, on peut voir que les valeurs obtenues se répartissent autour de deux pôles : 5 kPa, / N/m, / kPa et 30 kPa, 0.07 N/m, 60 kPa

représentant respectivement le module d'Young, la constante de raideur et la pression de turgescence (figures 13 et 14).

On peut donc conclure de ces résultats que dès 5 mg/L, la complexation du polymère avec les LPS (chapitre 4) a un impact important sur l'élasticité des membranes bactériennes. Cependant, comme nous pouvons le voir sur les mesures obtenues avec 10 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, les membranes de ce types de bactéries présentent d'importantes hétérogénéités, ainsi certaines zones sont plus affectées par l'action du polymère, cela peut être dû à une répartition inhomogène du polymère lors de l'agrégation. Enfin, cette concentration correspond au domaine où la majorité des cellules bactériennes sont lysées, ce qui explique que, dans la majorité des cas, on ne puisse obtenir de mesure de constante de raideur ou pression de turgescence pour la population bactérienne majoritaire.

II. Etudes des propriétés mécaniques des suspensions bactériennes floculées

Dans ce paragraphe, les échantillons étudiés ont subis, après l'étape d'agrégation, une étape de centrifugation (20000 G, 15 minutes), afin de mimer le traitement de déshydratation subi in situ par les boues d'épuration. Ils se présentent donc sous la forme de culots de centrifugation.

II.1.Etude des suspensions bactériennes non traitées et des solutions de polymère

La figure 15 présente les propriétés viscoélastiques de suspensions bactériennes en présence/absence de surstructures, non floculées par du polyéthylèneimine.

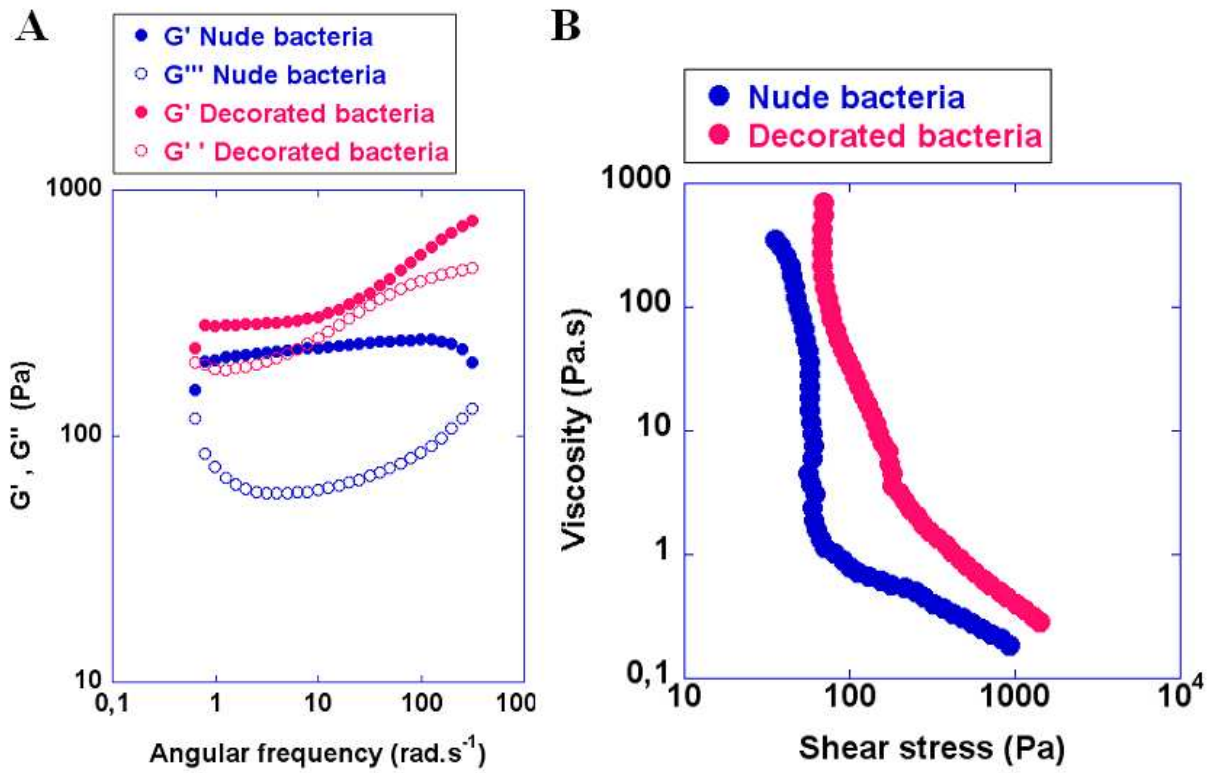


Figure 15 : Evolution A. des modules élastique (G') et visqueux (G'') en fonction de la fréquence angulaire, et B. de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement (shear stress) pour des suspensions bactériennes non floculées présentant ou non des surstructures.

Concernant les bactéries présentant des membranes nues, le module élastique G' est nettement supérieur au module visqueux (G''). La valeur de ces deux paramètres est relativement constante dans la gamme de fréquences étudiée (figure 15.A). Cette évolution est typique du comportement d'un solide et indique que ce type de membranes bactériennes a une réponse élastique à la déformation. Par ailleurs, dans la gamme de fréquences supérieures à 100 rad.s^{-1}, les effets d'inertie du rhéomètre peuvent "fausser" les valeurs des modules élastiques et visqueux [4]. A l'inverse, concernant les bactéries dont les membranes sont agrémentées de surstructures, les modules G' et G" sont du même ordre de grandeur et sont indépendants de la fréquence jusqu'à 10 rad.s^{-1}, signifiant que la déformation ne modifie pas l'intégrité des membranes. Au-delà de cette fréquence, les valeurs de G' et G" augmentent, indiquant une rigidification des suspensions bactériennes sous l'effet des oscillations. Cette augmentation de G' et G'' est liée à la présence des surstructures formant un encombrement stérique. La réorganisation des chaînes polysaccharidiques n'étant pas instantanée, celle-ci génère ainsi une dépendance en temps de type viscoélastique.

Par ailleurs, on peut voir sur la figure 15.B, qu'au repos, c'est-à-dire en absence de contrainte de cisaillement (shear stress), la viscosité des suspensions bactériennes étudiées est non nulle et présente un seuil d'écoulement pour une contrainte d'environ 10^2 Pa. A partir de cette contrainte critique d'écoulement, la viscosité diminue et tend vers une valeur limite d'environ 10^{-1} Pa.s. Cette valeur de viscosité sous cisaillement est 100 fois supérieure à celle de la viscosité de l'eau pure, qui est de 10^{-3} Pa.s.
Lorsqu'on compare les résultats obtenus en présence/absence de surstructures, il apparaît que, pour une valeur de contrainte de cisaillement donnée, la viscosité des suspensions bactériennes portant des surstructures est supérieure à celle obtenue pour des bactéries présentant des membranes nues. Cela s'explique par les effets d'interactions se produisant entre les chaines polysaccharidiques portées par les membranes bactériennes.

Des mesures ont également été effectuées en diminuant la contrainte de cisaillement, sans permettre un retour du système à l'état initial. Cette hystérèse est liée à une altération de l'état d'intégrité des membranes bactériennes, elle-même due à l'intensité des contraintes de cisaillement appliquées. C'est pour cette raison que, dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons exclusivement aux montées progressives en gradient de cisaillement.

La figure 16 présente les propriétés viscoélastiques de solutions de $PEI_{60000g/mol}$ et $PEI_{750000g/mol}$ d'une concentration de 10g/L.

