

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/183103 A1

(43) Date de la publication internationale
17 septembre 2020 (17.09.2020)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/20 (2006.01) C02F 3/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2020/050489

(22) Date de dépôt international :
10 mars 2020 (10.03.2020)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1902451 11 mars 2019 (11.03.2019) FR

(71) Déposants : INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUÉES DE TOULOUSE [FR/FR] ; 135 avenue
de Ranguéil, 31400 TOULOUSE (FR). CENTRE NATION-
AL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]
; 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR). INSTITUT
NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
[—/FR] ; 147 rue de l'Université, 75007 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : BESSIERE, Yolaine ; TBI 135 avenue de
Ranguéil, 31400 TOULOUSE (FR). PAUL, Etienne ; TBI
135 avenue de Ranguéil, 31400 TOULOUSE (FR). LOU-
VET, Jean-Noël ; TBI 135 avenue de Ranguéil, 31400
TOULOUSE (FR). BLANCHET, Elise ; TBI 135 ave-
nue de Ranguéil, 31400 TOULOUSE (FR). MENGELLE,
Evrard ; TBI 135 avenue de Ranguéil, 31400 TOULOUSE
(FR). DUBOS, Simon ; 135 avenue de Ranguéil, 31400
TOULOUSE (FR). BOUNOUBA, Mansour ; TBI 135 ave-
nue de Ranguéil, 31400 TOULOUSE (FR). SAUX, Ca-
rine ; Critt BioIndustries 135 avenue de Ranguéil, 31400
TOULOUSE (FR). MORGADO FERREIRA, Ana ; Veolia Water
Technologies - STI, 1 place de Montgolfier, 94910
SAINT-MAURICE (FR). CIRNE, Dores ; Veolia Water
Technologies - STI, 1 place de Montgolfier, 94910 SAINT
MAURICE (FR).

(74) Mandataire : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES ; Seine
Avenue, CS90017, 2 rue Sarah Bernhardt, CS90017, 92665
ASNIÈRES-SUR-SEINE CEDEX (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MICROBIAL CELLULAR BIOMASS HAVING FLOCCULANT PROPERTIES

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'UNE BIOMASSE CELLULAIRE MICROBIENNE AYANT DES PROPRIÉTÉ DE FLOCCULANT

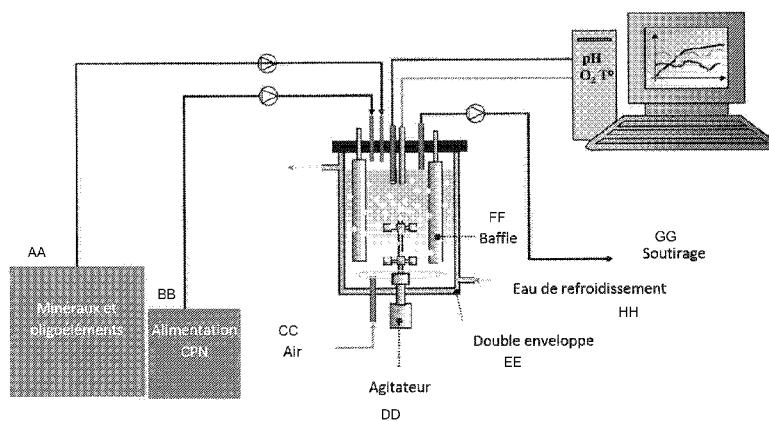


Figure 1

- AA Minerals and trace elements
- BB CPN feed
- CC Air
- DD Agitator
- EE Double-jacket
- FF Baffle
- HH Cooling water
- GG Drawing off

(57) Abstract: The invention relates to microbial cellular biomass having flocculant properties, to a method for producing same, and to the use thereof in flocculation treatment.

(57) Abrégé : L'objet de la présente invention se rapporte à une biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant, à son procédé d'obtention et à son utilisation dans le traitement par floculation.

[Suite sur la page suivante]



WO 2020/183103 A1

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))

PROCEDE DE PRODUCTION D'UNE BIOMASSE CELLULAIRE MICROBIENNE AYANT DES PROPRIETES DE FLOCCULANT

[0001] L'objet de la présente invention se rapporte à une biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant, à son procédé d'obtention et à son utilisation dans le traitement par flocculation d'une solution ou suspension aqueuse et/ou huileuse.

[0002] Les procédés de traitement de l'eau potable et des eaux usées comprennent généralement une ou plusieurs étapes pour éliminer les matières en suspension et les matières colloïdales (étape dite de clarification). La plupart de ces procédés de clarification combinent la coagulation, la flocculation et la décantation nécessitant à la fois un coagulant primaire, souvent des sels inorganiques, tels que le FeCl_3 , et un adjuvant de flocculant, un polymère, le plus utilisé étant le polyacrylamide anionique (PAM). On estime ainsi que de 1,2 à 7,2 kilotonnes de FeCl_3 sont ainsi utilisées chaque année dans une usine de traitement de l'eau traitant une charge organique correspondante à 1 million d'équivalent habitant, ce qui représente un coût non négligeable.

[0003] Outre le coût associé à ces traitements, les stations d'épuration (STEP) sont dépendantes d'un approvisionnement en produits chimiques dont la production et le transport ont un impact sur l'environnement. La production et l'utilisation de produits fabriqués au sein même de la station d'épuration selon un principe d'économie circulaire avec circuit court, minimisant par voie de conséquence les impacts environnementaux et améliorant le bilan environnemental de la STEP serait une évolution importante. De manière générale, toute diminution de la consommation de réactifs notamment de FeCl_3 améliorerait significativement le bilan environnemental d'une STEP. De plus, la synthèse des produits chimiques nécessite dans la majorité des cas, beaucoup de produits et matériels, et génère beaucoup de polluants ainsi que des eaux usées nécessitant aussi un traitement.

[0004] On note, de plus, que certains flocculants de type polymères synthétiques peuvent persister dans l'environnement et certains de leurs sous-produits peuvent s'avérer être dangereux. Le cas particulier du polyacrylamide (PAM) est représentatif car ce polymère peut se dégrader en acrylamide classé par l'Agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC) en tant que carcinogène probable du groupe 2A (Yuliani E., Imai T., Teeka J., Tomita S., Suprayogi Exopolysaccharide production from sweet potato-shochu

distillery wastewater by *Lactobacillus sakei* CY1, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2011, 25 (2), 2329-2333).

[0005] Ainsi, même si le polyacrylamide et ses dérivés produits à partir du pétrole sont les flocculants synthétiques les plus utilisés en raison de leur efficacité élevée à faible dosage et de leur manipulation facile, la recherche de produits alternatifs est primordiale, tant pour l'aspect protection de l'environnement que celui de la santé.

[0006] Ainsi, il existe un besoin, dans les processus de clarification, de développer l'utilisation de coagulants / adjuvants/ flocculants à base de bioproduits, d'une part, pour réduire la dépendance de la station d'épuration vis-à-vis des réactifs chimiques ajoutés, et, d'autre part, pour promouvoir l'utilisation de polymères biologiques à moindre impact sur l'environnement et sur la santé humaine.

[0007] Les exopolymères bactériens (EPS) sont des biopolymères qui sont sécrétés ou relargués par des cellules microbiennes et qui restent en partie plus ou moins fortement associés à la surface de la cellule (par exemple en capsule). Ces biopolymères sont principalement composés de protéines, de glucides, de lipides et/ou d'acides nucléiques.

[0008] Les EPS bactériens, et en particuliers la fraction comprenant des exopolysaccharides, peuvent présenter pour certains d'excellentes propriétés flocculantes et peuvent ainsi être une alternative satisfaisante aux polymères synthétiques tels que le PAM.

[0009] La plupart des études concernant la production d'EPS illustrent la production d'EPS au travers de cultures pures, soit par des organismes bien connus (*Pseudomonas*, *Bacillus*, bactéries lactiques, champignons, etc.), soit à partir d'isolats réalisés à partir de sources diverses (boues activées, sols, déchets, etc.) et utilisés alors comme des cultures pures. Bien que la production des EPS par voie microbienne soit considérée comme respectueuse de l'environnement car basé sur l'utilisation de carbone renouvelable et en phase avec le concept de bioraffinerie, les EPS microbiens ne constituent qu'une fraction mineure du marché actuel des polymères flocculants en raison du coût élevé de leur production et de la difficulté de leur récupération.

[0010] Pour cette raison, de nombreux efforts ont été consacrés au développement de procédés de production rentables en utilisant des substrats de culture moins chers. Ces substrats proviennent généralement de résidus sous forme liquide comme les sirops, la mélasse, les jus, le lactosérum du fromage et les eaux usées en général ou de matières solides comme la biomasse lignocellulosique et les déchets organiques. Ces moyens de

productions présentent malheureusement des inconvénients. Un des inconvénients majeurs se situe dans la mise en œuvre de cultures dites « pures » tant dans les besoins de stérilisation associés que dans l'incapacité des souches bactériennes pures à utiliser la diversité des substrats présents.

