

**MELISSA**

**ESTEC/CONTRACT 8125/88/NL/FG**

**Technical note 7**

MELISSA CCN1 TN 7

TABLE OF CONTENTS	P.
TN 7.1	
Growth of <u>Clostridia sp.</u> on different carbon and nitrogen sources and faeces.	1
TN 7.2	
The growth of pure cultures of <u>Rhodospirillum rubrum</u> and <u>Rhodobacter capsulata</u> on the supernatant of the liquefaction compartment.	6
TN 7.3	
Characteristics of polysaccharides produced by Spirulines.	11
TN 7.4	
Toxicity tests of Nitrosomonas-Nitrobacter effluents on Spirulina.	31

## TN 7.1: GROWTH OF CLOSTRIDIA ON DIFFERENT CARBON AND NITROGEN SOURCES AND FAECES.

### 1. Introduction

The proposed anaerobic digestion system of Melissa will be carried out by a liquefying compartment (*Clostridium*) followed by a phototrophic compartment (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*). For the liquefaction compartment special attention is drawn on thermophilic clostridia. Indeed, their metabolic characteristics are adequate for the anaerobic degradation of polymers, the main components of faecal matter. More specifically, *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* deserve further examination for their metabolism concerning degradation of polymers in faecal matter.

In this study, we tested the growth of *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum* on different carbon and nitrogen sources. We examined also the formation of volatile fatty acids (VFA), ammonium and other endproducts.

### 2. Materials and methods

#### Bacterial strains

The strains used were: *Cl. thermocellum* (ATCC 27405) and *Cl. thermosaccharolyticum* (LMG 2811).

#### Media

*Cl. thermosaccharolyticum* (LMG 2811) and *Cl. thermocellum* (ATCC 27405) were grown anaerobically at 60 °C on media GS-3, SY and medium MJ described by Johnson et al. (1981). Media GS-3 and SY are rich non-defined media, while medium MJ is chemically defined. Different carbon sources were tested using medium SY omitting cellobiose. Different nitrogen sources were also tested using medium SY omitting ureum. Table 1 shows the composition of the media.

Table 1. Composition of the media.

Components	MJ	SY	GS3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g	1.5 g	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.9 g	2.9 g	2.9 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0 g	1.0 g	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.15 g	0.15 g	0.15 g
FeSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.25 mg	1.25 mg	1.25 mg
Cellobiose	5.0 g	5.0 g	5.0 g
Ureum	2.1 g	2.1 g	2.1 g
Yeast-extrakt	-	0.5 g	6.0 g
Trace solution (Pfennig, '66)	-	8.0 ml	-
Cysteine.HCl	0.25 g	0.25 g	0.25 g
Resazurine	2.0 mg	2.0 mg	2.0 mg

### Analytical methods

- Growth was determined by measuring the gas production.
- The composition of the gas in the headspace of the tubes was analyzed with a gas chromatograph (Intersemat 122 M). Carbon dioxide is separated with a Poropak column while H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> are separated with a carbosieve column.
- Fermentation products (such as acetic acid, butyric acid, etc.) formed during growth were routinely determined by gas chromatography. Fatty acids were measured in acidified samples by gas chromatography, using a flame ionization detector. Samples for ethanol analyses were first centrifuged for 15 minutes at 2500 g and filtrated on a Millipore filter (0,45 µm). One microliter was injected in a gas chromatograph (FID)

## 3. Results

### 3.1. Growth on various media

Table 2 shows the gas production by the *Clostridium* strains grown on different media.

Table 2. Gas production by two *Clostridium* strains, grown on media GS-3, MJ and SY (gas production / 50 ml medium).

Strain	MJ	Gas production (ml)	
		SY	GS3
<i>C. thermocellum</i>	13	25	37
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	10	84	87

Both *Clostridium* strains were able to grow on all the media tested. *Cl. thermosaccharolyticum*, grown on media GS-3 and SY, produced considerably more gas than *Cl. thermocellum*. There was more gas produced by both strains on media GS-3 and SY than on medium MJ.

### 3.2. Growth on various N- and C-sources

The growth of *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum* was tested on different carbon and nitrogen sources. Table 3 shows the growth of both strains on medium SY. Different N-sources were tested; ureum was omitted and replaced by other N-sources.

Table 3. Growth of *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum* on medium SY, containing different N-sources (0,98 g N / l)

	<i>C. thermocellum</i>			<i>C. thermosaccharolyticum</i>		
	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	Acetic acid (meq/l)	Isovaler. (meq/l)	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	Acetic acid (meq/l)	Butyr. acid (meq/l)
NH <sub>4</sub> Cl	1.77	4.85	0	0.74	13.46	7.02
Ureum	3.36	3.46	0	1.21	11.81	2.93
T-pepton	2.84	8.53	0.56	1.05	24.66	13.10
Yeast-extract	3.75	6.16	0.36	0.85	21.98	12.44
Blanco	2.58	2.74	0	0.94	16.86	8.97

The best results were obtained when the strains were grown on medium SY, containing T-pepton and yeast-extract. In comparison with the other N-sources, the strains did not grow well when ureum was added to the medium. The remarkable growth of the strains on a blank medium can be explained by the presence of yeast-extract and cysteine in the medium. Those two components contain sufficient nitrogen and probably support the growth of the strains. Table 4 shows the growth of the *Clostridium* strains on medium SY. Cellobiose was replaced by other C-sources.

Table 4. Growth of *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum* on medium SY, containing different C-sources (5 g C / l).

	<i>C. thermocellum</i>			<i>C. thermosaccharolyticum</i>		
	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	Acetic acid (meq/l)	Isovaler. (meq/l)	CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	Acetic acid (meq/l)	Butyr.acid (meq/l)
Glucose	1.76	1.52	0	2.17	12.02	6.76
Cellobiose	1.49	3.42	0	2.03	11.31	5.95
Starch	-	0	0	2.23	13.29	5.77
Cellulose	1.80	1.48	0	-	0	0
Blanco	-	0	0	-	0	0

*Cl. thermosaccharolyticum* grows well on C-sources such as glucose, starch and cellobiose. The best growth of *Cl. thermocellum* was obtained on a medium containing cellobiose. Table 5 shows the fermentation products formed during growth on GS-3 medium.

Table 5. Fermentation products formed during growth on GS-3 medium by *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum*.

Organism	CO <sub>2</sub> (ml)	H <sub>2</sub> (ml)	Aca. (mg/l)	Butyr.a. (mg/l)	Isoval. (mg/l)	Lactic. (mg/l)	Eth.
<u><i>C. thermocellum</i></u>	29.8	7.2	377	0	52	138	+
<u><i>C. thermosacch.</i></u>	44.5	45.5	1153	909	0	873	+

Acetic acid was the most important metabolite, formed during growth of both strains on GS-3 medium.

