
PRECODD - Programme ECOTEchnologies et Développement Durable



Programme ECOPLUIES

Techniques alternatives de traitement des eaux pluviales et de leurs sous-produits : vers la maîtrise du fonctionnement des ouvrages d'infiltration urbains

Projet ANR-05-ECOT-006

Délivrable D-A8

Isolement de souches microbiennes
potentiellement utilisables pour des bio-industries
(étape 2)

Responsables du rendu :

Jean-philippe Bedell, Cecile Delolme, ENTPE L.S.E

Juin 2008

Introduction

La zone superficielle des bassins d'infiltration subit au cours de son vieillissement de nombreux processus, comme des apports discontinus d'eaux, de polluants et de MES. Ces apports intermittents liés aux pluies se traduisent par divers phénomènes physico-chimiques (filtration, adsorption...) et biologiques (développement microbien...) rendant l'interface de l'ouvrage très évolutive dans le temps et très hétérogène dans l'espace. Le premier objectif de la tâche A2 de ce programme est l'étude de l'évolution de l'interface, de sa fonction de filtre et des phénomènes de colmatage qui peuvent s'y développer, ainsi que la caractérisation physique, chimique et biologique de l'évolution de cette interface. Pour cela suite aux dénombrements des bactéries présentes, des isolations ont été entreprises. Dans cette deuxième partie, nous présentons le travail d'identification phylogénique des souches isolées et présentées dans la première partie. Ces souches étant isolées sur un milieu très anthropisé et donc riche en divers polluants, les isolats obtenus peuvent donc potentiellement représenter un intérêt pour des biotraitements ou pour des approches en lien avec l'utilisation de souches résistantes à de tels polluants.

Matériels et méthodes

1) Description du site

Le bassin d'infiltration de Chassieu recueille les eaux pluviales d'un bassin versant de 185ha (coefficient d'écoulement de 70 à 75%) se composant d'un secteur industriel stabilisé avec des bâtiments industriels (traitement de surface, usines de transformation de produits alimentaires, ateliers de véhicules, travaux d'impression, etc.), des parkings et des emplacements industriels hors d'usage. Le bassin a une capacité de 61.000 m³ et est relié à un bassin de décantation primaire de 32.000 m³. Le plancher du bassin est constitué par un sol fortement perméable de type fluvio-glaciaire.

2) Stratégie d'échantillonnage

Des échantillons ont été collectés au niveau d'un horizon de surface (EA, 0-5 centimètres), comprenant les sédiments déposés sur le plancher du bassin d'infiltration. Le prélèvement a été effectué à diverses occasions (septembre et novembre), avec des temps de prélèvement déterminés par les événements extérieurs d'accessibilité et/ou de pluie. À chacune de ces occasions, un échantillon représentatif de chaque horizon a été constitué en mélangeant et en homogénéisant des sous-échantillons provenant d'au moins 20 points différents de la surface du bassin. Chacun de ces échantillons représentatifs a été alors divisé en deux sous-échantillons : un a été employé pour des analyses physico-chimiques; l'autre a été stocké à 4°C pour des investigations microbiennes.

3) Caractérisation bactérienne

Dans la première partie, des souches avaient été isolées. Dans ce rapport la caractérisation et l'identification de ces souches et de l'ensemble du profil bactérien SSCP est présenté.