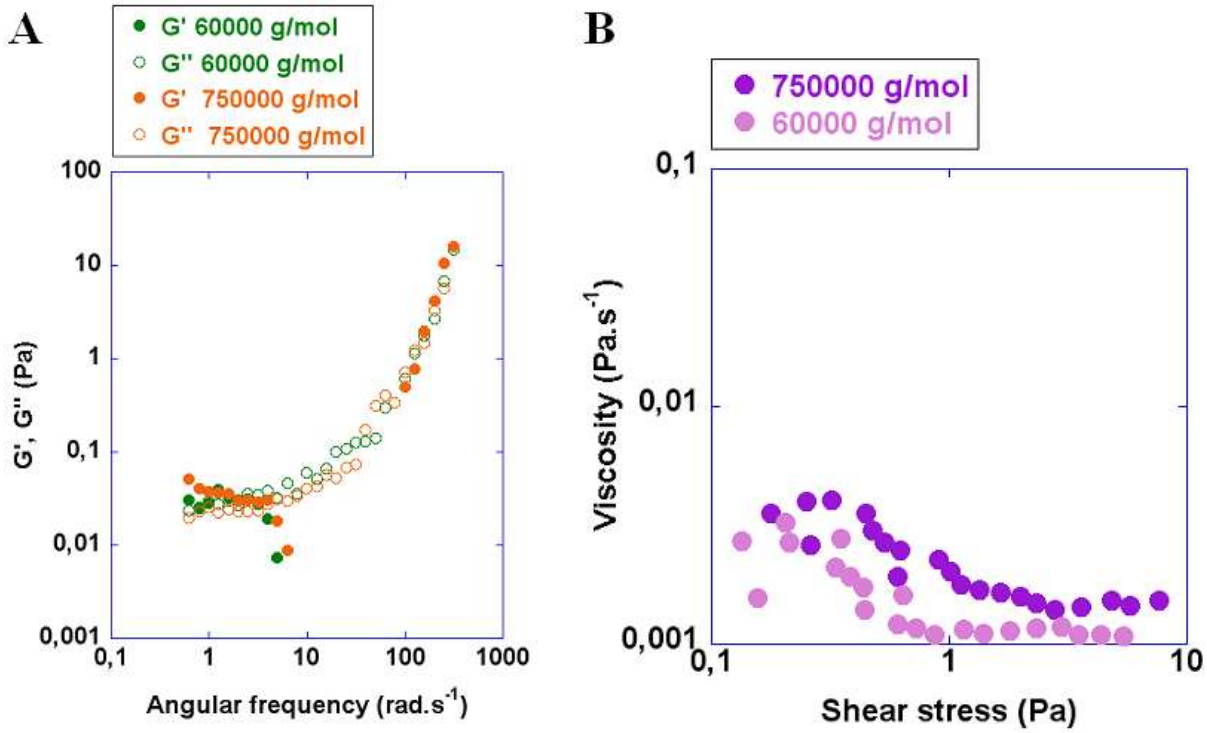


Figure 16 : Evolution A. des modules élastique (G') et visqueux (G'') en fonction de la fréquence angulaire, et B. de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement (shear stress) pour des solutions de $PEI_{60000g/mol}$ et $PEI_{750000g/mol}$.

La valeur du module élastique, de l'ordre de 10^{-2} Pa, est très inférieure à celles observées pour les suspensions bactériennes. Elle diminue très rapidement pour des fréquences supérieures à 10 $rad.s^{-1}$, sans influence de la masse moléculaire du polymère (figure 16.A). L'évolution de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement montre que le polymère a un caractère quasi-newtonien, à savoir, une viscosité quasi-indépendante de la contrainte de cisaillement. De plus, la viscosité des solutions de PEI est très proche de celle de l'eau, 10^{-3} $Pa.s^{-1}$, quelle que soit la masse moléculaire du polymère. Dans la mesure où, lors de la floculation des suspensions bactériennes, les concentrations sont 100 fois inférieures pour les plus élevées, on peut considérer que l'effet de l'ajout de la solution de PEI sur la viscosité reste négligeable.

II.2. Cisaillement oscillatoire

II.2.1 Etude des suspensions floculées par du polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à l'influence de la concentration en $PEI_{60000g/mol}$ sur le module élastique. La figure 17 présente l'évolution du module élastique

d'une suspension bactérienne ne présentant pas de surstructures pour des concentrations en polymère comprises entre 0 et 100 mg/L.

Tout d'abord, on remarque que l'ajout de PEI entraîne une forte augmentation de l'élasticité des suspensions bactériennes et que les valeurs obtenues dépendent de la fréquence angulaire appliquée. Cette dépendance en fréquence indique que les flocs formés par fixation du polymère sur les membranes bactériennes présentant ou non des surstructures, ont un comportement viscoélastique. Ainsi, l'application d'une contrainte se caractérise par un retard à la réorganisation de la structure des flocs.

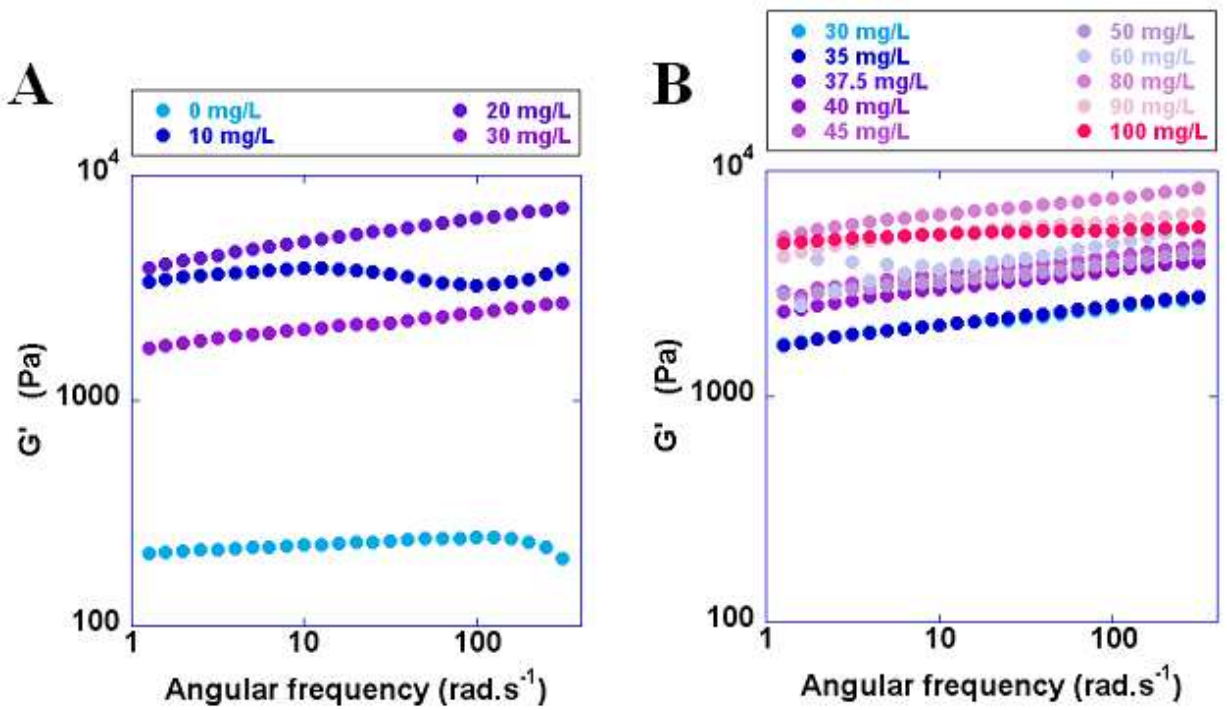


Figure 17 : Evolution du module élastique en fonction de la fréquence angulaire de suspensions bactériennes ne présentant pas de surstructure, floculées par A. 0 à 30 mg/L et B. 30 à 100 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$.

L'évolution de G' se fait en 3 étapes (figure 17), correspondant globalement aux domaines définis au chapitre 3.

Dans un premier temps, on a une augmentation de G' jusqu'à 20 mg/L de polymère, ce qui correspond à l'étape d'agrégation de cellules bactériennes intègres (figure 17.A). Cette évolution s'explique par le fait qu'à mesure que l'on augmente la proportion de polymère fixé sur les membranes bactériennes, l'encombrement stérique et les forces de frottement qui en

résultent sont plus importants, et s'opposent à la déformation des agrégats. On peut noter que cette hypothèse est en accord avec les données de spectroscopie de force, ce qui indique que, même si l'élasticité membranaire est très faible (4.3 kPa environ, Tableau 1), les cellules présentent néanmoins une certaine pression de turgescence (22 kPa, Tableau 1), prouvant ainsi qu'elles ne sont pas lysées.

Dans un deuxième temps, le module d'élasticité diminue entre 20 et 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$ (figure 17.A), ce qui correspond à la concentration pour laquelle il y a lyse bactérienne et érosion des agrégats. La suspension contient alors des résidus cellulaires peu agrégés (chapitre 3). Cela explique que l'énergie nécessaire pour déformer ces agrégats, formés de résidus colloïdaux d'origine intracellulaire, soit inférieure à celle nécessaire pour déformer des agrégats formés de bactéries intègres. Cela correspond à ce que nous avons observé à l'échelle nanométrique : le module d'Young de ce type d'agrégats bactériens est très faible (de l'ordre de 3 à 5 kPa), et la constante de raideur et la pression de turgescence ne sont plus mesurables.

Enfin, G' connaît une nouvelle augmentation jusqu'à 100 mg/L de polymère (figure 17.B), ce qui correspond à l'agrégation secondaire de matériel intracellulaire. La nature des agrégats explique donc, à la fois, le fait que le module d'Young mesuré dans cette gamme de concentration soit nettement inférieur (3 kPa pour 60 mg/L de polymère, tableau 1) à celui obtenue pour les bactéries non traitées (231 kPa, tableau 1) et le fait que la constante de raideur membranaire et la pression de turgescence ne soient plus mesurables. De plus, ce résultat est en accord avec la légère augmentation de module d'Young que nous avons observé lors de mesures effectuées à l'échelle nanométrique (12 kPa pour 100 mg/L de polymère, tableau 1). Il a été montré auparavant que la présence du polymère dans la suspension forme une matrice rigide enchâssant les particules colloïdales agrégés [5-6]. L'augmentation d'élasticité est donc liée à cette matrice polymérique, mais également à la nature des agrégats, composés de résidus colloïdaux.