### 3.3. Growth on the Melissa substrate

The growth of *Cl. thermocellum* and *Cl. thermosaccharolyticum* was tested on rat faeces. As such, rat faeces (1,5 % w/v) were inoculated with *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum*. However, it was impossible to cultivate the clostridia on this substrate.

## 4. Discussion

The study shows that both strains, *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum* can grow well on media GS-3 and SY. The best growth was obtained on medium GS-3.

Different N-sources could be used by the *Clostridium* strains. However, the strains did

not grow well when ureum was added to the medium. The best results were obtained when the strains were grown on media, containing organic N-sources.

Glucose, starch and cellobiose could be fermented by *Cl. thermosaccharolyticum*. The main products formed by *Cl. thermosaccharolyticum* were CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, acetic acid, butyric acid, lactic acid and ethanol. *Cl. thermocellum* grows well on cellobiose. In this case, the fermentation products were CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, acetic acid, lactic acid and ethanol.

In the Melissa model, rat excreta are used as fermentation substrate. As such, rat faeces were inoculated with *Cl. thermosaccharolyticum* and *Cl. thermocellum*. No growth could be obtained on this substrate. Further examination of the liquefaction compartment will be necessary. It is clear that the liquefaction compartment should be colonised by a consortium of different but yet compatible bacteria, having complementary characteristics. The presence of saccharolytic (e. g. *Cl. thermocellum* and *Cl. thermosaccharolyticum*) and proteolytic micro-organisms in the liquefaction compartment will be necessary in order to biodegrade the various polymers of the excreta. The crude protein concentration of faeces is estimated to be 20 - 30 % of the total dry weight. In order to have an efficient cycling of N and S (and C) an extensive degradation of proteins is necessary. As such, screening for a proteolytic thermophilic anaerobic micro-organism will be necessary. A better knowledge of the organic N-metabolism by anaerobic thermophilic micro-organisms will help us to use their metabolic potential in the Melissa ecosystem. These are the study objectives mentioned in CCN3.

## 5. References

Johnson E., Madia A. & Demain A. (1981). Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol. 41 (4) : 1060 - 1062.

Pfennig N. & Lippert K.D. (1966). Über das Vitamin B12 Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55: 245 - 256e.

TN 7.2. : THE GROWTH OF PURE CULTURES OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM  
AND RHODOBACTER CAPSULATA ON THE SUPERNATANT OF THE  
LIQUEFACTION COMPARTMENT.

1. Introduction.

The proposed anaerobic digestion system of Melissa couples an anoxygenic phototrophic compartment to a liquefying compartment. To meet the demands of the aerobic compartments, an intensive mineralisation of waste is necessary. This requires that both anaerobic compartments are complementary as well as compatible: the liquefaction compartment should not form dead end products nor metabolites toxic to the phototrophic bacteria.

Moreover, with respect to the nitrogen cycle, enough  $\text{NH}_3$  should be furnished to the aerobic system of Melissa, in order to meet the main Melissa objective, i.e. SCP production by *Spirulina*. From experiments in defined media (TN 6.2) it was observed that both *Rh. capsulata* and *R. rubrum* preferred  $\text{NH}_3$  to an organic N-source (ureum). From this observation, one can expect that the phototrophic micro-organisms may endanger the  $\text{NH}_3$ -delivery to the nitrification compartment.

In this preliminar study, we assessed the potential toxicity of a *Clostridium thermocellum* supernatant on the growth of phototrophic micro-organisms. Moreover, consumption of volatile fatty acids, organic N and  $\text{NH}_3$ -N by the phototrophs was measured.



## 2. Materials and methods.

### *Bacterial strains.*

The strains used were: *Clostridium thermocellum*, *Rhodobacter capsulata* (LMG5162) and *Rhodospirillum rubrum* (LMG4362<sup>T</sup>).

### *Media.*

*Rh. capsulata* and *R. rubrum* were maintained at 28°C on the basal medium of Segers and Verstraete (1983). *C. thermocellum* was cultured at 60°C on GS-2 medium for 3 days (Johnson et al., 1981).

### *Toxicity test.*

The phototrophs were inoculated into the supernatant of a *Clostridium thermocellum* GS-2 culture prepared as follows. The clostridial biomass was removed by centrifugation. pH of the supernatant was adjusted to 7.0 with NaOH and the supernatant was filter sterilized in screw-scapped test tubes with a volume of 20 ml. The tubes were inoculated with 0.5 ml of a full grown culture of *Rh. capsulata* or *R. rubrum* and incubated in the light chamber (60 E/m<sup>2</sup>.s) for 4 days, at room temperature.

### *Analytical methods*

Samples for analyses were first centrifuged for 15 minutes at 14500g to separate the biomass from the medium. The protein content of the biomass was determined by the Bradford (1976) method. The COD of the supernatant was determined by the dichromate method (APAH, 1980) as an indirect measurement of carbon source utilization. The NH<sub>3</sub>-N content of the medium was determined by steam distillation in a Kjeltec.1002 apparatus under alkaline conditions. Kjeldahl-N was determined similarly, after conversion to NH<sub>3</sub> by digestion.

### 3. Results.

Table 1 shows some characteristics of the *Clostridium thermocellum* supernatant.

Table 1. Analyses on the *C. thermocellum* supernatant (mg/l).

Kjeldahl-N	1554	(1)
NH <sub>3</sub> -N	242	(2)
Organic N	1312	(1)-(2)
COD	10761	
VFA	450	(acetic acid)

Both *Rh. capsulata* and *R. rubrum* were capable of growth on the *C. thermocellum* supernatant (Table 2). After 4 days of incubation, biomass protein production was 787 mg/l and 612 mg/l for *Rh. capsulata* and *R. rubrum* respectively. The supernatant of both cultures was analysed on nitrogen content, COD and volatile fatty acids (VFA). Acetic acid was assimilated completely. Remarkable is the doubling of NH<sub>3</sub>-concentration in the supernatant of the *Rh. capsulata* culture.

Table 2. Growth of phototrophs on the *Clostridium* supernatant.

Culture	% Change in			Biomass (mg/l)	
	Kj.-N	NH <sub>3</sub> -N	COD	Prot.	D.W.
<i>Rh. capsulata</i>	- 22	+ 102	- 38	787	1212
<i>R. rubrum</i>	- 19	- 9	- 26	612	942

#### 4. Discussion.

This preliminar study shows that both phototrophs, *Rh. capsulata* and *R. rubrum* can grow on the supernatant of a *C. thermocellum* GS-2 medium. The growth yield of both strains is about 0,30 g DW/gCOD which equals the highest growth performances observed on defined media (Tn 6.1 and Tn 6.2). This indicates that probably no toxic metabolites detrimental to the phototrophic compartment are formed by *C. thermocellum*.

