

MASTER PROFESSIONNEL

Mention : Sciences Environnementales
Spécialité : Qualité des Eaux, des Sols et
Traitements

Option : Procédés de Traitements et Dépollution



ELIMINATION DES MICROPOLLUANTS DANS LES EAUX USÉES : ETUDE D'UN BIOFILTRE FONGIQUE (FUNGAL TRICKLING FILTER)

Rapport de Master par Micaela Vargas

Jury:

Jonas Margot (Maître de stage-EPFL)
Boris Lakard (Tuteur-UFC)
Pierre Marie Badot (Directeur du Master)
Myriam Euvrard (Directeur de stage, option PTD)
François Digorgi (Directeur de stage, option SABV)

Lausanne, le 16 septembre, 2013

Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) pour me donner la possibilité de participer à ce projet de master fascinant.

Un remerciement spécial va au Laboratoire de Biotechnologie Environnementale (LBE), son directeur, le professeur Christof Holliger et mon superviseur Jonas Margot. Merci pour la bonne organisation, la transmission des connaissances et la communication au cours de cette expérience inoubliable et agréable.

Merci à tous les employés travaillant au laboratoire. J'ai vraiment apprécié la gentillesse, la bonne ambiance et les conseils pendant mon processus.

Je voudrais aussi remercier mes professeurs de l'Université de Franche-Comté (UFC), pour la qualité de leur enseignement, pour la richesse des connaissances et des méthodes qu'ils m'ont permis d'acquérir, pour leur disponibilité, et pour leurs conseils avisés, contribuant ainsi au succès de mon immersion dans une nouvelle branche.

Merci à mes amis pour leur aide, leur compagnie et leurs encouragements au long du stage.

Abstract

The existence of several micropollutants in wastewater has been long identified in broad categories of persistent organic pollutants that remain active after conventional wastewater treatment. This study conducts a biotechnological strategy applying bio-filtering for the removal of micropollutants using a White Rot Fungus (WRF), *Trametes versicolor*. Its main focus is to produce water that may be reutilized or directly evicted onto surface waters, after treatment at conventional Waste Water Treatment Plants (WWTPs).

WRF has been identified for its ability to degrade micropollutants, this inherent property is based on its capability to produce extracellular enzymes, like the laccase, which oxidizes a wide spectrum of aromatic components, particularly phenol and aniline. This oxidizing property suggests its use for the removal of micropollutants that are usually persistent to biodegradation.

In a first stage *T. versicolor* was grown in different timber supports (little scrap wood): The beech and oak were the best candidates for the growth of *T. versicolor*. In a second stage, laccase activity production was tested in columns (Biofilters) containing the wood support and the fungus *T. versicolor*. Various liquid media were recirculated in the column under different controlled conditions. Oxidation of different micropollutants by the laccase produced in the column was tested for several analgesics, antibiotics, herbicides and industrial additives. Moreover, single tests were run to each micropollutant alone and later tested on defined mixtures due to the sensitivity found in the oxidation rates, when mixed. To compare results and evaluate the efficiency of the laccase generated in the biofilters, oxidation tests with commercial laccase were also performed. The oxidation percentages found were similar, with a variation in the reaction favoring commercial laccase. In the final stage, degradation of micropollutant in the columns (biofilters) was tested. Results show that a variety of micropollutants were totally or partially degraded. However, the effect of micropollutants mixtures might alter the degradation rate. Nonetheless laccase and biofilters capacity to oxidize micropollutants seems very promising and it may be a first approach for improving water effluent quality at WWTPs.

Resumé

La présence de plusieurs micropolluants a été identifiée en sortie des traitements conventionnel des eaux usées. Ce travail a pour but le développement d'une stratégie biotechnologique (de type biofiltres) efficace pour l'élimination de micropolluants. Le champignon de la pourriture blanche (white rot fungus), *Trametes versicolor*, a été utilisé pour la réalisation/fabrication de biofiltres, avec pour objectif de produire des effluents de qualité suffisante pour être réutilisés ou libérés directement dans les eaux de surface. Ce champignon est connu pour sa capacité à dégrader des micropolluants, grâce à la production de la laccase, une enzyme extracellulaire capable d'oxyder un large spectre de composés aromatiques, notamment les phénols et les anilines. Cette capacité pourrait être exploitée pour éliminer certains micropolluants.

Dans une première étape *Trametes versicolor* a été cultivé sur différents substrats de bois (copeaux de bois): le hêtre et le chêne se sont avérés être les plus adaptés pour la croissance du champignon. Dans une seconde étape des tests de production de laccase en colonnes (biofiltres, contenant un substrat de bois et le champignon *T. versicolor*), ont été réalisés en faisant recirculer dans les colonnes différents milieux liquides dans des conditions diverses. L'oxydation de différents micropolluants [mesurée par chromatographie en phase liquide avec détecteur de diodes et injection automatique (HPLC-DAD)], a été testée avec la laccase produite dans les différentes colonnes, pour quelques analgésiques, antibiotiques, herbicide et additifs industriels. Ces composés ont été testés individuellement ou en mélange, ce qui a permis d'identifier l'effet des mélanges sur les taux d'oxydation. L'efficacité de la laccase obtenue en colonne a été comparée à celle d'une laccase commerciale. Les résultats ont montré des taux d'oxydation légèrement plus élevés avec la laccase commerciale. Finalement la capacité des biofiltres (en colonnes) à éliminer les micropolluants a été étudiée.

Les résultats ont montré qu'une large gamme de micropolluants étaient totalement ou partiellement dégradés. Par contre lorsque présents en mélanges les taux d'oxydation des micropolluants pouvaient significativement varier, soit augmenter ou soit diminuer suivant les substances compare aux taux avec les composés individuels. Néanmoins la capacité de la laccase et des biofiltres pour éliminer les micropolluants est très prometteuse et pourrait être une première étape pour l'amélioration de la qualité des effluents de STEP.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Problèmes environnementaux	2
1.2	Techniques écologiques : biofiltres	4
1.2.1	<i>Utilisation des champignons pour le traitement des micropolluants</i>	6
1.3	Champignon <i>Trametes versicolor</i>	7
1.4	Laccase	8
1.4.1	<i>Biodégradation de la lignine</i>	8
1.4.2	<i>Laccase-médiateur</i>	9
1.4.3	<i>Influence du pH, de la température, du milieu et des inhibiteurs sur la production de laccase</i>	10
2	Objectif général.....	11
2.1	Objectifs spécifiques	11
3	Matériel et méthodes.....	12
3.1	Micropolluants – produits chimiques et enzymes	12
	<i>Sulfamethoxazole</i>	13
3.2	Préparation de l'inoculum	14
3.3	Inoculation de différents supports.....	15
3.4	Colonnes	16
3.5	Détermination de l'activité enzymatique.....	19
3.6	Tests d'élimination de micropolluants.....	19
3.6.1	<i>Courbes de calibration (Etalonnage)</i>	19
3.6.2	<i>Analyses des micropolluants</i>	20
3.6.3	<i>Diverses conditions pour la production de laccase et l'élimination des micropolluants en colonne</i>	21
4	Résultats et analyses	22
4.1	Croissance de <i>T. versicolor</i> sur différents supports et production de laccase.....	22
4.2	Activité de la laccase produite par <i>T. versicolor</i> en colonnes	25
4.3	Oxydation de différents micropolluants par la laccase produite en colonne (filtrat de la colonne)	28
4.4	Dégradation de micropolluants par la laccase commerciale.....	32
4.5	Comparaison laccase produit en colonne – laccase commerciale	34
4.6	Elimination des micropolluants en colonne par <i>T. versicolor</i>	36
4.7	Diverses conditions pour la production de laccase et l'élimination des micropolluants en colonne	37
5	Discussion générale, critiques, limites	44
6	Conclusion.....	46
7	Bibliographie	48

8	Annexes.....	52
8.1	Protocole Activité laccase sur ABTS	52
	Protocole pour l'activité de la laccase sur ABTS.....	52
8.2	Courbes de calibration micropolluants, glucose	54
8.3	Protocole préparation différents tampons.....	60
8.4	Préparation UAB medium.....	61
8.5	Protocole test de dégradation	63
	Dégradation des micropollutants avec la laccase	63
8.6	Donnes Spectrophotomètre	64
8.7	Donnes HPLC	68

Liste des tableaux

Tableau 1: Elimination de micropolluant par WRF.....	6
Tableau 2: Quelques caractéristiques des micropolluants étudiés	12
Tableau 3: Test en colonnes, différents mediums.....	22
Tableau 4: Diverses conditions testées pour l'activité enzymatique.....	39

Liste des figures

Figure 1: Champignons <i>Trametes versicolor</i> dans la forêt.....	7
Figure 2: Schéma général de la réaction d'oxydation des phénols par les laccases	8
Figure 3: Mycélium de <i>Trametes versicolor</i> en culture liquide.....	15
Figure 4: Système de colonnes (huit colonnes - eau en recirculation)	16
Figure 5: Schéma du montage expérimental des colonnes	17
Figure 6: Système de colonne avec fermeture de vanne pour éviter la filtration immédiate (saturation).....	18
Figure 7: Colonne avec fermeture de vanne, contact eau-support prolongé.....	18
Figure 8: Nouveau système de colonnes à tester, recirculation permettant un meilleur contact eau-support	18
Figure 9: Croissance de <i>Trametes versicolor</i> sur différents supports.....	23
Figure 10: Activité de la laccase dans le filtrat de colonnes alimentées par de l'eau déminéralisée (différents supports).....	24
Figure 11: Valeurs d'activité de la laccase et suivi du pH en colonnes	25
Figure 12: Colmatage de colonnes et apparition d'autres champignons et de bactéries	27
Figure 13: Oxydation du BPA en mélanges avec d'autres micropolluants	29
Figure 14: Oxydation du DCF en mélange avec d'autres micropolluants.....	30
Figure 15: Oxydation du MFA en mélanges de micropolluants	30
Figure 16: Oxydation du TCS en mélange de micropolluants	31
Figure 17: Oxydation du PCL à différents pH	31
Figure 18: Dégradation de micropolluants par la laccase commerciale (moyenne et écart type de duplicas)	32
Figure 19: Oxydation du MFA avec la laccase commerciale.....	33
Figure 20: Oxydation du TCS avec la laccase commerciale.....	34
Figure 21: Comparaison laccase commerciale – laccase produit en colonne.....	35
Figure 22: Élimination du NPX, colonne copeaux de chêne et <i>T. versicolor</i> , pH 7.7 avec eau du robinet	36
Figure 23: Activité laccase colonne copeaux de chêne, pH 7.7 avec eau du robinet.....	36
Figure 24: Elimination du NPX en colonne, adsorption.....	37
Figure 25: Activité de laccase, avec recirculation d'eaux usées traitées, pH 7, avec et sans ajout de glucose.....	42
Figure 26: Activité de laccase dans différents milieux avec recirculation, pH ₀ 7	43
Figure 27: Variation du pH en fonction du temps de la réaction dans différents milieux avec recirculation.....	43
Figure 28: Oxydation du naproxène dans différents milieux avec recirculation, pH ₀ 7	44

1 Introduction

Capter l'eau directement à partir de sources non traditionnelles telles que les eaux usées industrielles ou municipales et leur redonner une suffisante qualité pour être réutilisés ou libérés directement dans les eaux de surfaces à un coût abordable est un défi. Les eaux usées contiennent une grande variété de contaminants et d'agents pathogènes, et ont une charge très élevée de matière organique, qui doit être retirée ou transformée en composants inoffensifs. Le niveau de traitement requis pour chaque type d'eau avant le recyclage dépend de l'application envisagée et la réutilisation du degré de contamination fécale, de matériel, de produits chimiques domestiques et industriels, et des nutriments, à la fois organiques et inorganiques.

Les procédés classiquement utilisés pour l'épuration des eaux usées peuvent enlever certaines matières organiques mais ne sont pas aussi efficaces pour éliminer d'autres matériaux organiques, des micropolluants qui représentent un problème émergent important en raison de leurs effets négatifs sur la santé et l'environnement.

Beaucoup de micropolluants organiques présents dans les eaux usées municipales, comme les produits pharmaceutiques, les produits de soins corporels, les détergents, les biocides et les pesticides sont mal éliminés dans les stations d'épuration conventionnelles (STEP). Pour réduire l'apport de ces substances dans les eaux de surface, des traitements complémentaires sont nécessaires (MARGOT *et al.* 2013).

Des systèmes physico-chimiques ou biologiques pour réduire l'effet de la contamination par les micropolluants ont été mis en place, mais la plupart d'entre eux sont coûteux ou nécessitent une haute technologie et par conséquent ne peuvent être appliqués à toutes les échelles (GAO *et al.* 2010). À cet égard, dernièrement des applications biotechnologiques ont émergé comme applications potentielles contre les sources de pollution mentionnées. Ces applications utilisant des bactéries ou des champignons (PREUSSLER *et al.* 2009) semblent être une stratégie prometteuse pour atténuer l'impact des micropolluants sur l'environnement.

Bien que les bactéries soient d'une extrême importance dans le processus, les champignons ont aussi un rôle potentiellement intéressant, en particulier les champignons responsables de la pourriture blanche (White Rot Fungus WRF), pour lesquels la dégradation d'un large éventail de polluants est bien connue (GAO et al. 2010).

Les champignons sont connus pour leurs compétences à produire une variété de protéines extracellulaires, d'acides organiques et d'autres métabolites, et leur capacité à s'adapter à des environnements difficiles sans restrictions. En biotechnologie ils ont attiré l'attention sur leur capacité à éliminer/oxyder des micropolluant présents dans les eaux usées. Les champignons de pourriture blanche sont ceux qui ont le plus d'intérêt pour leur pouvoir de dégradation de la lignine, cellulose et hémicelluloses. Cette propriété est basée sur la capacité à produire des enzymes extracellulaires, capables également de dégrader une série de micropolluants (SHAH et al. 2002; WESENBERG et al. 2003). Les enzymes les plus importantes sont la laccase (Lac), la manganèse peroxydase (MnP) et la lignine peroxydase (LiP) (WESENBERG *et al.* 2003).

Les laccases sont des enzymes extracellulaires multicuivre produites entre autres par le champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* (MARGOT et al. 2013). La laccase est une enzyme capable d'oxyder un ample spectre de composés aromatiques, spécialement phénoliques et anilines en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons réduisant l'oxygène en eau (GIANFREDA *et al.* 1999).

La capacité des laccases à oxyder une large gamme de composés phénoliques et d'aniline suggère que ces enzymes pourraient être utilisées pour convertir les micropolluants en composés moins toxiques ou pour les rendre plus sensibles à la biodégradation (MARGOT *et al.* 2013).

1.1 Problèmes environnementaux

Les dangers pour la faune et flore dus à la présence de micropolluants (produits pharmaceutiques et produits chimiques) présents dans les eaux de STEP rejetés dans les eaux de surface sont encore peu connus.

La plupart des études écotoxicologiques sur les produits pharmaceutiques étudiés jusqu'à présent, montrent que la plupart des produits pharmaceutiques ont une toxicité aiguë pour

les organismes aquatiques, qu'à des concentrations dépassant largement les seuils mesurés actuellement dans les eaux (KEIL 2008).

Par contre, des études réalisées avec l'éthinylestradiol (utilisé dans les contraceptifs hormonaux) montrent que les concentrations de cette substance dans les eaux de surface, présentent un danger pour la faune ; la féminisation des poissons a été observée dans les eaux de surface à proximité des Stations d'Épuration des Eaux Usées (STEP), même si l'éthinylestradiol n'est présent qu'en concentrations de quelques nano grammes par litre, sa forte œstrogénicité contribue à ce changement (KEIL 2008). Une étude réalisée sur les rivières du Canada a démontré l'effet des STEP à induire la féminisation de organismes aquatiques (moules sauvages). Des résultats récoltés en amont et aval des STEP ont montré une augmentation considérable des femelles en aval passant de 30 % en amont à 80 % en aval (GAGNÉ *et al.* 2011).

Dans une autre étude effectuée en Suisse, des gammares ont été exposés aux effluents de STEP dans un cours d'eau en aval du rejet. L'alimentation des gammaridés a été significativement réduite, de près de 90% à 50 et 150 m en aval du STEP (BUNDSCHUH *et al.* 2011).

Une autre exemple qui implique les produits pharmaceutiques est la diminution des vautours à cause du diclofénac. En 2003 on a découvert au Pakistan le mystère de la disparition des vautours, était dû aux analgésiques utilisés par les vétérinaires pour les bovins malades. Cet oiseau rapace se nourrissait de cadavres de bovins qui avaient été traités par le diclofénac (KEIL 2008).

L'évaluation des dangers pour la faune et la flore globale est confrontée à des difficultés, notamment à cause des mélanges de micropolluants (produits pharmaceutiques et produits chimiques). L'effet individuel des différentes substances s'additionnent pour autant qu'elles montrent le même mécanisme d'effets. A la date d'aujourd'hui il n'y a que très peu d'études qui prennent en compte les dangers des effets des mélanges des micropolluants présents dans eaux usées. Rien ou presque n'est connu, en ce qui concerne leurs propriétés écotoxicologiques (KEIL 2008).

1.2 Techniques écologiques : biofiltres

La filtration est un des procédés importants utilisés pour le traitement des eaux usées. Dans le traitement des eaux potables elle est utilisée pour purifier l'eau de surface alors que dans le traitement des eaux usées, le but principal de la filtration est de produire des effluents de qualité suffisante pour pouvoir être rejetés dans les eaux de surface. Les biofiltres sont également utilisés avec succès pour le traitement d'effluent gazeux.

A l'origine, les biofiltres (lit bactérien) étaient développés à l'aide d'une roche comme média filtrant, mais à l'heure actuelle, plusieurs types et formes de supports sont également utilisés, avec différents matériaux (média filtrant). Ce procédé est principalement utilisé pour le traitement de petites quantités d'eaux usées (petites communes, hôtels). Le principe de base dans un biofiltre est la biodégradation de polluants par les micro-organismes fixés sur le support du filtre (DURGANANDA *et al.* 2003).

La biofiltration est un traitement de l'eau utilisant la dégradation biologique, qui s'effectue généralement sur un biofilm fixé sur un solide (support). Il y a de nombreux avantages à ce type de traitement : les procédés biologiques de filtration nécessitent relativement peu d'entretien et aucun ajout de produits chimiques, de petites infrastructures, les coûts sont bas pour une élimination significative de la fraction des composés organiques de l'eau. Des procédés de filtration biologique ont été recommandés comme un bon outil pour réduire les fractions biodégradables et assimilables du Carbone Organique Dissous (COD), mais également pour éliminer les composants non-dégradables, tels que les matières colloïdales. La minimisation des composants organiques dans l'eau permet également de réduire les effets négatifs résultant de l'utilisation de chlore pour la désinfection (RATTIER *et al.* 2012).

La masse bactérienne fixée sur le support du filtre (biofilm) est chargée d'oxyder au mieux les matières organiques et de les utiliser comme source d'énergie. Les activités microbiennes peuvent varier en fonction des variations saisonnières. La performance d'un biofiltre peut fonctionner mieux en été qu'en hiver. Il est très important de contrôler et de maintenir la biomasse dans le filtre pour une opération réussie (DURGANANDA *et al.* 2003).

Bien que l'élimination biologique de contaminants dans l'eau potable est un processus qui a été utilisé dans l'industrie depuis de nombreuses années, l'entier potentiel de ces systèmes

n'a pas encore été atteint. Cela est dû au manque de compréhension du plus grand nombre de procédés microbiologiques qui se déroulent au sein du biofilm (RATTIER *et al.* 2012).