[0011] Il existe ainsi un besoin de fournir un produit ayant des propriétés de floculant suffisantes pour remplacer les polymères synthétiques pouvant avoir un impact sur la santé, de s'affranchir de la dépendance vis-à-vis du fournisseur et d'appliquer un principe d'économie circulaire avec circuit court en produisant le produit ayant des propriétés de floculant à l'endroit où l'on en a besoin, de valoriser les déchets et sous-produits en produisant les produits ayant des propriétés de floculant à partir de ces résidus, déchets, sous-produits contenant des carbohydrates et éventuellement de pouvoir les exporter facilement afin d'augmenter la rentabilité de la station d'épuration.

[0012] Un objet de la présente invention porte ainsi sur un procédé de production d'une biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant comprenant les étapes :

a) introduction dans un réacteur :

- d'un substrat comprenant éventuellement un inoculum microbien et comprenant au moins 30% en masse d'oses, choisis de préférence dans le groupe comprenant les hexoses et les pentoses ; et

- optionnellement d'éléments nutritifs pour l'inoculum microbien,

le milieu réactionnel obtenu ayant un rapport molaire C/N inférieur ou égal à 10 et un taux de dilution D inférieur ou égal à $0,35h^{-1}$;

b) agitation du milieu réactionnel obtenu en a) et maintien du rapport C/N à une valeur inférieure ou égale à 10 et du taux de dilution D à une valeur inférieure ou égale à $0,35h^{-1}$;

c) élimination des bactéries filamenteuses et champignons filamenteux éventuels par décantation séquentielle de la biomasse obtenue en b) ; et

obtention de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant.

[0013] Par « substrat », on entend tout hydrolysate ou mélange comprenant une source de carbone (oses), pasteurisé ou non pasteurisé, purifié ou non purifié, filtré ou non filtré, comprenant au moins 30% en masse de sucres (oses) provenant de n'importe quelle biomasse. Il peut s'agir par exemple d'un hydrolysate de bois, de paille et plus

généralement toute biomasse lignocellulosique, de céréales, racines (ex : betterave), de fruits mais aussi des résidus ou co-produits et déchets solides organiques éventuellement biodégradables ayant, une fraction élevée de sucres, notamment ceux indiqués dans le Rapport de l'Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME : panorama des coproduits et résidus biomasse a usage des filières chimie et matériaux biosourcés en France), Septembre 2015. Le substrat peut, dans certains cas, être un milieu de culture, s'il comprend tous les éléments nutritifs pour l'inoculum microbien.

[0014] Avantageusement, lorsque le substrat est un hydrolysate, il peut être obtenu par toute méthode d'hydrolyse chimique, thermique ou biologique connue de l'art telle que par exemple une hydrolyse enzymatique en milieu acide (Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P., Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, 48(8), 3713–3729)

[0015] Avantageusement, le substrat peut comprendre au moins 40% en masse d'oses. De préférence le substrat comprend au moins 50% en masse d'oses, et de manière encore plus préférée de 70 à 100 % en masse d'oses, voire de 90 à 100 %.

[0016] Avantageusement, le substrat peut comprendre un hydrolysate et/ou des oses.

[0017] Par « ose » ou « monosaccharide », on entend le monomère des glucides. Les oses possèdent au moins 3 atomes de carbone : ce sont des poly hydroxyaldéhydes (aldoses) ou des poly hydroxycétones (cétoses). Ils ne sont pas hydrolysables. Ils sont très solubles dans l'eau et possèdent généralement un pouvoir sucrant. On les distingue par la longueur de leur chaîne carbonée. Un ose à n carbones est composé d'une chaîne carbonée non ramifiée, n allant de 3 à 7 carbones, ne comportant que des liaisons simples. Tous les carbones portent une fonction alcool (OH) sauf un qui porte une fonction carbonyle. Cela détermine donc deux catégories d'oses. On appelle « aldose », un ose dont la fonction carbonyle est une fonction aldéhyde, elle se trouve sur le premier carbone (par exemple le glucose). On appelle « cétose », un ose dont la fonction carbonyle est une fonction cétone, elle se trouve sur le second carbone (par exemple le fructose).

[0018] Avantageusement, les oses peuvent être choisis parmi le groupe comprenant les hexoses et les pentoses. Par exemple, le substrat peut comprendre des aldohexoses (exemple : glucose ; galactose), des cétohexoses (exemple : fructose ; sorbose), des

aldopentoses (exemples : xylose ; arabinose ; ribose) ou bien encore des cétopentoses (exemple : ribulose ; xylulose) et leurs mélanges.

[0019] Avantageusement, le substrat peut comprendre un inoculum microbien, comprenant notamment des bactéries hétérotrophes. Les microorganismes dudit substrat peuvent être choisis dans le groupe comprenant les gammaprotéobactéries, les flavobactéries, les alphaprotéobactéries et les bêtaprotéobactéries. Par exemple, il peut s'agir de bactéries appartenant à des classes taxonomiques telles que les gammaprotéobactéries, les flavobactéries, les alphaprotéobactéries et les bêtaprotéobactéries. Par exemple, les gammaprotéobactéries peuvent être des *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Raoultella* de la famille des Enterobacteriaceae et *Acinetobacter* de Moraxellaceae, les flavobactéries peuvent être des *Flavobacterium* ou des *Flavobacteriaceae*, les alphaprotéobactéries peuvent être des *Rhodobacter* (*Rhodobacteraceae*) ou des *Novosphingobium* (*Sphingomonadaceae*) et les Betaproteobacteria peuvent être des *Comamonas* (*Comamonadaceae*). Avantageusement, les microorganismes sélectionnés lors de la mise en œuvre du procédé selon l'invention peuvent par exemple être lesdites bactéries hétérotrophes précédemment citées, ces microorganismes pouvant ensuite produire des EPS bactériens.

[0020] Par « biomasse », on entend une masse comprenant des microorganismes vivants.

[0021] Par « biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant », on entend biomasse ayant un pouvoir flocculant contenant des composés microbiens comprenant des exopolysaccharides (EPS), purs ou en mélange avec d'autres substances (par exemples des protéines) ayant des propriétés de flocculant et pouvant se substituer aux polymères synthétiques tels que les polyacrylamides par exemple.

[0022] Par « exopolysaccharides bactériens », on entend des EPS sécrétés ou relargués par des cellules microbiennes et qui restent en partie plus ou moins fortement associés à la surface de la cellule. Les exopolysaccharides bactériens peuvent ainsi être produits par les cellules et s'accumuler autour des cellules. Ces polysaccharides sont des homo- ou hétéro- polysaccharides principalement composés de glucides, le glucose, le galactose et le mannose étant les monomères les plus courants. Dans le cas des hétéropolysaccharides, on observe par exemple : D-glucose, D-galactose, L-rhamnose avec parfois, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, ou acide glucuronique, mais aussi acides guluronique et manuronique. D'autres sucres neutres (par exemple, le rhamnose et le fucose), certains acides uroniques (principalement des acides glucuronique et

galacturonique) et des osamines (sucres N-acétylamino) sont également fréquemment rencontrés. En plus des hydrates de carbone, les EPS bactériens peuvent contenir plusieurs substituants (tels que des groupes acyl et/ou pyruvate). La présence de certains de ces groupes acyls confère à l'EPS un caractère anionique, augmente son caractère lipophile et affecte sa capacité à interagir avec d'autres polysaccharides et les cations.

[0023] Par « boue activée », on entend une biomasse microbienne utilisée pour le traitement des eaux usées qui s'organise en floc. La boue activée se compose principalement d'organismes hétérotrophes, c'est-à-dire qui utilisent des matières organiques et acquièrent de l'énergie par oxydation ou respiration, ou encore fermentation. Certains de ces microorganismes produisent des EPS responsables de la floculation observée des boues activées.

[0024] Par « microorganismes indésirables », on entend des bactéries ou champignons, notamment bactéries filamenteuses et champignons filamenteux, qui ne présentent aucune propriété de floculant, ne produisant notamment pas les EPS responsables de la floculation observée des boues activées.

[0025] Par « décantation », on entend tout procédé dans lequel des particules sont séparées par une différence de masse volumique, par exemple centrifugation, hydrocyclone ou sédimentation.

[0026] Avantageusement, l'étape a) du procédé selon l'invention comprend une introduction dans un réacteur d'un substrat et optionnellement d'éléments nutritifs pour l'inoculum microbien. Ce mélange conduit à la formation d'un milieu de culture dans le réacteur (milieu réactionnel). Le substrat peut dans certains cas satisfaire à la définition de milieu de culture.

[0027] Avantageusement, le substrat peut être complété par l'introduction d'éléments nutritifs pour l'inoculum. En fonction de la composition du substrat, l'introduction d'éléments nutritifs permet d'obtenir dans le réacteur un milieu de culture adapté à la prolifération des microorganismes. Il peut s'agir d'une source complémentaire de carbone, de potassium, de phosphore, d'azote, de soufre, de magnésium, de calcium, de fer, de sodium, de chlorure et d'oligo-éléments (sels de Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti, Mo), d'eau ou encore d'un tampon pH. La source d'azote peut être minérale et se présente de préférence sous la forme d'ion NH_4^+ (en équilibre avec NH_3) mais peut également se présenter sous la forme de nitrates ou de nitrites. La source d'azote peut aussi être

organique (acides aminés, peptides, protéines, acides nucléiques). La source d'azote peut notamment être de l'urée ou un dérivé d'urée (urines) ou un engrais azoté. Le substrat peut également être source d'azote. La source d'azote peut être un mélange des sources précitées. La source de phosphore peut par exemple être de l'acide phosphorique, un phosphate ou un polyphosphate ou un mélange de ceux-ci.