An unexpected result was obtained for *Rh. capsulata*: the total nitrogen content of the medium decreased by 22%, but the NH<sub>3</sub>-N content increased by about 100%. This was probably due to the fermentation of organic N-sources, such as amino acids. The latter observation is of critical importance. Indeed, it would be beneficial to the system if phototrophic micro-organisms produce NH<sub>3</sub>-N for the third nitrification compartment.

Klemme (1989) reported that some strains of *Rh. capsulata* are proteolytic, but only in the presence of high Ca<sup>2+</sup> concentrations. Moreover, both *Rh. capsulata* and *R. rubrum* are able to use a wide range of L-amino acids as N-source. Therefore, it may not be necessary for all the protein to be degraded in the first compartment as *Rh. capsulata* may be capable of proteolysis. A better knowledge of the organic nitrogen metabolism of these

phototrophic micro-organisms will help us to use their metabolic potential in the Melissa ecosystem.

## 5. References.

- APAH (1980). Standard methods for the examination of water and wastewater. 15<sup>th</sup> edition. American Public Health Association, Washington D.C.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Johnson E., Madia A. and Demain A. (1981). Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (4) : 1060-1062.
- Klemme J. (1989). Organic nitrogen metabolism of phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 55: 197-219.
- Segers L. and Verstraete W. (1983). Conversion of organic acids to H<sub>2</sub> by Rhodospirillaceae grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2843-2853.

T.N. 7.3

CHARACTERISTICS OF POLYSACCHARIDES  
PRODUCED BY SPIRULINES

---

ETUDES PRELIMINAIRES DE  
L'EXOPOLYSACCHARIDE  
DE *SPIRULINA PLATENSIS*

Rémy FILALI MOUHIM

Laboratoire de B.F.M.V.  
CNRS, Gif sur Yvette,  
Essonne.

Laboratoire de Chimie Biologique  
Université de Lille Flandres-Artois  
Nord.

## SUMMARY

The filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* produces an exocellular polysaccharide that presents interesting rheological properties. In view of better characterisation, we report here preliminary results on the isolation, purification, composition structure of this polysaccharide.

It can be isolated from liquid cultures of *Spirulina platensis* by CETAVLON precipitation followed by a purification by chromatography on DEAE Trisacryl. The polymer is a heteropolysaccharide containing glucose, xylose, galactose, and two unidentified sugars. Uronic acids and small amount of sulfate are also present wich accounts for the acidic nature of the polymer. The methylated polysaccharide contains 2,3,6 tri-o-methyl glucose and 2,4,6 tri-o-methyl galactose.

## RESUME

La cyanobactérie filamenteuse *Spirulina platensis* produit un polysaccharide exocellulaire qui présente des propriétés rhéologiques intéressantes. Pour mieux le caractériser nous présentons ici les résultats préliminaires de l'isolement, de la purification, de la composition et de la structure de ce polysaccharide.

Il peut être isolé du milieu de culture de *Spirulina platensis* par précipitation au CETAVLON et purifié par chromatographie sur DEAE Trisacryl. Ce polymère est un hétéropolysaccharide contenant du glucose, du xylose, du galactose et deux sucres non identifiés. On trouve aussi des acides uroniques et une petite quantité de sulfate qui participent à la nature acide du polymère. Le polysaccharide méthylé contient du 2,3,6 tri-o-methyl glucose et du 2,4,6 tri-o-methyl galactose.

## ABREVIATIONS

C.P.G.	Chromatographie phase gaz
C.L.H.P.	Chromatographie liquide haute performance
C.C.M.	Chromatographie sur couche mince
A.T.F.A.	Acide trifluoroacétique
D.M.S.O.	Diméthyl sulfoxide
P.M.	Perméthylé
Xyl	Xylose
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
Man	Mannose
Rha	Rhamnose

## 2. L'EXOPOLYSACCHARIDE DE *SPIRULINA PLATENSIS*

### 2.1. MISE EN EVIDENCE ET DISPOSITION

Les suspensions de spirulines présentent un aspect visqueux qui montre la présence de macromolécules dans le milieu de culture. On peut les observer en microscopie photonique après coloration à l'encre de chine : des zones réfringentes apparaissent liées aux bactéries ou libres dans le milieu.

Van Eykelenburg a étudié précisément l'ultrastructure de *spirulina platensis* et a mis en évidence l'exopolysaccharide ( figure 3 ).

Il apparait que les fibres d'exopolysaccharide ont une disposition radiale.

### 2.2. CINETIQUE DE PRODUCTION

Van Eykelenburg a mis en évidence l'augmentation de production de polysaccharide en fonction de celle de la température.

( 1 )

Dans les conditions utilisées en laboratoire (36 C, 100 W / m<sup>2</sup> et aération ), la production d'exopolysaccharide est continue pendant la croissance de la cyanobactérie et se poursuit jusqu'à ce que la culture cellulaire blanchisse.

La quantité de polysaccharide par unité de volume en fin de culture est de 1,6 g / l.

Le polysaccharide est un métabolite primaire. ( figure 4 )