Dans un système de biofiltration, les polluants sont éliminés grâce à la dégradation biologique. Avec la progression du processus de filtration, des micro-organismes (aérobie, anaérobie, bactéries facultatives; champignons, algues, protozoaires et autres) se développent sur la surface de la couche filtrante et forment un film biologique ou une couche visqueuse appelée **biofilm**. Le développement du biofilm peut prendre quelques jours ou quelques mois, selon la concentration affluente de matière organique. Le point crucial pour le bon fonctionnement d'un biofiltre est de contrôler et de maintenir en bonne santé la biomasse sur la surface du filtre. Les performances du biofiltre dépendent en grande partie des activités microbiennes. Une source constante des substrats (substance organique et de nutriments) est donc nécessaire pour son bon fonctionnement et efficacité (DURGANANDA *et al.* 2003).

Il existe un certain nombre de technologies de biofiltres, utilisant une variété de matériaux, y compris la tourbe, le sable, le bois, le textile, la coco, le charbon et la mousse, ainsi que différents microorganismes (bactéries, champignons, algues).

Le biofiltre peut être utilisé comme un système à passage unique ou peut incorporer la recirculation. Les systèmes de biofiltration présentent un certain nombre d'avantages et de limites, lesquels varient en fonction du biofiltre utilisé.

La faisabilité d'un maintien à long terme d'organismes spécifiques comme le champignon *Trametes versicolor* par exemple dans le filtre et l'efficacité de ceux-ci pour traiter des eaux usées municipales ne sont pas encore connues.

Le traitement appelé lit fixe (Trickling filter en anglais) est un processus surtout connu pour les eaux usées. Cette technique consiste en faire passer un liquide en permanence ou périodiquement à travers d'un filtré composé de un lit fixe de supports solides couverts par les micro-organismes en croissance. Cette technique est d'intérêt aussi pour la production extracellulaire d'enzymes fongiques (LENZ *et al.* 2004).

1.2.1 Utilisation des champignons pour le traitement des micropolluants

Autres études ont développé une stratégie de biotechnologie pour éliminer les contaminants émergents dans les boues d'épuration, avec un accent particulier sur les composés pharmaceutiques, l'étude était basée sur l'application d'un champignon (white rot fungus), *Trametes versicolor*. Ce champignon est connu pour sa grande capacité de dégradation d'organocontaminants (RODRIGUEZ 2012).

La technique avec les champignons White Rot Fungus WRF a été aussi étudiée dans les eaux usées, notamment pour l'élimination de micropolluants. Les études effectuées sont mis en évidence un large spectre d'élimination de micropolluants. Le Tableau 1 montre différents résultats obtenus pour l'élimination de micropolluants par les WRF (SHUFAN 2012).

Tableau 1: Elimination de micropolluant par WRF

Micropolluants	Concentration (mg/l)	WRF espèces	Temps de traitement	Elimination (%)
Nonylphenol	45	<i>Trametes versicolor</i>	2 semaines	90
Diclofenac	10	<i>Trametes versicolor</i>	4 heures	100
Triclosan	72	<i>Trametes versicolor</i>	4 semaines	90
Nonylphenol	5	<i>Corioloopsis polzyona</i>	4 heures	95
Bisphenol A	200	<i>Stereum birsutum</i>	2 semaines	100
Bisphenol A	200	<i>Heterobasidium insulare</i>	2 semaines	100

(SHUFAN 2012)

Le but du projet dans lequel s'inscrit ce travail est d'optimiser la biodégradation des micropolluants dans des filtres biologiques. Pour ce faire, l'idée est de stimuler et de promouvoir dans ces filtres la croissance d'organismes produisant des enzymes oxydatifs (laccases, peroxydases, oxygénases). Ces enzymes, produits essentiellement par certains champignons

(tels que *Trametes versicolor*) pour dégrader la lignine dans le bois, s'avèrent également capables d'oxyder de nombreux micropolluants.

1.3 Champignon *Trametes versicolor*

Le champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* parfois appelé *Coriolus versicolor* ou *polypore versicolor* est un champignon lignivore, l'un des plus répandus dans le monde, il se trouve dans la plupart des pays. Le mycélium souvent se trouve caché dans la masse du bois. Ce champignon se distingue par une couleur brune, jaune brun et rouge brun rayé, en forme de tuiles ou de rosettes il se développe en temps chaud et humide. (LLOYD 1920).



a) Photo: N. Wilson



b) Photo: Ohweh



c) Photo: D. Fenwic



d) Photo: P. Wollinga

Figure 1: Champignons *Trametes versicolor* dans la forêt

Plusieurs études ont prouvé que dans des conditions appropriées le champignon *Trametes versicolor* présente un potentiel intéressant pour l'élimination de micropolluants dans l'environnement. En fait le champignon sécrète des enzymes, dont la laccase, la lignine peroxydase et la manganèse peroxydase, enzymes (protéines qui servent de catalyseurs naturels) capables de catalyser l'oxydation de composés phénoliques et non phénoliques (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2013).

1.4 Laccase

La laccase fongique est une oxydase multicuivre qui appartient aux phenoloxidas bleu multicuivre.(RODRIGUEZ 2012). L'enzyme contient quatre atomes de cuivre (Cu), dans différents états d'oxydation (I, II, III) (THURSTON 1994), qui jouent un rôle important dans le mécanisme catalytique. La laccase réduit l'oxygène pour former deux molécules d'eau et simultanément elle oxyde différents composés phénoliques et les amines aromatiques par l'abstraction de quatre électrons (BOURBONNAIS *et al.* 1997). La réaction d'oxydation des phénols par les laccases est représenté sur la Figure 2.

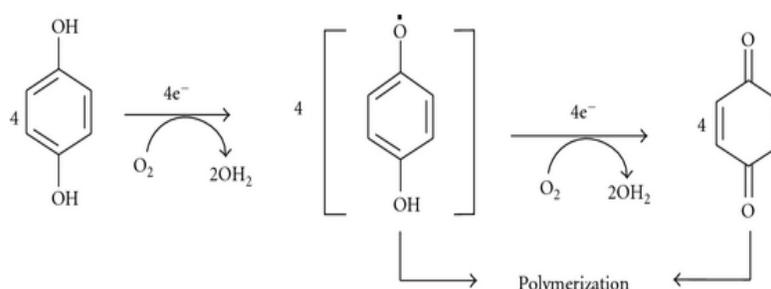


Figure 2: Schéma général de la réaction d'oxydation des phénols par les laccases

Les laccases sont des protéines présentes dans une grande variété d'organismes et elles ont diverses fonctions biologiques. Dans les champignons elles sont secrétées par les basidiomycètes ligninolytiques pour dégrader les polymères de la lignine (GIANFREDA *et al.* 2004).

1.4.1 Biodégradation de la lignine

Nombreux sont les organismes capables de dégrader la lignine, dont des bactéries et différents champignons, mais les seuls qui arrivent à dégrader le polymère de lignine entièrement sont les champignons basidiomycètes (champignons de pourriture blanche, appelés aussi champignons lignolytiques) (CRAWFORD 1981; KIRK *et al.* 1987).

Les champignons *T. versicolor*, *Phlebia radiata* et *Pleurotus ostreatus* sont de basidiomycètes qui arrivent à une forte oxydation de la lignine. La biodégradation de la lignine est un processus oxydatif enzymatique dans lequel participent des enzymes lignolytiques oxydoréductases.

Les enzymes impliquées sont principalement la laccases et les peroxydases ainsi qu'une variété d'enzymes auxiliaires, ainsi que des espèces actives de l'oxygène, des ions métalliques, des radicaux et des composés de bas poids moléculaire, oxydés par la laccase et capables d'attaquer la lignine non spécifiquement (KAWAI *et al.* 1989; GUILLEN *et al.* 2000). La peroxydase est capable d'oxyder des unités non phénoliques de la lignine en utilisant comme un accepteur d'électrons le H_2O_2 . La manganèse peroxydase a besoin de Mn^{2+} qui est oxyde en Mn^{3+} lequel diffuse dans le milieu et peut oxyder les unités phénoliques et non phénoliques de composés organiques (TIEN *et al.* 1983; KUWAHARA *et al.* 1984; JENSEN *et al.* 1996).

Les laccases catalysent l'oxydation des unités phénoliques présentes dans la lignine, en utilisant de l'oxygène comme un accepteur d'électrons (THURSTON 1994). Cette enzyme a une grande importance du fait de sa présence dans la plupart des champignons ligniolytiques (SAPARRAT *et al.* 2002).

1.4.2 Laccase-médiateur

La laccase fongique est une enzyme qui présente un fort potentiel biotechnologique en raison de son utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons. Cependant elle possède un potentiel redox E_0 maximum de 0,8 V, inférieur à celui des peroxydases lignolytiques qui est supérieure à 1 V, ce qui limite son rayon d'action à des composés aromatiques ayant un potentiel redox inférieur à 0.8 V, comme les unités phénolique de la lignine. Toutefois, en présence de certains composés de faible poids moléculaire agissant en tant qu'intermédiaires redox, appelés médiateurs, l'activité catalytique de la laccase peut être étendue à des substrats non phénoliques plus difficilement oxydables (système laccase-médiateur)(KAWAI *et al.* 1987).

Les médiateurs constituent un moyen de transporter les électrons : lorsqu'ils sont oxydés par l'enzyme et stabilisés sous forme de radicaux, ils diffusent loin du centre actif et peuvent ensuite oxyder d'autres substances avec des mécanismes d'oxydation différents à ceux des enzymes (KAWAI *et al.* 1987; BOURBONNAIS *et al.* 1997).

La sélection du médiateur joue un rôle très important dans l'efficacité de l'enzyme. Plusieurs médiateurs ont été testés pour différentes applications (l'oxydation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, et blanchiment des textiles, entre autres). Les inconvénients : coût et toxicité élevé (JOHANNES *et al.* 2000).

Le médiateur idéal doit posséder un poids moléculaire faible, et doit former des radicaux qui ne désactivent pas la laccase, stables, capables de se recycler en cycles successifs d'oxydoréduction sans se dégrader. Du point de vue industriel et environnemental, ils doivent avoir un coût accessible, et doivent être non toxique.

Le médiateur de la laccase le plus étudié est le 2,20-azino-bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS) en raison de la grande stabilité de son radical, cependant, le mécanisme par lequel il interagit avec la laccase est mal connu (COLLINS *et al.* 1996). La première étape d'oxydation de l'ABTS conduit à la formation d'un radical cationique (ABTS + monocationique), lequel est ensuite oxydé au di-cation (ABTS 2 +), qui est le responsable de l'oxydation de la lignine (BOURBONNAIS *et al.* 1990).

1.4.3 Influence du pH, de la température, du milieu et des inhibiteurs sur la production de laccase

La production de laccase est influencée par divers facteurs, tels que la composition du milieu, la présence de nutriments comme le fer, le cuivre et le manganèse, des facteurs comme le pH, la température, le taux d'aération, la présence d'azote, de glucose, entre autres (COUTO *et al.* 2002).

Des études ont démontré qu'une variété de substances, comme l'alcool vératrylique, le tryptophane et des composés aromatiques comme le phénol et l'aniline, ont une capacité à stimuler la production de laccase (KNAPP *et al.* 2001).

D'autres études montrent que certains éléments présents dans le bois et la paille induisent la production d'enzymes. Par exemple, le hêtre agit comme inducteur de production de laccase en combinaison avec diverses concentrations d'azote supplémentaires et de carbone (PAVKO 2011). D'autres études montrent que l'enzyme lignolytique produite par *Squalens sichomitus* peut être considérablement induite en ajoutant du bois de hêtre et des particules de paille dans les tests en milieux liquides. La demande en azote chez les champignons est importante pour la production d'enzymes. Les champignons de pourriture blanche peuvent utiliser de l'azote inorganique ainsi que des sources d'azote organique. Dans la plupart des cas, des études sur la croissance et la production d'enzymes chez les champignons ont utilisé l'azote inorganique (sels d'ammonium), puisque l'azote organique ne semblait pas être avantageux (PAVKO 2011).

En ce qui concerne le cuivre, les champignons montrent une induction de la production de laccase en sa présence. Des études ont montré une augmentation d'activité de la laccase sur le champignon de pourriture blanche *Stereum hirsutum* comme avec le champignon *Trametes troggi* en présence de CuSO_4 . Contrairement à ces résultats des études réalisées par Gomez Dorado *et al.* 2005 montrent que pour le champignon *Trametes versicolor* le CuSO_4 ne fonctionne pas comme inducteur de l'activité enzymatique de laccase (PREUSSLER *et al.* 2009).

En ce qui concerne le pH, la littérature suggère que la majorité des champignons filamenteux de pourriture blanche se développent de façon optimale à pH acide. La majorité des chercheurs suggèrent que l'optimum des valeurs de pH est susceptible d'être dans la plage de 4 à 4,5. Pour la température, la plupart des champignons de la pourriture blanche sont mésophiles avec la température de culture optimal 27-30° C. Les températures optimales pour les réactions enzymatiques sont généralement plus élevées (KNAPP *et al.* 2001).

Les champignons lignolytiques sont aérobies, ils ont besoin d'oxygène pour la croissance et le maintien de leur viabilité. La dégradation de la lignine nécessite également de l'oxygène. La demande en oxygène dépend du champignon et de son système lignolytique. Quelques études de bioréacteurs visant à améliorer le transfert de masse d'oxygène ont utilisé l'aération et l'agitation, cela a montré qu'il peut y avoir une altération sur la morphologie des champignons et que cela peut conduire à la diminution du taux de synthèse de l'enzyme (PAVKO 2011).

2 Objectif général

Concevoir et étudier l'efficacité de biofiltres fongiques pour l'élimination des micropolluants dans les eaux usées municipales. L'idée est d'immobiliser le champignon *Trametes versicolor* sur un support solide et de filtrer les eaux usées à travers ce support.

2.1 Objectifs spécifiques

Pour atteindre l'objectif général, les travaux ont été organisés selon les points suivants:

- Tester en laboratoire l'influence de différents supports ligneux sur l'immobilisation de *Trametes versicolor*, et sur son activité (production d'enzyme et dégradation de micropolluants).
- Tester l'influence de différentes conditions (pH réel ou acidifié, présence de nutriments) sur l'efficacité du filtre, suivi de l'activité de l'enzyme et de l'élimination de micropolluants.
- Définir les conditions optimales pour l'exploitation et l'efficacité des biofiltres fongiques.

3 Matériel et méthodes

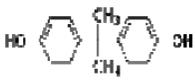
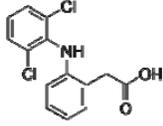
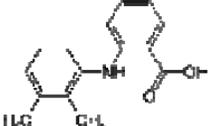
3.1 Micropolluants – produits chimiques et enzymes

Dans cette étude, nous avons utilisé le champignon de la pourriture blanche *Trametes versicolor* approvisionné par l'Université Autonome de Barcelone.

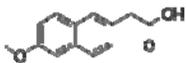
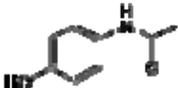
Le Tableau 2 montre le nom et quelques caractéristiques des micropolluants utilisés pour réaliser les différents tests. Les micropolluants les plus communs dans les eaux usées municipales ont été sélectionnés.

Les micropolluants ont été achetés chez Sigma Aldrich Chemie (Buchs, Suisse) avec une pureté supérieure à 97 %.

Tableau 2: Quelques caractéristiques des micropolluants étudiés

Composé	Bisphenol A	Diclofenac	Mefenamic acid
Group de substance	Produits industriels additifs	Analgésique, Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire, analgésique
Structure moléculaire			

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

	(CABANA et al. 2007)	(MARGOT <i>et al.</i> 2013)	(MARGOT <i>et al.</i> 2013)
CAS (a)	80-057	15307-86-5	61-68-7
Poids Moléculaire g/mol	228,3 (b)	296.16 (d)	241.29 (d)
Solubilité dans l'eau (mg/l)	120 - 300 à 25°C (b)	2.4 (d)	20 (d)
Concentration moyenne dans les effluents des stations d'épuration (Suisse) ng/l (a)	331	647	870
Composé	Naproxène	Triclosan	Paracetamol
Group de substance	Anti-inflammatoire analgésie	Pesticide microbicide	Anti-inflammatoire
Structure moléculaire	 (MARCO-URREA et al. 2010)	 (MARGOT <i>et al.</i> 2013)	 (LU <i>et al.</i> 2009)
CAS (a)	22204-531	3380-34-5	Mixture : acetaminophen 103-90-2, polyvinyl pyrrolidone 9003-39-8 (c)
Poids Moléculaire g/mol	230.30 (c)	289.55 (d)	151.2 Acetaminophen (e)
Solubilité dans l'eau (mg/l)	>3000 mg/l (à 37 °C) (c)	10 (d)	-
Concentration moyenne dans les effluents des stations d'épuration (Suisse) ng/l (a)	462	116	-
Composé	Sulfaméthoxazole	Isoproturon	
Group de substance	Antibiotique	Herbicide	

Structure moléculaire		
	(REYNOLDS et al. 1996)	(MARGOT et al. 2013)
CAS(a)	723-46-6	34123-59-6
Poids Moléculaire g/mol	253.278	206.28 (c)
Solubilité dans l'eau (mg/l)	610 mg/L (a 37 °C)	légèrement soluble (c)
Concentration moyenne dans les effluents des stations d'épuration (Suisse) ng/l (a)	238	12

- (a) (KASE et al. 2011)
- (b) (ANSES 2013)
- (c) (ALDRICH 2012)
- (d) (MARGOT et al. 2013)
- (e) (ALDRICH 2012)

Les produits chimiques et enzymatiques, comme les sels d'acétate de sodium, la laccase commercial, l'acide acétique, l'acide citrique, le phosphate de sodium, 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), le méthanol, le glucose, le sulfate d'ammonium et l'acétone ont été achetés chez Sigma Aldrich Chemie (Buchs, Suisse).

Les micropolluants utilisés ont une limite de solubilité dans l'eau, pour cette raison les solutions stock de micropolluants ont été préparées dans du méthanol et de l'acétone (BPA). L'effet des solvants organiques sur la laccase a été testé et aucune différence d'activité ou de stabilité n'a été observée (Voir section 4.4, et Figure 20 a)) (MARGOT et al. 2013).

3.2 Préparation de l'inoculum

Pour la préparation des cultures, des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre contenant de l'agar (15 g/l) / extrait de malt (20 g/l) (pH 4.5) ont été inoculées avec l'organisme d'étude

T. versicolor. Les boîtes ont été incubées pendant 5-7 jours à 25 ° C. Ce temps était suffisant pour obtenir une colonie à utiliser postérieurement pour les expériences.

Pour la préparation du mycélium, une solution autoclavée d'extrait de malt (20 g/l) acidifié à un pH de 4.5 (pH optimal pour *T. versicolor*) a été inoculée avec le champignon à partir des boîtes de Pétri. Les erlenmeyers contenant la préparation ont ensuite été incubés à 25°C pendant 5 jours avec agitation pour les laisser se développer.

Une fois le mycélium du champignon bien développé, la préparation a été filtrée pour récupérer le mycélium, qui a ensuite été mixé et stocké à 4°C dans une solution de NaCl 0.8 % jusqu'à son utilisation.