[0028] Avantageusement, le rapport C/N du mélange obtenu à l'étape a) est un rapport molaire. Les valeurs de C et de N sont exprimées en moles. Le rapport molaire C/N peut avoir une valeur inférieure ou égale à 10, de préférence comprise dans un intervalle allant de 1 à 10 et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de 7 à 10. La mesure de l'azote total réduit « N » (organique et inorganique) se fait par la méthode dite de Kjeldahl. La mesure de l'azote minéral réduit (NH_4^+) est faite par la méthode de Kjeldahl ou par la chromatographie HPLC ionique ou encore par la méthode colorimétrique de Nessler. Le carbone « C » est mesuré par le COT (Carbone Organique Total). Il est tenu compte dans la valeur de « C » uniquement du carbone organique biodégradable qui est celui qui est dégradé dans le réacteur. Le rapport C/N peut être mesuré et ajusté sur la base de prélèvements effectués au sein du réacteur ou sur les entrées et sorties du réacteur (par exemple sur la base d'un bilan entrée/sortie).

[0029] Avantageusement, le taux de dilution D dans le réacteur peut être inférieur ou égal à $0,35\text{h}^{-1}$, de préférence compris dans un intervalle allant de $0,05$ à $0,30\text{h}^{-1}$, et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de $0,08$ à $0,20\text{h}^{-1}$ ou encore de $0,09$ à $0,014\text{h}^{-1}$. Le taux de dilution est le rapport entre le débit liquide ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$) entrant dans le réacteur sur le volume du liquide dudit réacteur (m^3). Dans le cas d'un réacteur semi-continu, le calcul du taux de dilution se fait sur la durée du cycle. Le liquide peut éventuellement comprendre des solides en suspension, notamment par exemple le substrat, l'inoculum et d'autres éléments.

[0030] Avantageusement, le pH dans le réacteur est compris dans un intervalle allant de 6 à 9, de préférence de 6,5 à 8 ou encore de 6,8 à 7,8.

[0031] Avantageusement, le mélange obtenu à l'étape a) a un rapport molaire C/P inférieur ou égal à 600. Le rapport C/P du mélange obtenu à l'étape a) est un rapport molaire. Les valeurs de C et de P sont exprimées en moles. Le rapport molaire C/P peut avoir une valeur inférieure ou égale à 600, de préférence inférieure ou égale à 100 et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de 40 à 100. La valeur de C est la même que

dans le rapport C/N. La mesure de phosphore peut être réalisée par digestion en milieu acide et en présence de persulfate, le phosphore solubilisé est ensuite dosé par colorimétrie selon la norme NF EN 14672 de décembre 2005. Généralement, dans le procédé selon l'invention, lorsque le taux de dilution D augmente, le rapport C/P requis diminue. Par exemple, lorsque le taux de dilution D est compris dans un intervalle allant de $0,25$ à $0,35\text{h}^{-1}$, le rapport C/P peut être de l'ordre de 40 à 70. Lorsque le taux de dilution D est compris dans un intervalle allant de $0,14$ à $0,25\text{h}^{-1}$, le rapport C/P peut être inférieur ou égal à 600. Lorsque le taux de dilution D est compris dans un intervalle allant de $0,09$ à $0,14\text{h}^{-1}$, le rapport C/P peut être de l'ordre de 40 à 600. Par exemple, lorsque D est d'environ $0,12\text{h}^{-1}$, C/P peut être inférieur ou égal à 100, de préférence compris dans un intervalle allant de 40 et 100 ou encore dans un intervalle allant de 40 et 60.

[0032] Avantageusement, l'étape b) du procédé selon l'invention comprend une agitation du milieu réactionnelle obtenu à l'issue de l'étape a). Il peut s'agir d'une agitation mécanique ou magnétique.

[0033] Avantageusement, dans l'étape b) selon le procédé de l'invention, la durée d'agitation peut être comprise dans un intervalle allant de quelques minutes à plusieurs heures, jours ou mois. La durée de l'étape b) peut dépendre de la fréquence à laquelle l'étape c) est mise en œuvre.

[0034] Avantageusement, pendant toute la durée de l'étape b), le rapport C/N peut être maintenu à une valeur inférieure ou égale à 10, de préférence comprise dans un intervalle allant de 4 à 10 et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de 7 à 10.

[0035] Avantageusement, le rapport C/N des étapes a) et b) est identique.

[0036] Avantageusement, pendant toute la durée de l'étape b), le taux de dilution D peut être maintenu à une valeur inférieure ou égale à $0,35\text{h}^{-1}$, de préférence compris dans un intervalle allant de $0,05$ à $0,30\text{h}^{-1}$, et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de $0,08$ à $0,20\text{h}^{-1}$ ou encore de $0,09$ à $0,14\text{h}^{-1}$.

[0037] Avantageusement, le taux de dilution D des étapes a) et b) est identique.

[0038] Avantageusement, l'imposition d'un taux de dilution D dans le réacteur fixe un temps de séjour des cellules dans le réacteur et impose indirectement un taux spécifique de croissance μ minimum aux cellules non décantées, permettant ainsi l'élimination des cellules non désirées.

- [0039] Avantageusement, pendant toute la durée de l'étape b), le rapport C/P peut être maintenu à une valeur inférieure ou égale à 600, de préférence inférieure ou égale à 100 et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de 40 à 100.
- [0040] Avantageusement, le rapport C/P des étapes a) et b) peut être identique.
- [0041] Avantageusement, l'étape c) du procédé selon l'invention peut comprendre une élimination des bactéries filamenteuses et des champignons filamenteux éventuels, et éventuellement d'autres micro-organismes indésirables, par décantation séquentielle de la biomasse obtenue à l'étape b).
- [0042] Avantageusement, l'étape c) du procédé selon l'invention peut être mise en œuvre de manière alternative ou simultanée avec l'étape b). Le procédé peut comprendre une ou plusieurs itérations des étapes a), b) et/ou c), lesdites étapes a), b) et/ou c) étant consécutives ou simultanées. En particulier, dans le cadre d'un fonctionnement continu, les étapes a) et b) peuvent être simultanées ou consécutives.
- [0043] Avantageusement, l'étape c) peut être mise en œuvre directement dans le réacteur ou bien sur les effluents issus du réacteur. Lorsque l'étape c) est mise en œuvre dans le réacteur, l'agitation est arrêtée et la biomasse obtenue à l'étape b) est alors mise à décanter dans le réacteur. Le décanat obtenu, comprenant bactéries filamenteuses et champignons filamenteux éventuels, et éventuellement d'autres microorganismes indésirables, est éliminé du réacteur, par exemple via une purge partielle du volume liquide du réacteur. Lorsque l'étape c) est mise en œuvre sur les effluents issus du réacteur, le décanat est alors éliminé et le résiduel qui contient notamment des bactéries ayant les propriétés de flocculant est réinjecté dans le réacteur. Dans ce mode de réalisation du procédé, l'étape c) peut être mise en œuvre simultanément à l'étape a) et/ou b) car l'agitation n'a pas besoin d'être interrompue pour permettre la décantation du milieu réactionnel. L'étape c) du procédé de l'invention permet d'éviter l'accumulation de micro-organismes indésirables, notamment les microorganismes filamenteux (bactéries ou champignons) dans le réacteur. L'étape c) peut permettre en outre d'éliminer d'autres microorganismes indésirables dont la vitesse de décantation est supérieure à celle des microorganismes produits au cours du procédé, notamment les EPS bactériens.
- [0044] Avantageusement, dans l'étape c) selon le procédé de l'invention, la durée de la décantation est suffisante pour éliminer les microorganismes filamenteux ayant une

vitesse de sédimentation comprise dans un intervalle allant de 0,1 mètre par heure à 20 mètres par heure et plus généralement comprise entre 0,5 m/h et 5 m/h.

[0045] Par « durée de décantation suffisante », on entend la durée nécessaire pour que dans un réacteur donné, les microorganismes indésirables aient le temps d'atteindre la fraction du milieu réactionnel qui sera purgée. Par exemple, la durée de décantation de l'étape c) pour un milieu réactionnel ayant un volume 8 L et une hauteur 25 cm, dont 11% en volume sont purgés est de 4 à 5 minutes. Les microorganismes éliminés sont, par exemple, des bactéries du genre *Sphaerotilus* en particulier, l'espèce *S. natans*. L'homme du métier saura adapter la durée de l'étape c), en fonction du type de microorganismes filamenteux à éliminer et des paramètres de température, de viscosité, de volume et de hauteur du milieu réactionnel, pour éliminer une quantité suffisante de microorganismes filamenteux, notamment aussi en fonction de la forme du réacteur et de la fraction de volume de milieu réactionnel purgé.