### 2.3. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU POLYMERE

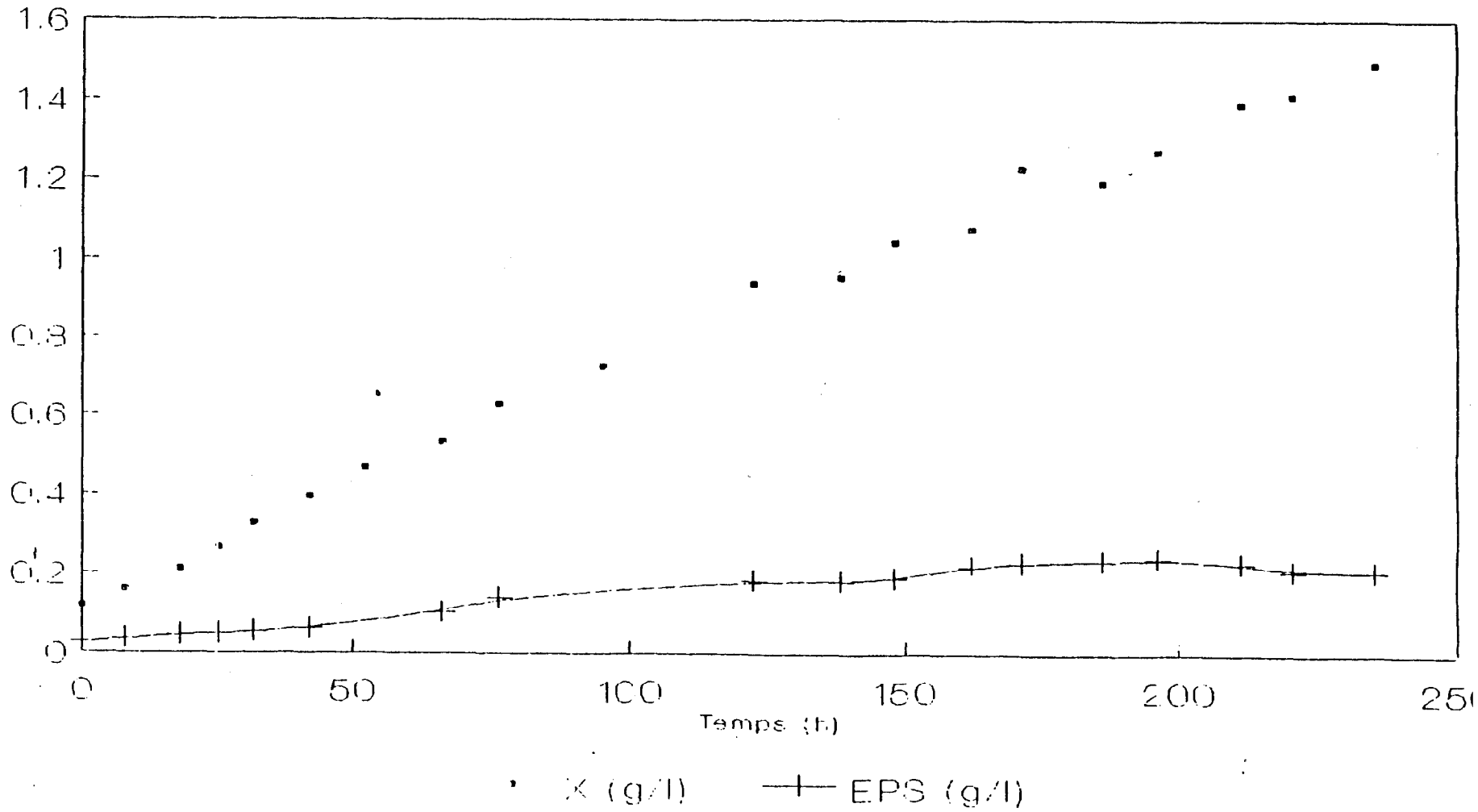
Nous nous sommes intéressés aux propriétés physico-chimiques de ce polysaccharide dans le cadre de la mise au point d'un photobioréacteur pour les spirulines. La présence d'un polysaccharide au sein du réacteur perturbe les transferts de gaz et l'agitation du milieu. Cette perturbation est d'autant plus importante que le polymère est pseudo-plastique. L'analyse des propriétés d'une solution de ce polysaccharide a montré le comportement pseudo-plastique de ce polymère qui consiste en une diminution de la viscosité lors de l'augmentation de la vitesse de cisaillement. Elle a également mis en évidence des propriétés d'épaississant alimentaire ( figures 5 et 6 ) .

Ce comportement s'est révélé être différent de celui du Xanthane, polysaccharide microbien utilisé dans l'industrie.

Nous avons donc essayé de mieux comprendre la relation entre la structure et la conformation de ce polysaccharide de spiruline pour une éventuelle application industrielle .