Comme nous avons pu le voir (et le vérifier pour les cas suivants), les variations du module élastique pour les différentes concentrations en polymère sont uniformes suivant la fréquence. Ainsi, dans la suite de ce travail, nous allons représenter l'évolution du module élastique à la fréquence de 1 Hz (correspondant à environ 6.3 $rad.s^{-1}$) en fonction de la concentration en polymère.

La figure 18 présente l'évolution du module élastique à la fréquence de 1 Hz, pour des suspensions bactériennes en présence et absence de surstructures floculées par du $PEI_{60000g/mol}$.

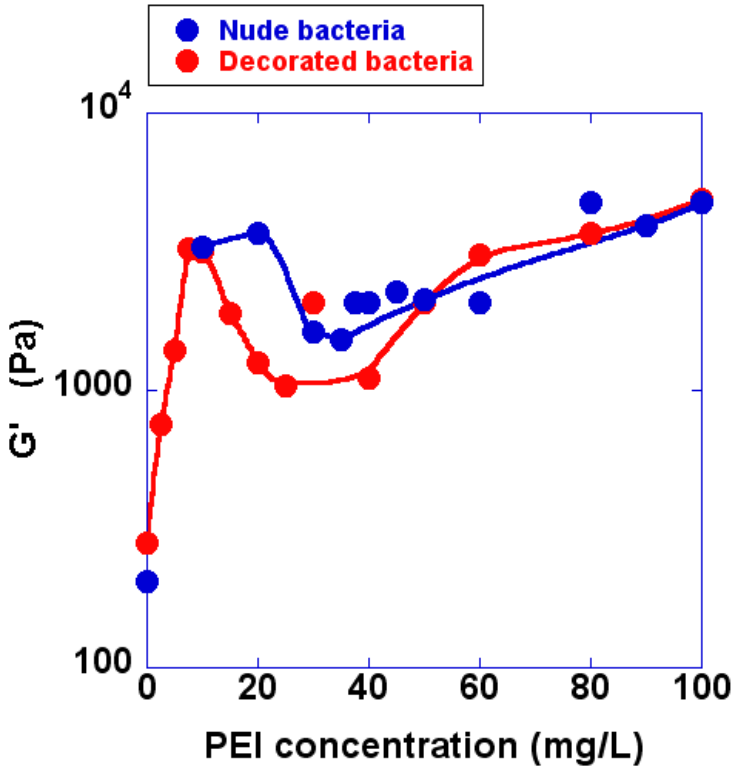


Figure 18 : Evolution du module élastique à la fréquence de 1 Hz pour des suspensions bactériennes portant ou non des surstructures, floculées du $PEI_{60000g/mol}$.

On peut voir que, dans le cas où les cellules bactériennes produisent des surstructures, l'évolution du module élastique en fonction de la concentration en $PEI_{60000g/mol}$ se caractérise par 3 domaines (figure 18) :

- augmentation entre 0 et 10 mg/L,
- diminution entre 10 et 40 mg/L,
- augmentation entre 40 et 100 mg/L.

Dans un premier temps, lorsque la concentration en polymère est comprise entre 0 et 10 mg/L, l'agrégation de cellules bactériennes intègres est à l'origine d'une augmentation de l'élasticité. Ce résultat peut paraître contradictoire avec la valeur de module d'Young obtenue via la spectroscopie de force pour cette gamme de concentration (2 kPa, pour 5 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$, tableau 2) qui révèle que la membrane bactérienne est fortement altérée par la présence de PEI. Néanmoins, à cette même échelle, on mesure une pression de turgescence et

une constante de raideur membranaire (respectivement 0.02 N/m et 33 kPa, tableau 2). Ces données, associées au fait que les surstructures résiduelles sont à l'origine d'un encombrement stérique pouvant générer des forces de frottement s'opposant à la déformation des agrégats, permettent d'expliquer l'augmentation de l'élasticité à l'échelle de l'agrégat.
Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de PEI induit conjointement à l'agrégation de ce type de cellules bactériennes intègres, le relargage des LPS par complexation. L'encombrement stérique lié à ceux-ci est donc moindre, ce qui facilite la reconformation des agrégats les uns par rapport aux autres. Cela explique que le module élastique diminue dès 10 mg/L de polymère, et non à partir de 20 mg/L, valeur correspondant au relargage de la quasi-totalité des surstructures (chapitre 3). Au-delà de 20 mg/L, il y a fixation du polymère sur les membranes bactériennes mises à nues, ce qui crée une matrice polymérique autour des corps bactériens (chapitre 3). Il en résulte des effets d'interaction croissants entre les différentes chaînes polymériques, augmentant ainsi la résistance à la déformation des agrégats et provoquant une augmentation du module d'élasticité dès 40 mg/L. On n'observe pas de diminution d'élasticité lorsque l'on atteint les concentrations lytiques (> 60 mg/L, chapitre 3), cela est dû au fait que le polymère est présent en quantité suffisamment importante dans la suspension, ce qui ne permet pas d'observer de « restabilisation ». Néanmoins, les mesures de spectroscopie de force à l'échelle locale, montrant une élasticité très faible des agrégats (4 kPa pour 100 mg/L de polymère, tableau 2) et ne permettant plus de mesurer de pression de turgescence et de constante de raideur, nous autorisent à dire que le matériel étudié a effectivement été lysé.

Si l'on compare les courbes obtenues pour les deux types de suspensions bactériennes, on constate qu'entre 10 et 35 mg/L de polymère (gamme de concentration correspondant à l'agrégation de bactéries intègres), l'élasticité des bactéries présentant initialement des surstructures est la plus faible. Cela peut paraître en contradiction avec certains résultats publiés dans la littérature [7-9], selon lesquels les structures exopolymériques permettent d'améliorer la stabilité et la résistance au cisaillement des flocs bactériens. Cependant, dans la mesure où les LPS ont été relargués par complexation avec les macromolécules de $PEI_{60000g/mol}$, ces derniers ne jouent plus leur rôle de stabilisation de l'édifice bactérien, ce qui est en accord avec les résultats de Frølund B. *et al.* [10], selon lesquels un relargage des EPS altère la stabilité des flocs. Ainsi, à concentration égale, la quantité de polymère se fixant sur les membranes bactériennes mises à nues est inférieure à celle fixée sur les bactéries ne produisant pas la partie antigène O du LPS. La matrice polymérique, moins importante,

oppose donc une résistance plus faible à la déformation des agrégats. On peut également noter que les deux types de cellules bactériennes présentent un maximum d'élasticité pour une concentration en polymère proche de la concentration optimale de floculation, comme cela a été montré précédemment [11]. Cela est lié au fait qu'un maximum de sites de fixation est occupé, minimisant ainsi les forces osmotiques [12].

Enfin, on peut constater qu'à partir de 60 mg/L de polymère, concentration pour laquelle les deux types de bactéries sont lysées, l'élasticité augmente avec la même intensité, ce qui s'explique par le fait que le polymère forme une matrice rigide entourant les agrégats bactériens, s'opposant à la déformation des flocs [5-6].

II.2.2 Etude des suspensions floculées par du polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol

La figure 19 présente l'évolution du module élastique à la fréquence de 1 Hz pour des suspensions bactériennes en présence/absence de la partie antigène O du LPS, floculées par du $PEI_{750000g/mol}$.

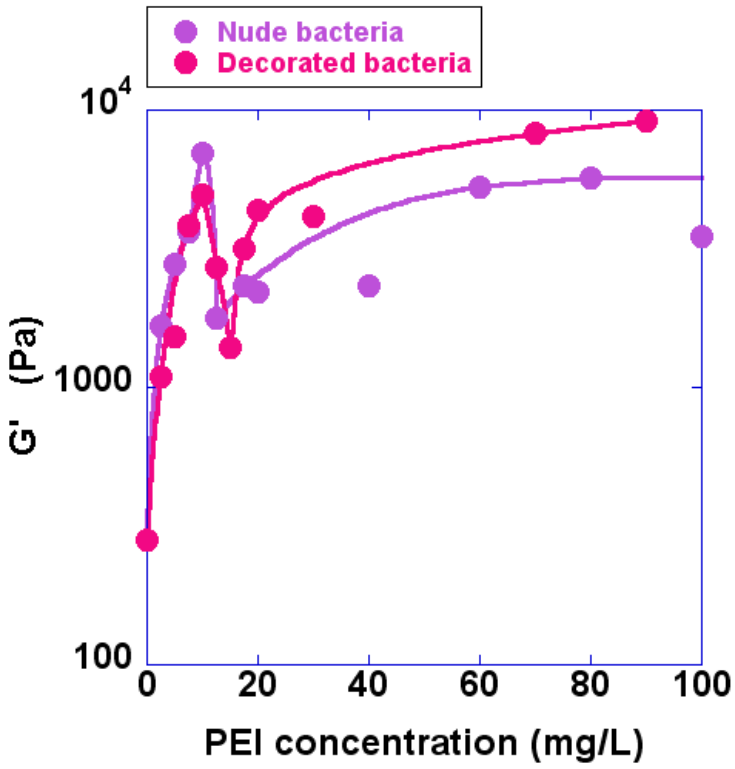


Figure 19 : Evolution du module élastique à la fréquence de 1 Hz pour des suspensions bactériennes portant ou non des surstructures, floculées du $PEI_{750000g/mol}$.