[0046] Avantageusement, l'étape c) permet lors de la mise en œuvre du procédé de l'invention, que le temps de séjour des microorganismes indésirables soit inférieur à celui des microorganismes ayant des propriétés de floculant.

[0047] Avantageusement, lorsque le procédé comprend plusieurs étapes c) selon le procédé de l'invention, la fréquence de mise en œuvre de l'étape c) est de préférence comprise dans un intervalle allant de 1 à 60 fois par jour et de manière encore plus préférée dans un intervalle allant de 15 à 30 fois par jour.

[0048] Avantageusement, le ratio t_c/t_b (durée de l'étape c)/durée de l'étape b) a une valeur allant de 0,01 à 0,40, de préférence de 0,05 à 0,30. On définit le ratio t_c/t_b comme étant la durée d'une étape c) / la durée d'une étape b), lorsque l'étape c) est mise en œuvre dans le réacteur et comme la somme des durées de l'étape c) / la durée de l'étape b), lorsque l'étape c) est réalisée sur les effluents issus du réacteur.

[0049] Avantageusement, la production de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant se produit de manière continue lors des étapes b) et/ou c).

[0050] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre une étape d'inoculation du réacteur avec un ou plusieurs microorganismes. Cette étape d'inoculation du réacteur peut par exemple comprendre l'introduction d'une boue activée, d'un inoculum issu d'un autres procédé de traitement biologique des eaux usées, par exemple d'un biofiltre, d'un lit bactérien, d'un procédé de lagunage mais aussi un extrait

de sol ou de déchets, résidus organiques ou encore d'un inoculum sélectionné sur sucre simple et ions ammonium, selon le procédé de l'invention, de préférence à un rapport molaire C/N inférieur ou égale à 10. Cette étape d'inoculation est une étape dite d'amorçage et peut avoir lieu préalablement à l'étape a), notamment lorsque le substrat envisagé pour la mise en œuvre du procédé ne contient pas de microorganismes ou s'ils ne sont pas en nombre suffisant ou suffisamment viable dans le substrat pour amorcer le procédé selon l'invention. Pendant cette étape, le ou les microorganismes d'intérêt se développent de manière à pouvoir produire ensuite la biomasse lors de la mise en œuvre du procédé.

[0051] Avantageusement, la concentration de microorganismes provenant de l'inoculum ou du substrat peut généralement représenter au moins 10 mg de cellules viables en masse sèche par litre de volume de liquide dans le réacteur.

[0052] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre une étape d'injection dans le réacteur d'un ose ou mélange d'oses additionnel. Cette étape peut être mise en œuvre à tout moment dans la mise en œuvre du procédé pour ajuster le rapport C/N, ou bien lors de l'étape d'amorçage ou pour favoriser le processus de sélection et de production de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant.

[0053] Avantageusement, le procédé selon l'invention est mis en œuvre dans un réacteur continu ou semi-continu. En fonctionnement dans un réacteur continu, la croissance, la sélection des microorganismes et la production de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant se produit lors des étapes a), b) et c), au sein du même réacteur. Le procédé peut également être mis en œuvre dans plusieurs réacteurs, les étapes a), b) et c) étant mise en œuvre dans un premier réacteur, conduisant à la croissance et à la sélection des microorganismes. L'étape de production de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant pouvant ensuite être réalisé dans un second réacteur.

[0054] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre à une température de 4 à 55°C, de préférence de 10 à 30°C, de manière encore préférée à température ambiante. La température ambiante peut varier en fonction du lieu et de la saison, mais est généralement comprise dans un intervalle allant de 15 à 25°C.

[0055] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre en milieu ouvert, sous aération. L'aération du milieu réactionnel peut se faire à l'air libre ou sous

aération forcée. Le gaz utilisé pour l'aération peut être de l'air, ou un mélange enrichi en oxygène. De préférence, l'aération est interrompue lors de l'étape c) afin de favoriser la décantation.

[0056] Avantageusement, le procédé de l'invention est mis en œuvre dans un environnement stérile ou non stérile, de préférence non stérile. Un avantage du procédé selon l'invention est qu'il peut être mis en œuvre dans un environnement non stérile, par exemple un environnement ouvert sur l'extérieur et soumis à la contamination.

[0057] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre une étape de vidange totale du réacteur comprenant le nettoyage du réacteur et la réintroduction du milieu réactionnel. Cette étape peut permettre dans certains cas d'éviter la formation de biofilms sur les parois du réacteur, sur les sondes et sur les pales de l'agitateur mécanique ou l'agitateur magnétique.

[0058] Avantageusement, le procédé selon l'invention est mis en œuvre pendant une durée comprise entre 1 jour et plusieurs mois.

[0059] Avantageusement, le procédé peut avoir une durée minimale de mise en œuvre dépendant du taux de dilution D . De préférence, le procédé est mis en œuvre pendant une durée au moins égale à $4 \cdot 1/D$. Par exemple, lorsque $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$, la durée de mise en œuvre du procédé est d'au moins 1,5 jour. Cette durée peut correspondre à la durée de sélection des microorganismes qui produiront ensuite les EPS et formeront la biomasse microbienne cellulaire ayant des propriétés de flocculant obtenue selon le procédé de l'invention.

[0060] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre une étape de déshydratation de la biomasse microbienne cellulaire ayant des propriétés de flocculant obtenue selon le procédé de l'invention. L'étape de déshydratation peut être réalisée par séchage (apport de chaleur par conduction, convection ou rayonnement, ou par l'utilisation d'un gaz) ou par lyophilisation.

[0061] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre toute étape permettant la conservation de la biomasse selon l'invention par l'abaissement de l'activité de l'eau, notamment en tant que solvant, afin de limiter les réactions de dégradation de la biomasse selon l'invention.

[0062] Avantageusement, le procédé selon l'invention peut comprendre en outre une étape de traitement des eaux usées. Ladite étape de traitement des eaux usées peut comprendre une étape de mise en contact d'eaux usées avec un coagulant et la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant. De préférence, l'étape comprend la mise en contact d'eaux usées avec un coagulant puis avec la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant.

[0063] L'invention consiste également en une biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant obtenue selon le procédé de l'invention.

[0064] On définit un effet de floculation en se basant sur la loi de Stokes et montrant une augmentation de la vitesse de sédimentation de matériel colloïdal et en suspension d'éléments type (par exemple de masse volumique 1100 kg/m^3), tels que par exemple les bactéries (diamètre $1 \text{ }\mu\text{m}$, vitesse de décantation = $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ m/h}$), de colloïdes (diamètre $0,1 \text{ }\mu\text{m}$, vitesse de décantation = $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ m/h}$) ou de colloïdes (diamètre $0,01 \text{ }\mu\text{m}$, vitesse de décantation = $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ m/h}$). Avantageusement, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant obtenue selon le procédé de l'invention permet d'obtenir des diamètres de particules (flocs) d'au moins $100 \text{ }\mu\text{m}$, généralement entre $100 \text{ }\mu\text{m}$ et 1 mm , conduisant à des vitesses de sédimentation respectives de ces mêmes éléments, dans les mêmes conditions, entre $1,5 \text{ m/h}$ et 150 m/h . Ces vitesses sont compatibles avec des procédés de sédimentation utilisés classiquement dans l'art.

[0065] Avantageusement, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention comprend des EPS, de préférence des exopolysaccharides bactériens. La biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention possède un pouvoir floculant équivalent ou même supérieur à celui des polymères produits par synthèse chimique utilisés classiquement dans les stations d'épurations, tel que par exemple le polyacrylamide anionique (par exemple Floerger-type AN 934 SH).

[0066] On entend par polyacrylamide, un polymère répondant à la formule $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CONH}_2)-]_n$, formé à partir de monomères acrylamide. En fonction de l'utilisation visée, le polyacrylamide peut être fonctionnalisé. Il peut ainsi être ionique (cationique ou anionique) ou non-ionique. Le polyacrylamide fonctionnalisé peut par exemple être un copolymère synthétisé par copolymérisation de monomères acrylamide et de monomères acide acrylique ou par hydrolyse du groupement amide du polyacrylamide. Le PAM de

type AN 934 SH est un polyacrylamide fonctionnalisé, anionique, comprenant environ 30 mol% de charges et ayant une masse moléculaire moyenne M_w allant de $1,3 \cdot 10^6$ à $1,6 \cdot 10^6$ Da. Sa teneur en eau est inférieure à 13%. Il a en outre une viscosité allant de 5,7 à 6,5 cPs et une densité de 49,92 lbs/ft³ (données fabricant).