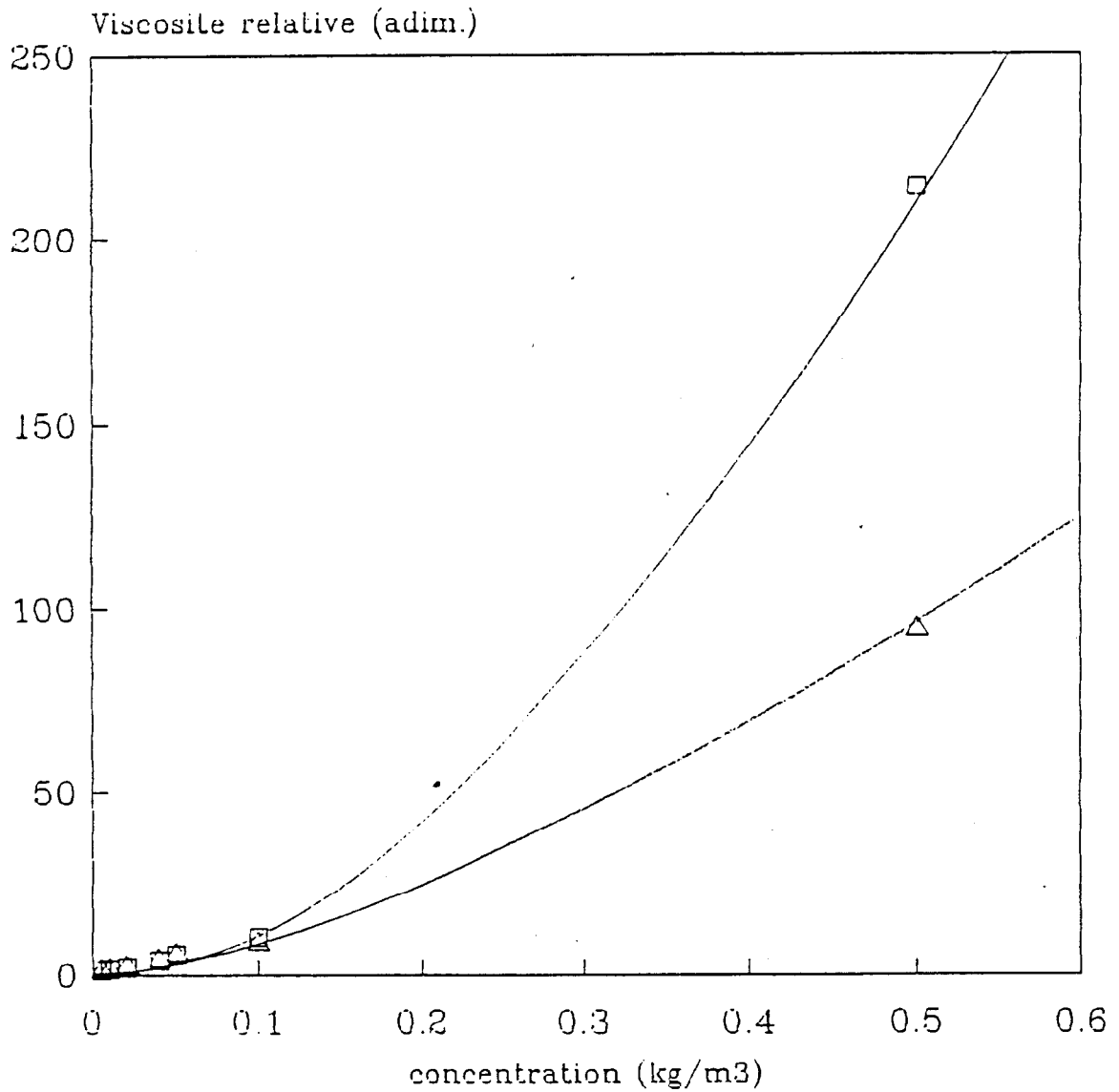


courbe de croissance de Spirulines  
en batch et production d'EPS



x biomasse. EPS : exopolyside

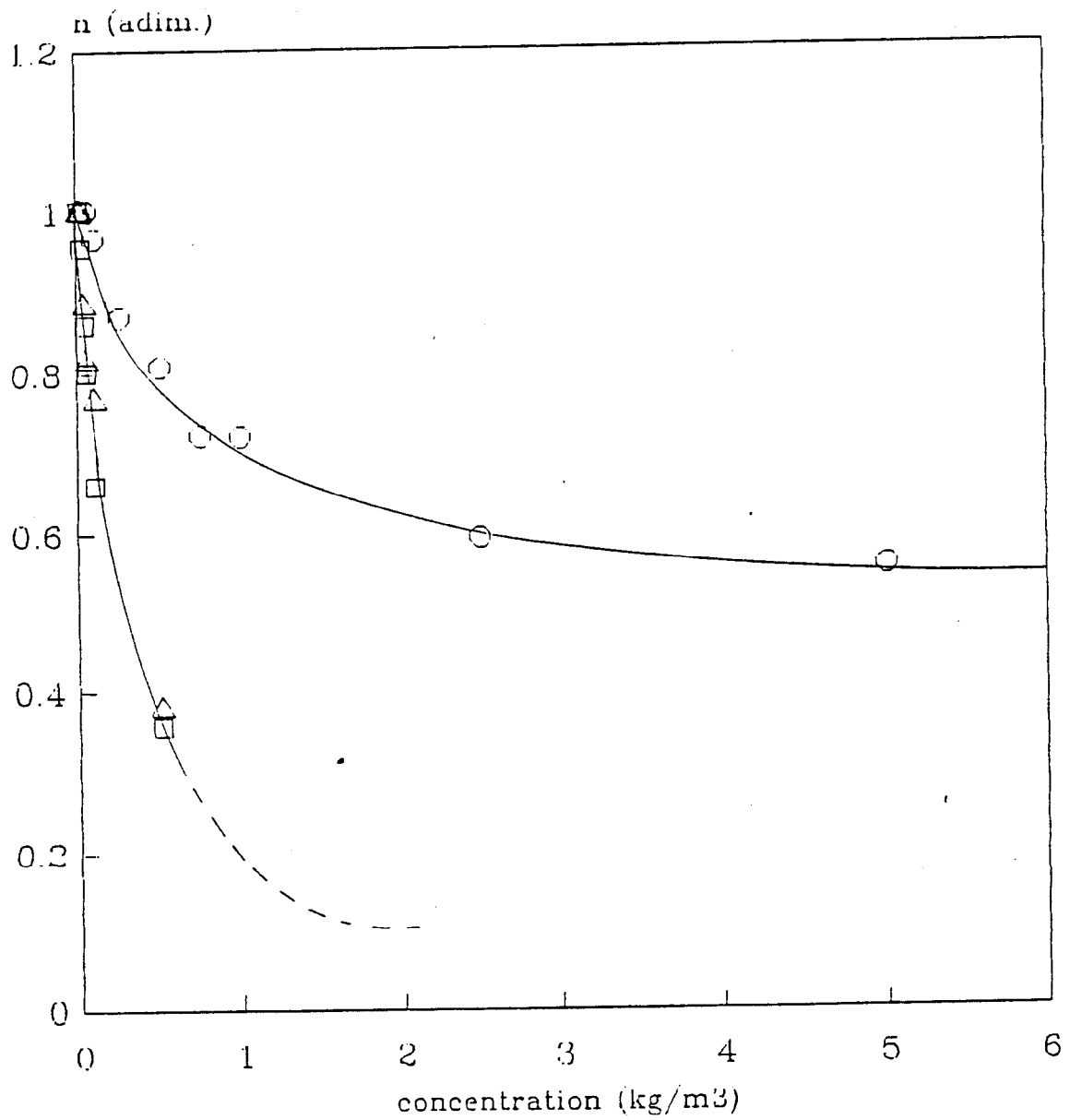
Viscosite relative ( $\dot{\gamma} = 1s^{-1}$ ) en fonction  
de la concentration en polysaccharide.



□ NaCl 0.1M      △ Milieu ZARROUK

Viscosite du solvant :  
Milieu de ZARROUK : 8.7 E-4 Pl  
NaCl 0.1 M : 8.4 E-4 Pl

Indice de pseudoplasticite en fonction  
de la concentration en polysaccharide.



○ EAU      □ NaCl 0.1M      △ Milieu ZARROUK

Modele HERSHEL-BULKLEY

## **RESULTATS**

## 1. PRODUCTION DU POLYMERE

La technique d'isolement et de purification du polysaccharide de *Spirulina platensis* est fonctionnelle. Le stage a permis de préciser la phase de purification.

## 2. COMPOSITION QUALITATIVE DU POLYMERE NATIF

### 2.1. Composition en oses

Les différents échantillons analysés sont composés des mêmes sucres :

- \* des sucres neutres : Xylose, Rhamnose, Fucose, Galactose, Mannose, Glucose.
- \* des acides uroniques : acide glucuronique, acide galacturonique.
- \* de deux oses non identifiés.

Les proportions varient en fonction des échantillons. Nous avons rassemblé les différents rapports molaires dans le tableau suivant :

	Xyl	Rha	Fuc	Gal	Man	Glc (référence)
1	1,3	0,3	0,7	2,7	+	2
2	1,3	0,3	0,6	2,0	+	2
3	1,2	0,5	0,7	0,9	+	2
4	6,1	0,3	1,0	1,7	0,4	2

La technique utilisée ne permet pas de doser de manière quantitative les acides uroniques.

Toutefois on observe que :

- \* la proportion de galactose évolue au cours du vieillissement de la culture.
- \* la variation de force ionique agit aussi sur la composition du polymère.
- \* la carence en phosphore apporte la variation la plus spectaculaire avec une proportion de Xylose multipliée par cinq.

## 2.2. RECHERCHE DES SUBSTITUANTS

La méthode par C.P.G. n'a pas donné les résultats escomptés. La méthode par C.L.H.P. a permis de confirmer la composition en sucres des échantillons mais n'a pas mis en évidence la présence de substituants sur les différents échantillons. Un exemple est proposé figure 8.