On peut constater sur cette figure que l'élasticité de ces deux types de cellules bactériennes présente la même évolution. Tout d'abord, on observe une augmentation du module élastique jusqu'à 10 mg/L, suivie d'une brusque diminution, jusqu'à 12.5 mg/L et 20 mg/L de polymère, respectivement en absence et présence de surstructures. Finalement, au-delà de cette concentration en polymère, le module élastique augmente et marque un plateau à des valeurs légèrement inférieures à 10^4 Pa, ce qui s'accorde avec les résultats obtenus par Merkel [13], selon lesquels une augmentation de la concentration en polymère supérieure à la dose optimale de floculation conduit à une augmentation de la résistance au cisaillement. Par contre, nous n'avons pu observer de diminution de cette résistance au cisaillement consécutive à une taille d'agrégats trop importante, comme cela a été observé par Örmeci et Abu-Orf [14]. Cela peut être lié au fait que les concentrations en polymère auxquelles nous avons travaillé ne sont pas suffisantes.

Comme nous l'avons montré au chapitre 4, ce polymère provoque l'agrégation des cellules bactériennes dès les plus faibles concentrations (chapitre 4). L'augmentation du module élastique est liée, dans un premier temps, à la formation de ces agrégats. La spectroscopie de force confirme la « toxicité » du polymère en montrant que les membranes bactériennes sont très fortement altérées et présentent une élasticité très faible, de l'ordre de 0.5 kPa pour 2.5 mg/L et 5 mg/L de polymère, respectivement en absence et présence de surstructures. Dans le cas où les cellules bactériennes ne produisent pas de surstructures, l'érosion des agrégats induite par le $PEI_{750000g/mol}$ s'intensifie jusqu'à une lyse totale pour une concentration supérieure à 5 mg/L. Les chaînes polymériques sont présentes en quantité insuffisante pour former une matrice rigide autour des agrégats, ce qui explique la diminution de l'élasticité. Lorsque les membranes bactériennes sont agrémentées de surstructures, la toxicité du polymère est telle que ce dernier provoque l'érosion et la lyse quasi-immédiate des cellules bactériennes dès qu'il entre en contact avec les membranes bactériennes mises à nue et endommagées par le relargage des surstructures. Des agrégats de matériel résiduel intra-cellulaire sont alors formés. Le polymère, dont une partie a été mobilisée par la complexation avec les LPS, est présent en quantité insuffisante pour établir une matrice rigide s'opposant à la déformation des agrégats. Cela explique que l'élasticité augmente à nouveau pour une concentration en polymère supérieure (20 mg/L) à celle des bactéries présentant des membranes nues. On peut noter que contrairement à ce que l'on a observé pour le même type

de cellules floculées par du $PEI_{60000g/mol}$, la complexation des LPS avec le polymère n'entraîne pas de chute de l'élasticité. L'effet de taille et de toxicité du polymère est donc prépondérant par rapport à la présence des surstructures.

Pour des concentrations supérieures à 20 mg/L de $PEI_{750000g/mol}$, correspondant à la lyse des deux types de bactéries étudiées, l'élasticité des échantillons étudiés augmente ce qui est en accord avec les résultats présentés dans la littérature [15-19], il y a donc formation d'une matrice polymérique limitant la déformation des agrégats. Cette dernière a été mise en évidence précédemment dans la littérature [20-23] et explique l'augmentation de leur résistance au cisaillement [5-6]. On constate cependant que le module élastique est supérieur lorsque les cellules bactériennes produisent des surstructures, contrairement à ce que l'on a pu voir lors de la floculation par du $PEI_{60000g/mol}$. Cela illustre l'hypothèse selon laquelle la matrice formée par les structures exopolymériques augmente la résistance mécanique des flocs [7-9].

En fait, comme nous l'avons vu précédemment, lorsque le $PEI_{750000g/mol}$ entre en contact avec la membrane bactérienne mise à nue, les cellules bactériennes sont immédiatement lysées, sans que la totalité des surstructures n'ait été relarguée. Certaines subsistent donc sur les membranes bactériennes lors de la seconde étape d'agrégation (chapitre 4), ce qui génère des forces de frottement et des forces osmotiques [9 ; 24-25] s'opposant à la reconformation des agrégats.

On peut enfin mettre en évidence que, dans ce cas, la mesure du module élastique peut permettre pour ce polymère, de déterminer de façon précise, l'état d'intégrité des cellules bactériennes et les concentrations lytiques.

II.3. Ecoulement

La figure 20 présente les courbes d'écoulement, viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement, obtenues pour des cellules bactériennes ne produisant pas de surstructure floculées par du $PEI_{60000g/mol.}$

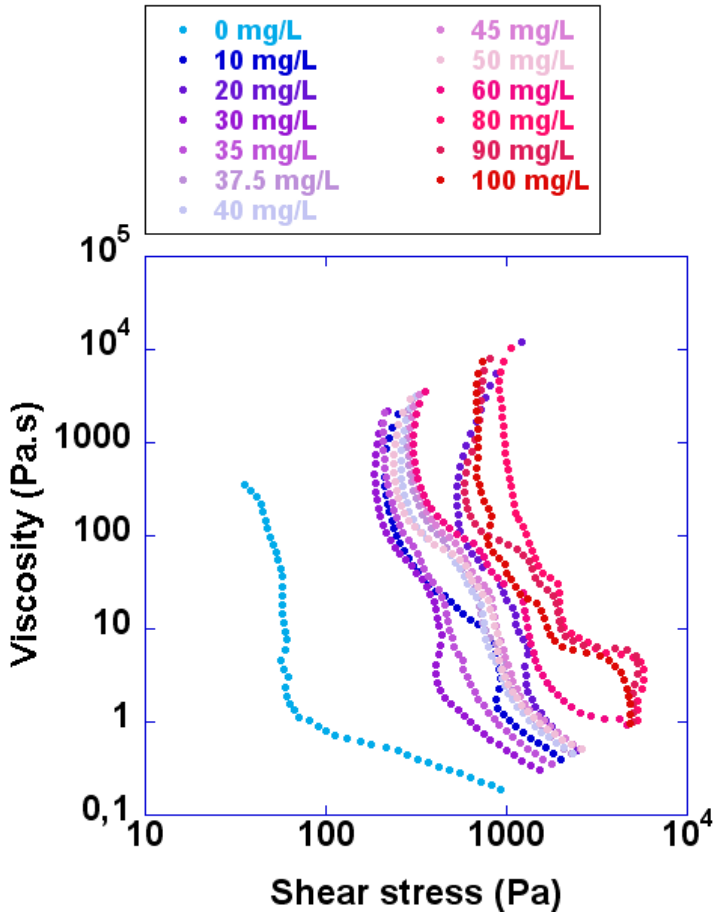


Figure 20 : Evolution de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement effectué sur des suspensions bactériennes ne présentant pas de surstructure, floculée par du $PEI_{60000g/mol}$

Quelque soit la concentration en polymère, l'augmentation de la vitesse de cisaillement induit une diminution de viscosité, on parle de caractère rhéofluidifiant. Lorsque l'énergie de cisaillement est suffisante, il y a érosion des agrégats bactériens, ce qui, comme l'ont montré Abu-Orf et Dentel [26] a pour effet d'exposer de nouvelles charges négatives à la surface des agrégats. En raison de l'apparition de forces osmotiques, ce phénomène induit la libération d'une partie du fluide, ce qui a pour effet de diminuer la viscosité de l'échantillon.

Lorsque le système est fortement agrégé, au-delà de 60 mg/L, le gradient de cisaillement et la viscosité augmentent fortement et les courbes présentent des fluctuations. Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'agrégation de ces suspensions induit une augmentation de la taille moyenne des agrégats. Ainsi les fluctuations observées sur les courbes d'écoulement peuvent être attribuées à des mouvements de ces structures plus larges que l'entrefer de la géométrie de mesure utilisée.

Afin d'exploiter ces résultats, les courbes d'écoulement obtenues ont été modélisées par le modèle de sphères dures étendu aux objets anisotropes que nous allons décrire ci-dessous. Ce modèle nous donne accès à la viscosité infinie (pour un gradient de cisaillement infini) et la contrainte critique d'écoulement (contrainte à partir de laquelle le fluide s'écoule). Il s'applique à des fluides newtoniens (dont les propriétés mécaniques présentent une dépendance linéaire avec l'énergie mécanique appliquée) et non-newtoniens (cas des boues d'épuration et suspensions bactériennes floculées [27-28]). En utilisant l'approche de Quémada, ce modèle permet de décrire l'écoulement de suspensions contenant des particules anisotropes, pouvant être assimilées à des sphères dures.