[0067] On entend par « floculation » le processus physico-chimique au cours duquel des matières en suspensions dans un liquide s'agglomèrent pour former des particules plus grosses (flocs). Le « pouvoir floculant » consiste mesurer l'efficacité de l'effet d'agglomération des matières en suspension. Ce pouvoir floculant est par exemple souvent mesuré en relatif par rapport à des références comme une élimination de turbidité en présence ou en absence du floculant dans un test de sédimentation. Par exemple, le PAM AN 934 SH (0.2ppm), associé à du chlorure ferrique (20mg/L) permet un rendement d'épuration (1-turbidité / turbidité témoin sans aucun ajout) > 60% sur ERU (Eau Résiduelle Urbaine). Le PAM AN 934 SH (0.2ppm), associé à du chlorure ferrique (2mg/L) permet un rendement d'épuration (1-turbidité / turbidité témoin sans aucun ajout) > 85% sur kaolinite. Dans les mêmes conditions, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention donne des résultats équivalents, voir largement supérieurs, de 60 à 99% sur ERU et de 85 à 99 % sur kaolinite.

[0068] Avantageusement, en présence d'un coagulant, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention a un pouvoir floculant qui conduit à une élimination de la turbidité d'une eau usée égal à au moins 50 % du pouvoir floculant du polyacrylamide anionique (AN 934 SH) dans les mêmes conditions (ERU, température), de préférence au moins 100%, par exemple entre 100% et 500%.

[0069] Un avantage supplémentaire de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention est de conduire à une forte diminution de la demande chimique en oxygène (DCO) des ERU clarifiée, la DCO étant une mesure indirecte de la pollution desdites ERU.

[0070] Avantageusement, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant selon l'invention peut être purifiée ou non purifiée avant d'être utilisée.

[0071] Avantageusement, la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant peut être sous forme hydratée ou déshydratée. Sous forme déshydratée, elle offre l'avantage supplémentaire de limiter les coûts liés à son éventuel transport.

- [0072] L'invention se rapporte également à une utilisation de la biomasse cellulaire microbienne selon l'invention dans le traitement d'une solution ou suspension aqueuse et/ou huileuse, notamment des eaux usées (urbaines, industrielles ou agricoles), des eaux fluviales, des eaux pluviales, des eaux de ruissellement, des eaux d'extraction minière, des eaux de nettoyage, des huiles ou des gaz. La biomasse cellulaire microbienne selon l'invention peut être utilisée dans tout type de solution ou suspension aqueuse nécessitant une floculation.
- [0073] L'invention se rapporte encore à un procédé de traitement des eaux usées comprenant une étape de mise en contact d'une solution ou suspension aqueuse et/ou huileuse avec un coagulant et une biomasse microbienne cellulaire selon l'invention.
- [0074] Avantageusement, le coagulant peut être tout coagulant utilisé dans les procédés de traitement connus. En particulier, il peut être choisi dans le groupe comprenant des ions trivalents de sels de fer et d'aluminium, de préférence FeCl_3 . Le coagulant pourra aussi être choisi dans le groupe comprenant des biopolymères ou substances biosourcées ayant les propriétés de coagulants (ex : tanins, chitine, amidons modifiés).
- [0075] Avantageusement, l'utilisation ou le procédé de traitement selon l'invention peut être mis en œuvre pour floculer des minéraux et/ou des matières organiques dans des contextes autres que le traitement des eaux, dans tous les milieux où un flocculant est utile. En particulier, l'utilisation ou le procédé de traitement selon l'invention peut être mis en œuvre en amont des membranes de filtrations pour limiter le colmatage ou bien pour aider à l'élimination de l'eau dans les étapes avalées de déshydratation / séchage des boues.
- [0076] Avantageusement, l'utilisation ou le procédé de traitement peut comprendre une étape de réhydratation ou de dilution de la biomasse microbienne cellulaire ayant des propriétés de flocculant selon l'invention.
- [0077] La figure 1 est une représentation schématique de la mise en œuvre du procédé de l'invention comprenant un réacteur continu, un système d'alimentation en minéraux et oligoéléments, un système d'alimentation en substrat, source de phosphore et d'azote (CPN), un système d'alimentation en air, un agitateur mécanique, un conduit de purge, un système de soutirage, des baffles et un dispositif de contrôle du taux de dilution et des rapports C/N et C/P.

[0078] La figure 2 représente une photographie de l'appareillage dit « jar-test » utilisé pour effectuer les tests de floculation, les six béchers étant remplis avec des eaux résiduaires urbaines.

[0079] La figure 3 représente une analyse des performances de biomasses obtenues par le procédé selon l'invention. Sur l'axe des abscisses est reporté le gain du polymère commercial (PAM AN 934 SH) par rapport au coagulant FeCl_3 seul (en pourcentage), et sur l'axe des ordonnées est reporté le gain (%) de la biomasse selon l'invention testée par rapport au FeCl_3 seul.

[0080] La figure 4 représente une vue agrandie (Echelle : 10 μm) d'exopolysaccharides bactériens compris dans une biomasse microbienne cellulaire selon l'invention. On observe grâce à la coloration à l'encre de chine la couche relativement compacte qui entoure la paroi bactérienne et constitue la capsule qui est formée de molécules visqueuses élaborées par la bactérie (il est également possible d'utiliser d'autres colorations comme la coloration au bleu d'Alcian qui, à pH 2,5 adhère aux macromolécules chargées négativement et colore alors en bleu les polysaccharides acides).

[0081] La figure 5 représente une comparaison entre A) une photographie d'observations microscopiques de consortium dominé par *Sphaerotilus* (procédé de sélection mené sans purge sélective, c'est-à-dire sans étape c) du procédé) et B) une photographie d'observations microscopiques de consortium dominé par la biomasse ayant des propriétés de floculant (procédé de sélection mené avec purge sélective des bactéries filamenteuses) ; vue agrandie (Echelle : 10 μm). Cette comparaison montre qu'en l'absence d'étape c) du procédé, les bactéries filamenteuses et champignons filamenteux ne sont pas éliminés.

[0082] L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples, non limitatifs, qui suivent.

[0083] **Exemple 1 : mis en œuvre du procédé selon l'invention**

[0084] Inoculum et milieux de culture

[0085] Un réacteur sous agitation et aération est inoculé par une boue activée issue de la station d'épuration de Ginestous, France) prélevée et conservée selon le Cavaillé et al. (Cavaillé et al. 2016. "Understanding of Polyhydroxybutyrate Production under Carbon and Phosphorus-Limited Growth Conditions in Non-Axenic Continuous Culture."

Bioresource Technology 201 (February): 65–73.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.003>).

[0086] La boue est centrifugée à 4100 g pendant une durée de 15 minutes et le surnageant est ensuite éliminé. Le culot est récupéré et des aliquots sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à -20°C.

[0087] L'inoculum ainsi préparé, avant l'ensemencement du réacteur, un aliquot est décongelé pendant 15h à la température de 4°C et ensuite rincé avec une solution saline (0.9%w/v NaCl) grâce à trois centrifugations successives (4100 g – 15 min). Avant l'inoculation du réacteur, les boues sont alimentées en fed-batch pendant 24h avec des ajouts de 1,8 g/L d'un mélange équimolaire de fructose et glucose.

[0088] Le réacteur estensemencé avec une concentration initiale en boue activée de 1,5 g/L de matières volatiles en suspension.

[0089] Le milieu de culture est composé d'une première solution contenant la source de carbone, d'azote et de phosphore. Il s'agit d'une alimentation contenant une source de carbone (dans l'exemple un mélange équimolaire de glucose et fructose), une solution tampon phosphate et de l'ammonium ajouté selon le degré de limitation par l'azote choisi, ici de manière à obtenir un rapport (C/N) consommé de 8,5 (molaire).

[0090] Une seconde solution est ajoutée contenant les sels minéraux et éléments trace requis pour les cultures microbiennes (Tableau 1).

Composé	Concentration
Ferric Ammonium Citrate Solution à 250g/L ($C_6H_5+4yFe_xN_yO_7$ à approx. 28% Fe)	0,1 mL/L
MgSO ₄ .7H ₂ O Solution à 250g/L	0,2 mL/L
KOH Solution à 250g/L	0,07 mL/L
H ₂ SO ₄ 96%v/v	0,035 mL/L
Solution "éléments traces" (0,3 g/L H ₃ BO ₃ , 0,21 g/L CoCl ₂ 6H ₂ O, 0,11 g/L ZnSO ₄ 7H ₂ O, 0,04 g/L MnCl ₂ 4H ₂ O, 0,03 g/L Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O, 0,02 g/L CuSO ₄ 5H ₂ O et 0,01 g/L NiCl ₂ 6H ₂ O)	0,1 mL/L

Tableau 1.

[0091] Afin d'évaluer l'effet d'une contamination microbienne constante sur l'efficacité de la sélection microbienne, un débit continu de boues activées diluées est injecté dans le réacteur. Ce débit est choisi pour apporter un flux de cellules contaminantes correspondant à 5% de la production de cellules du réacteur (5% de r_x (g/(L.h) –

0,1g/L/h), soit environ 0,005 g/L/h dans les conditions stables avec une DCOp autour de 0,8g/L dans le réacteur. Malgré cet apport continu de cellules contaminantes, la sélection de la biomasse cellulaire ayant des propriétés de flocculant se produit.