Figure 3: Mycélium de *Trametes versicolor* en culture liquide

3.3 Inoculation de différents supports

Le mycélium obtenu a été utilisé pour faire l'inoculation des différents supports ligneux (préalablement autoclavés), les quantités de mycélium utilisées étant entre 2 à 4 % (v/v) de la quantité de support utilisée. Une fois inoculés, les différents substrats ont été incubés pendant 4 à 5 jours à 25°C.

Différents supports, collectés dans les forêts du plateau Suisse ont été inoculés : copeaux de bouleau, d'épicéa, de frêne, de chêne, de hêtre, plaquettes de hêtre, paille et jonc.

3.4 Colonnes

Deux systèmes ont été utilisés. Le premier système comptant de huit colonnes de verre de 25 cm de hauteur x 3.5 cm de diamètre, contenant les supports avec *T. versicolor*. Des distributeurs de liquide ont été mis en place pour distribuer le liquide uniformément sur la surface des cultures à partir de la partie supérieure du réacteur (milieu non saturé). Un flacon de 500 ml a été utilisé comme réservoir contenant 200 ml du milieu, lequel recirculait dans le réacteur au moyen d'une pompe. L'énergie était requise uniquement pour les pompes de recirculation. La Figure 5 montre un schéma du système, la Figure 4 (a et b) sa mise en place.



a) Système de colonnes avec eau en recirculation



b) Colonnes avec les différents supports et *T. versicolor*

Figure 4: Système de colonnes (huit colonnes - eau en recirculation)

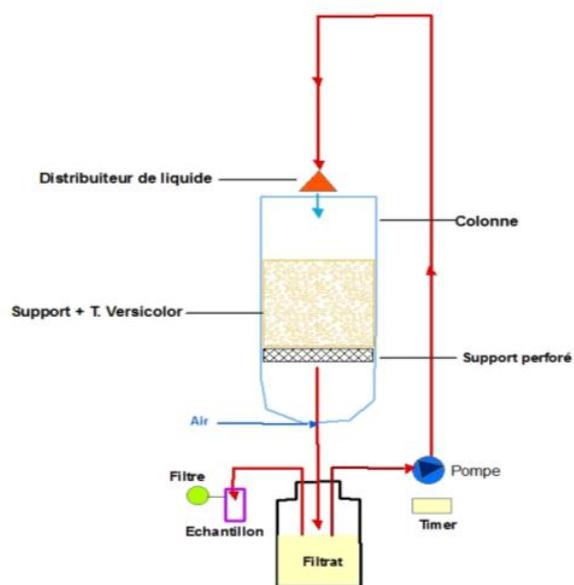


Figure 5: Schéma du montage expérimental des colonnes

Un autre système a été mis en place, avec une seule colonne plus grosse de 30 cm de hauteur et de 7.5 cm de diamètre, fonctionnant de manière similaire aux 8 colonnes, la différence étant que dans ce cas la colonne se remplissait complètement (saturation), une vanne permettant la fermeture automatique de la colonne dans la partie inférieure, ce qui permettait un contact eau-support prolongé. Le temps de fermeture de la vanne était programmé pour une durée déterminée, comme aussi le temps pour la filtration. Un flacon de 1 litre a été utilisé comme réservoir contenant 500 ml du milieu, lequel circulait dans le réacteur par le moyen d'une pompe. Les Figures 6 et 7 montrent sa mise en place.



Figure 6: système de colonne avec fermeture de vanne pour éviter la filtration immédiate (saturation)



Figure 7: Colonne avec fermeture de vanne, contact eau-support prolongé



Figure 8: Nouveau système de colonnes à tester, recirculation permettant un meilleur contact eau-support



3.5 Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant un dosage colorimétrique pour la mesure de l'oxydation de 0.5 mM d'ABTS dans un tampon d'acétate (0.1 M) à pH 4.5. La mesure était réalisée avec un spectrophotomètre UV-visible (U-3010, Hitachi, Tokyo, Japon), l'ABTS était utilisé comme substrat et la mesure de croissance de l'absorbance était mesurée à 420 nm avec un coefficient d'extinction de 36,000 M⁻¹ cm⁻¹ (CHILDS *et al.* 1996) pendant 10 minutes. La pente initiale de la réaction était notée (A/min) dans la zone linéaire. Une unité d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme nécessaire pour produire la catalyse de l'oxydation de 1 μmol d'ABTS par minute à 25°C, pH 4.5. En annexe 1 voir protocole pour l'activité de laccase sur ABTS.

La pente de la droite permet de calculer l'activité enzymatique U/l (en μmol d'ABTS oxydé par minute et par litre de surnageant):

$$\frac{U}{l} [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}] = \frac{\text{pente} [A \cdot \text{min}^{-1}] \cdot 1'000'000 [\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}]}{\varepsilon \cdot l [M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] [\text{cm}]} \cdot \frac{1000 [\mu\text{l}]}{V [\mu\text{l}]}$$

Avec:

- ε - l'absorptivité molaire (aussi appelé coefficient d'extinction molaire), exprimée en M⁻¹·cm⁻¹, qui varie pour chaque composé et longueur d'onde, et vaut 36'000 M⁻¹cm⁻¹ pour l'ABTS à 420 nm
- l - la longueur du chemin optique, qui vaut 1 cm avec ces cuvettes
- V - le volume de surnageant ajouté(en μl) par rapport au volume final (1000 μl)

3.6 Tests d'élimination de micropolluants

3.6.1 Courbes de calibration (Etalonnage)

Les solutions standard de chaque micropolluant utilisé ont été préparées à 8 différentes concentrations : 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.635 et 0.3125 mg/l. Les surfaces des pics de chaque micropolluant en fonction de la concentration ont été utilisées pour obtenir les courbes

d'étalonnage. Les courbes de calibration pour chaque micropolluant sont présentes dans l'annexe 2.

3.6.2 Analyses des micropolluants

Les analyses de micropolluants ont été effectuées par chromatographie en phase liquide avec détecteur de diodes UV-visible et injection automatique (HPLC-DAD) (LC-2000plus, Jasco, Tokyo, Japan). Des aliquotes de 50 µl sont injectées dans le HPLC, où les différents composés sont séparés (colonne Bondapak-C18, 15-20 mm, 3.9 mm x 300 mm, Waters TM, Milford, USA). La séparation des composés était exécutée à 25 °C avec un gradient de H₂O pur contenant 0.1 % d'acide acétique (pH 3.3) et une concentration en méthanol augmentant de 40 à 65 % (v/v) à un débit de 1ml/min. La limite de détection (LOD) était d'environ 0.3 mg/l (1 µM).

Les tests d'oxydation de micropolluant avec la laccase ont été préparés en diluant des solutions stock de micropolluants de concentration 1g/l (concentration finale en vial de 20 mg/l) dans différents tampons, citrate-phosphate (pH 3-9), contenant la quantité de laccase souhaitée.

En Annexe 3, voir le protocole pour la préparation des différents tampons.

100 µ de laccase commerciale en concentration de 2 g/l, étaient ajouté dans un volume final de 1ml (840-880 µl solution tampon, 100 µl laccase 2g/l, 20-60 µl micropolluant 1 g/l), le volume du tampon varie en fonction du nombre de micropolluants testés.

Les réactions ont été initiées par l'ajout de micropolluants, les flacons étaient bien mélangés (vortex), puis incubés à 25 °C. Des aliquotes étaient ensuite régulièrement injectées dans l'HPLC pour suivre la cinétique d'oxydation des micropolluants.

Pour la laccase produite en colonne, les micropolluants étaient directement dilués à une concentration de 20 mg/l dans le surnageant de la colonne contenant la laccase à tester.

3.6.3 Diverses conditions pour la production de laccase et l'élimination des micropolluants en colonne

La production de laccase peut être affectés par divers facteurs tels que la composition du milieu, la température, le pH, le taux d'aération, les concentrations de NH_4 , de cuivre, de glucose et de différents composés aromatiques entre autres (COUTO *et al.* 2002).

Diverses conditions ont été testées en colonnes, en ajoutant de l'azote sous forme d'ammonium en différentes concentrations (20-100-500 mg/l), du glucose (4-8 g/l), du cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) (400-800 μM), utilisant différents pH (4-7.5), différents milieux (eau du robinet, eau déminéralisée, eaux usées traitées) et également en présence ou non de micropolluants (NPX 10 mg/l).

D'autres tests ont aussi été réalisés, en utilisant un milieu défini (macronutriments, micronutriments, glucose, ammonium, tampon MOPS pH 7) selon les données de BLANQUEZ *et al.* 2004 (voir préparation des milieux en Annexe 4). Quatre colonnes avec système de recirculation ont été utilisées pour réaliser cette expérience, les spécifications sont montrées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Test en colonnes avec différents milieux

Colonne	Milieux (volume totale de 200 ml)
1	eau déminéralisée (178 ml), tampon MOPS 100 mM pH 7(20 ml), NPX 1 g/l (2 ml)
2	eau déminéralisée (156 ml), tampon MOPS 100 mM pH 7 (20 ml), NPX 1 g/l (2 ml), UAB medium (micronutriments 2 ml, macronutriment 20 ml)
3	eau déminéralisée (146 ml), tampon MOPS 100 mM pH 7 (20 ml), NPX 1 g/l (2 ml), UAB medium (micronutriments 2 ml, macronutriment 20 ml), glucose 80 g/l (10 ml)
4	eau déminéralisée (126 ml), tampon MOPS 100 mM pH 7 (20 ml), NPX 1 g/l (2 ml), UAB medium (micronutriments 2 ml, macronutriment 20 ml), glucose 80 g/l (10 ml), ammonium 5g N/l (20 ml)

*Les quantités montrées sur le Tableau 3 correspondent aux volumes de solutions mères. Pour la préparation de ces solutions voir Annexe 4.

4 Résultats et analyses

4.1 Croissance de *T. versicolor* sur différents supports et production de laccase

La croissance du champignon *Trametes versicolor* et la production de laccase ont été étudiées avec plusieurs supports ligneux différents (bouleau, épicéa, frêne, chêne, hêtre, paille et jonc) afin de déterminer le support le plus adapté pour la croissance du champignon et pour la production de laccase. Ont été considérés les supports facilement disponibles dans la zone géographique. Les tests ont été effectués en utilisant des copeaux (bois déchiqueté) et des plaquettes comme supports, préalablement rincés et autoclavés

Certains champignons ont une préférence pour un type d'arbre et un arbre peut être associé à plusieurs espèces de champignons. Parmi les supports testés, la préférence du cham-

ignon *Trametes versicolor* était visiblement pour le hêtre et le chêne (Figure 9). Au bout d'une semaine il a été constaté que *T. versicolor* était beaucoup plus développé sur les supports de chêne et de hêtre, moins présent sur les supports de frêne et de bouleau et très peu présents sur l'épicéa.

D'un autre côté, des tests avec de la paille et des joncs ont aussi été effectués : *T. versicolor* parvient bien à se développer sur ces supports mais prend plus de temps et la biomasse est inférieure à celles des supports de chêne ou de hêtre.

Les supports testés les plus adaptés à la croissance de *Trametes versicolor* sont le hêtre et le chêne.

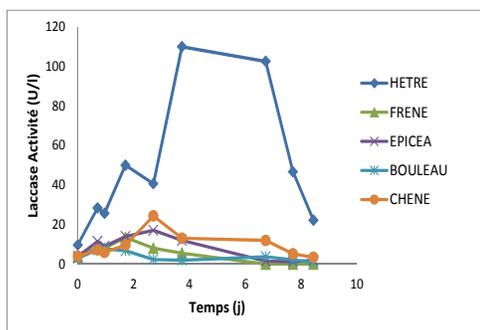


Figure 9: Croissance de *Trametes versicolor* sur différents supports

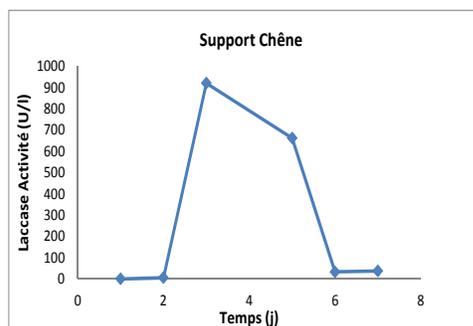
Pour connaître l'activité de la laccase sur les différents supports, l'activité dans le filtrat des différentes colonnes a été mesurée. Cinq colonnes ont été testées avec les supports de chêne, de hêtre, de bouleau, d'épicéa et de frêne. Les colonnes ont été alimentées par 200 ml d'eau déminéralisée.

Les résultats des activités de la laccase dans le filtrat des colonnes montrent que les niveaux les plus élevés ont été atteints avec les copeaux de hêtre, à des valeurs d'environ 110 U/l. L'activité avec ce support a augmenté progressivement de jour en jour atteignant un maximum le quatrième jour. La valeur maximale obtenue pour le hêtre était quatre fois plus élevée que celle obtenue pour le chêne, qui a atteint un maximum de 24 U/l le troisième jour. La valeur la plus basse a été observée avec le bouleau avec un maximum de 7.7 U/l le premier jour et diminuant par la suite.

Parmi les différents supports inoculés avec *Trametes versicolor*, le hêtre est le support avec lequel l'activité de laccase la plus élevée a été observée. Le hêtre ainsi que le chêne ont été choisis pour la suite des expériences (étude d'oxydation et d'élimination de micropolluants). Bien que le chêne dans le test des différents supports ait produit des valeurs d'activité de la laccase beaucoup plus faibles, d'autres tests réalisés avec ce support ont permis d'atteindre des activités de laccase élevées (Figure 10 b) raison pour laquelle ce support, en plus de sa capacité pour la croissance de *Trametes versicolor*, a aussi été choisi pour la réalisation des tests de dégradation des polluants.



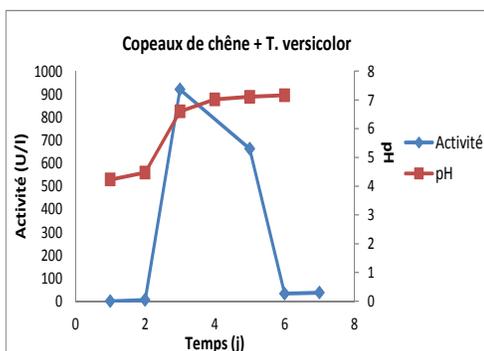
a) Activité de la laccase sur différents supports, mesurée dans le filtrat



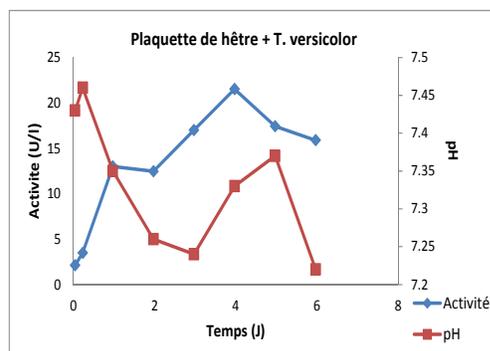
b) Activité de la laccase avec le chêne comme support, mesurée dans le filtrat

Figure 10: Activité de la laccase dans le filtrat de colonnes alimentées par de l'eau déminéralisée (différents supports)

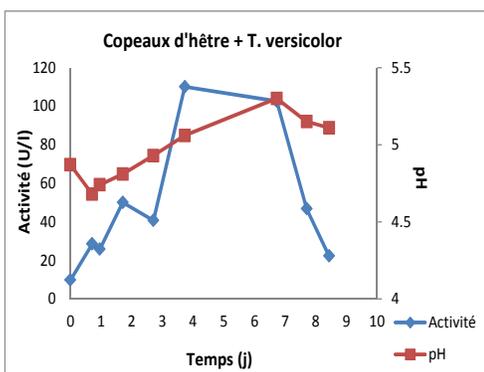
4.2 Activité de la laccase produite par *T. versicolor* en colonnes



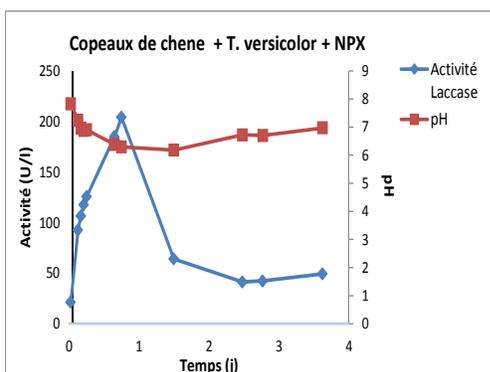
a) Activité de la laccase et mesure de pH, avec recirculation d'eau déminéralisée



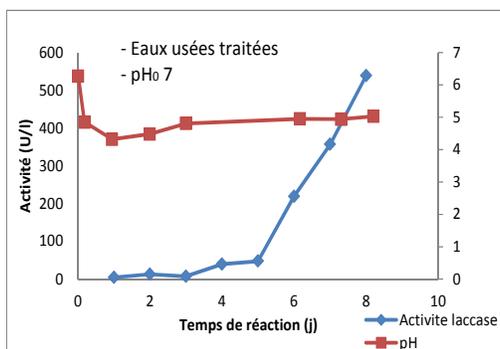
b) Activité de laccase et mesure de pH, avec recirculation d'eau du robinet



c) Activité de la laccase et mesure du pH, avec recirculation d'eau déminéralisée



d) Activité de laccase et mesure du pH, avec recirculation d'eau du robinet (avec saturation périodique du substrat)



e) Activité de la laccase et mesure du pH, avec recirculation d'eaux usées traitées

Figure 11: Valeurs d'activité de la laccase et suivi du pH en colonnes

Les activités de la laccase produites par *T. versicolor* dans les expériences en colonnes sont montrées dans la Figure 11. L'activité de la laccase a été détectée déjà au cours du premier jour de contact et a atteint son maximum en quatre jours, dans trois cas différents (Figure 11, a, b, c). Puis l'activité a commencé à diminuer au bout du 6^{ème} jour, simultanément à l'apparition d'autres champignons dans les colonnes. En présence de naproxène, la valeur maximale d'activité a été de 204 U/l après 18 heures (Figure 11, d).

Le pH semble jouer un rôle important pour la production d'enzyme, l'activité de laccase étant plus élevée quand le champignon se trouve au contact d'une solution à un pH initial autour de 4 à 5. (KNAPP et al. 2001) suggère un pH situé entre 4 et 4.5 pour la production optimale de laccase.

Il est possible de distinguer une différence entre les activités obtenues avec les supports de chêne ou de hêtre avec un pH autour de 4 et 5 (Figure 11, a et c). Dans ces deux cas, on observe une activité importante, mais avec le chêne l'activité est 9 fois plus élevée qu'avec le hêtre. Ceci pourrait être dû au colmatage de la colonne, comme discuté ci-dessous et non à cause des différents substrats utilisés. En présence de naproxène, l'activité est montée à une valeur de 204.13 U/l à un pH stable de 7.5 durant 4 jours d'étude. Il faut noter que dans ce cas le support était périodiquement volontairement saturé, permettant un meilleur contact eau-champignon.

Il est important de remarquer que, avec ces différentes expériences, les colonnes qui étaient les plus colmatées (meilleure rétention d'eau sur le support) ont eu une activité beaucoup plus élevée. Par exemple dans la (Figure 11, a), la colonne étant complètement colmatée, permettant ainsi plus de contact eau-champignon et une amélioration de l'élimination des micropolluants. Dans le cas des plaquettes de hêtre (Figure 11, b), il a été remarqué que l'eau coulait plutôt le long de la paroi de la colonne, ne permettant pas un contact suffisant entre l'eau et le champignon. Avec ces résultats est née l'idée de modifier le système, en utilisant des colonnes de diamètre plus important et un système de recirculation qui permet de saturer périodiquement le biofiltre afin d'améliorer le contact eau-champignon et l'élimination de micropolluants. Les résultats obtenus avec ce système de saturation sont présentés dans la Figure 11 (d), où des valeurs élevées d'activité ont été mesurées, même à un pH de 7.