Avant de décrire le modèle utilisé, nous rappelons ici quelques concepts du modèle de sphères dures. Dans le cas de systèmes dilués, la viscosité de la suspension augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration (jusqu'à des concentrations de l'ordre du pourcent) [29] et répond à l'équation suivante :

$$\eta_s = \eta_f \left(1 + \frac{5}{2}\phi\right)$$

où η_S représente la viscosité de la suspension (Pa.s), η_f, celle du fluide et ϕ la fraction volumique (%).

Cependant, l'une des limites de ce modèle est qu'il est applicable uniquement lorsque les particules n'interagissent pas d'un point de vue hydrodynamique. Ces interactions dépendent au premier ordre de la taille moyenne des particules. Elles n'apparaissent que pour les particules éloignées d'une distance inférieure à leur diamètre hydrodynamique (correspondant au diamètre maximal de la particule en rotation).

Lorsque la concentration en particules s'élève, il est nécessaire de tenir compte des interactions hydrodynamiques [30]. Pour cela, on développe au second ordre l'équation précédente :

$$\eta_s = \eta_f \left(1 + \frac{5}{2}\phi + \left(\frac{5}{2}\right)^2 \phi^2\right)$$

Ce type de modèle s'applique pour des fractions volumiques maximales de 10 %, mais ne prend pas en compte explicitement la taille moyenne des particules. La viscosité relative, η_s/η_f, dépend donc uniquement de la fraction volumique en particules.

Les particules anisotropes tendent à piéger de l'eau dans les irrégularités liées à leur structure, il est donc nécessaire de tenir compte des effets d'encombrements géométriques [31].

Les forces hydrodynamiques (F) s'exerçant sur les particules sont données par la loi de Stokes :

$$F \approx \eta_f \dot{\gamma} D^2$$

avec $\dot{\gamma}$ le gradient de vitesse local (s^{-1}) autour des particules et D, le diamètre (m). Dans les milieux hétérogènes, le principe de continuité de la contrainte permet d'obtenir la relation suivante :

$$F \approx \sigma D^2$$

où σ correspond à la contrainte de cisaillement appliquée au matériau (Pa).

Dans le but de comparer ces forces hydrodynamiques par rapport à l'énergie Brownienne, un nombre de Péclet hydrodynamique (adimensionnel) est introduit tel que :

$$Pe \approx \frac{\sigma D^3}{k_B T}$$

où k_B correspond à la constante de Boltzman ($J.K^{-1}$) et T à la température (K).

Lorsque les concentrations particulaires augmentent, il y a apparition d'un potentiel d'interaction entre les particules, ainsi, le nombre de Péclet peut s'écrire de la façon suivante :

$$Pe \approx \frac{\sigma D^3}{E} \equiv \frac{\sigma}{\sigma_C}$$

avec E correspondant aux énergies d'interaction et σ_c, à la contrainte de cisaillement critique.

Cette relation nous autorise à comparer les forces hydrodynamiques aux énergies brownienne et d'interaction.

Le modèle de Quémada, s'appliquant aux suspensions de sphères dures [32-34] permet d'obtenir une relation liant les viscosités à gradient de cisaillement nul η_0 et infini η_∞ en tenant compte de l'anisotropie des particules, telle que la viscosité relative, η_r , qui est égale à :

$$\eta_r = \frac{\eta_\infty}{\eta_f}\left(\frac{1+Pe}{\chi+Pe}\right)^2 \qquad \text{avec } \chi = \frac{1-\frac{\alpha\phi_{sph}}{\phi_0^*}}{1-\frac{\alpha\phi_{sph}}{\phi_\infty^*}} \quad (-1 \le \chi \le 1)$$

avec ϕ_{sph}, la fraction volumique en sphères, ϕ_0^* et ϕ_∞^*, correspondant respectivement aux fractions volumiques critiques d'empilement de sphères au repos et sous gradient de cisaillement infinis.

Dans le cas de systèmes anisotropes, la fraction volumique effective en sphère dures correspond au volume piégé par les particules en rotation et s'exprime de la façon suivante :

$$\phi_{sph} = \frac{(\pi/6)D^3}{volume\ de\ la\ particule}$$

Dans ce travail, D correspond au diamètre moyen des particules déterminé par granulométrie laser (chapitres 3 et 4).

Enfin, la valeur du paramètre χ est en relation directe avec l'état du matériau.
Dans le cas où la viscosité reste finie au repos, χ est positif et vaut :

$$\chi = \left(\frac{\eta_\infty}{\eta_0}\right)^{1/2}$$

A l'inverse, dans le cas où une contrainte d'écoulement apparaît au repos, c'est le cas du matériel que nous avons étudié, ce paramètre est négatif et s'exprime de la façon suivante :

$$\chi = -\frac{\sigma_y}{\sigma_c}$$

Finalement, ce modèle, appliqué pour différents types de suspensions anisotropes [31 ; 35-36], nous permet de modéliser les courbes d'écoulement expérimentales à l'aide de 3 paramètres :

$\chi, \eta_\infty, \sigma_c$

La figure 21 présente la modélisation d'une courbe de suspension bactérienne floculée par 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$.

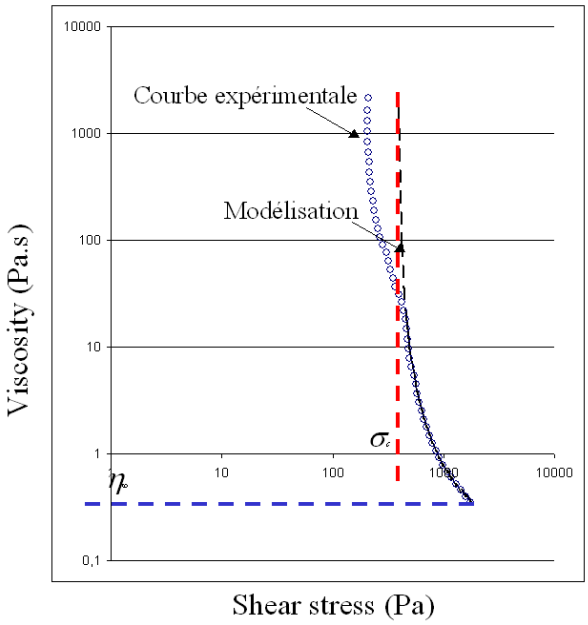


Figure 21 : Modélisation de la courbe d'écoulement obtenue pour une suspension bactérienne ne présentant pas de surstructure, floculée par 35 mg/L de $PEI_{60000g/mol}$.

Notons tout d'abord que les valeurs extraites de ces modélisations présentent certaines limites. En effet, en raison de la taille des agrégats par rapport à l'entrefer, induisant des artéfacts de mesure pour les faibles contraintes de cisaillement, nous n'avons pu modéliser le paramètre de la contrainte critique d'écoulement. Ce problème ne se pose pas pour les valeurs de viscosité à gradient de cisaillement infini, car dans ces conditions, la structure des agrégats est totalement altérée par le cisaillement et la viscosité résultante correspond alors, à la valeur limite atteinte en écoulement. Pour s'affranchir des effets de taille et de sédimentation des agrégats dans l'entrefer, il aurait été intéressant d'utiliser un réacteur de type cellule de Couette pour effectuer ces mesures. Nous avons cependant préféré cette géométrie car les quantités de matériel dont nous disposions étaient relativement faibles. Un réacteur Couette aurait nécessité la production de plusieurs millilitres d'échantillon, ce qui, en raison des temps d'expérimentation et de production des échantillons, n'aurait été que très difficilement réalisable.

La figure 22 présente les valeurs de viscosité sous gradient de cisaillement infini et la quantité d'eau après centrifugation en fonction de la concentration en PEI, pour les deux types de suspensions bactériennes étudiées et les deux masses moléculaires.

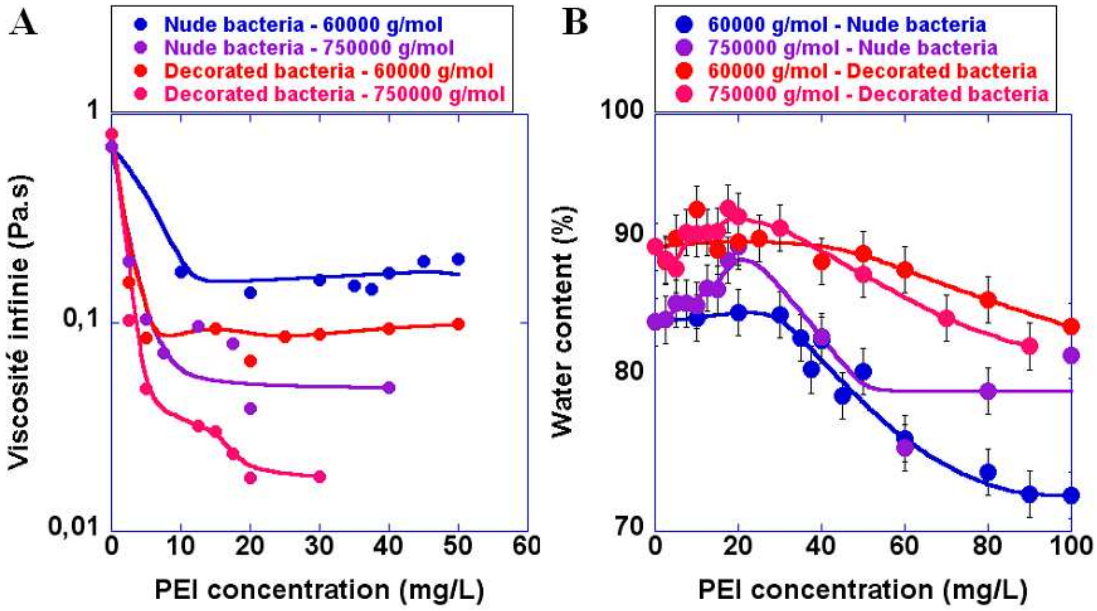


Figure 22 : Evolution de A. la viscosité sous gradient de cisaillement infini modélisée et de B. la quantité d'eau après centrifugation en fonction de la concentration en PEI.