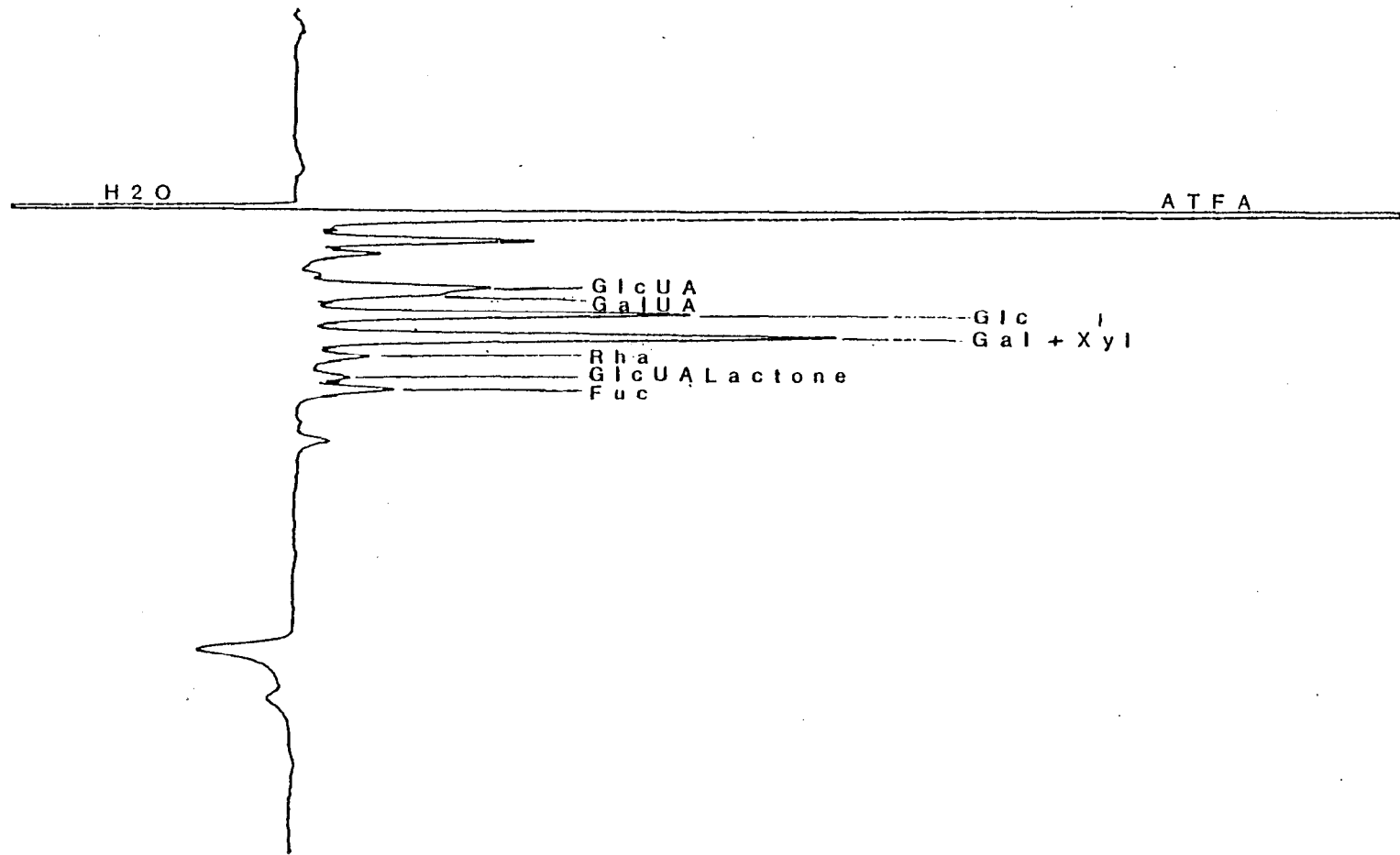


Fig. 8.

### 3. FRACTIONNEMENT DU POLYMERE

La proportion d'acides uroniques dans le polymère ainsi que la contamination de la fraction native par des pigments chlorophylliens et les protéines associées, nous ont incité à utiliser une résine échangeuse d'anions (D.E.A.E.) pour effectuer la purification de l'échantillon de départ.

#### 3.1 CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR COLONNE DE GEL DE D.E.A.E. TRISACRYL

Durant ce stage nous avons utilisé deux méthodes pour fractionner l'exopolysaccharide de spirulina platensis.

La première méthode en continu nous a permis d'obtenir sept fractions contenant du sucre.

NaCl ( mM )	Fraction	Masse (mg)
150	C1	297
200	C2	186
250	C3	14
350	C4	362
400	C5	59
500	C6	315
1M	C7	395

Cette technique est peu adaptée à la purification de ce polysaccharide pour les raisons suivantes :

- Le diamètre et la hauteur ne sont pas adaptés au passage de produits très visqueux. Les perturbations liées à cette viscosité nous ont obligé à "touiller" la colonne dès l'utilisation de NaCl 200 mM.

- Le débit d'élution de 25 ml/h ne semble pas convenir: on obtient des concentrations localement fortes en polymère. Ce dernier est récupéré précipité en sortie de colonne.

- La durée de cette purification n'est pas adaptée: elle a pris 31 jours. Pour mettre au point une technique "en continu" qui convienne, il faudra opter pour un diamètre de colonne très grand en regard de la hauteur du gel et pour un débit d'éluant plus important en sortie de colonne.



La deuxième méthode "en batch" nous a permis d'obtenir quatre fractions contenant du sucre.

NaCl (mM)	Fraction	Masse (mg)
150	B1	500
200	B2	480
250	B3	300
350	B4	90

Cette technique est très rapide à mettre en oeuvre car l'élution des différentes fractions ne demande qu'une journée. Elle semble un peu moins sensible car nous n'obtenons que quatre fractions.

Lorsque l'on concentre une fraction comme par exemple la 500 mM qui est à la limite de la sensibilité de la technique de dosage utilisée, et que l'on dose le sucre, on observe une légère coloration montrant la présence de sucre.

Après passage sur D.E.A.E., on observe visuellement une modification de la viscosité du polysaccharide. Celle-ci peut être liée à la séparation des copolymères de l'exopolysaccharide et à la rétention par la colonne de protéines ou de fractions minoritaires du polyside participant à la rhéologie du polymère.

### 3.2 CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL 2B

Cette technique sert à vérifier l'homogénéité des fractions obtenues. Nous chargeons la colonne avec 20 mg de produit dans 5 ml de tampon acétate.

Nous nous attendons à obtenir une fraction unique qui s'élue avec le volume mort de la colonne.

Pour la fraction 150 mM (rendement : 80%), on observe deux pics sur le diagramme d'élution la fraction majoritaire exclue du gel et une fraction incluse qui représente 25%, en masse, de la quantité chargée (figure 9).