La saturation périodique du biofiltre, bien qu'améliorant le contact eau-champignon, pose quelques problèmes : il a été remarqué que les conditions de saturation empêchent la survie à long terme du champignon qui est habitué à vivre dans des conditions insaturées. On observe par exemple (Figure 11, a) que la colonne complètement colmatée arrive à une activité élevée mais que celle-ci diminue rapidement d'un jour à l'autre. Dans les colonnes où il y a colmatage, d'autres champignons ainsi que des bactéries peuvent entrer en compétition avec *Trametes versicolor* (Figure 12).



a) Accumulation d'eau dans le support

b) Apparition d'autres champignons

c) Présence d'autres champignons et colmatage de la colonne



d) Apparition d'autres champignons

e) Colmatage des colonnes, présence d'un champignon vert (à gauche), présence d'un biofilm en surface (à droite)

f) Colonne sans colmatage (à gauche), avec colmatage (à droite)

Figure 12: Colmatage de colonnes et apparition d'autres champignons et de bactéries

D'autres expériences ont été réalisées dans des colonnes de plus grand diamètre pour améliorer le contact eau-support (diminution du ruissèlement le long des parois de la colonne) avec un système de recirculation, un support plus compact pour permettre une période plus longue de contact eau-support. Les expériences ont été réalisées avec des eaux usées traitées pour s'approcher au mieux des conditions réelles d'application (traitement en STEP).

Dans ces expériences, l'activité de la laccase a été détectée déjà au premier jour de contact et a atteint son maximum au bout de 7 jours avec une activité de 538 U/l. Au jour 8, d'autres champignons sont apparus.

4.3 Oxydation de différents micropolluants par la laccase produite en colonne (filtrat de la colonne)

Lors des tests de production de laccase en colonnes, le surnageant (filtrat) d'une colonne ayant une activité laccase élevée (934.4 U/l) a été récupéré pour réaliser des tests d'oxydation de différents micropolluants.

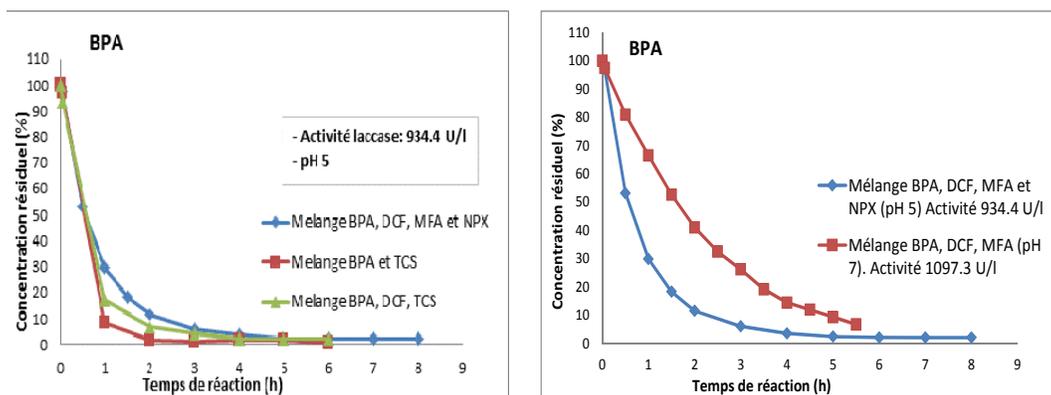
Initialement, les tests d'oxydation des micropolluants étaient effectués individuellement. Après avoir réalisé quelques tests en utilisant des mélanges de micropolluants les résultats montrent que le taux d'oxydation en mélange sont différents et qu'ils peuvent varier en fonction des mélanges. Comme l'objectif de ce travail est l'application de laccase pour le traitement des eaux usées, il est nécessaire de faire une étude des mélanges de micropolluants qui sont présents dans les eaux usées.

Dans l'étude plusieurs mélanges ont été effectués. Les micropolluants utilisés sont le Diclofenac (DCF), l'acide méfénamique (MFA), le Triclosan (TCS), le Bisphenol A (BPA), le Paracetamol (PCL), le Naproxène (NPX), le Sulfaméthoxazole (SMX) et l'Isoproturon (ISP). Les différents mélanges testés sont représentés dans les graphiques ci-dessous.

Les résultats obtenus pour l'oxydation du Bisphenol A (BPA) avec différents mélanges sont présentés dans les Figures 13 a) et b).

Une élimination de plus de 80 % de la concentration du BPA a été observée dans les mélanges TCS-BPA et BPA-DCF-TCS après seulement 1 heure de réaction. Pour le mélange BPA-DCF-MFA-NPX une élimination de 81 % a été observée après 1 heure et demie, arrivant à 97 % d'élimination après 5 heures. Ces tests démontrent la capacité de laccase à oxyder le BPA et que ce micropolluant n'a pas un effet mélange remarquable, il s'oxyde plus lentement en présence du DCF, MFA et NPX (effet de compétition pour l'enzyme), mais arrive à s'éliminer à presque 100 % après 5 heures de réaction.

La figure 13 (b) montre différents mélanges du BPA avec d'autres micropolluants à deux différents pH (5 et 7). Le BPA n'a été que légèrement influencé par la présence d'autres composés, mais le taux d'oxydation était plus lent à pH 7. Pour le mélange BPA-DCF-MFA à pH 7, il a fallu 5 heures et demie pour atteindre un taux d'élimination de 93 % et 1 heure pour un taux de 47 %. Pour atteindre le même taux d'élimination (47 %) à pH 5 il n'a fallu que 30 minutes, en 1 heure un taux d'élimination de plus que 81 % pouvait déjà être atteint.



a) Oxydation du BPA dans différents mélanges

b) Oxydation du BPA à différents pH

Figure 13: Oxydation du BPA en mélanges avec d'autres micropolluants

Pour le Diclofenac (DCF), la présence d'autres micropolluants affecte son élimination. La Figure 14 montre qu'en mélange le DCF arrive à être éliminé à plus de 80 % en 4 heures, sauf en mélange avec le SMX où la valeur d'élimination est de seulement 66 % en 4 h. En mélange DCF-MFA-NPX-BPA l'élimination du DCF est autour de 90 % en 3 h de réaction, le même composé en mélange avec le BPA et TCS est éliminé en plus que 90 % en 2 heures et le DCF en mélange qu'avec le TCS attends un temps de réaction 4 h pour le même taux d'élimination.

Dans le cas du DCF on observe que la présence d'autres composés peut avoir une forte influence, vu que selon les mélanges la vitesse de réaction peut augmenter ou diminuer.

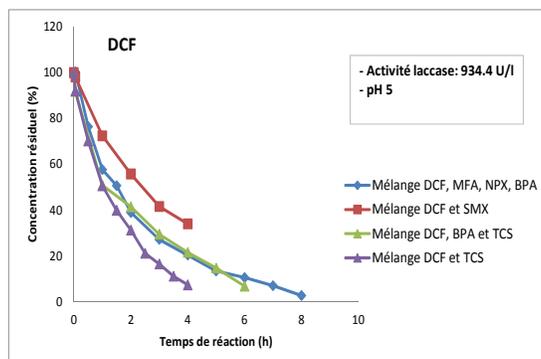


Figure 14: Oxydation du DCF en mélange avec d'autres micropolluants

En ce qui concerne le MFA on observe une forte influence quand il est en mélange. Par exemple en 1 heures de temps de réaction (Figure 15), le 50 % du MFA a été enlevé dans un mélange MFA-DCF-NPX-BPA et pour le mélange MFA-ISP-SMX la taux d'élimination été de 34 %.

Nos résultats montrent à nouveau que le taux de transformation peuvent être sensiblement différent dans les mélanges.

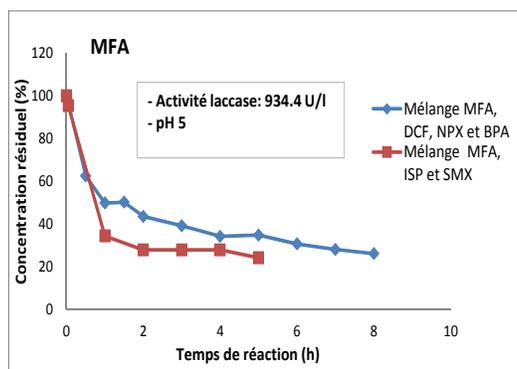


Figure 15: Oxydation du MFA en mélanges de micropolluants

Pour le Triclosan (TCS) nos résultats montrent que le taux d'élimination est également sensiblement différent dans les mélanges. Avec une activité de laccase de 934.4 U/l, le TCS seul est éliminé à 79 % en 6 heures. Au même temps de réaction, le TCS en combinaison avec le BPA atteint un taux d'élimination de 71 %, par contre, quand il est mélangé avec le DCF le taux d'élimination est presque 3 fois plus bas (24 %). Le mélange TCS-BPA-DCF montre aussi le même effet, avec un taux d'élimination de seulement 31 % en 6 heures de

réaction et 15 % en 4 heures. Visiblement, le taux d'élimination diminue en présence du diclofenac (DCF).

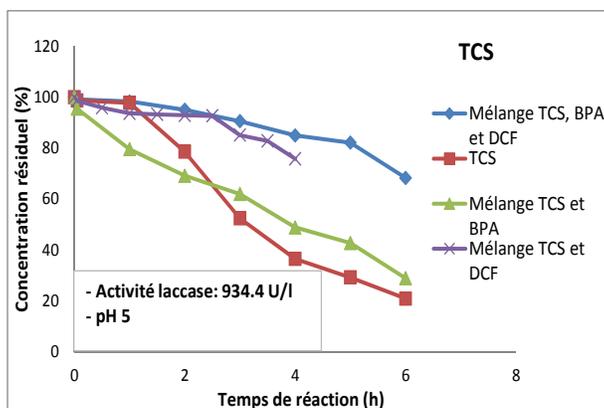


Figure 16: Oxydation du TCS en mélange de micropolluants

Sur la Figure 17 on observe les différentes concentrations résiduelles en fonction du temps de réaction pour le paracetamol (PCL) à deux différents pH (7 et 5). A pH 5, le taux d'élimination attend déjà 79 % en 15 min, 91 % en 30 minutes et 99.5 % en 1 heure 30 minutes; à un pH de 7 ce taux est de 52 % à 30 min de réaction, 80 % à 1 heure et demie et 97 % à un temps de réaction à deux heures et demie.

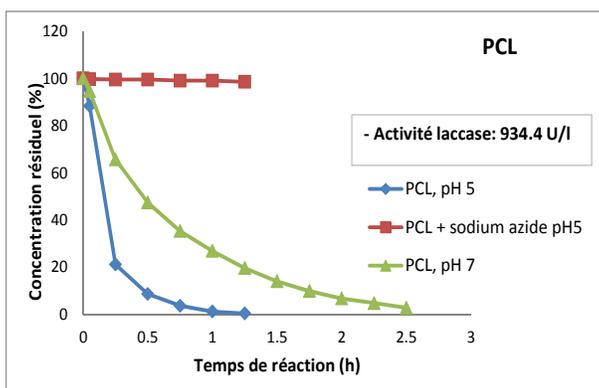


Figure 17: Oxydation du PCL à différents pH

Pour nous assurer que l'élimination était due à l'activité enzymatique, un test en conditions similaires mais avec de l'azoture de sodium (azide), un inhibiteur de la laccase, a été réalisé. Ce résultat est montré sur la Figure 17. On observe qu'il n'y a pas d'élimination du PCL, ce qui indique que les résultats montrés précédemment sont dûs à la réaction enzymatique.

4.4 Dégradation de micropolluants par la laccase commerciale

La laccase commerciale a été testée à deux différents pH et deux différentes activités enzymatiques. Pour le BPA, un taux d'élimination de 97 et 100 % après 1 heure de réaction (pH 5, activité de 748 U/l) a été observé dans les différents mélanges testés. Le PCL a été testé à un pH de 6 et une activité de 610 U/l. Dans tous les mélanges testés, le taux d'élimination était supérieur à 90 % après 1 heure de réaction.

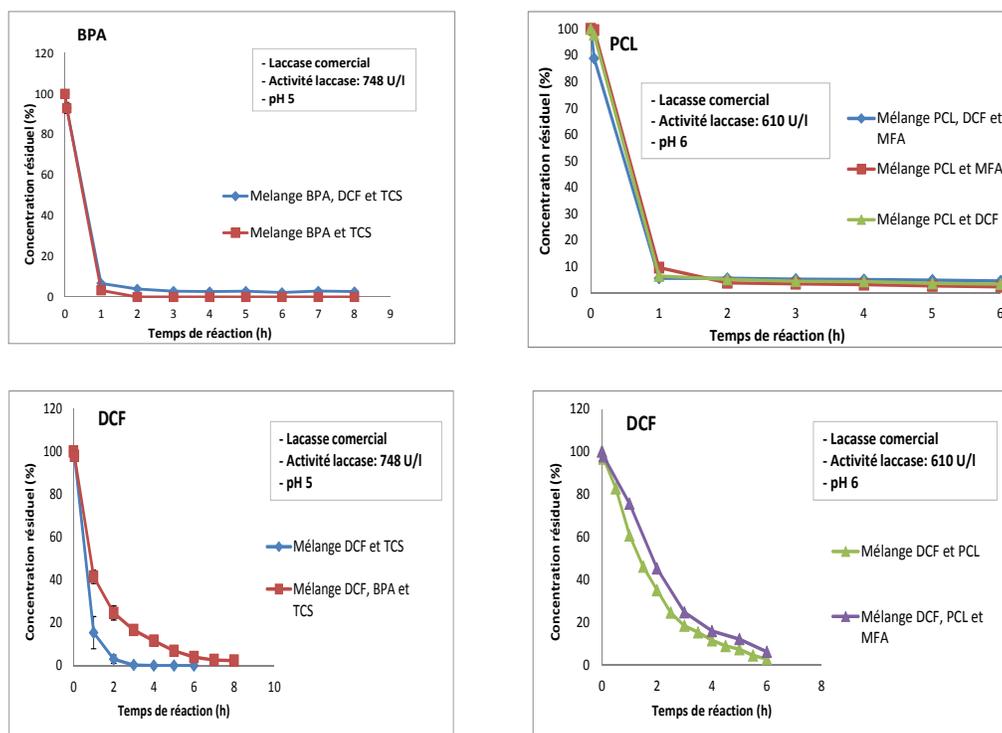


Figure 18: Dégradation de micropolluants par la laccase commerciale (moyenne et écart type de duplicas)

En ce qui concerne le DCF il a été testé à deux pH et activités différents. Dans les différents mélanges testés le DCF arrive à être éliminé à plus de 90 en moins de 6 h. A un pH de 5 et une activité enzymatique plus élevée on observe une élimination plus rapide, avec 80 % d'élimination en 1 et 3 heures de réaction. (Mélange DCF-TCS : 84% en 1 heure), DCF-BPA-TCS : (81 % en 3 heures). A un pH de 6 et une activité un peu plus basse, le DCF en mélange est éliminé moins rapidement avec une élimination de 80 % après plus de 3 heures, la réaction étant plus rapide dans le mélange DCF-PCL que DCF-PCL-MFA.

Avec ces expériences on met en évidence l'influence qu'ont le pH et les mélanges sur l'élimination des micropolluants.

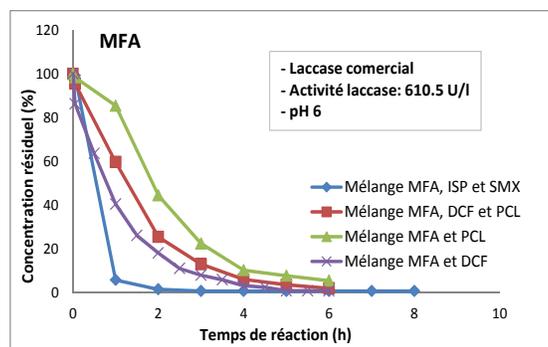
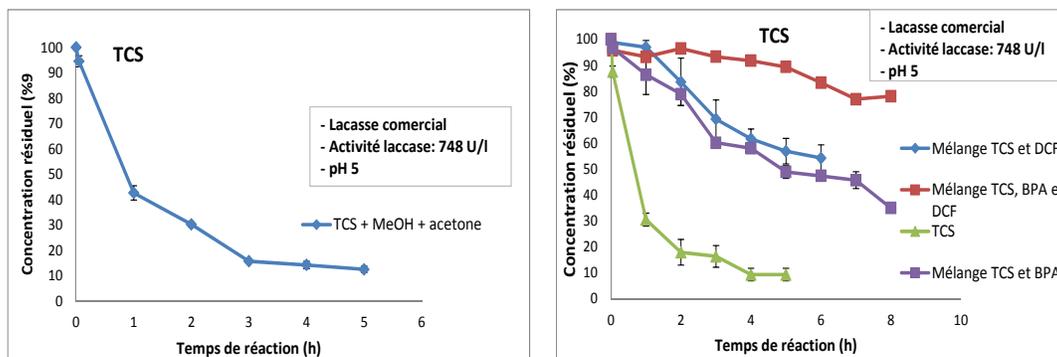


Figure 19: Oxydation du MFA avec la laccase commerciale

Les résultats des mélanges de micropolluants avec le MFA (Figure 19) montrent que le MFA peut atteindre une élimination de plus de 90 % après 1 heure (MFA-ISP-SMX), 2 heures et demie (MFA-DCF) et 4 heures (MFA-PCL et MFA-DCF-PCL). La présence du PCL semble ralentir l'oxydation du MFA.

Pour le TCS, plusieurs mélanges ont été effectués. Les expériences ont été réalisées en duplicat avec un coefficient de variation maximal de 9 %. Les résultats sont présentés dans la Figure 20, b).

Le TCS seul est bien éliminé, avec 82 % d'élimination déjà après 2 heures de réaction. Le TCS n'est pas bien éliminé en mélange. En combinaison avec le BPA, le TCS est éliminé à 65 % après 8 heures de réaction, le pourcentage d'élimination étant encore plus bas en combinaison avec le DCF (45 % après 6 heures de réaction). Avec les 3 micropolluants ensemble (TCS-DCF-BPA), le taux d'élimination du TCS est encore plus bas, avec 25 % en 8 heures de réaction. Ça met en évidence que le TCS en présence de ces 2 micropolluants (DCF-BPA) n'arrive pas à être éliminé de la même manière que quand il est en solution mono-composé.



a) Oxydation du TCS en présence de MeOH et d'acétone

b) Oxydation du TCS en mélanges avec la laccase commerciale (moyenne et écart-type de duplicas)

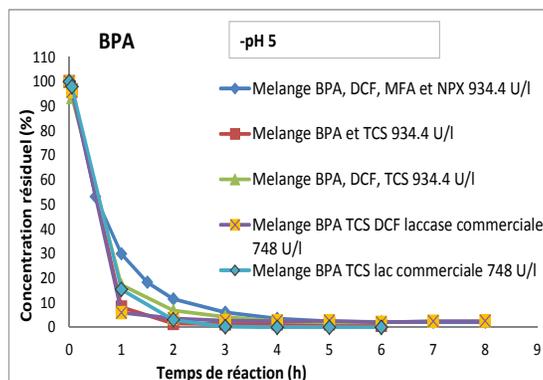
Figure 20: Oxydation du TCS avec la laccase commerciale

Les résultats obtenus dans les mélanges avec le Triclosan ont mis en doute la possibilité que le méthanol et l'acétone utilisés pour préparer les solutions mères soient la cause de la basse élimination du TCS. Pour cette raison une expérience avec ajout de MeOH (4 %) et d'acétone (2 %) a été effectuée. La figure 20 (a) montre les résultats obtenus. Après 5 heures de contact, le TCS a été oxydé à 88 % soit presque autant qu'en absence de solvant. Le méthanol et l'acétone n'ont donc aucun effet important sur l'élimination de ce micropolluant.