Séquençage

Pour établir les phylotypes des souches bactériennes isolées, l'ADN 16S de chaque souche a été amplifié en utilisant les amorces 16Sc et 16Sd [2]. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisée avec les différentes étapes suivantes (3 min de dénaturation initiale à 94 °C, suivie par 30 cycles de 1 min à 94 °C, de 2 min à 50 °C, de 2 min à 72 °C, puis une prolongation finale de 10 min à 72 °C) sur un thermocycleur PE 2400 (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Les produits de PCR ont été purifiés au moyen du kit de purification QiaQuick PCR (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Le séquençage a été effectué à l'aide du kit « ABI PRISM Dye Terminator » cycle de réaction de séquençage (Perkin-Elmer). Il a été effectué sur l'extrémité 5' des deux brins dans un volume final de 20 µl (QSP à eau ultra-pure) contenant 35 ng d'ADN purifié et 2 µM de primer. De l'eau ultra-pure est utilisée pour toutes les expériences. Les réactions de séquençage ont été réalisées avec 25 cycles de 30 sec à 96 °C, 30 sec à 50 °C et 4 min à 60 °C. L'excédent d'amorce du kit est enlevé par des colonne de purification. Les produits de séquençage sont séparés par une électrophorèse de 3 heures avec une ABI PRISM 3100 séquenceur d'ADN (Perkin-Elmer) dans un gel à 5% (Long Ranger gel, FMC). Les réactions de séquençage ont été corrigées au moyen de SeqScape 2. Les phylotypes ont été obtenu selon la base de données BLAST [1] et Ribosomal DATABASE [7].

« Molecular fingerprints » (empreintes moléculaires)

L'ADN a été extrait d'un échantillon de 250 mg de chaque sédiments en utilisant un kit d'extraction des sols TM Kit (MO Bio Laboratoire, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) et en suivant les instructions du fabricant. Trois extractions indépendantes ont été effectuées sur chacun des échantillons.

L'intégrité de l'ADN extrait a été vérifié par électrophorèse sur un gel à 2% d'agarose dans TBE 1X (89 mM Tris base, borate de 89 mM, 2 mM EDTA). Les concentrations d'ADN ont été estimés par fluorimétrie en utilisant le kit PicoGreen [®] quantification d'ADN (Invitrogen SARL, Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), ou en comparant l'intensité de fluorescence des ADNs obtenus sur le gel d'agarose à celle de l'ADN des marqueurs de poids moléculaire XIII (Roche Molecular Biochimiques, Penzberg, Allemagne). La région V3 de l'ADNr 16S correspondant à un fragment de 205 bp dans E. coli a été utilisé comme un marqueur de la diversité (voir Baker et al. [4]. La PCR a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Zinger et al. [23]. En bref, le mix de la PCR contient 0,26 µ M de l'amorce W49 F (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' ») [8] ou de l'amorce W104 (5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3») [24], plus 0,05 mM de tous les quatre dNTP, 0,5 U d'Isis TM ADN polymérase (MP Biomedicals, Qbiogene Inc, Illkirch, France) et 1 µl de l'ADN obtenu des sédiments (0,02 à 0,2 ng d'ADN / µl de mix PCR) dans un volume final de 25 µl. l'eau ultra-pure a été utilisé pour toutes les expériences. La réaction de PCR est la suivante : une première dénaturation à 94 °C

pendant 2 min suivie par 30 cycles de 15 secondes à 94 °C, de 15 sec à 56 °C, de 15 sec à 72 °C et une dernière prolongation de 7 min à 72 °C. Les produits PCR sont visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%. Le contrôle (sans addition d'ADN) n'a pas montré d'ADN amplifié. Les produits de PCR ont été purifiés au moyen du kit « Qiaquick PCR purification » (Qiagen, Courtaboeuf, France) et selon les recommandations du fabricant.

Méthode d'analyse CE-SSCP :

L'électrophorèse capillaire simple brin du polymorphisme de conformation (CE-SSCP) a été effectué tel que décrit par Zinger et al. [23]. A 1 µl du produit de la PCR-SSCP a été mélangé 10 µl de formamide Salut Di-(Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et 0,2 µl du standard interne marqueur de poids moléculaire d'ADN Genescan-400HD ROX (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les échantillons ont été dénaturé à 90 °C pendant 2 min et immédiatement refroidi dans la glace. La CE-SSCP a été effectuée sur un ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) à l'aide d'un capillaire de 36 cm de long. Le polymère non-dénaturant est composé de 5% du GenScan polymère, de 10% de glycérol et du tampon 3200 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le tampon de « Running » est composée de 10% de glycérol et du tampon 3200. Le temps d'injection et la tension ont été fixé à 22 sec et 1 kV. L'électrophorèse a été réalisée à 32 °C avec une durée de 25 minutes.