Les résultats présentés en figure 22.A sont à manipuler avec précaution, et nécessiteraient de plus amples investigations pour décrypter plus finement les mécanismes induisant les fluctuations de la viscosité sous cisaillement infini.

Néanmoins sur cette figure, on peut voir qu'à mesure de l'augmentation de la concentration en PEI (> concentrations lytiques), la viscosité à gradient de cisaillement infini se stabilise. On constate qu'une augmentation de la masse moléculaire du polymère tend diminuer la valeur de ce palier, pour un type de bactérie donné. Or, il a été montré qu'il existe un seuil de contrainte à partir duquel les liens formés entre les bactéries et le polymère sont rompus [13], ce qui génère une détérioration des flocs à grande échelle [37]. A partir de ce stade, il y a écoulement des boues et diminution de leur viscosité [38]. Ce phénomène explique que la détérioration des agrégats induise la libération d'une partie de l'eau piégée et la diminution de la viscosité à mesure de l'augmentation du gradient de cisaillement (jusqu'au cisaillement infini). On peut donc déduire de ce résultat qu'après déshydratation par centrifugation, une augmentation de la masse moléculaire du polymère tend à augmenter la teneur en eau de l'échantillon. Cette hypothèse est clairement confirmée dans le cas de bactéries ne produisant pas de surstructures, par les mesures de siccité (figure 22.B). Dans le cas de bactéries portant des surstructures, on peut voir que les teneurs en eau obtenues pour les deux masses moléculaires sont relativement proches, compte tenu des barres d'erreurs. Il est probable que

cela soit lié à des effets de toxicité du PEI. L'augmentation de la masse moléculaire génère un abaissement des concentrations lytiques (chapitres 3 et 4). Ainsi, à mesure que la masse moléculaire de PEI augmente, la proportion de polymère dans les agrégats composés de résidus bactériens évolue de manière inversement proportionnelle. Cette dispersion colloïdale a pour effet d'induire des forces osmotiques à l'origine de la rétention d'eau au sein des agrégats. A l'inverse, pour une masse moléculaire inférieure, la matrice polymérique formée est comparable à un milieu fortement concentré, ce qui par l'intermédiaire de forces osmotiques, tend à diminuer la quantité d'eau dans les agrégats et explique que la viscosité à cisaillement infini obtenue après déshydratation soit supérieure. Cette hypothèse est corroborée par le fait que la viscosité infinie obtenue pour des cellules bactériennes faiblement endommagées (concentration en polymère < 10 mg/L) est supérieure à celle obtenue après lyse bactérienne (figure 22.A).

De plus, quelle que soit la masse moléculaire du polymère, la présence de surstructures tend à diminuer la viscosité des échantillons après centrifugation (figure 22.A) et la siccité des échantillons (figure 22.B). La rétention d'eau est donc supérieure aux cas où les membranes bactériennes sont nues. Ces résultats sont corroborés par l'étude de [39], qui a montré un réel impact de la production de structures exopolymériques sur la viscosité d'une suspension soumises à des contraintes. Rappelons que dans ce cas, la totalité des surstructures n'a pas été relarguée. Il est donc probable que des molécules d'eau soient piégées à cause de fortes pressions osmotiques induites par la présence de cations compensateurs [40-41], comme cela a été montré [9; 25]. En effet, ces forces osmotiques ont un rôle de stabilisation [42] et s'opposent à l'écroulement du matériau induit par les forces de déshydratation [43] et donc à la libération des molécules d'eau lors de l'application de contrainte de déshydratation [41 ; 44]. C'est pour cette raison qu'une diminution de la proportion de structures exopolymériques est à l'origine d'une augmentation de la siccité de l'échantillon, comme cela a été montré au préalable par [9 ; 45].

III. Synthèse

Tout d'abord, on peut constater que suivant la masse moléculaire du polymère, les effets observés sur l'élasticité et la viscosité à gradient de cisaillement infini diffèrent. Cela s'explique par la différence de structure des agrégats. En effet, pour le $PEI_{60000g/mol}$, pour des

concentrations comprises entre 10 mg/L et 60 mg/L, on constate que, dans le cas des bactéries dont les membranes sont dépourvues de surstructures, lorsque l'élasticité est supérieure, la viscosité est supérieure pour ce même type de bactérie. Cette gamme de concentration est à l'origine de la formation d'une matrice rigide englobant les agrégats plus importante que dans le cas où les bactéries produisent des surstructures (car une partie de ce polymère a été consommée par complexation avec les LPS). C'est pour cette raison que les premiers présentent une résistance à la déformation supérieure aux seconds. Le fait que la viscosité à gradient de cisaillement infini suive cette évolution est liée à l'apparition de forces osmotiques engendrées par la présence du polymère. Celui-ci se comporte comme un milieu concentré, induisant des forces osmotiques ayant pour effet de d'augmenter la siccité des agrégats.

A l'inverse, pour le $PEI_{750000g/mol}$, une élasticité supérieure est corrélée à une viscosité sous cisaillement infinie minimale, dans le cas où les bactéries produisant la partie antigène O du LPS. Ce polymère induit une lyse bactérienne quasi-immédiate. Le fait que la résistance au cisaillement soit supérieure lorsque les cellules bactériennes présentent des surstructures s'explique par le fait que leur relargage n'ayant pas été total, celles-ci induisent un encombrement stérique s'opposant à la déformation de l'agrégat. Le fait que la viscosité à gradient de cisaillement infini évolue de manière inverse provient également de la présence des surstructures. Ces dernières induisent des forces osmotiques s'opposant à l'écroulement de la structure de l'agrégat, et ont pour effet de piéger de l'eau au sein de la structure. Ce phénomène explique que la siccité de ce type d'agrégats soit relativement faible par rapport au cas où les surstructures sont absentes.

D'autre part, quelque soit la masse moléculaire employée, la siccité des agrégats après déshydratation est inférieure lorsque les cellules bactériennes produisent des surstructures. Cela est lié, comme nous l'avons dit précédemment, aux forces osmotiques induites par leur présence. On peut également noter qu'en absence de surstructure, une dose de PEI supérieure à la dose optimale nous a permis d'augmenter fortement la siccité des échantillons (figure 22.B), tandis que lorsque les surstructures sont présentes, il n'y a que peu de différence entre la siccité obtenue pour la concentration optimale de polymère et la surdose. La siccité la plus élevée est donc obtenue pour les cellules dont les membranes sont dépourvues de surstructures floculées par du $PEI_{60000g/mol.}$

En conclusion, des mesures de viscosité, aisément réalisable à l'aide d'un rhéomètre, corrélées à des mesures de siccité, pourraient permettre d'ajuster la concentration en floculant. Par ailleurs, des mesures d'élasticité pourraient permettre d'évaluer les concentrations en polymères lytiques. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'impact du floculant sur la déstabilisation et la déshydratation de cellules bactériennes dépourvues de leur surstructure via un traitement chimique.

Références bibliographiques

[1] Polyakov, P. ; Soussen, C. ; Duan, J. ; Duval, J.F.L. ; Brie, D. ; Francius, G. Automated force volume image processing for biological samples. PloS ONE [en ligne]. 2011**,** 6 (4), e18887.

[2] Gaboriaud F. ; Dague E. ; Bailet S. ; Jorand F. ; Duval J. ; Thomas F. Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change. Colloids and surface B : Biointerface [en ligne]. 2006, 52 (2), 108-116.

[3] Francius G. ; Polyakov1 P. ; Merlin J. ; Abe Y. ; Ghigo J.M. ; Merlin C. ; Beloin C. ; Duval J.F.L. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of Escherichia coli cells subjected to osmotic stress. PloS ONE [en ligne]. 2011, 6(5): e20066. doi:10.1371/journal.pone.0020066.

[4] Baravian C. ; Benbelkacem G. ; Caton F. Unsteady rheometry: can we characterize weak gels with a controlled stress rheometer? Rheological Acta [en ligne]. 2007, 46, 577-581.

