

---

**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-A7**

Isolément de souches microbiennes  
potentiellement utilisables pour des bio-industries (étape 1)

Responsable du rendu :  
Bedell-Delolme (Part. 1 – INSA VALOR - ENTPE L.S.E.)

13/03/2007

## 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 qu'à caractériser physiquement, chimiquement et biologiquement l'évolution de cette interface. Pour cela lors des campagnes de caractérisation de cette interface, et suite aux dénombrements des bactéries présentes, des isolaments ont été entrepris. Dans cette première partie, nous présentons le travail de collecte et d'isolement des souches entrepris avec une attention particulière vis à vis d'une possible résistance aux métaux notamment le zinc très présent dans cette interface. Ces souches étant isolées sur un milieu très anthropisé et donc riches 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 l'eau 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 m<sup>3</sup> et est relié à un bassin primaire de 32.000 m<sup>3</sup>. Le plancher du bassin est constitué par un sol fortement perméable et 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, et un horizon sous-jacent (EB, 5-20 centimètres), comprenant le sol fluvio-glaciaire (photo1). 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.

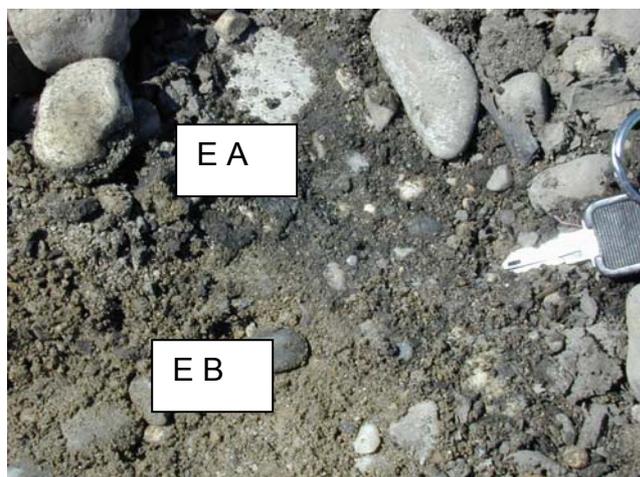


Photo 1 : Illustration des deux types d'échantillons (EA : 0-1 cm ; EB : 2-5 cm).

### 3) Caractérisation bactérienne

#### A) Dénombrement sur boîte

Dix grammes d'échantillon sec, additionnés de 50ml d'une solution saline stérile (0.8% NaCl), ont été placés dans un mélangeur stérilisé (type Waring Blender, Eberbach Corporation) et homogénéisés pendant 90 secondes. Des suspensions homogènes de sol ont été diluées en série dans la solution saline stérile, puis 100µL des dilutions appropriées ont été déposés sur des boîtes de pétri. L'amphotéricine B (Sigma) a été employé comme agent antifongique (concentration finale de 2.5 mg.L<sup>-1</sup>). Trois boîtes ont été inoculées pour chaque dilution. La numération des unités formant des colonies (CFU), qui correspondent aux bactéries hétérotrophes viables, a ensuite été effectuée par le comptage sur boîtes (contenant un milieu PCA, DIFCO) après incubation des boîtes de Pétri pendant six jours à 28°C (Ranjard et al., 1997). Le comptage a été effectué sur des boîtes contenant entre 30 et 300 CFU. Chaque résultat est exprimé comme la moyenne de trois déterminations : la variabilité entre les trois boîtes était moins de 10% pour tous échantillons. La numération des bactéries résistantes de zinc a été réalisée avec le même milieu de culture de PCA, auquel du zinc (Zn SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 7mM) a été ajouté.

## B) Isolement des souches de bactéries

Les colonies bactériennes avec des morphologies distinctes observées pendant les comptages sur boîte (résistantes au zinc comprises) ont été déposées sur de nouvelles boîtes de Pétri (au moins trois fois). Afin d'obtenir des isolats purs, des parties aliquotées de chaque isolat bactérien ont été préservées dans du glycérol de 10% (v/v) à -80°C et réemployés si nécessaire. Les analyses effectuées sur les colonies isolées ont porté sur la morphologie des cellules et des colonies, ainsi que sur des essais de coloration de Gram, et des réactions d'oxydase de cytochrome et de catalase. Les types de bactéries présentes (des coques ou des bacilles) ont été notés pendant les essais de coloration de Gram.