L'analyse des données de la SSCP

Les pics des profils de la SSCP ont été détectés avec GeneMapper™ Software Version 3.7 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), en utilisant Genescan-400HD ROX comme standard de taille afin de définir une taille apparente pour chaque pic. Ainsi, l'emplacement des pics est exprimée arbitrairement en nombre de paires de bases apparentes (pb). Pour la comparaison statistique des profils SSCP, la liste des pics détectés par GeneMapper™ et leurs aires ont été analysées. Étant donné que les fichiers de données (pic +aire) n'a pas suivi une loi normale, nous avons utilisé le coefficient (S) de la corrélation de Spearman pour comparer les profils SSCP. La variable d'intérêt a été $\pi_i = n_i/N$ [aire du pic / aire totale]. Le niveaux d'intensité de fluorescence des profils SSCP ont été comparés en appliquant le test de Kruskal-Wallis (KW) pour les données récupérées à partir de GeneMapper™. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Minitab® 13,31 (Minitab Ltd, Paris, France) avec un intervalle de confiance de 95%. L'indice de diversité de Shannon (H') a été calculé comme suit : $\sum (\pi_i \ln \pi_i)$.

Résistance au Zn	Couche	Forme	Gram	Date	Souche	Séquence proche (% identité)	pic SSCP (pb)	Classe
Non	EA	Bacillus	-	Novembr	A14	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (99)	184.32	Alphaproteobacteria
Non	EB	Bacillus	+	Novembre	A17	<i>Arthrobacter</i> sp. (100)	190.1	Actinobacteria
Non	EA	Coccus	+	Septembre	A3	<i>Rhodococcus</i> sp. (99)	191.69	Actinobacteria
Non	EA	Coccus	+	Avril	A5	<i>Rhodococcus</i> sp. (99)	191.69	Actinobacteria
Non	EA	?	+	Avril	A2	<i>Rhodococcus fascians</i> (99)	191.69	Actinobacteria
Non	EB	Coccus	+	Novembre	A18	<i>Micrococcus luteus</i> (97)	205.37	Actinobacteria
Non	EA	Bacillus	-	Novembre	A15	<i>Haloanella gallinarum</i> (94)	214.95	Flavobacteria
Oui	EB	Coccus	+	Septembre	B9	<i>Rhodococcus</i> sp. (99)	191.69	Actinobacteria
Oui	EA	Bacillus	-	Septembre	B12	<i>Acinetobacter</i> sp. (96)	186/210.79	Gammaproteobacteria

Tableau 1 : Identification des souches isolées des sédiments du bassin d'infiltration et localisation sur le profil SSCP.

(1 déterminé à partir de la base de donnée « Ribosomal Database project II »).