[5] Deneux-Mustin S. ; Lartiges B.S. ; Villemin G. ; Thomas F. ;Yvon J. ; Bersillon J.L. ; Snidaro S. Ferric Chloride and lime conditioning of activated sludges : an electron microscopic study on resin-embedded samples. Water Research [en ligne]. 2001, 35 (12), 3018-3024.

[6] Marinetti M. ; Dentel S.K. ; Malpei F. ; Bonomo L. Assessment of rheological methods for a correlation to sludge filterability. Water Research [en ligne]. 2010, 44 (18), 5398-5406.

[7] Jorand F. ; Zartarian F. ; Thomas F. ; Block J.C. ; Bottero J.Y. ; Villemin G. ; Urbain V. ; Manem J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water Research [en ligne]. 1995, 29 (7), 1639-1647; DOI 10.1016/S0043-1354/95.

[8] Higgins M.J. ; Novak J. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1997, 123 (5), 479-485.

[9] Mikkelsen L.H. ; Keiding K. Physico-chemical characteristics of full scale sewage sludges with implications to dewatering. Water Research [en ligne]. 2002, 36 (10), 2451-2462.

[10] Frølund B. ; Palmgren R. ; Keiding K. ; Nielsen P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research [en ligne]. 1996, 30 (8), 1749-1758.

[11] Wang Y.L. ; Dentel S.K. ; Mahmudov R. Transformation between flocs and aggregates in the conditioned sludge suspensions during a rotational test using a torque rheometer. Powder Technology [en ligne]. 2011, 208 (1), 189-194.

[12] Dentel S.K. ; Abu-Orf M.M. Laboratory and full-scale studies of liquid stream viscosity and streaming current for characterization and monitoring of dewaterability. Water Research [en ligne]. 1995, 29 (12), 2663-2672.

[13] Merkel W. The flow characteristics of sewage sludge and other thick materials. Journal of Applied Physics [en ligne]. 1934, 5 (11), 355-361.

[14] Örmeci B. ; Abu-Orf M.M. Using torque rheology for the identification of the optimum polymer dose and the best performing polymer. Journal of Residuals Science and Technology [en ligne]. 2006, 3 (4), 227-232.

[15] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Rheology as tool for polymer dose assessment and control. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 1999, 125 (12), 1133-1141.

[16] Örmeci B. ; Abu-Orf M.M. Protocol to measure network strength of sludges and its implications for dewatering. Journal of Environmental Engineering [en ligne]. 2005, 131 (1), 80-85.

[17] Örmeci B. Optimization of a full-scale dewatering operation based on the rheological characteristics of wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2007, 41 (6), 1243-1252.

[18] Langer S.J. ; Klute R. Hahn H.H. Mechanisms of floc formation in sludge conditioning with polymers. Water Science and Technology [en ligne]. 1994, 30 (8 pt 8), 129-138.

[19] Campbell H.W. ; Crescuolo P.J. The use of rheology for sludge characterization. Water Science and Technology [en ligne]. 1982, 14 (6-7 /7), 475-489.

[20] Michaels A.S. ; Bolger C.J. The plastic flow behavior of flocculated kaolin suspensions. Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals [en ligne]. 1962, 1 (3), 153-162.

[21] Firth B.A. ; Hunter J.R. Flow properties of coagulated colloidal suspensions. I. Energy dissipation in the flow units. Journal of Colloid And Interface Science [en ligne]. 1976, 57 (2), 248-256.

[22] Otsubo Y. ; Umeya K. Rheological properties of silica suspensions in polyacrylamide solutions. Journal of Rheology [en ligne]. 1984, 28 (2), 95-108.

[23] Chen B.H. ; Lee S.J. ; Lee D.J. Rheological characteristics of the cationic polyelectrolyte flocculated wastewater sludge. Water Research [en ligne]. 2005, 39 (18), 4429-4435.

[24] Klausen M.M. ; Thomsen T.R. ; Nielsen J.L. ; Mikkelsen L.H. ; Nielsen P.H. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. FEMS Microbiology Ecology [en ligne]. 2004, 50 (2), 123-132.

[25] Kuntz I.D. ; Kauzman W. Hydration of Proteins and Polypeptides. Advances in Protein Chemistry [en ligne]. 1974, 28 (C), 239-345.

[26] Abu-Orf M.M. ; Dentel S.K. Polymer dose assessment using the streaming current detector. Water Environment Research [en ligne]. 1997, 69 (6), 1075-1085.

[27] Dentel S.K. Evaluation and role of rheological properties in sludge management. Water Science and Technology [en ligne]. 1997, Volume 36 (11), 1-8.

[28] Forster C.F. Sludge surfaces and their relation to the rheology of sewage sludge suspensions. Journal of chemical technology and biotechnology [en ligne]. 1982, 32 (8), 799-807.

[29] Einstein A. On the motion of small particles suspended in liquids at rest required by the molecular-kinetic theory of heat. Annalen der Physik. 1905, 17, 549-560.

[30] Batchelor G. K. Brownian diffusion of particles with hydrodynamic interaction. J. Fluid Mech. 1976, 74(1), 1-29.

[31] Baravian C. ; Vantelon D. ; Thomas F. Rheological Determination of Interaction Potential Energy for Aqueous Clay Suspensions. Langmuir [en ligne]. 2003, 19, 8109-8114.

[32] Berli C. L. A. ; Quemada D. Rheological modeling of microgel suspensions involving solid-liquid transitions. Langmuir [en ligne]. 2000, 16, 7968-7974.

[33] Berli C. L. A. ; Quemada D. Prediction of the interaction potential of microgel particles from rheometric data. Comparison with different model. Langmuir [en ligne]. 2000, 16, 10509-10514.

[34] Quemada D. ; Berli C. L. A. Energy of interaction in colloids and its implication in rheological modeling. Advances in Colloid and Interface Science [en ligne]. 2002, 98, 51-85.

[35] Michot L. J. ; Baravian C .; Bihannic I. ; Maddi S. ; Moyne C. ; Duval J. F. L. ; Levitz P. ; Davidson P. Sol-gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. influence of particle anisotropy. 2. gel structure and mechanical properties. Langmuir [en ligne]. 2009, 25, 127-139.

[36] Paineau E. ; Michot L. J. ; Bihannic I. ; Baravian C. Aqueous suspensions of natural swelling clay minerals. 2. Rheological characterization. Langmuir [en ligne]. 2011, 27 (12), 7806-7819.

[37] Dentel S.K. ; Abu-Orf M.M. ; Walker C.A. Optimization of slurry flocculation and dewatering based on electrokinetic and rheological phenomena. Chemical engineering journal [en ligne]. 2000, 80 (1-3), 65-72.

[38] Baudez J.C. About peak and loop in sludge rheograms. Journal of Environmental Management [en ligne]. 2006, 78 (3), 232-239.

[39] V. D. ; Cruz M. ; Marques R. ; Grandfils C. ; Gonçalves M.P. ; Oliveira R. ; Reis M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by Enterobacter sp. Carbohydrate Polymers [en ligne]. 2010, 81 (4), 758-764.

[40] Keiding K. ; Wybrandt L. ; Nielsen P. Remember the water - A comment on EPS colligative properties. Water Science and Technology [en ligne]. 2001, 43 (6), 17-23.

[41] Curvers D. ; Usher S.P. ; Kilcullen A.R. ; Scales P.J. ; Saveyn H. ; Van der Meeren P. The influence of ionic strength and osmotic pressure on the dewatering behaviour of sewage sludge. Chemical Engineering Science [en ligne]. 2009, 64 (10), 2448-2454.

[42] Keiding K. ; Rasmussen M.R. Osmotic effects in sludge dewatering. Advances in Environmental Research [en ligne]. 2003, 7 (3), 641-645.

[43] Buscall R. ; White L.R. The consolidation of concentrated suspensions. Part 1. - The theory of sedimentation. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactios 1: Physical Chemistry in Condensed Phases [en ligne]. 1987, 83 (3), 873-891.

[44] Bowen W.R. ; Williams P. The osmotic pressure of electrostatically stabilized colloidal dispersions. Journal of Colloid and Interface Science [en ligne]. 1996, 184 (1), 241-250.

[45] Jean D.S. ; Lee D.J. Effects of salinity on expression dewatering of waste activated sludge. Journal of Colloid and Interface Science [en ligne]. 1999, 215 (2), 443-445.

Conclusion générale

L'objectif premier de ce travail a été d'accroître les connaissances actuelles concernant la floculation de boues biologiques issues de station d'épuration. Pour se faire, ces dernières ont été « modélisées » par des suspensions bactériennes pures agrégées par des macromolécules de polyéthylèneimine de différentes masses moléculaires. L'originalité de ce système est de permettre de faire varier le paramètre présence/absence de surstructures sur les membranes bactériennes, sans pour autant faire varier le génome des bactéries étudiées.

Les principaux résultats obtenus nous permettent de dire que les mécanismes d'agrégations diffèrent suivant la masse moléculaire du polymère et la présence ou non de surstructures membranaires.