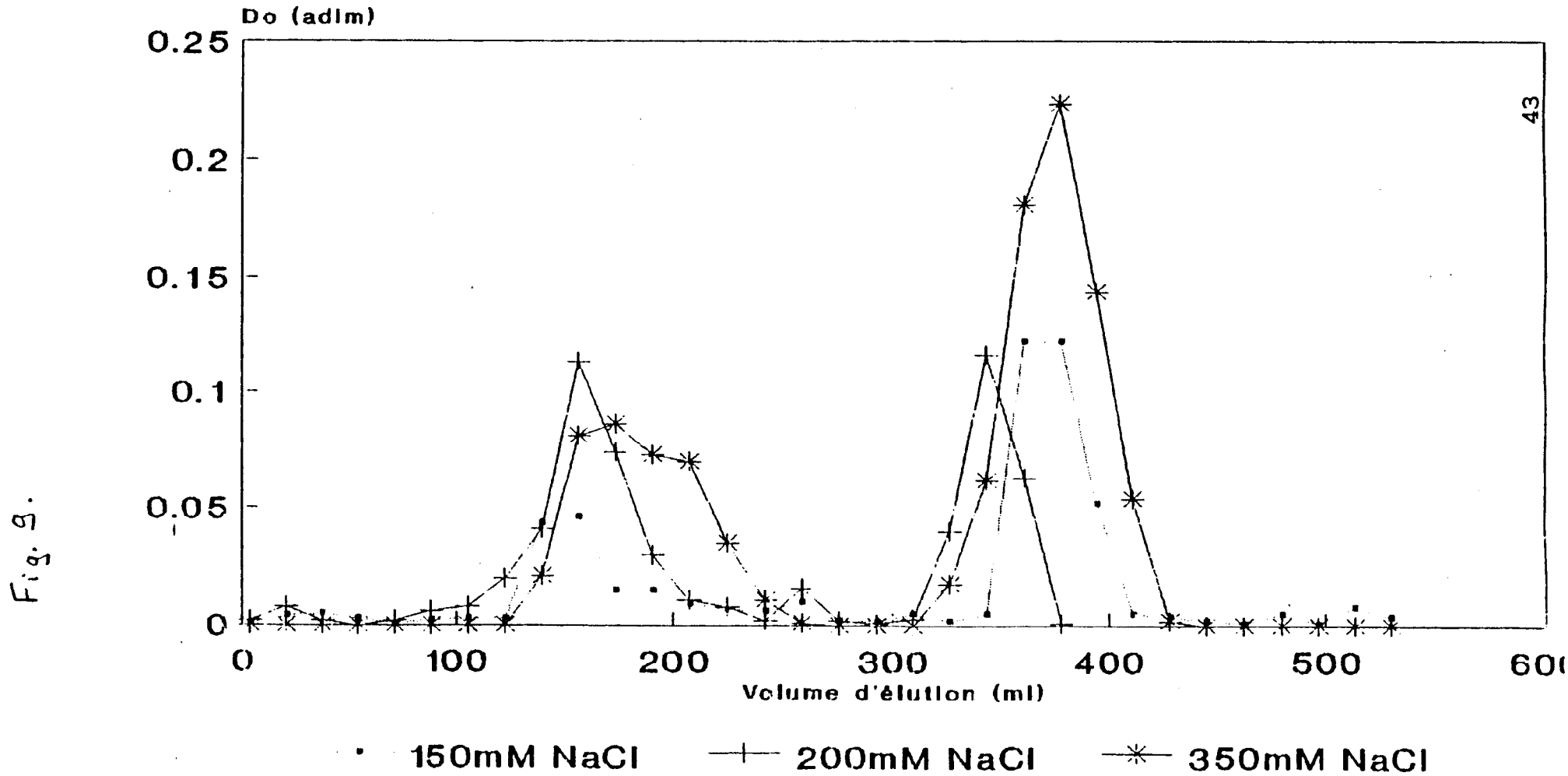
Cette observation se répète avec les autres fractions étudiées. Il semble que le polysaccharide soit modifié par les traitements préalables : la lyophilisation (fragilisation due à l'élimination de l'eau liée de la macromolécule), la résolubilisation avant passage sur Sépharose CL2B (agitation au barreau magnétique 15 h, chauffage à 100 C/10 mn).

Pour éviter ce problème lors du traitement "en batch" nous n'avons pas lyophilisé le polysaccharide.

Dans les mêmes conditions d'élution nous n'avons pas observé de coloration lors de la détection au phénol sulfurique.

Nous avons retrouvé le polysaccharide au sommet de la colonne. Il n'est pas tamisable par le gel de Sépharose dans les conditions choisies. L'utilisation d'acétate comme éluant peut expliquer ce phénomène. Il précipite la fraction de polysaccharide natif, contrairement à la fraction dénaturée par la lyophilisation où l'aspect dissociant domine.

# Profil d'élution des fractions d'EPS de Spirulines sur Sépharose CL2B



Repérage au phénol sulfurique

### 3.3 DOSAGE DES SULFATES PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE A HAUT PH

Nous avons dosé sur les fractions issues de la purification "en batch" sur D.E.A.E. trisacryl le pourcentage pondéral en sulfate. En fonction de la réponse donnée par l'intégrateur, il est possible grâce à la droite étalon réalisée, d'obtenir la quantité de sulfate libérée par le polysaccharide.

Nous avons transformé les valeurs obtenues en multipliant les valeurs par 0,465 (masse de HSO<sub>3</sub> / masse de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ces résultats en terme de HSO<sub>3</sub> correspondent à la forme moléculaire courante du sulfonate lié aux polysaccharides.

Ces valeurs vont dans le même sens que le dosage centésimal de la formule brute du polysaccharide. Elles confirment la présence d'équivalent sulfate sur le polysaccharide.

On observe différents taux de substitution de sulfates sur ces fractions. Toutefois il n'y a pas de corrélation directe entre ces taux et la force ionique utilisée pour éluer les fractions contrairement au cas de l'Agar-Agar.

Dans le cas de ce polysaccharide, la présence d'acides uroniques et d'acides organiques en modulent l'effet.

---

Fraction (mM)	Quantité d'acide sulfonique (%)
NaCl 150 mM	0,88
NaCl 200 mM	0,69
NaCl 250 mM	1,33
NaCl 350 mM	1,30

---

Taux de substitution des acides sulfoniques dans les différentes fractions éluées sur le D.E.A.E. Sephacryl "en batch".

### 3.4. COMPOSITION EN SUCRES DES DIFFERENTES FRACTIONS DU POLYMERE

	Xyl	Rha	Fuc	Gal	Man	Glc (référence)
B1	8,8	0,3	1,8	1,4	0,7	2
B2	9,2	0,3	1,2	1,5	0,2	2
B3	3,5	0,3	0,5	1,6	0,2	2
B4	2,9	0,4	0,5	2,2	0,5	2

	Xyl	Rha	Fuc	Gal	Man	Glc (référence)
C1	105	24	+	6,4	2,0	2
C2	2,1	0,7	0,2	1,1	1,1	2
C3	6,5	/	+	0,2	0,3	2
C4	10	+	+	1,5	0,2	2
C5	4	+	0,4	0,7	0,1	2
C6	0,6	+	+	0,5	0,1	2

Le manque d'homogénéité entre les compositions de ces deux tableaux ne permet pas d'interpréter ces résultats. Les éléments obtenus lors des différentes C.P.G. permettent de confirmer, sur des échantillons purifiés, la présence des dix types de monosaccharides précédemment décrits. On les retrouve dans chaque fraction dans des proportions différentes. Il n'y a pas de contaminants peptidoglycanniques.