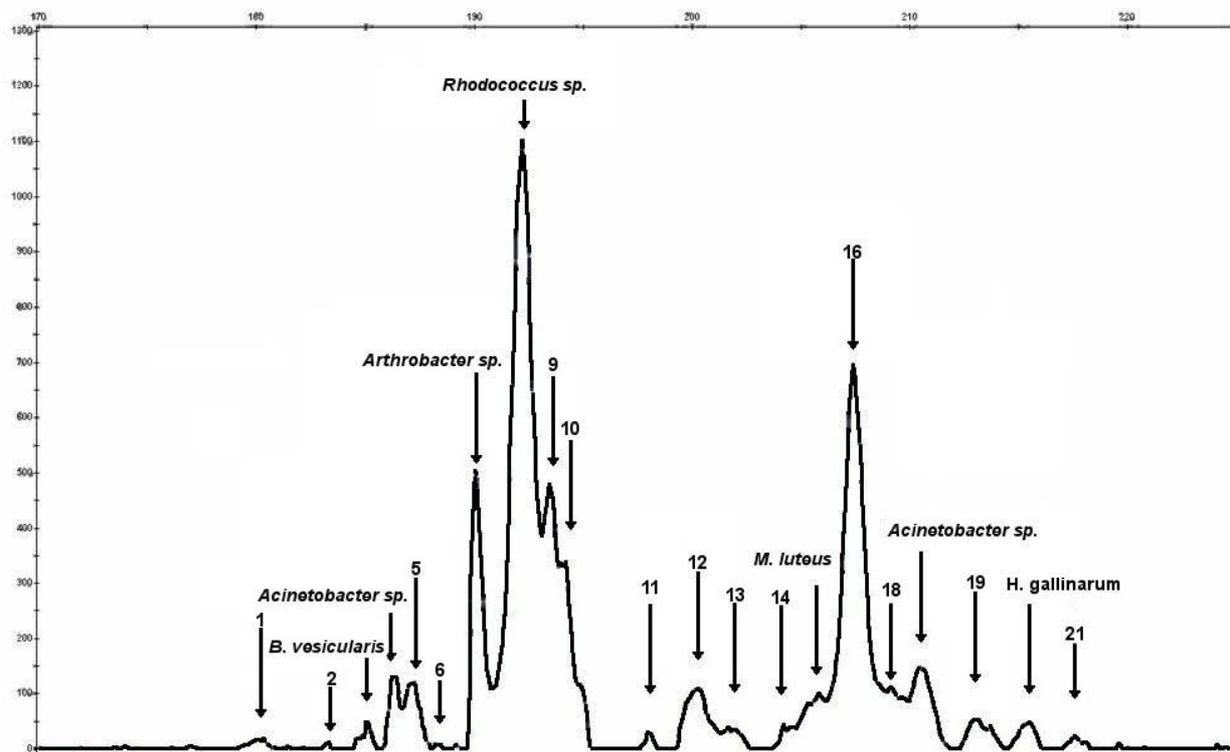


Figure 1: Profil SSCP des échantillons EA (les souches identifiées par un pic sont indiquées par leur nom ou par un numéro). L'axe des X correspond à la mobilité des pics [poids moléculaire (nombre de paire de base apparente)], L'axe des Y correspond à l'intensité relative en fluorescence.

Caractérisation des souches cultivables

Plusieurs souches des différentes dates d'échantillonnage ont été isolées sur un milieu PCA et sur le même milieu additionné avec 7 mM Zn. Seulement deux souches (B9 et B12) ont pu être conservées avec leur résistance au Zn (Tableau 1). Nous avons caractérisé neuf souches de celles isolées (Tableau 1), y compris les deux qui étaient résistantes à l'addition de 7 mM de Zn. Rhodococcus sp. semble être bien représentée dans nos souches isolées. Pour identifier les souches bactériennes, les séquences codant pour le gène de l'ARNr 16S a été introduite à la fois dans la base de données BLAST (NCBI) et Ribosomal projet de II. Six des souches, y compris une résistante au Zn, appartenaient au groupe des actinobactéries, qui est compatible avec la capacité qu'ont ces bactéries de se développer sur des milieux riches en polluants organiques [9, 16, 17, 18, 20]. Les profils SSCP des souches ont également été obtenus. Étonnamment, Acinetobacter sp. se retrouve sur deux pics au lieu d'un seul (Figure 1). Ce résultat peut être dû à la présence de deux souches différentes ou de deux régions V3 différentes.

L'évaluation de la diversité bactérienne par SSCP.

Les méthodes de culture ne permettent d'évaluer qu'au maximum 10% du total de la diversité bactérienne [2]. Afin d'évaluer la diversité bactérienne de l'horizon EA, nous avons réalisé la signature SSCP de cette horizon [23]. L'analyse SSCP a montré, en utilisant GeneMapper®, la détection de 21 pics (Figure 1). Certains de ces pics peuvent être identifiés avec la co-migration des pics des bactéries isolées, à savoir *B. vesicularis* (pic 3), *Acinetobacter* sp. (pics 4 et 18), *Arthrobacter* sp. (pic 7), *Rhodococcus* sp. (pic 8), *M. luteus* (pic 15) et *H. gallinarum* (pic 20). Ces pics représentent 55,34% de la superficie totale. Ces résultats suggèrent que la proportion de bactéries cultivées peut être aussi élevée que 55% du total des bactéries détectées par CE-SSCP. Sur la base de l'hypothèse prudente qu'un pic correspond à une espèce, nous avons calculé un indice de Shannon de 2,17.