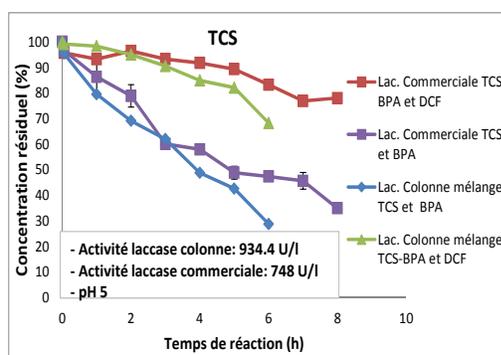
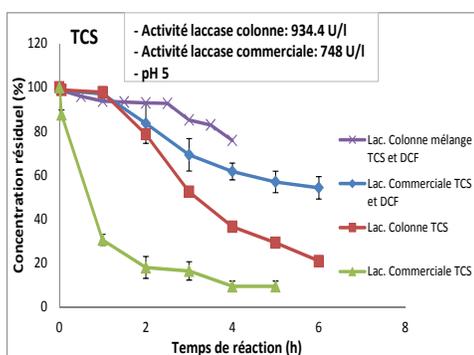
4.5 Comparaison laccase produit en colonne – laccase commerciale

L'oxydation des micropolluants par la laccase commerciale et la laccase produite en colonne a été comparées dans les mêmes conditions de pH et avec de relativement similaires valeurs d'activité de laccase. Dans la Figure 21 on remarque que, à pH 5, le BPA est éliminé à plus de 90 % en moins d'une heure avec les deux laccases, les taux d'oxydation étant relativement similaires dans les deux cas, bien que l'activité initiale de la laccase commerciale soit inférieure.

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

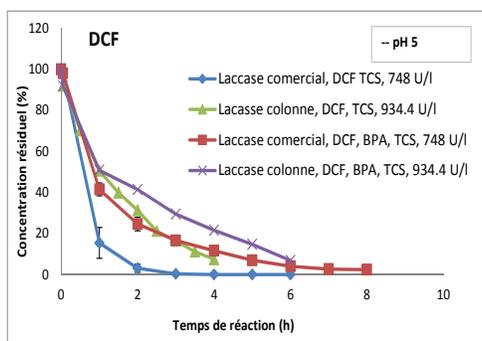


a) Oxydation du BPA avec la laccase commerciale et la laccase produite



b) Oxydation du TCS avec la laccase produite en colonne

c) Oxydation du TCS avec la laccase commerciale



d) Oxydation du DCF avec les deux laccases

Figure 21: Comparaison laccase commerciale – laccase produit en colonne

Le TCS seul est mieux éliminé avec la laccase commerciale (Figure 21, b), mais en mélange avec le BPA, les taux d'élimination sont similaires avec les deux laccases. En combinaison

avec le DCF, le taux d'élimination du TCS est plus élevé avec la laccase commerciale (91 % après 4 h) qu'avec la laccase produite (24 % après 4 h). Pour le mélange des 3 micropolluants TCS-DCF-BPA, le taux d'élimination du TCS est faible, mais relativement similaire avec les deux laccases.

4.6 Elimination des micropolluants en colonne par *T. versicolor*

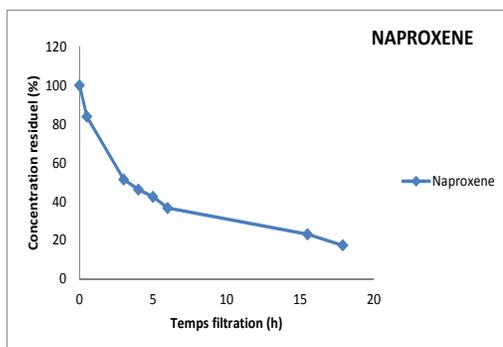


Figure 22: Élimination du NPX, colonne copeaux de chêne et *T. versicolor*, pH 7.7 avec eau du robinet

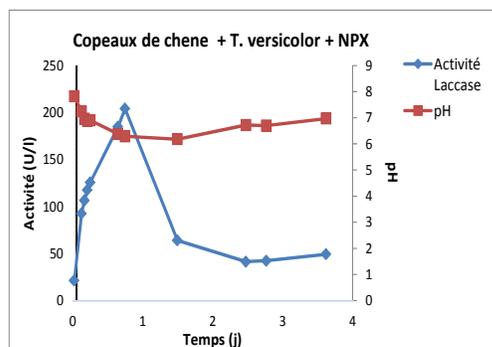


Figure 23: Activité laccase colonne copeaux de chêne, pH 7.7 avec eau du robinet

Les résultats des expériences effectuées en colonnes avec le naproxène à 10 mg/l montrent une forte diminution du naproxène avec 80 % d'élimination en 15 heures (Figure 22).

En regardant les Figures 22 et 23 on s'aperçoit que l'élimination du naproxène en colonne n'est probablement pas liée à l'activité de la laccase (qui arrive à un pic élevée en 1 jour). En effet, d'autres tests d'oxydation du naproxène avec la laccase seule ont montré que le naproxène se dégrade pas. L'élimination du naproxène peut être attribuée aussi aux autres enzymes présentes ou au champignon. Des études ont démontré que le champignon est capable de dégrader complètement le naproxène (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2010). La baisse de NPX peut aussi être attribuée en partie à l'adsorption sur les supports ou sur le champignon. Pour étudier le phénomène d'adsorption, deux colonnes en parallèle, avec les mêmes conditions, ont été étudiée (colonne contrôle sans *T. versicolor* et colonne avec *T. versicolor*). Les résultats sont présentés dans la Figure 24.

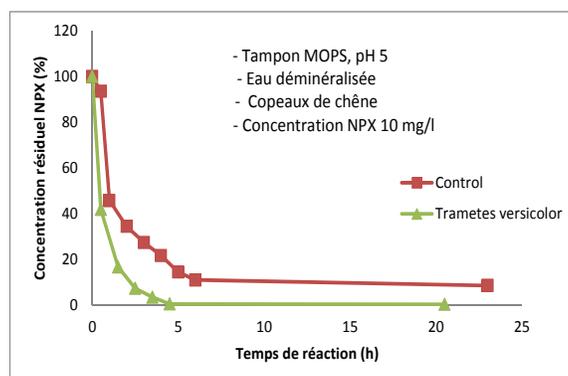


Figure 24: Elimination du NPX en colonne, adsorption

Une élimination rapide (100 % en moins de 5 h) du naproxène a eu lieu dans la colonne avec *T. versicolor*. Dans la colonne de control on observe aussi une élimination du naproxène, mais à un taux plus lent (85 % en 5 h). Ces résultats nous montrent que l'élimination peut être attribuée en grande partie à une adsorption sur le support. Avec ces résultats, l'hypothèse que l'adsorption est responsable de la disparition du naproxène existe, mais visiblement le champignon joue un rôle aussi important. En effet, l'élimination du NPX où il est présent est plus élevée et plus rapide.

4.7 Diverses conditions pour la production de laccase et l'élimination des micropolluants en colonne

Nombreux sont les facteurs qui affectent la production de l'enzyme fongique, et par conséquent, l'oxydation des micropolluants est également influencée par ces facteurs, qui peuvent être la composition du milieu, le pH, l'aération, la température, ou autre

La détermination de l'activité de la laccase est un indicateur du potentiel d'oxydation extracellulaire de *T. versicolor*. Cependant, la laccase peut être produite mais inactivée par des conditions environnementales, ce qui la rend indétectable sur le test d'activité, même si on remarque une forte colonisation du champignon. La production d'enzymes peut fortement dépendre des conditions nutritionnelles, du substrat ou du milieu de culture (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.* 2010).

Comme la composition du milieu a un effet important sur la croissance fongique, plusieurs tests basés sur les recherches bibliographiques ont été réalisés. Fournissant de l'azote

(NH₄), du glucose, du cuivre et autres, et variant le pH et les milieux, on a pu étudier l'influence de ces paramètres sur la production de laccase, comme présenté dans le Tableau 4.

Tableau 4: Diverses conditions testées pour l'activité enzymatique

°N	Support	Azote (NH ₄)	Glucose	Cuivre (CuSO ₄)	pH initial	Eau du robinet	Eaux déminéralisé	Eau usée traitée	Activité max obtenue (U/l)	Temps de réaction pour activité max (jours)	Micropolluants	UAB medium	Colmatage colonne
1	Chêne	-	-	400 uM	5	-	✓	-	171.19	1	-	-	✓
2	Chêne	-	-	-	7.5	✓	-	-	204	0.74	NPX 10 mg/l	-	-
3	Chêne	100 mg/l	8 g/l	-	4.6	-	-	✓	308.3	4	-	-	-
4	Hêtre	-	-	-	5	-	✓	-	110	4	-	-	-
5	Hêtre	-	-	800 uM	5	-	✓	-	17	3	-	-	-
6	Chêne	-	8 g/l	-	4.6	-	-	✓	42	11	-	-	-
7	Chêne	500 mg/l	8 g/l	-	5.5	-	✓	-	615.5	0.39	NPX 10 mg/l	-	✓
8	Chêne	100 mg/l	-	--	4.61	-	-	✓	44.72	7	-	-	-
9	Chêne	-	-	-	4.5	-	✓	-	920	6	-	-	✓
10	Épicéa	-	-	400 uM	5	-	✓	-	27	12	-	-	-
11	Chêne	-	-	-	4.5	-	✓	-	230	9	-	-	✓
12	Chêne	-	-	-	7	-	✓+ tampon MOPS	-	1211	1.1	NPX 10 mg/l	-	✓
13	Chêne	-	-	-	7	-	✓+ tampon MOPS	-	727	1.8	NPX 10 mg/l	✓	✓
14	Chêne	-	4 g/l	-	7	-	✓+ tampon MOPS	-	1223	0.87	NPX 10 mg/l	✓	✓
15	Chêne	500 mg/l	4 g/l	-	7	-	✓+ tampon MOPS	-	2205	2.5	NPX 10 mg/l	✓	✓
16	Hêtre	-	8 g/l	-	7	-	-	✓	157	8	-	-	-
17	Hêtre	-	-	-	7	-	-	✓	538	8	-	-	✓

Dans le Tableau 4, en rouge on remarque les plus hautes activités de laccase enregistrées lors de nos tests effectués dans des conditions diverses. Dans la gamme des conditions testées on remarque l'influence significative du pH. On remarque que l'activité est plus élevée en milieu acide (pH 4-6). Avec un pH acide l'activité de laccase apparaît en moins temps qu'en milieu basique.

Une condition qui se répète dans tous les cas où on observe une activité remarquable de la laccase est la condition de colmatage de colonne (accumulation d'eau dans le support).

Selon la bibliographie, les champignons montrent une induction de la production de laccase en présence de cuivre. (MOUSO et al. 2003), par exemple, ont observé une augmentation de l'activité de laccase dans le champignon de pourriture blanche *Stereum hirsutum* en présence de CuSO_4 . D'autres résultats concordants d'augmentation de l'activité enzymatique de la laccase (champignon *Trametes trogii*) en présence de cuivre ont été décrit par (HAGLUND et al. 2002).

Pour nos expériences, nous avons pris en compte les travaux réalisés par (PREUSSLER et al. 2009) où l'activité enzymatique produite était plus élevée en présence de 400 mM de CuSO_4 . Dans les expériences effectuées, nous n'avons pas pu atteindre des valeurs significatives plus élevées d'activité de laccase en utilisant le CuSO_4 , contrairement aux expériences de (PREUSSLER et al. 2009). Une explication à ces résultats peut être donnée par les travaux réalisés par GOMEZ *et al.* 2005 qui n'ont pas été en mesure de corrélérer l'effet de CuSO_4 comme inducteur de l'activité enzymatique de la laccase sur le champignon *Trametes versicolor*.

En présence de glucose, on remarque une rapide augmentation de l'activité de laccase. En moins d'une demi-journée, une activité de 615 U/l a pu être atteinte en présence de glucose et d'azote.

D'autres tests ont été effectués en ajoutant ou pas du glucose (4g/l), dans des eaux usées traitées, à pH 7. Les premiers 4, jours la colonne contenant le glucose présentait des activités de laccase plus élevées (Figure 25). Au bout du sixième jour, l'activité dans cette colonne s'est maintenue stable pour commencer à descendre le 8ème jour. Dans la colonne sans glucose, l'activité est montée progressivement dès le premier jour en arrivant à activités de laccase 3 fois plus élevées que dans la colonne avec glucose. Le pH dans les deux cas

est descendu de 7 à un pH entre 4.5 et 5. Au bout du 8ème jour, on a détecté la présence d'autres champignons dans la colonne avec glucose, ceci pouvant peut être la cause de la baisse d'activité.

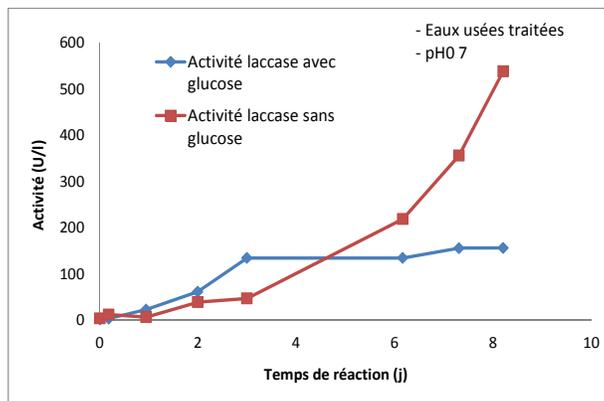


Figure 25: Activité de laccase, avec recirculation d'eaux usées traitées, pH 7, avec et sans ajout de glucose

Les résultats des tests réalisés avec un milieu défini (macronutriments, micronutriments, glucose, azote, tampon MOPS pH 7) sont montrés dans les Figures 26, 27 et 28.

Les résultats d'activité de laccase obtenus pour les différents milieux et colonnes sont montrés sur la Figure 26. On remarque que l'activité dans la colonne qui contient que du NPX, arrive à une valeur plus élevée que dans les autres colonnes testées (au bout de 20 heures de réaction). Après 25 heures de réaction l'activité commence à descendre et l'activité des autres colonnes commence à monter au bout de 40 heures. La colonne contenant du glucose et de l'azote atteint un pic élevé après 60 heures de réaction. En ce qui concerne le pH (voir Figure 27), la présence de glucose fait que le pH du milieu descend de 7 à des valeurs inférieures à 5 en moins d'un jour de temps de réaction. La colonne contenant les micro et macronutriments montre aussi une baisse du pH de 7 à 5.5, qui semble ensuite rester stable. La colonne que ne contient aucun milieu défini montre une baisse de pH de 7 à 6.

En ce qui concerne l'élimination du naproxène (NPX), dans les quatre cas, l'élimination s'est produite à plus de 90% en moins de 18 heures (Figure 28). L'élimination a été plus rapide (5 heures, élimination à 80 %) pour la colonne contenant le milieu UAB, glucose et azote, et pour la colonne sans milieu. Les autres 2 colonnes ont eu un taux d'élimination de 60 % en 5 heures de temps de réaction.

On remarque que même sans ajouter de milieu minéral, on arrive à obtenir des résultats intéressants pour l'activité de la laccase comme pour l'élimination de micropolluant. On remarque aussi que le pH n'est pas trop modifié. Ces résultats nous permettent de penser que l'élimination des micropolluants avec des biofiltres en STEP serait possible sans ajouter de nutriments et sans modifier le milieu.

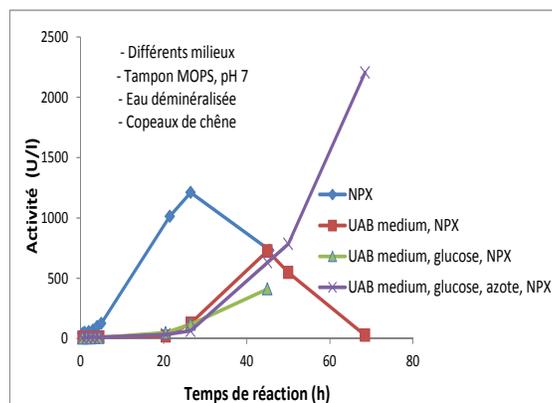


Figure 26: Activité de laccase dans différents milieux avec recirculation, pH₀ 7

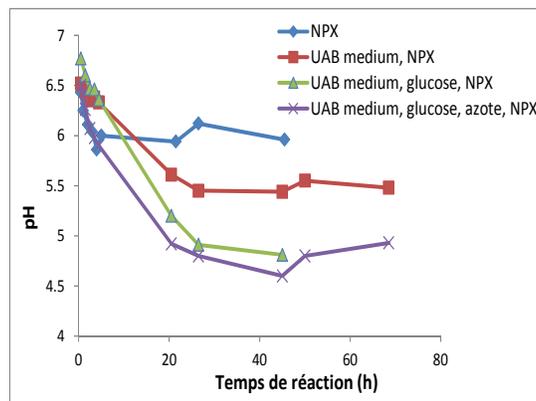


Figure 27: Variation du pH en fonction du temps de la réaction dans différents milieux avec recirculation

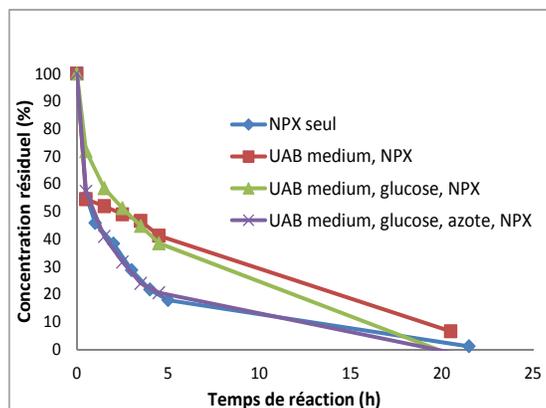


Figure 28: Oxydation du naproxène dans différents milieux avec recirculation, pH₀ 7

5 Discussion générale, critiques, limites

En ce qui concerne le champignon *T. versicolor*, visiblement le hêtre et le chêne ont démontré une aptitude plus grande à favoriser la croissance de celui-ci. Sur ces substrats inoculés avec *T. versicolor*, différents milieux testés nous ont montré que le pH a une influence sur la production de laccase, les activités les plus élevées s'observant à des pH autour de 4.5 et 6. On a observé que quand le pH descend ou monte au-delà de ces valeurs, l'activité de la laccase descend. Pour la production de laccase, la gamme optimale de pH semble être comprise entre pH 4 et pH 6.

Lors des tests, s'il on ajoute des nutriments, plus précisément de l'azote et du glucose, on remarque que les activités de la laccase augmentent rapidement après 40 à 70 heures de réaction. En présence du glucose le pH descend rapidement d'un pH 7 à pH 5 (7 heures de réaction). On a constaté aussi qu'en présence de glucose, l'activité de la laccase arrive à monter rapidement mais une fois atteint un seuil (palier) élevé elle peut redescendre en moins d'un jour. Un inconvénient observé en présence du glucose est l'apparition d'autres champignons et bactéries.