#### 4. ANALYSE STRUCTURALE DU POLYOSIDE

##### 4.1 HYDROLYSE MENAGEE DU POLYMERE

La cinétique d'hydrolyse met en évidence six bandes. Les deux plus hautes correspondent aux monosaccharides -hexose et pentose-. Les deux suivantes aux disaccharides aldobiouroniques -hexose et pentose- et les suivantes à des trisaccharides( 2 acides uroniques, 1 ose neutre -hexose et pentose-).

Pour les études structurales, le temps optimal de production d'oligosaccharides est obtenu par l'action de l'acide pendant 3 h 30 mn sur le polysaccharide. Les fractions obtenues sur de plus grandes quantités de polysaccharide pourront être analysées par C.L.H.P. sur colonne pelliculaire d'échange d'anions à haut pH et détection ampérométrique pulsée.

##### 4.2 METHYLATION

Après hydrolyse, acétylation et méthanolyse, nous avons séparés les éthers méthyliques par C.P.G. de la fraction 150 mM. Cette expérience a permis de mettre en évidence les composés suivants :

- \_ P.M. Xyl
- \_ P.M. Fuc
- \_ P.M. Gal
- \_ 2,3,6 Glc
- \_ 2,4,6 Gal

Le 2,3,6 Glc met en évidence une liaison 1-4 dans l'enchaînement du polysaccharide.

Les oses perméthylées sont situées sur des chaînes latérales. Comme pour les compositions globales, on voit apparaître des pics non identifiables correspondant à des sucres peu courants.

La technique que nous avons utilisé n'est pas tout à fait adaptée à notre polysaccharide qui a du mal à se solubiliser dans le D.M.S.O.. De plus, sur les fractions 250 et 350 mM, nous n'avons pu récupérer une quantité suffisante de matière après passage sur LH20 pour effectuer des analyses.

Nous ne pouvons donc obtenir que des résultats partiels. Pour des résultats plus fiables et donc plus exploitables, il sera nécessaire de refaire une méthylation après avoir peracétylé le polysaccharide de manière à faciliter sa solubilisation dans le D.M.S.O..

## CONCLUSION

Les conclusions générales que nous pouvons dégager de ces travaux sont les suivantes :

- A partir d'une culture de Spirulines nous avons isolé un exopolysaccharide. Ceci est confirmé par l'absence de sucres aminés -présents dans la paroi bactérienne- et par une composition différente de celle de la paroi de *Spirulina platensis* ( ). La technique d'extraction mise au point est reproductible. Nous avons précisé les conditions de purification de ce polysaccharide par chromatographie sur un échangeur d'anions.

- L'analyse chimique fait ressortir un point commun à toutes les fractions : une grande complexité. Chaque fraction est composée de dix sucres différents : xylose, rhamnose, fucose, mannose, galactose, glucose, acide galacturonique, acide glucuronique et deux sucres non identifiés. Les hétéropolysaccharides connus chez les procaryotes en contiennent généralement de deux à huit. Il est probable que chacune des fractions isolées soit composée de plusieurs polymères différents. Ceci est bien mis en évidence lors de la carence en phosphore et l'augmentation du xylose dans toutes les fractions étudiées.

- La présence d'oses non identifiés montre qu'il y a probablement l'un de ces sucres qui est o-méthylé, ce constituant étant spécifique des exopolysaccharides de procaryotes photosynthétiques.

- La présence de dérivés sulfatés est un caractère unique parmi les exopolysaccharides procaryotes. Il était considéré comme caractéristique des polyosides algaux.

- Une proportion élevée d'acides uroniques (30 à 40% en poids) ajoutée aux sulfates confèrent aux exopolysaccharides un fort caractère anionique.

- Durant ce stage nous avons seulement abordé l'étude de la structure de ces polyosides. En effet, nous avons utilisé des techniques classiques que nous avons dû adapter à ce polymère peu connu. C'est volontairement que nous n'avons pas étudié les composants lipidiques et protéiques qui pourraient être des co polymères.



## TOXICITY TESTS OF *NITROSOMONAS-NITROBACTER* EFFLUENTS ON *SPIRULINA*

---

A *Nitrosomonas - Nitrobacter* coculture were divided into two samples:

- sample 1 was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filters
- sample 2 was sterilized by heat for 30 min at 140°C.

Starting from an initial culture of *Spirulina*, toxicity tests were performed as follow:

- the control consisted in one volume of initial culture of *Spirulina*, diluted with the same volume of fresh *Spirulina* culture medium (Zarrouk),
- Two erlenmeyers containing the initial culture of *Spirulina* were diluted in the same proportion with sample 1, that corresponds to the filtered *Nitrosomonas - Nitrobacter* coculture,
- two others erlenmeyers containing the initial culture of *Spirulina* were diluted in the same proportion with sample 2 that corresponds to the heated *Nitrosomonas - Nitrobacter* coculture.

Such different cultures of *Spirulina* were allowed to grow for 13 days at 35°C, under a light intensity of 5 w/m<sup>2</sup> and in the presence of 2% CO<sub>2</sub>. Growth was turbidimetrically followed by measuring OD750nm on samples of each culture. Numerical results (OD750), corrected from the turbidity of the used effluents of *Nitrosomonas - Nitrobacter* cocultures, and the corresponding amount of biomass (in g/l) are presented in the following table.

Time (h)	Control		Filtered 1		Filtered 2		Heated 1		Heated 2	
	OD	g/l	OD	g/l	OD	g/l	OD	g/l	OD	g/l
0	.025	.035	.03	.035	.03	.035	.035	.035	.035	.035
42	.075	.096	.077	.095	.075	.096	.093	.11	.09	.105
141	.425	.54	.21	.266	.45	.573	.325	.406	.33	.412
187	.57	.73	.28	.355	.59	.745	.40	.502	.42	.53
242	.775	.99	-	-	.75	.96	.58	.732	.53	.65
305	1.04	1.3	.6	.77	.9	1.15	.7	.89	.67	.85

The "Filtered 1" culture appeared to be contaminated and therefore does not provide significant results.

By comparison with the control, growth of *Spirulina* did not appear to be significantly disturbed by the filtered culture medium of the used *Nitrosomonas* - *Nitrobacter* coculture. However, the heat sterilized coculture appeared to reduce by approx. 1/3 the growth rate of *Spirulina*, a result that could be related to the observation that organic matter impairs growth of *Spirulina*. Moreover, in both cases, no effects on the morphology, the chlorophyll or the phycocyanin content of the algae were observable.

In conclusion, if filtered, effluents of *Nitrosomonas* - *Nitrobacter* cocultures are not toxic to *Spirulina* and do not exert significant effect on their physiology.