[0092] Production de la biomasse cellulaire ayant des propriétés de flocculant

[0093] Le substrat utilisé comprend les éléments du tableau 2 ci-dessous :

Composé	Concentration massique dans le réacteur (g/L)	Concentration molaire dans le réacteur (mol/L)
Glucose	0,766	0,025
Fructose	0,766	0,025
N (essentiellement NH ₄ Cl)	0,32	0,0059
P (solution tampon phosphate)	0,033	0,001
C/N		8,5
C/P		50

Tableau 2.

[0094] Les microorganismes sélectionnés par le procédé sont essentiellement de type *Comamonadaceae*. Ces microorganismes produisent des EPS bactériens.

[0095] Un réacteur de 8L de volume utile (10 L au total) (Figure 1) équipé de double-enveloppe a été utilisé. L'agitation fixée à 130 RPM est assurée grâce à des turbines de Rushton et deux contre-pales de 5 cm de largeur. Pour réguler la concentration en oxygène dissous à (2.5 ± 0.5) mg/L, des débitmètres (EL-FLOW®, Bronkhorst High-Tech B.V., France) ont été utilisés. La température est régulée à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, et le pH est maintenu à 7.0 ± 0.3 avec l'ajout d'hydroxyde de potassium (KOH, 1M). Les conditions opératoires et l'acquisition des données en ligne (concentration en oxygène dissous, pH et température) sont pilotées via un logiciel d'acquisition.

[0096] Deux fois par mois, les réacteurs sont vidés pour nettoyage afin d'éviter la formation de biofilms sur les parois, sur les sondes et sur les pales. Quand cela est jugé nécessaire, les tuyaux d'alimentation sont remplacés.

[0097] Les réacteurs sont pilotés de manière séquencée, avec une phase d'alimentation et d'agitation (55 min) suivie d'une phase de décantation (4 min 30 sec) puis une phase de purge (30sec). La purge des réacteurs est réalisée grâce à 3 piquages en fond de cuve, reliés à des bacs de récupération. A chaque cycle, le volume alimenté est équivalent au

volume purgé de 960 mL (débit de purge de 1,9 L/min). Etant donné que le volume utile est de 8L, le temps de rétention hydraulique est de 8,33 h (taux de dilution $D = 0,12h^{-1}$).

[0098] On obtient la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant A.

[0099] **Exemple 2** : Evaluation des propriétés floculantes de biomasses cellulaires microbiennes ayant des propriétés de floculant selon l'invention

[0100] Les propriétés floculantes sont évaluées sur un effluent représentatif, ici une eau résiduaire urbaine (ERU).

[0101] Les essais de floculation sont réalisés en jar-tests (Lavibond® - Amesbury, United Kingdom, modèle Floc-Tester, SN: 1013/61444) en conditions (vitesses d'agitation, durée des phases) identiques pour chaque combinaison de coagulant / floculant. Une photographie du système appelé « jar-test » est présentée sur la Figure 2.

[0102] Le coagulant utilisé est le chlorure ferrique. Pour chaque test, 6 béchers remplis avec 900 mL d'ERU sont utilisés. Les trois premiers béchers sont utilisés comme référence (n°1: contrôle (sans ajout), n°2: $FeCl_3$ 20 mg/L seul, n°3 $FeCl_3$ 20 mg/L + polyacrylamide AN934SH (nommé PAM) 0.2 mg/L). Les trois béchers restants sont utilisés pour l'évaluation de la biomasse A à 3 concentrations différentes (n°4, n°5, n°6 $FeCl_3$ 20 mg/L + biomasse A). La biomasse A est utilisée directement sans extraction ou purification préalable. Le dosage est évalué par mesure de la demande chimique en oxygène totale (DCO). Généralement, des concentrations de 1, 6 et 12 mgDCO/L sont mises en œuvre dans les trois béchers de test.

[0103] Après avoir agité et mesuré la turbidité initiale (Turb 0), le protocole comprend trois étapes principales : (i) Ajout coagulant ($FeCl_3$ – 20 mg/L) dans tous les béchers sauf le contrôle et agitation à 150 rotations par minute (RPM) pendant 3 min ; (ii) ajout du floculant (PAM 0,2 mg/L – Biomasse A 1-6-12 mgDCO/L dans les béchers 4 à 6) et agitation à 50 RPM pendant 15 minutes ; (iii) décantation de 1 minute et prélèvement à 2,2 cm de la surface pour mesure de la turbidité (Turbx)

[0104] Les résultats sont analysés au vu des rendements d'épuration (en %) calculés comme suit :

[0105] Rendement d'épuration (%r) = $(Turb0 - Turbx) / Turb0 (*100)$

[0106] Les rendements d'épuration obtenus sont rapportés à la référence qui contient seulement le chlorure ferrique (bécher 2). Lorsque le rendement d'épuration obtenu avec

la biomasse selon l'invention est supérieur à celui obtenu avec le chlorure ferrique seul, un gain positif est calculé comme suit :

$$[0107] \text{ GainBiomasseX (vs FeCl}_3\text{)} = (\%r_X - \%r_{\text{FeCl}_3}) / \%r_{\text{FeCl}_3}$$

$$[0108] \text{ GainPAM (vs FeCl}_3\text{)} = (\%r_{\text{PAM}} - \%r_{\text{FeCl}_3}) / \%r_{\text{FeCl}_3}$$

[0109] Finalement les performances obtenues sont systématiquement comparées à celles obtenues avec le PAM AN 934 SH : Performance par rapport au PAM = GainBiomasseX / GainPAM. Cette analyse de résultat permet de s'affranchir de la très grande variabilité des eaux usées en termes de composition et de leur comportement vis-à-vis des coagulants et des flocculants utilisés.

[0110] La méthode de représentation est donnée dans la Figure 3.

[0111] Quatre niveaux de performance sont définis : mauvais (inférieur à 20% du gain du PAM), moyen (entre 20% et 50% du PAM), bon (entre 50% et 100% du PAM) et excellent (supérieur au gain du PAM).

[0112] Le Tableau 3 présente les résultats obtenus avec des biomasses selon l'invention (référence et variante 1 et 2), à savoir d'excellentes performances de floculation (i.e. supérieures à celle du PAM AN 934 SH). Y sont aussi présentés les conditions opératoires et résultats de deux variantes permettant d'obtenir également des performances satisfaisantes.

	Référence	Variante 1	Variante 2
<i>Conditions opératoires</i>			
inoculum	Boue activée	Boue activée	Consortia Référence
Substrat	Glucose / fructose	Glucose / fructose	Hydrolysats
Microorganismes essentiellement sélectionnés	Comamonadaceae majoritaire	Comamonadaceae majoritaire	Comamonadaceae majoritaire
C/N	8,5	9,5	8,5
C/P	48	48	48
D (h ⁻¹)	0,12	0,12	0,12
Durée de cycle (étapes b + c)	1h	1h	1h
Durée de décantation (étape c)	4min 30 sec	4min 30 sec	4min 30 sec
<i>Résultats</i>			
Propriétés flocculantes sur ERU	101% à 490%	110% à 200%	450 à 550%

du AN 934 SH (ou GainPAM vs FeCl3)			
Propriétés floculantes sur ERU de la biomasse selon l'invention	Excellentes	Bonnes	Excellentes
Propriétés floculantes sur kaolinite de la biomasse selon l'invention (valeur du AN 934 SH)	n/d	Excellentes (72%)	n/d
Propriétés floculantes sur digestat dilué de la biomasse selon l'invention (valeur du AN 934 SH)	n/d	Bonnes (465%)	n/d

Tableau 3. n/d = non déterminé.

[0113] Dans la variante 2, l'hydrolysate est issu de refus de tamisage hydrolysés par voie enzymatique (hémicellulases, endo- β -1,4-glucanases, endo- β -D-xylanase).

[0114] Exemple 3 : contre-exemples

[0115] Le Tableau 4 présente quelques conditions opératoires n'ayant pas conduit à la production stable de biomasse présentant des propriétés floculantes (contre-ex 1 et 2).

	Référence	Contre-ex. 1	Contre-ex. 2
<i>Conditions opératoires</i>			
inoculum	Boue activée	Boue activée	Boue activée
Substrat	Glucose / fructose	Glucose / fructose	Glucose / fructose
C/N	8,5	9 (à 17)	9,5
C/P	48	48	250 → 350
D (h ⁻¹)	0,12	0,12	0,12
Durée de cycle (une étape b + c)	1h	n/a	n/a
Durée de décantation (une étape c)	4min 30 sec	0	0
<i>Résultats</i>			
Propriétés floculantes sur ERU	Excellentes	Mauvaises	Mauvaises

Tableau 4. n/a = non applicable.

Revendications

[Revendication 1] Procédé de production d'une biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant comprenant les étapes :

a) introduction dans un réacteur :

- d'un substrat comprenant éventuellement un inoculum microbien et comprenant au moins 30% en masse d'oses, choisis de préférence dans le groupe comprenant les hexoses et les pentoses ; et

- optionnellement d'éléments nutritifs pour l'inoculum microbien, le milieu réactionnel obtenu ayant un rapport molaire C/N inférieur ou égal à 10 et un taux de dilution D inférieur ou égal à $0,35h^{-1}$;

b) agitation du milieu réactionnel obtenu en a) et maintien du rapport C/N à une valeur inférieure ou égale à 10 et du taux de dilution D à une valeur inférieure ou égale à $0,35h^{-1}$;

c) élimination des bactéries filamenteuses et champignons filamenteux éventuels par décantation séquentielle de la biomasse obtenue en b) ; et obtention de la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de flocculant.