Il est à noter encore une fois que les activités de laccase les plus élevées ont été constatées dans les colonnes où existait une accumulation d'eau sur le substrat, mais que cela stimulait le développement des autres champignons et bactéries.

Avec les tests effectués, on a constaté que les conditions les plus optimales se rencontrent dans les colonnes où existe un colmatage et une accumulation d'eau. La saturation périodique du biofiltre, bien qu'améliorant le contact eau-champignon, pose quelques problèmes : il a été déduit que les conditions de saturation empêchent la survie à long terme du champignon qui est habitué à vivre dans des conditions insaturées. L'apparition d'autres champignons et de bactéries a été aussi constatée, ceux-ci risquant d'entrer en compétition avec *Trametes versicolor*. Il est nécessaire de trouver un système où le champignon puisse être en contact avec l'eau de façon adéquate, tout en restant en conditions insaturées (proche de celles naturelles) pour lui donner une chance de survivre et de rivaliser avec les bactéries et d'autres champignons.

Il a été démontré qu'il est possible d'obtenir des activités de laccase élevées à un pH de 7, ce qui se rapproche du pH des eaux usées traitées. De même, des tests réalisés avec les eaux usées traitées en recirculation, ont montré que l'activité était élevée, mais il faut assurer que le contact eau-champignon se réalise bien.

Bien qu'en ajoutant du glucose, de l'azote, des macro et micronutriments l'activité de la laccase arrive en un temps plus court à des valeurs supérieures d'activité, le champignon seul en colonne ou en présence de micropolluants arrive à des valeurs intéressantes d'activité en maintenant le pH entre 7 et 6.

Dans cette étude, la plupart des micropolluants testés étaient dégradés à plus de 80 à 100 % par la laccase présente dans les filtrats produits en colonnes. L'effet du mélange était notable, influençant significativement les vitesses de réaction. Par exemple le TCS a été éliminé à 32 % en 6 heures en mélange avec DCF et BPA alors qu'il était éliminé à 80 % en 6 h lorsqu'il été seul en solution.

La présence d'autres composés peut donc avoir une forte influence sur la cinétique soit en augmentant (DCF) soit en baissant (TCS, MFA) la vitesse de réaction .

Ces résultats suggèrent que l'effet mélange doit être mieux compris, vu que l'application de biofiltres vise à l'élimination de micropolluants contenues dans les eaux usées traitées, contenant un mélange de tous ces micropolluants ainsi que des autres composés organiques et inorganiques.

D'autres micropolluants comme le BPA, qui n'ont pas connu un effet mélange, ont été éliminés à plus de 90 % en moins de 5 heures. Le paracétamol aussi a été éliminé dans tous les mélanges testés à 95 % après 1 heure de réaction. Par contre, les tests réalisés avec le filtrat des colonnes n'ont pas permis l'élimination du NPX, SMX et ISP. Dans ces trois cas, il n'y a pas eu un taux d'élimination supérieur à 10 %, seuls et en mélange.

La description de ce phénomène (effet mélange) exige une enquête plus approfondie, mais les résultats préliminaires montrent un rôle important des effets de mélange pour le destin des micropolluants dans une matrice complexe comme celle des eaux usées.

Le NPX n'a pas été éliminé avec la laccase du filtrat des colonnes, mais, testé directement sur les colonnes, il est démontré qu'il arrive à être éliminé, si bien que la diminution de la concentration du NPX ne peut pas être attribuée à l'activité de la laccase. La présence d'autres enzymes ou du champignon, ainsi que l'adsorption semblent jouer un rôle important pour son élimination. Ce résultat est intéressant pour cette étude, parce que des micropolluants qui ne se dégradent pas avec la laccase pourraient le faire grâce aux champignons.

Le pH a eu aussi un effet sur le taux d'élimination, comme sur l'activité de la laccase. Les micropolluants seuls et en mélanges sont éliminés plus rapidement à un pH acide entre 4 et 5. Un exemple de ce résultat est l'élimination du PCL qui nécessite moins d'une heure pour être éliminé à un pH de 5 et presque 3 heures à pH 7. Dans les deux cas le taux d'élimination peut atteindre plus de 95 %. Ces résultats nous permettent de savoir que l'élimination de micropolluants dans les eaux usées serait possible, sans devoir modifier le milieu.

6 Conclusion

Trametes versicolor présente une croissance intéressante sur des substrats de bois (le hêtre et le chêne) mis en colonnes. La production de laccase et son activité ont atteint des valeurs qui permettent la dégradation de micropolluants.

Plusieurs micropolluants ont pu être dégradés par la laccase produite en colonnes. Pour le BPA, DCF, MFA, PCL, TCS, des taux d'oxydation de 70 à 100 % ont été atteints en quelques heures seulement.

Des variations du taux d'élimination ont été observées dans les mélanges de micropolluants, avec soit une diminution ou une augmentation des taux de dégradation de micropolluants, composé aux taux avec les composés seuls.

Les conditions de pH ont montré une influence sur la production et sur l'activité de la laccase tout comme sur le taux d'élimination des micropolluants, le pH étant optimal dans la gamme acide (4 - 6). A pH plus élevés (6-7), le taux d'élimination de micropolluants était aussi possible mais avec un temps de réaction plus élevé.

La présence de nutriments n'a pas montré une influence significative sur l'élimination des micropolluants.

Les micropolluants qui n'ont pas été éliminés par la laccase, sont éliminés en colonnes par le champignon, par d'autres enzymes et par le phénomène d'adsorption.

Les conditions optimales dans les colonnes (biofiltres) pour l'élimination de micropolluants doivent encore être déterminées. Des conditions permettant un temps de contact eau-champignon élevé sont nécessaires pour la production optimale de laccase et l'élimination des micropolluants.

En conditions saturées, *T. versicolor* n'arrive pas à survivre beaucoup du temps, et d'autres champignons et bactéries apparaissent.

Le Naproxène testé en colonnes avec des eaux usées traitées, peut être éliminé sans modifier le milieu.

La capacité de *Trametes versicolor* à éliminer des micropolluants est très prometteuse et pourrait être une solution pour l'amélioration de la qualité des effluents des stations d'épuration.

7 Bibliographie

ALDRICH, S. (2012) "Material Safety Data Sheet MSDS – Paracetamol, Naproxene et Isoproturon."

ANSES. 2013. Evaluation des risques du bisphenol A (BPA) pour la santé humaine.

BOURBONNAIS, R. and M. G. PAICE. 1990. **Oxidation of non-phenolic substrates, Anexpanded role for laccase in lignin biodegradation.** Pulp and Paper Research Institute of Canada **267**(1): 99-102.

BOURBONNAIS, R., M. G. PAICE, D. LEECH and B. FREIERMUTH. 1997. **Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification.** Proc. TAPPI Biol. Sci.: 335-338.

BUNDSCHUH, M., R. PIERSTORF, W. H. SCHREIBER and R. SCHULZ. 2011. **Positive effects of wastewater ozonation displayed by in situ bioassays in the receiving stream.** Environmental Science and Technology **45**(8): 3774-3780.

CABANA, H., J. L. H. JIWAN, R. ROZENBERG, V. ELISASHVILI, M. PENNINGCKX, S. N. AGATHOS and J. P. JONES. 2007. **Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriopsis polyzona*.** Chemosphere **67**(4): 770-778.

CHILDS, R. and W. BARDSLEY. 1996. **The steady state kinetics of peroxidase whit 2,2' azino di (3 ethylbenzthiazoline 6 sulphonic acid) as chromogen.** Biochem. : 93-103.

COLLINS, P., M. KOTTERMAN, J. FIELD and A. DOBSON. 1996. **Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*.** . APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **62**(12): 4563–4567.

COUTO, S. R., M. GUNDÍN, M. LORENZO and M. Á. SANROMÁN. 2002. **Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions.** Process Biochemistry **38**(2): 249-255.

CRAWFORD, R. 1981. Lignin biodegradation and transformation, Wiley Interscience. . New York.

DURGANANDA, S., V. SARAVANAMUTHU, H. HUU, G. WANG and M. HEE. 2003. **Biofilter in wáter and wastewater treatment. Faculty of engineering University of Technology, Sydney (UTS) and Faculty of Applied Chemistry Chonnam Faculty of Applied Chemistry, Chonnam National University, Korea; Faculty of Engineering, University of Technology, Sydney 500-757.**

- GAGNÉ, F., B. BOUCHARD, C. ANDRÉ, E. FARCY and M. FOURNIER. 2011. **Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall.** Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **153**(1): 99-106.
- GAO, D., L. DU, J. YANG, W. M. WU and H. LIANG. 2010. **A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control.** Critical Reviews in Biotechnology **30**(1): 70-77.
- GIANFREDA, L. and M. A. RAO. 2004. **Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review.** Enzyme and Microbial Technology **35**(4): 339-354.
- GIANFREDA, L., F. XU and J. M. BOLLAG. 1999. **Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes.** Bioremediation Journal **3**(1): 1-25.
- GOMEZ, C., MARTINEZ, M., NIETO, D., PEDROSA, A., RODRIGUEZ, R., ROSAS, J. 2005. **Estudio sobre el efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y Lacasa producida por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera.** Universitas Scientarium. Revista de la facultad de Ciencias 10: p. 37-45
- GUILLEN, F., V. GOMEZ-TORIBIO, M. J. MARTINEZ and A. T. MARTINEZ. 2000. **Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase.** Archives of Biochemistry and Biophysics **383**(1): 142-147.
- HAGLUND, C., L. LEVIN, F. FORCHIASSIN, M. LOPEZ and A. VIALE. 2002. **Degradation of environmental pollutants by *Trametes trogii*.** Revista Argentina de Microbiologia **34**(3): 157-162.
- JENSEN, K., W. BAO, S. KAWAI, E. SREBOTNIK and K. HAMMEL. 1996. **Manganese-dependent cleavage of non-phenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **62**(10): 3679-3686
- JOHANNES, C. and A. MAJCHERCZYK. 2000. **Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems.** Applied and Environmental Microbiology **66**(2): 524-528.
- KASE, R., R. EGGEN, M. JUNGHANS, C. GOTZ and H. J. 2011. **Assessment of micropolluants from municipal wastewater combination of exposure and ecotoxicological effect data for Switzerland.** Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL: 31-54.
- KAWAI, S., T. UMEZAWA and T. HIGUCHI. 1989. **Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde.**

- KAWAI, S., T. UMEZAWA, T. HIGUCHI, K. KOIDE, T. NISHIDA and M. SHIMADA. 1987. **α - $C\beta$ cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor***. Mokuzaï Gakkaishi
- KEIL, F. 2008. **Les moyens d'intervention pour réduire la pollution de l'eau: principes actifs de médicaments pour l'homme**. Institut de recherche social-écologique (ISOE) GmbH, 60486 Francfort-sur-le-Main, Allemagne.
- KIRK, T. K. and R. L. FARRELL. 1987. **Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin**. Annual Review of Microbiology **41**: 465-505.
- KNAPP, J., E. VANTOCH-WOOD and F. ZHANG. 2001. **Use of Wood – rotting fungi for the decolorization of dyes and industrial effluents, In: Fungi in Bioremediation**.
- KUWAHARA, M., J. K. GLENN, M. A. MORGAN and M. H. GOLD. 1984. **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters **169**(2): 247-250.
- LENZ, J. and U. HOLKER. 2004. **Trickle-film Processing: An Alternative for Producing Fungal Enzymes**. BIOforum Europe: 55-57.
- LLOYD, L. 1920. **Mycological Writings**.
- MARCO-URREA, E., M. PÉREZ-TRUJILLO, C. CRUZ-MORATÓ, G. CAMINAL and T. VICENT. 2010. **Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR**. Journal of Hazardous Materials **176**(1-3): 836-842.
- MARGOT, J., J. MAILLARD, L. ROSSI, D. A. BARRY and C. HOLLIGER. 2013. **Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase**. New Biotechnology **30**(6): 803-813.
- MOUSO, N., L. PAPINUTTI and F. FORCHIASSIN. 2003. **Combined effect of copper and initial pH of the culture medium on production of laccase and manganese peroxidase by *Stereum hirsutum* (Willd) Pers**. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. **20**(4): 176-178.
- PAVKO, A. 2011. **Fungal Decolourization and Degradation of synthetic dyes come chemical engineering aspects**. University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Waste Water - Treatment and Reutilization: 65-89.
- PREUSSLER, C., E. SHIMIZU, L. VILLALBA and P. ZAPATA. 2009. **Copper laccase induction in white rot fungi *Trametes Villosa***. Rev. Cienc. Tecnol: 9-16.

RATTIER, M., J. REUNGOAT, W. GERNJAK and J. KELLER. 2012. **Organic Micropollutant Removal by Biological Activated Carbon Filtration**. Urban Water Security Research Alliance Technical Reprt (53): 1-33.

REYNOLDS, J. and W. MARTINDALE. 1996. **Martindale The Extra Pharmacopoeia**. Pharmaceutical Press. London.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., V. CASTRO-GUTIÉRREZ, J. S. CHIN-PAMPILLO and K. RUIZ-HIDALGO. 2013. **On-farm biopurification systems: Role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters**. FEMS Microbiology Letters **345**(1): 1-12.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., E. MARCO-URREA and G. CAMINAL. 2010. **Naproxen degradation test to monitor Trametes versicolor activity in solid-state bioremediation processes**. Journal of Hazardous Materials **179**(1-3): 1152-1155.

RODRIGUEZ, C. 2012. Degradation of Pharmaceuticals in sewage sludge by Trametes versicolor. Departament d'Enginyeria Química. Barcelona, Thesis Universitat Autònoma de Barcelona. **PhD**

SAPARRAT, M. C. N., F. GUILLÉN, A. M. ARAMBARRI, A. T. MARTÍNEZ and M. J. MARTÍNEZ. 2002. **Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete Corioloopsis rigida**. Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 1534-1540.

SHAH, V. and F. NERUD. 2002. **Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization**. Canadian Journal of Microbiology **48**(10): 857-870.

SHUFAN, Y. 2012. **Removal of micropolluants by a fungus-augmented membrane bioreactor**.

THURSTON, C. F. 1994. **The structure and function of fungal laccases**. Microbiology **140**(1): 19-26.

TIEN, M. and T. KENT KIRK. 1983. **Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium burds**. Science **221**(4611): 661-663.

WESENBERG, D., I. KYRIAKIDES and S. N. AGATHOS. 2003. **White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents**. Biotechnology Advances **22**(1-2): 161-187.

8 Annexes

8.1 Protocole Activité laccase sur ABTS

Solution d'ABTS à 10 mM

Solution 10 mM	Masse	Concentration	Volume total	H ₂ O	ABTS
	[g/mol]	[mM]	[ml]	[ml]	[mg]
ABTS diammonium salt (in H ₂ O)	548.68		5	5	27.434

Protocole pour l'activité de la laccase sur ABTS

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation d'1 µmol d'ABTS par minute à 25°C, pH 4.5.

Dans cuvette de spectrophotomètre de 1.5 ml, ajout, dans l'ordre, de (volume final 1000 ul) :

- 850 ul de solution tampon acétate 100 mM, pH 4.5, bien aérée
- 100 ul de surnageant de culture (éventuellement centrifugé à 10'000g pendant 10 min), éventuellement filtré à 0.2 µm
- 50 ul d'ABTS 10 mM (concentration finale : 0.5 mM)

Mesure de l'absorbance A à 420 nm, 25°C, pendant 10 minutes. Noter la pente initiale de la réaction (A/min) dans la zone linéaire.

La pente de la droite permet de calculer l'activité enzymatique U/l (en µmol d'ABTS oxydé par minute et par litre de surnageant) :

$$\frac{U}{l} [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}] = \frac{\text{pente} [A \cdot \text{min}^{-1}] \cdot 1'000'000 [\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}]}{\varepsilon \cdot \ell [M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] [\text{cm}]} \cdot \frac{1000 [\text{ul}]}{V [\text{ul}]}$$

Avec :

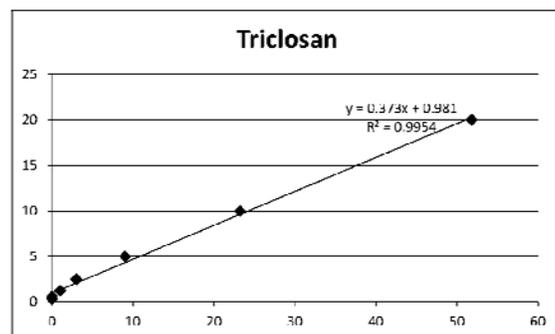
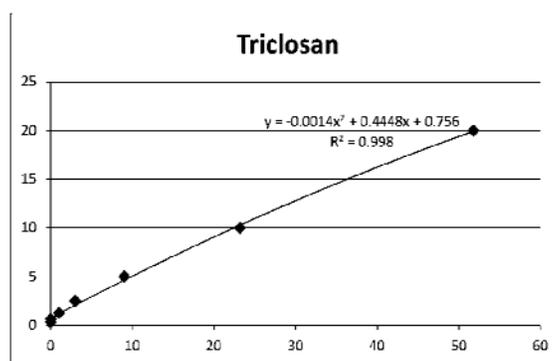
Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

- ϵ l'absorptivité molaire (aussi appelé coefficient d'extinction molaire), exprimée en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, qui varie pour chaque composé et longueur d'onde, et vaut **36'000 $M^{-1} cm^{-1}$** pour l'ABTS à 420 nm
- **l** la longueur du chemin optique, qui vaut **1 cm** avec ces cuvettes
- **V** le volume de surnageant ajouté(en ul) par rapport au volume final (1000 ul)

8.2 Courbes de calibration micropolluants, glucose

Triclosan (méthode Triclo1, 50 ul injecté)
pH6

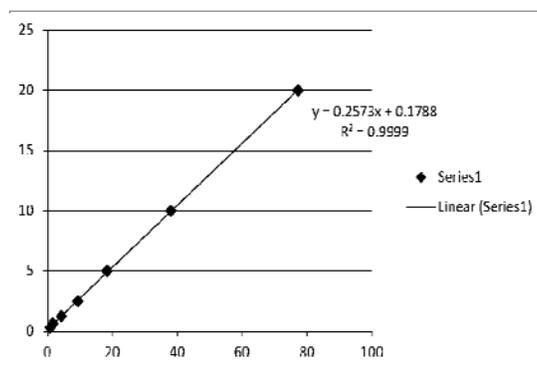
Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	200	280	Courbe	droite
20	6.19	51.8	4.8	20.0401	20.3024
10	6.15	23.2	2.2	10.32182	9.6346
5	6.16	9	0.8	4.6458	4.338
2.5	6.19	3	0.3	2.0778	2.1
1.25	6.17	1	0.1	1.1994	1.354
0.625	6.23	0	0	0.756	0.981
0.3125	6.2	0	0	0.756	0.981



Mefenamic acid (méthode Mefen1)