Discussion

King et al. [14] a montré l'intérêt de l'analyse des profils de CE-SSCP pour l'identification et la caractérisation des communautés de bactéries dans les sols. Dans leur analyse de la région V3 de l'ADNr 16S, ils ont constaté que les amorces 341-534 ont donné les meilleurs résultats pour la reconnaissance des bactéries du sol, permettant ainsi d'identifier six des douze bactéries [14]. Le protocole utilisé ici est donc robuste [23]. La méthode d'extraction utilisée (ADN PowerSoil™ kit d'extraction) permet l'obtention d'un ADN total pour l'analyse PCR, avec une bonne élimination des inhibiteurs de la réaction. De plus, les profils SSCP obtenus sont reproductibles. Le grand nombre de pics sur le profil indique la présence de nombreux phylotypes bactérienne [14, 19]. L'aire d'un pic offre une indication approximative de l'abondance relative des souches ou phylotypes représentés par ce pic. En supposant que les bactéries en culture sont les seuls constituants des pics 7 et 8, les Actinomycètes *Rhodococcus* sp. *Arthrobacter* sp. représentent jusqu'à 51% du total des bactéries détectées par la chromatographie CE-SSCP. En fait, les Actinomycètes sont connus pour être tolérant aux métaux lourds et dégrader certains polluants organiques, et ils ont été détectés dans des sites pollués [9, 16, 17, 18, 20]. Les souches de *Rhodococcus* sont aussi connus pour leur capacité à dégrader les polluants organiques [13, 15]. Une souche d'*Acinetobacter* a aussi été isolée. Cette protéobactérie a également été trouvée dans les sites pollués et elle joue un rôle dans la disponibilité de métal ou la dégradation de polluants organiques [6, 5, 21]. Bien que nous n'ayons pas effectué les dosages biochimiques correspondants, nous pouvons supposer que les deux souches sont en cause dans la dégradation de molécules organiques. En plus d'être important pour la résistance au Zn, on peut envisager qu'ils jouent aussi un rôle dans l'immobilisation des métaux lourds dans l'horizon EA. Le métal lié à la bactérie peut être libéré par des procédés mécaniques ou chimiques, ou même après la mort des cellules. Lors de l'analyse SSCP nous n'avons pas isoler ou détecter de souches *Pseudomonas* (qui devrait culminer à 219,5 paire de bases apparentes). Cela reste surprenant parce que les souches de ce genre sont très répandues dans d'autres écosystèmes terrestres. En outre, les souches des pics 9, 10, 12 et 16, qui représentent 35% du total des bactéries, n'ont pas été cultivées. Toutefois, une souche potentiellement pathogène, *M. luteus*, a été isolée, bien que l'analyse du profil SSCP ait montré que c'était une composante mineure (<3%). Ce fait est intéressant pour la gestion du site en ce qui concerne la possibilité de présence d'agents pathogènes. *M. luteus* peut également

utiliser différents types d'hydrocarbures comme source de carbone [22] c'est-à-dire qu'elle est en mesure de se développer dans ces sédiments fortement contaminés par des hydrocarbures.