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une aération du milieu réactionnel au cours du procédé.

[Revendication 3] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, mis en œuvre dans un environnement ouvert.

[Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, mis en œuvre dans un environnement non stérile.

[Revendication 5] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le milieu réactionnel de l'étape a) comprend des microorganismes choisis dans le groupe comprenant les gammaprotéobactéries, les flavobactéries, les alphaprotéobactéries et les bêtaprotéobactéries.

[Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre une étape d'inoculation du réacteur avec un ou plusieurs microorganismes, de préférence choisis dans le groupe comprenant les gammaprotéobactéries, les flavobactéries, les alphaprotéobactéries et les bêtaprotéobactéries, préalablement à l'étape a).

[Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le substrat comprend un hydrolysate et/ou des oses.

- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre une étape d'injection dans le réacteur d'un ose ou mélange d'oses.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la température dans le réacteur est de 4 à 55°C, de préférence de 10 à 30°C, de manière encore préférée à température ambiante.
- [Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape c) est une décantation à l'intérieur du réacteur, le décantat étant éliminé du réacteur ou une décantation de l'effluent sortant du réacteur, le décantat étant éliminé et le résiduel étant ensuite réinjecté dans le réacteur.
- [Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre une étape de traitement des eaux usées, ladite étape de traitement des eaux usées comprenant de préférence une étape de mise en contact d'eaux usées avec un coagulant et la biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant.
- [Revendication 12] Biomasse cellulaire microbienne ayant des propriétés de floculant obtenue selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 10.
- [Revendication 13] Utilisation de la biomasse cellulaire microbienne selon la revendication 12 dans le traitement des eaux usées.
- [Revendication 14] Procédé de traitement des eaux usées comprenant une étape de mise en contact d'eaux usées avec un coagulant et une biomasse microbienne cellulaire selon la revendication 12.