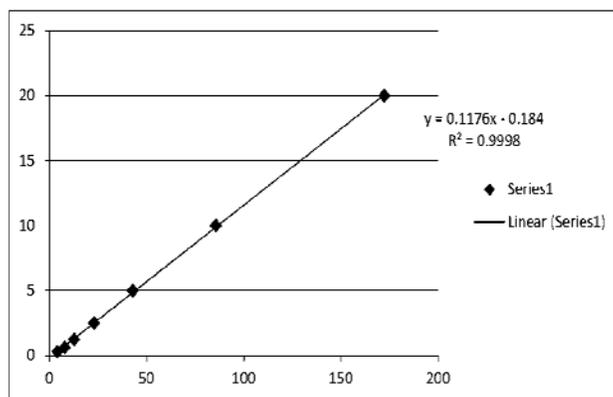
pH6

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	TR					Sum3	Droite sum 3
		200	224	280	352			
20	8.25	46.3	50.5	14.4	12.3	77.2	20.04236	
10	8.2	24.7	24.6	7.1	6.3	38	9.9562	
5	8.18	11	11.9	3.4	3	18.3	4.88739	
2.5	8.16	6.4	5.9	1.8	1.6	9.3	2.57169	
1.25	8.13	2.6	2.6	0.8	0.8	4.2	1.25946	
0.625	8.24	0.9	0.8	0.4	0.4	1.6	0.59048	
0.3125	8.26	0.5	0.6	0.1	0.1	0.8	0.38464	



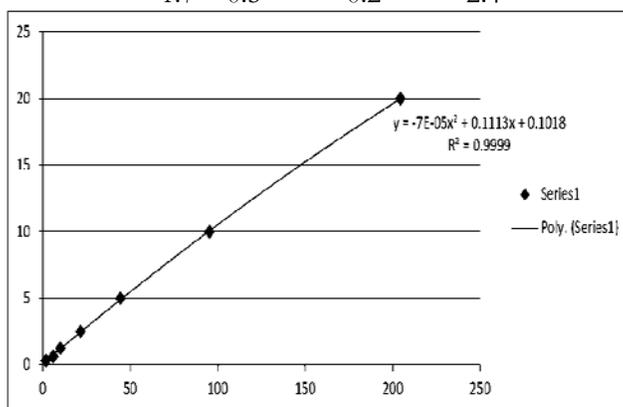
Diclofenac (méthode Diclo1) pH6

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	TR			Sum3	Droite sum 3
		200	228	276		
20	7.4	101.5	38.2	32.6	172.3	20.07848
10	7.4	51.1	18.2	16.3	85.6	9.88256
5	7.4	26.1	8.6	8.2	42.9	4.86104
2.5	7.4	14.7	4.3	4	23	2.5208
1.25	7.4	8.7	2.1	1.9	12.7	1.30952
0.625	7.4	6	1.1	0.8	7.9	0.74504
0.3125	7.4	3.3	0.4	0.3	4	0.2864



Bisphenol A (méthode BPA1) pH6

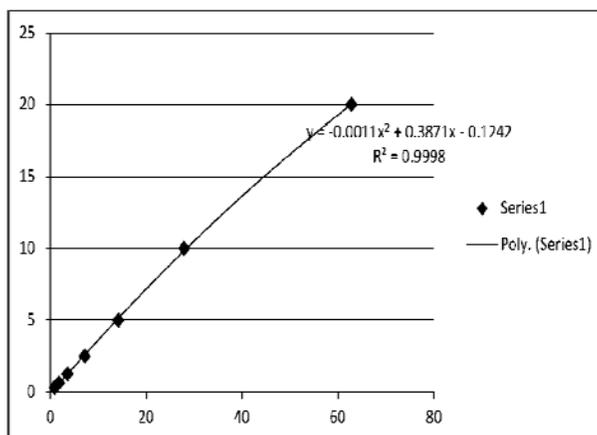
Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	200	232	280	Sum3	Droite sum
20	20	204.4	47.7	9.1	261.2	20.21214
10	10	95.2	22.7	5.2	123.1	9.68892
5	5	44.3	10.4	2.8	57.5	4.6902
2.5	2.5	21.6	5	1.3	27.9	2.43468
1.25	1.25	10	2.3	0.6	12.9	1.29168
0.625	0.625	5.9	1.3	0.3	7.5	0.8802
0.3125	0.3125	1.7	0.5	0.2	2.4	0.49158



Sulfamethoxazole (méthode MP9_SMX) pH6

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	200	268	Sum2	Droite sum
20	14	88.8	62.8	151.6	
10	14	38.5	27.9	66.4	
5	14	22.2	14.2	36.4	
2.5	14	10.5	7.2	17.7	
1.25	14	6.4	3.6	10	
0.625	14	2.9	1.8	4.7	
0.3125	14	2.6	0.9	3.5	

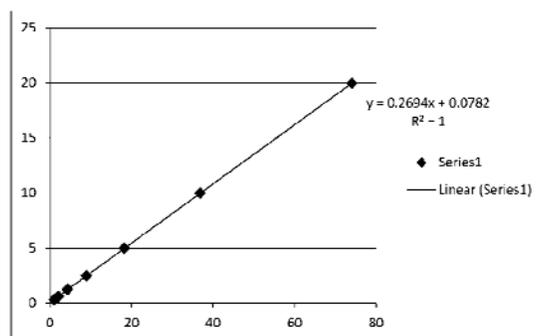
Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique



Isoproturon (méthode MP9_IPN)

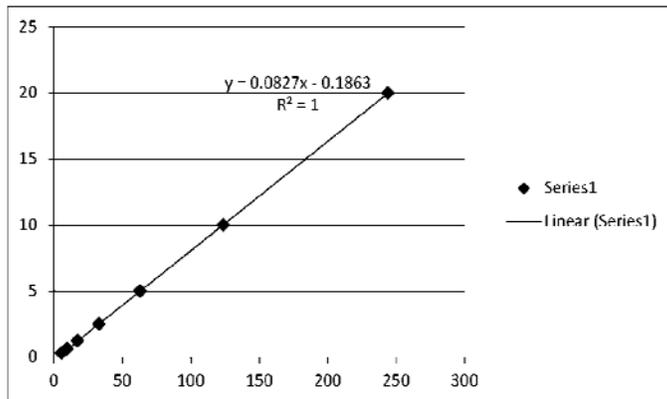
pH5

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	200	242	Droite 242
20	19.6-22.9	104.7	74	20.0138
10	19.6-22.9	54	36.8	9.99212
5	19.6-22.9	25.1	18.2	4.98128
2.5	19.6-22.9	11.1	8.9	2.47586
1.25	19.6-22.9	3.6	4.3	1.23662
0.625	19.6-22.9	0	2.1	0.64394
0.3125	19.6-22.9	0	1	0.3476



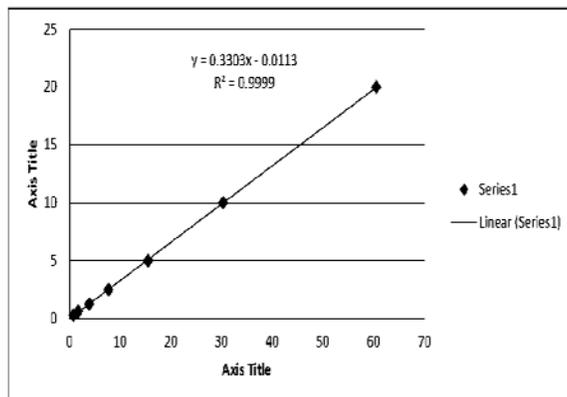
Naproxene NPX (méthode Napro1.METH)

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	232	Droite 232
20		243.7	19.96769
10		123.7	10.04369
5		62.9	5.01553
2.5		32.9	2.53453
1.25		17.3	1.24441
0.625		9.5	0.59935
0.3125		5.6	0.27682



Paracetamol PCL (méthode MP9_PCL)

Conc. Ini (mg/l)	TR (min)	244	Droite 232
20	4.6-7.5	60.5	19.97185
10	4.6-7.5	30.3	9.99679
5	4.6-7.5	15.5	5.10835
2.5	4.6-7.5	7.7	2.53201
1.25	4.6-7.5	3.9	1.27687
0.625	4.6-7.5	1.7	0.55021
0.3125	4.6-7.5	0.8	0.25294



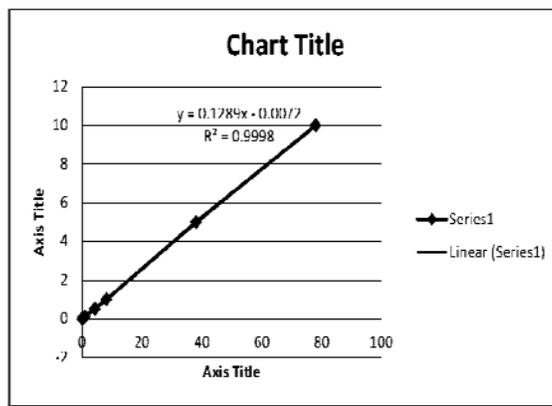
GLUCOSE

Conc. Ini
(g/l)

Surface

Droite

10	78	10.047
5	38	4.891
1	8.1	1.03689
0.5	4.2	0.53418
0.1	0.9	0.10881
0.05	0.4	0.04436
0.01	0.1	0.00569
0.001	0	-0.0072



8.3 Protocole préparation différents tampons

Tampon citrate-phosphate, Tris-HCl et acétate

Tampon 30 ml à 20-40 mM			
	ml	ml	ml
		Na ₂ HPO ₄ 0.2 M	H ₂ O
	Citric acid 0.1 M		
pH3	4.94	1.06	24
pH4	3.76	2.24	24
pH5	3.09	2.91	24
pH6	2.498	3.502	24
pH7	1.39	4.61	24
pH8	0.3644	5.6356	24
	Tris 0.2M	HCl 0.2M	
pH8	6	3.92	20.08
pH9	6	1	23
Tampon acetate 200 ml à 100 mM			
	ul	mg	ml
		C ₂ H ₂ NaO ₂ pur	H ₂ O
	Acetic acid glacial (60.05g/mol)		
pH 4.5	360.3	360.9	100
pH 4.5	720.5	721.9	200
Solutions mère (50 ml)			
Citric acid 0.1 M			
M_mol	Citric acid	H ₂ O	
[g/mol]	mg	ml	
192.12	960.6	50	
Na₂HPO₄ 0.2 M			
M_mol	Na ₂ HPO ₄	H ₂ O	
[g/mol]	mg	ml	
141.96	1419.6	50	
Tris 0.2 M			
M_mol	Tris	H ₂ O	
[g/mol]	mg	ml	
121.14	1211.4	50	

8.4 Préparation UAB medium

Adapted UAB Defined medium for micropollutant degradation test with *T. versicolor*
(adapted with minor changes from Blanquez et al. 2004, Borrás et al. 2008 + personal communication)

Micronutrient	Concentration [g/l]	Concentration [mM]	Molar mass [g/mol]	Place
Nitrilotriacetic acid (NTA, chelating agent) (C ₆ H ₉ NO ₆)	1.5	7.85	191.14	3A
MnSO ₄ ·II ₂ O	0.5	2.96	169.02	4M
NaCl	1	17.11	58.44	1S
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.36	278.02	4T
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.181	0.65	281.1	3C
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.35	287.55	5Z
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.04	249.69	3C
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.01	0.02	474.39	3A
H ₃ BO ₃	0.01	0.16	61.83	3B
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.012	0.05	218.98	Armoire JM

Macronutrient	Concentration [g/l]	Concentration [mM]	Molar mass [g/mol]	Place
KH ₂ PO ₄	20	146.96	136.09	2P
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.3	21.50	246.48	4M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.335	9.08	147.02	3C

Defined medium	Concentration [g/l]	Concentration [mM]	Molar mass [g/mol]	Place
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	8.80	44.40	198.17	4C
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.368	17.92	132.14	1A
MES buffer (C ₆ H ₁₁ NO ₄ S)	1.952	10.00	195.23	3E or 4M
Macronutrients	100 ml·l ⁻¹	Dilution	10	
Micronutrients	10 ml·l ⁻¹		100	

Final major elements concentration in DM1	Concentration [mg/l]	Concentration [mM]	Molar mass [g/mol]
Glucose	8000	44.40	180.16
N	502.1	35.84	14.01
P	455.1	14.70	30.97
Cl ⁻	70.4	1.99	35.45
SO ₄ ²⁻	1932.2	20.11	96.06

Preparation of the defined medium (per liter of final medium)

Solutions	Volume [ml/l]
Macronutrients (autoclaved)	100
Micronutrients (autoclaved)	10
Glucose stock solution (88 g/l) (autoclaved)	100

Ammonium sulfate stock solution (23.68 g/l) (autoclaved)	100
MES buffer stock solution (19.52 g/l), pH 5.5 (filter sterilized)	100
Micropollutant stock solution (1 g/l in methanol) (final 10 mg/l)	10
Trametes versicolor pellets (not diluted): final goal 3-4 g dry weight /l	200
Demineralized water	380

8.5 Protocole test de dégradation

Dégradation des micropollutants avec la laccase

Conditions expérimentales

- Directement dans la vial d'injection (1.8 ml) avec in 1 ml de réactifs
- A 25°C sans mélange (seulement ponctuel)
- Test directement dans le filtrat des colonnes de *Trametes*, surnageant filtré à 0.2 um
- Concentration initial de polluants: 20 mg/l (addition de 20 ul de la solution stock 1g/l dans MeOH)

Procédure

Mesurer la concentration de polluants (méthode a choisir avec l'HPLC) directement après l'ajout des polluants fermer la vial et agiter au vortex puis injecter directement dans l'HPLC. Noter l'heure d'ajout des polluants et l'heure de la première injection)

Incubation à 25°C dans le support de l'HPLC à l'abri de la lumière directe

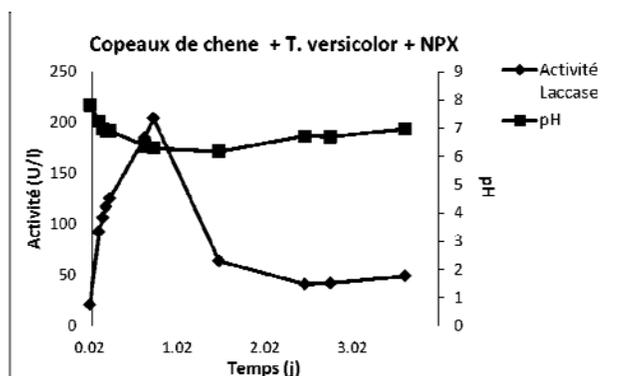
Inhibition avec sodium azide 10 mM - Procédure

Procédure similaire à ci-dessus mais avec ajout de sodium azide 10 mM pour stopper la réaction enzymatique :

- 970 ul de filtrat des colonnes de *Trametes*
- 10 ul de sodium azide 1 M : bien mélanger avant l'ajout des polluants
- 20 ul de la solution stock de micropolluant à choix 1 g/l

8.6 Données Spectrophotomètre

t(d)	t (h)			date	ul	temp	Activite	U/l	pH
			30 min	08.06.2013	100	20-120	0.08464	23.51111	7.65
0.020833	0.5	30	30 min	08.06.2013	100	20-120	0.07649	21.24722	7.82
0.125	3	180	3h	08.06.2013	100	20-100	0.3333	92.58333	7.24
0.166667	4	240	4h	08.06.2013	100	20-120	0.3833	106.4722	6.96
0.208333	5	300	5h	08.06.2013	100	20-110	0.4231	117.5278	6.88
0.25	6	360	6h	08.06.2013	100	20-100	0.4526	125.7222	6.9
0.645833	15.5	930		08.07.2013	100	10--60	0.6656	184.8889	6.38
0.745833	17.9	1074	14h00	08.07.2013	100	20--70	0.7349	204.1389	6.29
1.495833	35.9	1074	9h00	08.08.2013	100	20-100	0.2307	64.08333	6.18
2.475	59.4		9h30	08.09.2013	100	20-150	0.1489	41.36111	6.72
2.766667	66.4		16h20	08.09.2013	100	20-120	0.1525	42.36111	6.7
3.620833	86.9		12h50	08.10.2013	100	20-100	0.1776	49.33333	6.97

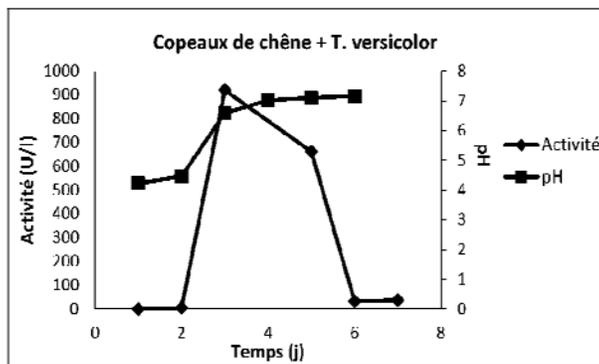


Activite colonne 4

	date	ul	temp	actvite	U/l	pH
1	06.04.2013	100	50-250	0.000551	0.152972	4.23
	06.05.2013					
2	06.05.2013	100	50-220	0.02063	5.730556	4.47
	06.06.2013					
	06.07.2013					
3	06.10.2013	25	20-100	0.8284	920.4444	6.6
5	06.11.2013	25	20-40	0.5962	662.4444	7.02
6	06.12.2013	25	50-100	0.02962	32.91111	7.11
7	13/6/2013	25	60-120	0.0336	37.33333	7.16

Copeaux chène inoculée le 01-05-13

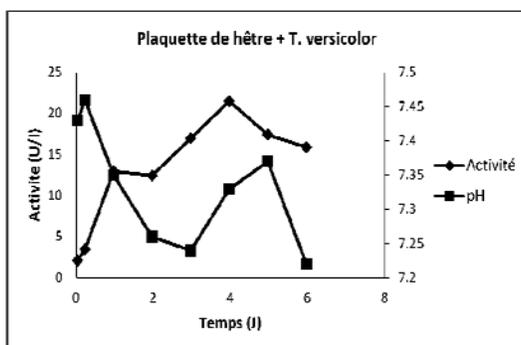
Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique



Activite colonne 7

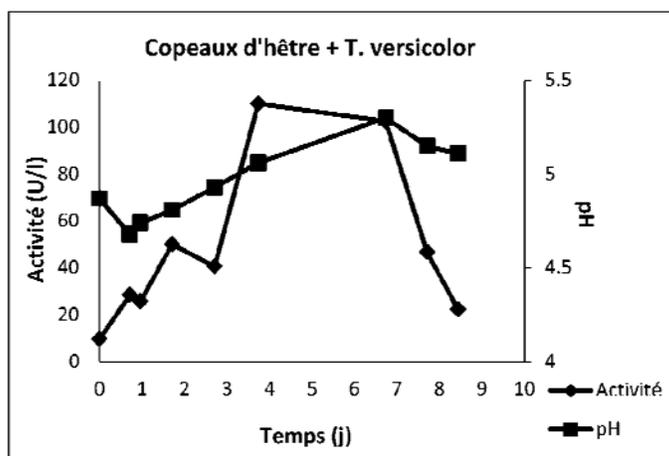
Plaquettes de hêtre inoculée 05.06.13, mise en colonne 25.06.13

t (hrs)	Activite	U/l	pH	
1	0.007626	2.118333	7.43	0.041667
5.5	0.01254	3.483333	7.46	0.229167
23.3	0.04678	12.99444	7.35	0.970833
47.3	0.04485	12.45833	7.26	1.970833
71.3	0.06121	17.00278	7.24	2.970833
95.3	0.07746	21.51667	7.33	3.970833
119.3	0.06274	17.42778	7.37	4.970833
143.3	0.05721	15.89167	7.22	5.970833



22-07-13 colonne avec COPEAUX HETRE inoculée 08-07-13 mise en colonne 15-07-13

T(hrs)	U/l	pH	
0	9.71666667	4.87	0
17	28.4722222	4.68	0.708333
23	25.7222222	4.74	0.958333
41	50.0277778	4.81	1.708333
65	40.6527778	4.93	2.708333
89.5	110.027778	5.06	3.729167
161.5	102.611111	5.3	6.729167
185	46.6944444	5.15	7.708333
202.5	22.25	5.11	8.4375