Tout d'abord, nous avons pu voir que quelque soit le type de bactérie étudié, le polymère de masse moléculaire 600 g/mol s'adsorbe sur les membranes bactériennes, les fragilisent mais n'induit pas d'agrégation. C'est pour cette raison que nous n'avons pas étudié l'impact de ce polymère sur la déshydratation des boues.

Les polymères auxquels nous nous sommes intéressés, de masses moléculaires plus importantes, agrègent les suspensions bactériennes, quel que soit le type de membranes.

Lorsque les bactéries ne présentent pas de surstructure, le mécanisme d'agrégation se déroule en trois étapes, on a tout d'abord agrégation de cellules intègres, puis une érosion et une lyse des agrégats (correspondant à une restabilisation de la suspension) et enfin, une réagrégation de résidus colloïdaux issus de la lyse. On peut noter que lorsque la masse moléculaire du polyéthylèneimine est de 750000 g/mol, la concentration minimale pour laquelle la suspension bactérienne est floculée est très inférieure à celle obtenue pour un polymère de masse moléculaire 60000 g/mol. De plus, la toxicité du polymère pour les cellules bactériennes est si importante que l'étape d'agrégation de bactéries intègres n'est pas visible aux concentrations auxquelles nous avons travaillé. De même, il n'y a pas de restabilisation, car la masse moléculaire du polymère permet de former immédiatement des agrégats de taille suffisante pour décanter.

Dans le cas où les cellules bactériennes produisent la partie antigène O du LPS, l'agrégation se fait à des concentrations plus faibles que lorsque les surstructures sont absentes (en raison de l'encombrement stérique qu'elles induisent), pour une masse moléculaire de 60000 g/mol, et pour une concentration similaires pour une masse moléculaire de 750000 g/mol. On peut donc dire dans ce dernier cas, que l'influence de la masse moléculaire du polymère est

prépondérante. Pour ce type de suspension, on observe, conjointement à l'agrégation de bactéries intègres, un relargage des LPS par complexation avec le polyéthylèneimine. Il s'en suit une fixation du polymère sur les membranes bactériennes fragilisées (le relargage des LPS a pour effet de perméabiliser les membranes bacctériennes), puis une érosion des agrégats et une lyse des cellules bactériennes. Notons qu'en raison de la toxicité du polymère de masse moléculaire 750000 g/mol, cette lyse a lieu immédiatement après le relargage des surstructures, dès que le polymère atteint la membrane bactérienne mise à nue. Comme on peut le voir, les LPS agissent comme une barrière protectrice contre les altérations du polyéthylèneimine, et lorsque ces derniers sont relargués, les phénomènes observés sont semblables à ceux que nous avons observés pour les bactéries ne produisant pas de surstructures.
Ces résultats montrent donc clairement qu'un excès de polyéthylèneimine induit une fragilisation des membranes, conduisant une lyse des cellules bactériennes, que ces dernières produisent ou non des surstructures.

Le second objectif de ce travail a été d'étudier l'impact de l'état des cellules bactériennes agrégées et de la masse moléculaire du floculant sur la déshydratation de boues biologiques. Pour cela, nous avons utilisé des suspensions bactériennes floculées que nous avons centrifugées afin de mimer le traitement subi in situ, lors de la déshydratation et nous en avons mesuré l'élasticité et estimé la viscosité à gradient de cisaillement infini. Nous avons corrélé ces données à la siccité des échantillons ainsi obtenus.
Pour des concentrations de polyéthylèneimine de masse moléculaire 60000 g/mol supérieures à la dose optimale de floculation, les suspensions dont les bactéries ne produisent pas de surstructure présentent une élasticité et une viscosité à gradient de cisaillement infini supérieures au cas où celles-ci sont présentes. Cela s'explique d'une part, par le fait que la matrice polymérique rigide formée autour des corps bactériens est plus importantes lorsque les surstructures sont absentes, en raison de la complexation LPS/PEI, et d'autre part, par la fragilisation des membranes bactériennes consécutive à cette complexation. Plus cette matrice est importante, plus les forces osmotiques qu'elle génère sont intenses, ce qui explique que la siccité des échantillons est maximale dans le cas de suspensions bactériennes floculées par un polymère de masse moléculaire 60000 g/mol.
Pour des concentrations similaires, le polyéthylèneimine de masse moléculaire 750000 g/mol confère une élasticité supérieure aux échantillons contenant des cellules bactériennes produisant des surstructures. Cependant la viscosité à gradient de cisaillement infini de ces

dernières reste inférieur à celle obtenues pour les échantillons ne produisant pas la partie antigène O du LPS. Cela s'explique par le fait que même si les deux types de cellules bactériennes sont totalement lysées sur la gamme de concentrations étudiées, la différence de structure des agrégats formés réside dans le fait que la toxicité du polymère est telle que la totalisé des surstructures n'a pu être relarguées avant que les bactéries ne soient lysées. Ces dernières induisent l'apparition de forces osmotiques s'opposant à la déshydratation des agrégats.

Le fait que l'augmentation de la masse moléculaire du polymère diminue la siccité des échantillons pour une même gamme de concentrations, peut être liée à une altération plus prononcée des agrégats étudiés, en particulier, dans le cas où les cellules bactériennes ne présentent pas de surstructure.

Enfin, quelque soit la masse moléculaire employée, il apparaît clairement à l'étude de ces résultats, que la présence de surstructures membranaires est à l'origine de l'apparition de forces osmotiques s'opposant à la déshydratation des échantillons.

Faute de temps, nous n'avons pu soumettre des boues biologiques issues de station d'épuration aux différentes analyses utilisées dans cette étude et comparer les résultats obtenus avec nos systèmes modèles. De plus, dans la mesure où les échantillons ne présentant pas de surstructures présentent un gain considérable en termes de siccité, il serait intéressant de poursuivre ce travail par l'étude d'une « solution » permettant d'obtenir un relargage des surstructures avant la floculation des cellules bactériennes. Un autre axe à prendre en compte sera l'effet toxique et lytique du polymère sur ces membranes bactériennes fragilisées.

D'autre part, nous avons pu voir que, en particulier pour les polymères de hautes masses moléculaires (prioritairement utilisé en station d'épuration), les mesures d'élasticité et viscosités effectuées à l'aide d'un rhéomètre pourraient permettre de déterminer l'état (intègre ou lysé) de suspensions bactériennes déshydratées, et, après corrélation avec des mesures de siccité, d'ajuster la quantité de floculant utilisée.

Résumé

Après déshydration, les boues biologiques présentent en moyenne une siccité de 30%, ce qui pose d'importants problèmes environnementaux. Afin de comprendre les mécanismes phisico-chimiques de rétention d'eau dans ces boues, nous les avons modélisées par une souche bactérienne pure présentant la particularité de produire ou non des surstructures, suivant sa température de culture. Les suspensions bactériennes ainsi obtenues ont été floculées par du polyéthylèneimine de différentes masses moléculaires. Des mesures de densité optique, mobilité électrophorétique, conductivité, pH, absorbance, granulométrie, ainsi que des observations en MET et AFM ont été effectuées. Cela nous a permis de caractériser la structure des agrégats ainsi obtenus et d'évaluer les influences relatives de la masse moléculaire du polymère ainsi que de sa concentration et de la présence/absence de surstructures sur l'agrégation de cellules bactériennes. Des mesures d'élasticité, de constante de raideur et de pression de turgescence ont été effectuées par spectroscopie de force, ce qui nous a permis de caractériser les propriétés nanomécaniques des agrégats. Dans un second temps, les suspensions floculées ont été déshydratées par centrifugation, procédé mis en œuvre dans certaines station d'épuration. Des mesures d'élasticité et de viscosité (gradient de cisaillement infini) ont été effectuées par rhéologie. La corrélation de celles-ci avec des mesures de siccité nous a permis de conclure à un impact important des surstructures, de la masse moléculaire et de la concentration en polymère sur la déshydratation des boues biologiques.

Abstract

After dewatering, a biological sludge still contains an average water content of 70%, thus causing huge environmental problems. To achieve a better understanding of the mechanisms underlying physicochemical interactions inducing water retention in the sludge, the bacterial sludge was modeled by a pure strain producing or not surface appendages, depending on the growth temperature. These bacterial suspensions were flocculated by polyethyleneimine of various molecular weights. Measurements of optical density, electrophoretic mobility, conductivity, pH, absorbance, particle size, as well as AFM and TEM observations were performed. This allowed to characterize aggregates structures and to estimate the influence of molecular weight and concentration of polymer and presence/absence of surface appendages. Measurements of elasticity, spring constant and turgor pressure were carried out by force spectroscopy allowing to characterize nanomechanical properties of aggregates. In a second step, a dewatering of these flocculated suspensions was performed by centrifugation, process used in some wastewater treatment plants. Measurements of elasticity and viscosity were carried out by rheology. Correlations with dryness measurements allowed to conclude that the presence/absence of surface appendages, and also the molecular weight and concentration of the polymer have a significant impact on biological sludge dewatering.