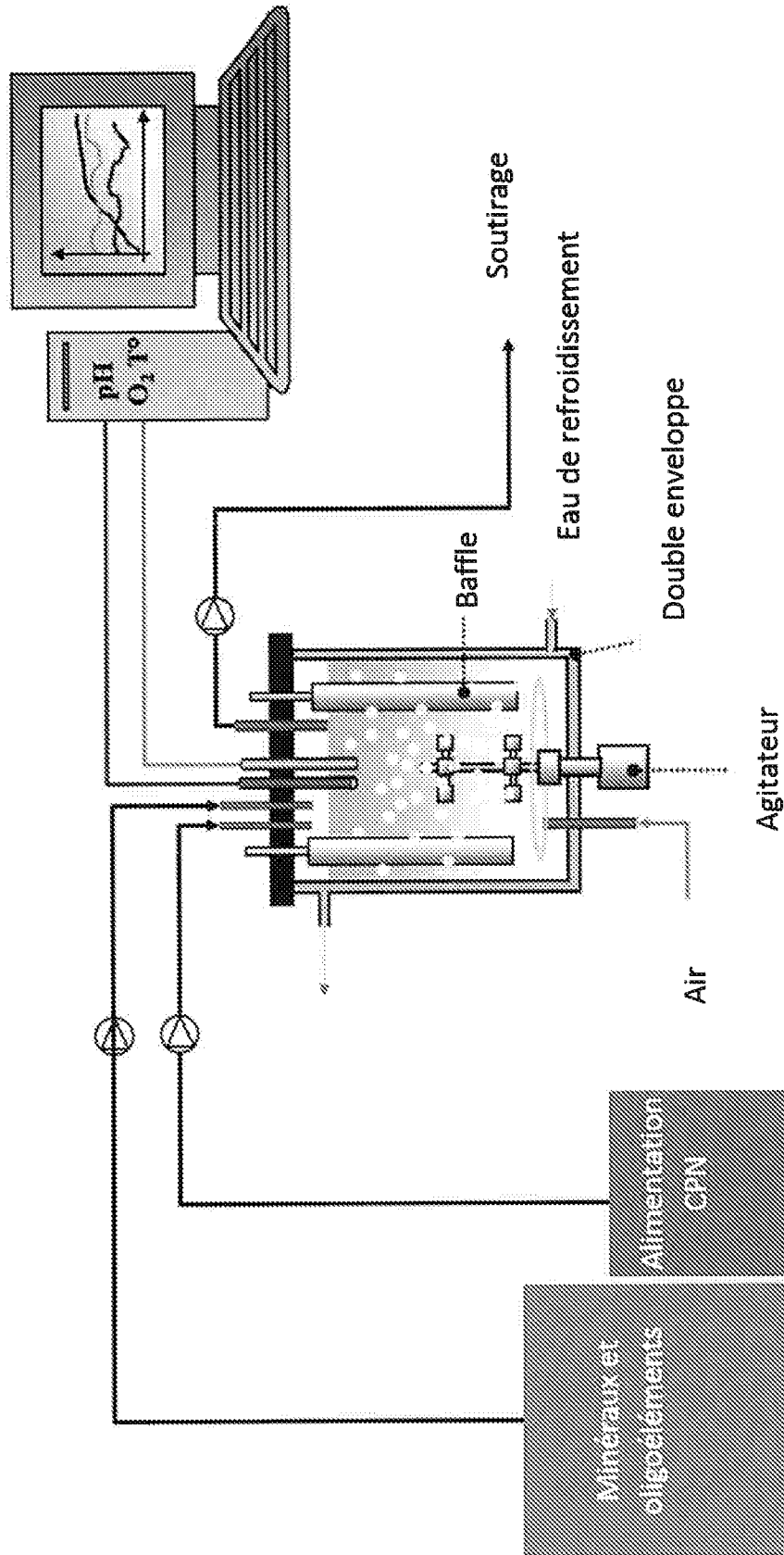


Figure 1

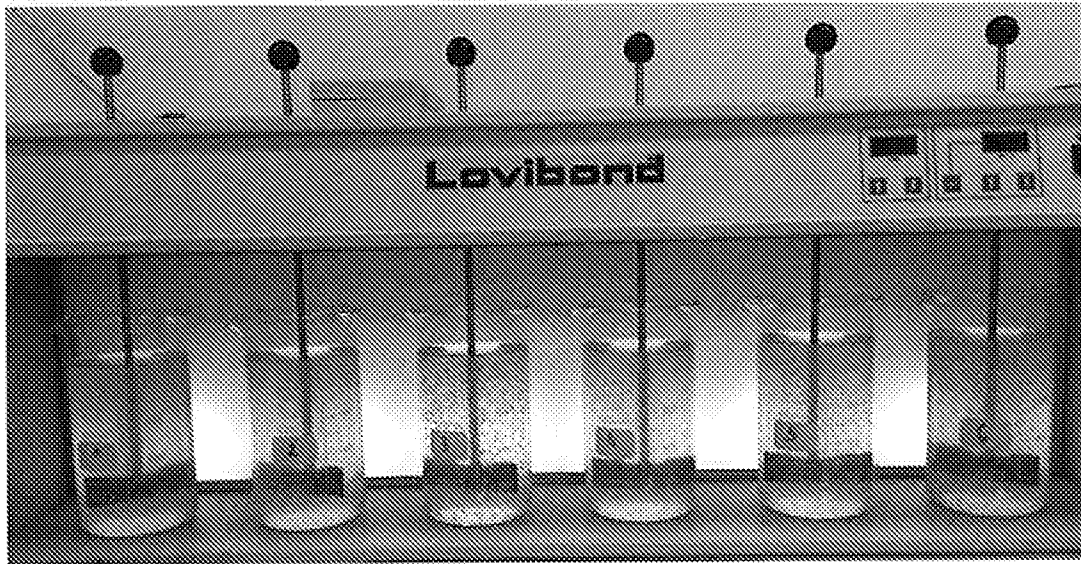


Figure 2

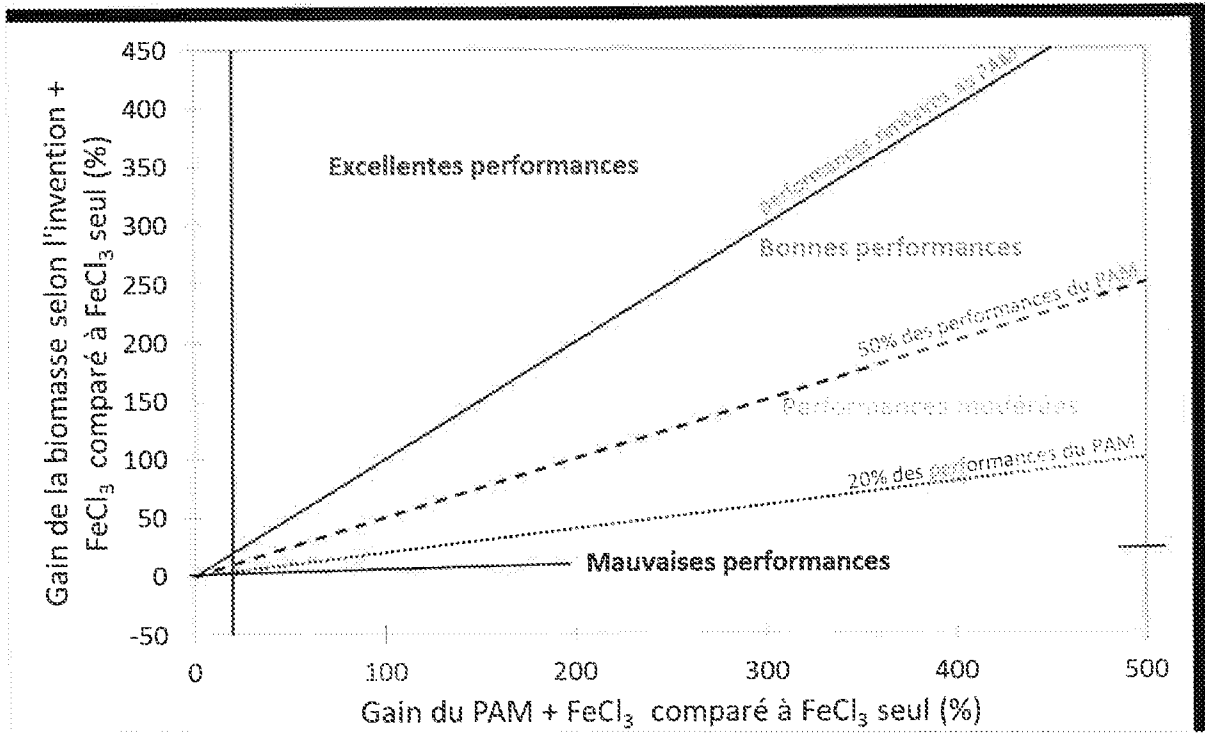


Figure 3

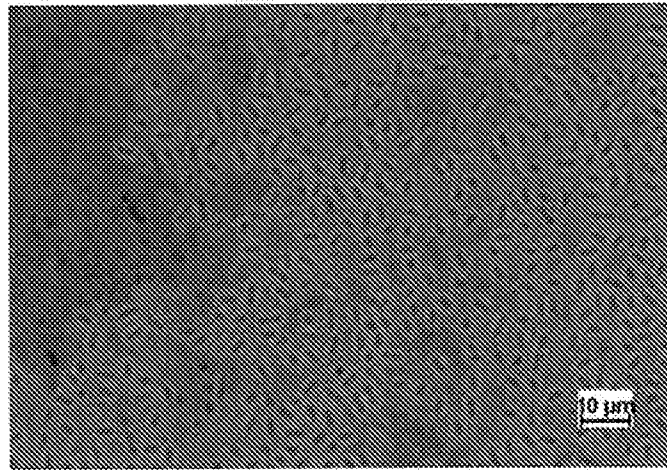


Figure 4

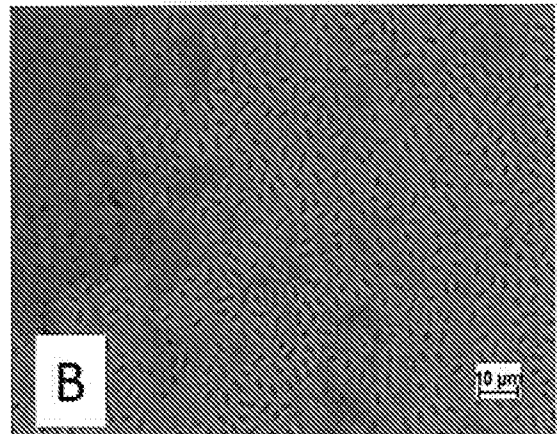
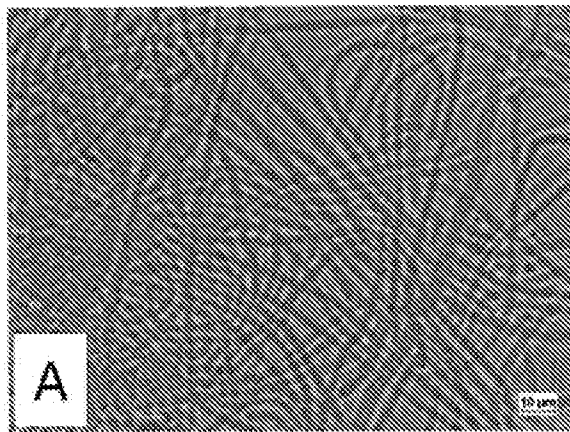


Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2020/050489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 1/20</i> (2006.01)i; <i>C12P 19/04</i> (2006.01)i; <i>C02F 3/00</i> (2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C02F; C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRASERTSAN ET AL. "Optimization for biopolymer production by <i>Enterobacter cloacae</i> WD7" <i>CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB</i> , Vol. 71, No. 3, 06 December 2007 (2007-12-06), pages 468-475 DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2007.06.017 ISSN: 0144-8617, XP022379018 the whole document	1-12
X	FAOUZI BEN REBAH ET AL. "Microbial Flocculants as an Alternative to Synthetic Polymers for Wastewater Treatment: A Review" <i>SYMMETRY</i> , Vol. 10, No. 11, 01 November 2018 (2018-11-01), page 556 DOI: 10.3390/sym10110556 XP055632827	12-14
A	the whole document	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 July 2020		Date of mailing of the international search report 17 July 2020
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Sonnerat, Isabelle Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORE T T ET AL. "Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications" <i>JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 144, 06 June 2014 (2014-06-06), pages 1-25 DOI: 10.1016/J.JENVMAN.2014.05.010 ISSN: 0301-4797, XP029035301	12-14
A	the whole document	1-11
X	XIA S ET AL. "Production and characterization of a biofloculant by <i>Proteus mirabilis</i> TJ-1" <i>BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 99, No. 14, 01 September 2008 (2008-09-01), pages 6520-6527, [retrieved on 2007-12-26] DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2007.11.031 ISSN: 0960-8524, XP022679228	12
A	the whole document	1-11,13,14
X	JUNYUAN GUO ET AL. "Enhanced efficiencies of sludge dewatering and domestic wastewater treatment by using the biofloculant from rice stover : Sludge dewatering and domestic wastewater treatment" <i>WATER AND ENVIRONMENTAL JOURNAL, GB</i> , Vol. 31, No. 1, 22 December 2016 (2016-12-22), pages 120-126 DOI: 10.1111/wej.12221 ISSN: 1747-6585, XP055638807	12-14
A	the whole document	1-11
X	WANG LI ET AL. "Biofloculants from hydrolysates of corn stover using isolated strain <i>Ochrobactium ciceri</i> W2" <i>BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL</i> , Vol. 145, 21 November 2012 (2012-11-21), pages 259-263 DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.11.020 ISSN: 0960-8524, XP028706113	12-14
A	the whole document	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2020/050489

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/20 C12P19/04 C02F3/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C02F C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PRASERTSAN ET AL: "Optimization for biopolymer production by Enterobacter cloacae WD7", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB, vol. 71, no. 3, 6 décembre 2007 (2007-12-06), pages 468-475, XP022379018, ISSN: 0144-8617, DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2007.06.017 le document en entier ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 8 juillet 2020		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 17/07/2020
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Sonnerat, Isabelle

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FAOUZI BEN REBAH ET AL: "Microbial Flocculants as an Alternative to Synthetic Polymers for Wastewater Treatment: A Review", SYMMETRY, vol. 10, no. 11, 1 novembre 2018 (2018-11-01), page 556, XP055632827, DOI: 10.3390/sym10110556	12-14
A	le document en entier -----	1-11
X	MORE T T ET AL: "Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications", JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 144, 6 juin 2014 (2014-06-06), pages 1-25, XP029035301, ISSN: 0301-4797, DOI: 10.1016/J.JENVMAN.2014.05.010	12-14
A	le document en entier -----	1-11
X	XIA S ET AL: "Production and characterization of a bioflocculant by Proteus mirabilis TJ-1", BIORESOURCETECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 99, no. 14, 1 septembre 2008 (2008-09-01), pages 6520-6527, XP022679228, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2007.11.031 [extrait le 2007-12-26]	12
A	le document en entier	1-11,13, 14
X	JUNYUAN GUO ET AL: "Enhanced efficiencies of sludge dewatering and domestic wastewater treatment by using the bioflocculant from rice stover : Sludge dewatering and domestic wastewater treatment", WATER AND ENVIRONMENTAL JOURNAL, vol. 31, no. 1, 22 décembre 2016 (2016-12-22), pages 120-126, XP055638807, GB	12-14
A	ISSN: 1747-6585, DOI: 10.1111/wej.12221 le document en entier -----	1-11
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WANG LI ET AL: "Bioflocculants from hydrolysates of corn stover using isolated strain Ochrobactium ciceri W2", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 145, 21 novembre 2012 (2012-11-21), pages 259-263, XP028706113, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.11.020</p>	12-14
A	<p>le document en entier -----</p>	1-11