Colonne B Eaux usées traitées 400 ml

Colonne B		Temps (j)	temps (h)	date	ul	temp	Activite	U/l	pH
	min								
	15	0.010417	0.25	27.08.2013	100	10-80	0.01608	4.466667	6.27
16h30		0.1875	4.5	27.08.2013	100	80-180	0.04577	12.71389	4.85
8h40		0.95	22.8	28.08.2013	100	100-200	0.02602	7.227778	4.32
10h00		1.999167	47.98	29.08.2013	100	20-80	0.1421	39.47222	4.48
10h00		2.999167	71.98	30.08.2013	100	20-100	0.1712	47.55556	4.81
14h00		6.165833	147.98	02.09.2013	100	10-60	0.7888	219.1111	4.95
17h30		7.311667	175.48	03.09.2013	100	10-30	1.284	356.6667	4.94
15h00		8.2075	196.98	04.09.2013	25	10-100	0.4846	538.4444	5.03

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

Colonne C Eaux usees traitee, glucose (20 ml glucose, 380 eaux usees)

Colonne B									
	min	Temps (j)	temps (h)	date	ul	temp	Activite	U/l	pH
	15	0.010417	0.25	27.08.2013	100	10-80	0.01608	4.466667	6.27
16h30		0.1875	4.5	27.08.2013	100	80-180	0.04577	12.71389	4.85
8h40		0.95	22.8	28.08.2013	100	100-200	0.02602	7.227778	4.32
10h00		1.999167	47.98	29.08.2013	100	20-80	0.1421	39.47222	4.48
10h00		2.999167	71.98	30.08.2013	100	20-100	0.1712	47.55556	4.81
14h00		6.165833	147.98	02.09.2013	100	10-60	0.7888	219.1111	4.95
17h30		7.311667	175.48	03.09.2013	100	10-30	1.284	356.6667	4.94
15h00		8.2075	196.98	04.09.2013	25	10-100	0.4846	538.4444	5.03

8.7 Données HPLC

Filtrat colonne 4

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 10.06.13

copeaux chene inocule 01.05.13

pH 7

Activié laccase 1097.333333 U/l

Activite final mix 1010.777778 U/l 7.01

t(hrs)	temp (min)	BPA	DCF200	MFA
0	0			
0.05	3	165.3	121.4	62.9
0.5	30	134.2	126	57.5
1	60	108.1	117.8	53.2
1.5	90	84	110	50.4
2	120	64.5	107.9	49.5
2.5	150	50.3	101.6	48.5
3	180	40.1	95.2	46.4
3.5	210	28.9	87.6	41.3
4	240	21.4	88.4	40.7
4.5	270	17.5	83.6	38
5	300	13.4	77	38.6
5.5	330	9.4	72.2	27.1
		737.1	1188.7	554.1

Filtrat colonne 4

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 10.06.13

copeaux chene inocule 01.05.13

pH 5

Activié laccase 934.444444 U/l

Activité final Mix 881.777778 U/l 5.42

t(hrs)	temps min	BPA	NPX	DCF 200	DCF 224	DCF
0	0					
0.05	3	175.5	289.5	101.7	44.8	146.5
0.5	30	90.2	286.5	78.3	33.7	112
1	60	48.9	278.2	59	25.9	84.9
1.5	90	29.2	280.2	52.2	22.6	74.8
2	120	17.9	282	40.6	17.3	57.9
3	180	8.9	276	27.8	13	40.8
4	240	4.8	276.9	21.1	9.9	31
5	300	3	279.2	13.8	7.2	21
6	360	2.5	278.7	11.6	5.2	16.8

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

7	420	2.4	277.2	8.9	2.8	11.7
8	480	2.4	275.5	3.8	1.7	5.5

MFA 224	MFA 278	MFA352	MFA
33.6	5.6	9	48.2
21.4	4.2	5.3	30.9
16	4.2	4.3	24.5
16.5	4.2	4	24.7
14.8	2.8	3.7	21.3
12	3.7	3.4	19.1
10.3	3.2	3.1	16.6
11	3.1	2.8	16.9
9.7	2.6	2.5	14.8
8.8	2.4	2.3	13.5
8.1	2.3	2.1	12.5

Mix 3 BPA DCF et TCS filtrat colonne 4 pH5

BPA-
 Methode DFC_MFA1
 Date 12.06.13
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 5
 Activié laccase 934.4444444 U/l

t(hrs)	Temps min	BPA 200	DCF200	DCF 224	DCF 278
0	0				
0.05	3	126.9	116.3	52.5	34.9
1	60	21	68.5	29.6	19.5
2	120	7.7	50.9	24.3	16
3	180	4.4	38.3	17.7	11.4
4	240	2.1	24.3	13	8.7
5	300	1.6	16.4	9.1	6.2
6	360	1.6	9.5	4.5	3.4

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

DCF somme	TCS 200	TCS 278	TCS somme
87.4	46.8	3.3	50.1
49.1	46.1	3.5	49.6
40.3	44.3	3.2	47.5
29.1	41.2	3.5	44.7
21.7	38.2	3.1	41.3
15.3	37.6	2	39.6
7.9	29.4	2.3	31.7

TCS filtrat colonne 4 pH5

Methode BPA-DFC_MFA1
 Date 12.06.13
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 5
 Activié laccase 934.4444444 U/l

t(hrs)	temps min	TCS 200	Tcs 278	TCS somme
0	0			
0.05	3		48.4	52.5
1	60		47.9	51.8
2	120		36.6	39.4
3	180		22.6	24.3
4	240		14.7	15.9
5	300		11.4	12.2
6	360		7.5	8.1

DCF et ICS filtrat colonne 4 pH5
 Methode BPA-DFC_MFA1
 Date 25.06.13
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 5
 Activié laccase 934.4444444 U/l

t(hrs)	Temps min	DCF200	DCF 224	DCF 278	DCF somme
0	0				
0.05	3	90.8	40.5	26.7	158
0.5	30	66.9	30.8	23.2	120.9
1	60	49.9	23	14.6	87.5
1.5	90	40.2	16.8	12.4	69.4
2	120	30.5	13.6	10.6	54.7
2.5	150	18.6	11.5	7.4	37.5
3	180	15	9.2	5.3	29.5
3.5	210	12.3	4.9	3.3	20.5
4	240	7.3	3.8	3	14.1

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

TCS 200	TCS 278	TCS somme
38	2.8	40.8
36.8	2.6	39.4
35.9	2.4	38.3
35.7	2.4	38.1
35.4	2.5	37.9
35.2	2.6	37.8
31.6	2.5	34.1
30.7	2.3	33
27.7	2	29.7

Naproxene filtrat colonne 4 pH 5

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 20.06.13

copeaux chene inocule 01.05.13

pH 5

Activié laccase 934.4444444 U/l

NPX 232

t(hrs)	Temps min	
0	0	
0.05	3	294.6
1	60	289
2	120	284.8
3	180	280.6
4	240	276.1
5	300	271

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

Paracetamol filtrat colonne 4 pH 5
 Methode MP_9_PCL_METH
 Date 21.06.13
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 5

		934.4444444	U/l	PCL + sodium acid
		PCL 244		
t(hrs)	Temps min			
0	0			
0.05	3	42.8		61.9
0.25	15	10.3		61.8
0.5	30	4.2		61.8
0.75	45	1.8		61.5
1	60	0.6		61.5
1.25	75	0.2		61.2
1.5	90			61.7

Paracetamol filtrat colonne 4 pH 7
 Methode MP_9_PCL_METH
 Date 24.06.13
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 7

		934.4444444	U/l
		PCL 244	
t(hrs)	Temps min		
0	0		
0.05	3	57.3	
0.25	15	39.8	
0.5	30	28.7	
0.75	45	21.4	
1	60	16.3	
1.25	75	11.9	
1.5	90	8.5	
1.75	105	6	
2	120	4.1	
2.25	135	2.9	
2.5	150	1.7	

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

Mix ISP SMX MFA filtrat colonne 4 pH5
 Methode METH long...
 Date
 copeaux chene inocule 01.05.13
 pH 5
 Activité laccase 934.444444 U/l

t (hrs)	Temps min	ISP 242	SMX 258	MFA 224	MFA 278	MFA 352	MFA somme
0	0	0					
0.05	3	101.9	62	20.4	5.6	4.1	30.1
1	60	101.7	61.5	6.6	1.8	2	10.4
2	120	101.1	61	5.3	1.2	1.8	8.3
3	180	101.2	58.5	5.1	1.6	1.6	8.3
4	240	101.2	58.6	5.1	1.6	1.6	8.3
5	300	100.9	56.1	4.6	0.9	1.6	7.1

Laccase commerciale

1

DCF et TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul
 Methode BPA-DFC_MFA1
 Date 01.07.13
 pH 5
 Activité lac 748 U/l 0.6732 25

t (hrs)	Temps min	DCF 200	DCF 224	DCF 278	DCF somme	TCS 200	TCS 224	TCS 278
0	0							
0.05	3	88.3		39	26.3	150.8	13	4.1
1	60	3.7		6	3.9	13.6	34.3	11
2	120	1.5		0.5	1.2	3.2	24.9	8.7
3	180	0.5		0.2	0.3	1	19.7	7.3
4	240	0.1		0.1		0.2	18.3	6.6
5	300					0	16	5.9
6	360					0	15.3	5.3

2 duplicat

DCF et TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul
 Methode BPA-DFC_MFA1
 Date 01.07.13
 pH 5
 Activité lac 748 U/l 0.6732 25

t (hrs)	Temps min	DCF 200	DCF 224	DCF 278	DCF somme	TCS 200	TCS 224	TCS 278
0	0							
0.05	3	108.3		46.6	30.6	185.5	28.2	9.5
1	60	25.6		11.3	7.5	44.4	38.1	11.9
2	120	5.9		3	2	10.9	35.5	10.4
3	180	2		0.7	0.5	3.2	26.9	9
4	240	0.9		0.6	0.2	1.7	21.7	7.9
5	300	0.1				0.1	20.6	7.2
6	360	0.1				0.1	19.8	6.9

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

1

BPA, DCF et TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 07.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l 0.6732 25

t (hrs)	Temps min	DCF200	DCF 224	DCF 278	DCF somme	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme	BPA
0	0									
0.05	3	77.7		77.1	77.2	145	14.2	5	1.4	20.6
1	60	39.3		17.1	11.5	67.9	25	8.7	1.7	35.4
2	120	25.4		11.3	6.4	43.1	27.5	8.6	1.5	37.6
3	180	17.2		7.6	4.9	29.7	27.4	8.8	1.5	37.7
4	240	11.8		5.5	3.8	20.9	27.3	8.8	1.6	37.7
5	300	6.6		3.6	2.8	13	26.2	7.6	1.8	35.6
6	360	5.2		2.4	1.5	9.1	24.5	7.9	1.6	33.4
7	420	4		1.7	0.8	6.5	20.6	6.8	1.5	29.3
8	480	2.8		1	0.5	4.3	21.4	6.9	1.9	29

2 duplicate

BPA, DCF et TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 07.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l 0.6732 25

t (hrs)	Temps min	DCF200	DCF 224	DCF 278	DCF somme	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme	BPA
0	0									
0.05	3	81.9		76.1	78.6	149.9	18.7	6.8	1.6	27.7
1	60	34		15.2	9.4	58.6	28.6	9.4	1.7	37.7
2	120	19.7		8.7	5.8	33.3	28.4	8.8	1.4	38.6
3	180	13.5		6.2	3.1	22.8	25.9	8.1	1.5	35.5
4	240	9.8		4	2.9	16.7	25.1	7.5	1.5	34.1
5	300	6.2		2.8	1.7	10.7	25.3	7.2	1.4	33.9
6	360	2.4		2.3	1.1	5.8	22.5	6.7	1.9	30.5
7	420	2.6		1.4	0.4	4.4	21.9	6.2	1.9	28.8
8	480	4.1		1.3	0.4	5.8	22.4	6.4	1.9	30.1

1

TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 09.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l 0.6732 25

t (hrs)	Temps min	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0				0
0.05	3		15.1	4.5	20.8
1	60		3.7	1.3	5.3
2	120		1.5		1.5
3	180		1.3		1.3
4	240				0
5	300				0

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

2 duplicat

TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 09.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l 0.6732 **25**

t (hrs)	Temps min	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0				
0.05	3		15.4	5.3	22
1	60		4.8	1.5	6.6
2	120		4	0.3	4
3	180		3.4		3.4
4	240		1.2		1.2
5	300		1.2		1.2

1

TCS avec laccase commercial 2 g/l, sol tampon pH 5 + MeOH + acetone 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 05.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l 0.6732 **25**

t (hrs)	Temps min	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0				
0.05	3		13.5	4.5	18
1	60		5.1	1.4	6.5
2	120		3.9	0.8	4.7
3	180		1.6		1.6
4	240		1.5		1.5
5	300		1.1		1.1

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

2 duplicat

TCS avec laccase comercial 2 g/l, sol tampon pH 5 + MeOH + acetone 200 ul

Methode BPA-DFC_MFA1

Date 05.07.13

pH 5

Activité lac 748 U/l

0.6732

25

t (hrs)	Temps min	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0				
0.05	3		14.1	4.9	19
1	60		6.2	1.5	7.7
2	120		3.8	0.5	4.3
3	180		1.4		1.4
4	240		0.9		0.9
5	300		0.6		0.6

1

BPA et TCS avec laccase comercial 2 g/l, sol tampon pH 5 200 ul

Methode BPA DFC MI A1

Date

pH 5

Activité lac 748 U/l

0.6732

25

t (hrs)	Temps min	BPA 200	BPA 224	BPA some	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0							
0.05	3	108.2	28.3	108.2	11.5	4		15.5
1	60	5.3		5.3	17.8	6.2		24
2	120	0.2		0.2	16.7	5.8		22.5
3	180			0	13	4.5		17.5
4	240			0	13	4.2		17.2
5	300			0	9.3	3.6		12.9
6	360			0	9	3.6		12.6
7	420			0	8.1	3.5		11.6
8	480			0	8.6	3		9.6

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

2 **duplicat**

BPA et TCS avec laccase comercial **2 g/l, sol tampon pH 5** **200 ul**
 Methode: BPA DFC_MIA1
 Date
 pH 5
 Activité lac /18 U/l **0.6732** **25**

t (hrs)	Temps min	BPA 200	BPA 224	BPA somme	TCS 200	TCS 224	TCS 278	TCS somme
0	0							
0.05	3	100.9	26.2	130.1	23.6	6.6		30.2
1	60	2.7		2.7	24.3	7.4		31.7
2	120			0	18.4	6.8		25.2
3	180			0	12	5.2		17.2
4	240			0	11.8	4.3		16.1
5	300			0	10.2	4.1		14.3
6	360			0	10.2	3.7		13.6
7	420			0	10.2	3.3		13.5
8	480			0	5.9	2.7		8.6

1

ISP SMX MIA avec laccase comercial **2 g/l, sol tampon pH 6** **200 ul**
 Methode: MP9 METH
 Date 04-07.13
 pH 6
 Activité lac 748 U/l **0.6732** **25**

t (hrs)	Temps min	ISP 242	SMX 268	MFA 224	MFA 278	MFA 352	MFA som
0	0						
0.05	3	88.7	81.3	66	17.5	14.8	96.3
1	60	88.5	74.4	3.2	0.9	1	5.1
2	120	83.5	72.6	0.8			0.8
3	180	83.2	72.5				0
4	240	83.8	72.1				0
5	300	83.5	72.2				0
6	360	83.8	73				0
7	420	83.8	72				0
8	480	83.7	72.5				0

1

PCL DFC MIA avec laccase comercial **4 g/l, sol tampon pH 6.5** **200 ul**
 Methode: MP9 METH
 Date 17-07.13
 pH 6
 Activité lac 610.056 U/l **0.5005** **25**
 act. final /94.333 U/l **0.7148** **25**
 Ph final 6.57

t (hrs)	Temps min	PCL 244	DCF 200	DCF 224	DCF 278	DCF somme	MFA 224	MFA 278	MFA 352	MFA som
0	0									
0.05	3	51.1	112.1	52.2	36.5	201.1	50.2	14.1	12.7	77.3
1	60	3.2	89.8	98.8	27.9	155.8	31.9	8.8	7.9	48
2	120	3.2	56.5	22.8	14.7	94	13	3.5	3.6	20.1
3	180	3	30.2	12.7	8.3	52.2	6.3	1.7	1.9	9.9
4	240	2.9	20	7.9	6.3	34.7	2.2	1.2	0.8	4.7
5	300	2.8	16.7	5.3	4.5	26.5	1.2	0.5	0.5	2.2
6	360	2.6	7.8	3.2	3.4	14.4	0.9			0.9

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

		1					
		PCL MFA avec laccase comercial 4 g/l, sol tampon pH 6.5		200 ul			
		Methode MP9 METH					
		Date 17-07.13					
		pH 6					
		Activié lac 610.056 U/l		0.54905		25	
		act. Final 774.556 U/l		0.6971		25	
		Ph final 6.9					
t (hrs)	Temps min	PCL 244	MFA 224	MFA 278	MFA 352	MFA somm	
0	0						
0.05	3		60.3	53.7	13.9	13.1	80.7
1	60		5.8	46.3	12.5	11.2	70
2	120		2.3	23.7	6.4	6	36.1
3	180		2.1	12.4	2.5	3	17.9
4	240		1.9	4.7	1.6	1.5	7.8
5	300		1.6	3.6	1	1.1	5.7
6	360		1.4	2.6	0.6	0.6	3.8

		1					
		PCL DFC avec laccase comercial 4 g/l, sol tampon pH 6.5		200 ul			
		Methode MP9 METH					
		Date 17-07.13					
		pH 6					
		Activié lac 610.056 U/l		0.54905		25	
		act. Final 794.333 U/l		0.7149		25	
		Ph final 6.69					
t (hrs)	Temps min	PCL 244	DCF 200	DCF 224	DCF 278	DCFC somm	
0	0						
0.05	3		59.2	93.6	46.7	33	173.3
1	60		3.9	90.5	44.4	29.9	164.8
2	120		3.1	89.5	39.6	27.7	156.8
3	180		2.7	83.8	36.9	25.6	146.3
4	240		2.6	76.5	35.4	23.3	135.2
5	300		2.2	72.8	31.6	21	125.4
6	360		2	72.5	28.3	19.9	120.7

Elimination des micropolluants dans les eaux usées : Etude d'un biofiltre fongique

Naproxene, colonne A 600 ml eau robinet et NPX 10 g/l

Methode Napro1.METH

Date 06.08.13

colonne avec COPEAUX CHENE inoculée 02-07-13 mise en colonne 25-07-13

pH 7.7

T(h)	Temps min	NPX 232		NPX	% NPX	
0		0	124	10.0685		
0.5		30	104.3	8.43931	83.81894026	16.18105974
3		180	64.8	5.17266	51.37468942	48.62531058
4		240	58.5	4.65165	46.2000298	53.7999702
5		300	53.9	4.27123	42.42171128	57.57828872
6		360	46.9	3.69233	36.67209614	63.32790386
15.5	08.07.2013	930	30.4	2.32778	23.11943189	76.88056811
17.9	08.08.2013	1074	23.4	1.74888	17.36881676	82.63018324
	08.09.2013 16h20		25.2	1.89774	18.84828922	81.15171078
	08.10.2013 12h50		24.2	1.81504	18.02691563	81.97308437