Un index de biodiversité a été calculé sur la base d'une espèce par pic, bien que cette hypothèse soit certainement une sous-estimation pour trois raisons. Tout d'abord, il y a au moins trois différents *Rhodococcus* qui ont migré à la même position sur le profil SSCP. Deuxièmement, plusieurs phylotypes qui migrent à la même position sur le profil SSCP peuvent être représentée par un pic unique [19]. Étant donné que le nombre réel de phylotypes par pic reste inconnu, nous avons utilisé une hypothèse très conservatrice afin de fournir une limite inférieure pour l'indice de la biodiversité. Les valeurs de l'indice Shannon (H) ont été obtenues pour d'autres sous-sédiments de surface [10] et pour les sols. [3], qui ont donné des indices de 2.87 et 2.14, respectivement. Enfin, les variations peuvent être exprimées pour les mêmes expérimentations. Par exemple, les valeurs d'indice de diversité de Shannon ont été 1.36, 1.16 et 1.47 pour les échantillons d'une étude sur un triplicat de colonnes d'un système de traitement de drainage minier dans lequel le suivi des complexes communauté microbienne était exploité par la CE-SSCP [12]. Ici, nous avons calculé seulement une valeur et le principal problème est que le H', valeur calculée à partir de n'importe quel échantillon, sera une sous-estimation de sa juste valeur en raison de la couverture incomplète de la diversité bactérienne (pour plus de complément sur ce point, voir l'article de Hill et al. [11]).

Conclusion

La première étape a permis d'isoler plusieurs souches distinctes. Cette deuxième a permis : (i) de valider la technique par CE-SSCP pour l'identification et la caractérisation des bactéries de sédiments de bassins d'infiltration d'eaux pluviales, et (ii) d'identifier au niveau de l'espèce via la base de données Ribosomal database project II et de localiser sur le profil CE-SSCP certaines bactéries de ces sédiments. Une réflexion sur la déclaration et la propriété de ces souches est en cours.

Référence :

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
2. Amann RI, Ludwig W, Schleife KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
3. Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L (2004) Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401-412
4. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55:541-555
5. Barkay T, Miller SM, Summers AO (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 27:355-384
6. Beaulieu M, Bécaert V, Deschênes L, Villemur R (2000) Evolution of bacterial diversity during enrichment of PCP-degrading activated soils. *Microbial Ecol* 40(4):345-355

7. Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33:D294-D296
8. Duthoit F, Godon JJ, Montel MC (2003) Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:3840-3848.
9. Francisco R, Alpoim MC, Morais PV (2002) Diversity of chromium-resistant and -reducing bacteria in a chromium-contaminated activated sludge. *J Appl Microbiol* 92:837–843
10. Hedrick DB, Peacock A, Stephen E, John R, Macnaughton SJ, Bruggemann J, White DC (2000) Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J Microbiol Methods* 41(3):235-248
11. Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 43:1-11
12. Hong H, Pruden A, Rearbon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbial Methods* 69: 52-64
13. Janssen DB, Dinkla IJT, Poelarends GJ, Terpstra P (2005) Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* 7:1868–1882
14. King S, McCord BR, Riefler RG (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *J Microbiol Methods* 60:83-92
15. Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol* 16:282–290
16. Margesin R, Labbé D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl Environ Microbiol* 69:3085–3092
17. Marshal SJ, White GF (2001) Complete Denitration of Nitroglycerin by Bacteria Isolated from a Washwater Soakaway. *Appl Environ Microbiol* 67:2622–2626
18. Martinez R J, Wang Y, Raimondo MA, Coombs JM, Barkay T, Sobecky PA (2006) Horizontal gene transfer of PIB-Type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Appl Environ Microbiol* 72:3111–3118
19. Mohr KI, Tebbe CC (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ Microbiol* 8:258-272
20. Roane TM, Pepper IL (2000) Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microb Ecol* 38:358–364
21. Singh P, Suri CR, Cameotra SS (2004) Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Biochem Bioph Res Co* 317:697–670
- 22 Toledo FT, Calvo C, Rodelas B, González-López J (2006) Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and applied microbiology* 29:244-252
23. Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (2007) Improvements of PCR and CE-SSCP methods in microbial ecology: towards high-throughput method for microbial diversity studies in soils. *Microb. Ecol.* 54:203-216..
24. Zumstein E, Moletta R, Godon JJ (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* 2:69-78