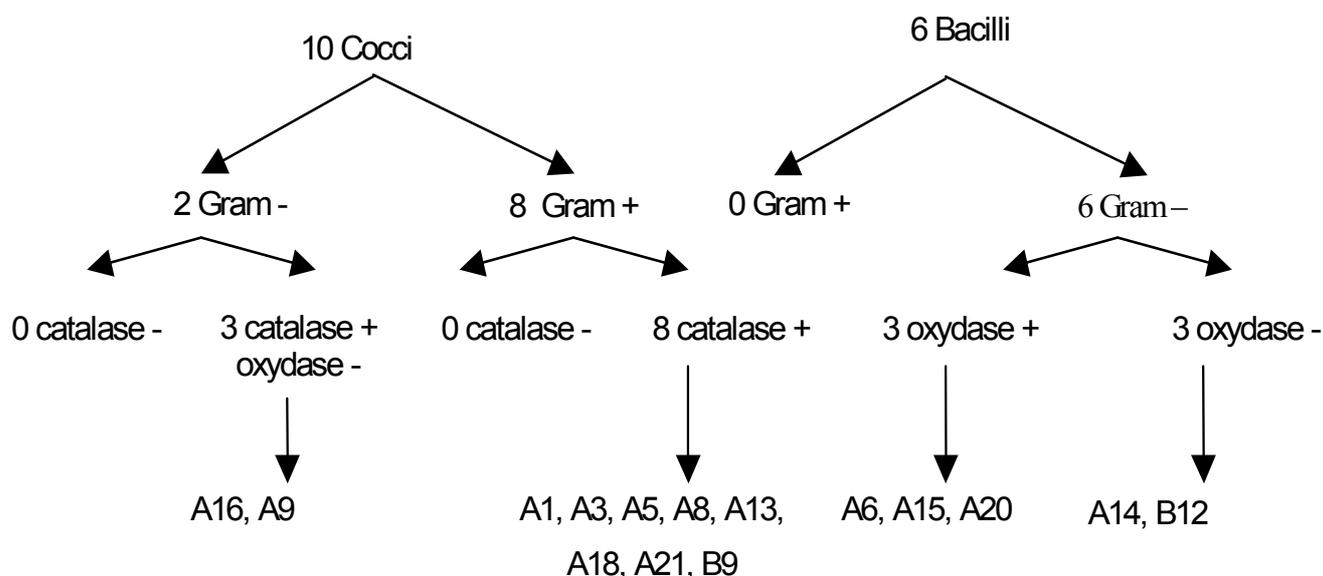


Schéma 1 : Représentation schématique des principales caractéristiques des souches isolées.

[A+numéro signifie que la souche a été isolée à partir de la culture d'un échantillon de surface, et B+numéro signifie que la souche a été isolée de la culture d'un échantillon du sol sous-jacent]

## Résultats

Des nombres plus élevés de bactéries ont été déterminés dans la couche EA, correspondant à la couche la plus contaminée, autour de  $10^9$  CFU/g DW contre autour de  $10^6$  CFU/g DW pour la couche EB.

Une trentaine de souches a été isolée à partir des boîtes contenant du PCA seul où les différents échantillons ont été déposés. Parmi ces souches seulement 14 ont pu être isolées en maintenant leur intégrité (souches non disparues et correspondant bien à une seule souche de bactéries suite aux différents repiquages (Photo 2).

Douze souches de bactéries bien distinctes ont été isolées sur des boîtes de Pétri avec un milieu de culture PCA avec 7 mM de Zn. Parmi ces douze souches, seulement deux (B9 et B12) ont maintenu leur résistance au Zn et ont pu être conservées. La résistance aux métaux est souvent codée dans les plasmides qui peuvent ne pas être stables. Par exemple, le plasmide pJP4, qui code pour la dégradation de l'acide 2,4D dichlorophénoxyacétique et pour la résistance au mercure, n'est pas stable dans des isolats *Alcaligenes* si cette contrainte est développée en l'absence de la pression sélective (DiGioavanni et al., 1996). Ainsi, la perte de plasmides pour le manque de pression sélective peut expliquer la perte de résistance au Zn dans les dix autres contraintes.



Photo 2 : Photos de quelques souches isolées (de gauche à droite, en haut : A3 ; A13 ; en bas : B9 sur milieu PCA et PCA+Zn, et A6).

La caractérisation des souches isolées par la coloration de Gram n'a indiqué aucune dominance de gram positif (8 isolats) ou de bactéries gram négatif (8 isolats) (Schéma 1). L'étude taxonomique de plusieurs souches prises dans les échantillons a conduit à l'identification des genres *Micrococcaceae*, des *Entérobactériaceae*, du *Vibrionaceae* et de *Acinetobacteriae*. La plupart des souches n'ont pas été déterminée au niveau de l'espèce, mais elles peuvent être différenciées par la morphologie, les activités et la coloration de Gram par exemple (Schéma 1).

Pour établir les phylotypes des souches bactériennes, l'ADN 16S complet de chaque isolat devra être amplifiée à l'aide des amorces 16Sc et 16Sd (Amann et al., 1995). Un essai d'amplification par une réaction en chaîne de polymérisation (PCR) a été testé comme suit : 3 minutes de dénaturation initiale à 94°C, suivies de 30 cycles de 1 minute à 94°C, de 2 minutes à 50°C, de 2 minutes à 72°C, et puis d'une prolongation finale de 10 minutes à

72°C) sur un thermocycler du PE 2400 (Perkin-Elmer, Cortaboeuf, France). Les produits de PCR ont été épurés en utilisant un kit de purification de QiaQuick PCR (Qiagen, Cortaboeuf, France) selon les instructions du fabricant.

A l'heure actuelle, l'obtention de cet ADN16S nécessaire à tout séquençage et identification ultérieure, notamment avec la base de données Ribosomal Database project II. (Cole et al., 2005), a été obtenu avec succès sur deux des 5 souches testées. Ainsi, avec les souches A3 et B9 nous avons obtenu leur ADN 16S alors que cela n'a pas été le cas pour les souches A1, A8 et B12.

## Conclusion

La première étape a permis d'isoler plusieurs souches distinctes. Des phases d'optimisation et de développement sont en cours afin de pouvoir obtenir l'ADN 16S de la majorité des souches isolées et de pouvoir ainsi les identifier au niveau de l'espèce via la base de données Ribosomal database project II. Une réflexion sur la déclaration et la propriété de ces souches est aussi en cours.

## Référence :

AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFE KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.

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.

DI GIOVANNI G D, NEILSON J W, PEPPER IL, SINCLAIR NA (1996) Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl Environ Microbiol* 62(7): 2521-2526.

RANJARD L, RICHAUME A, JOCTEUR-MONROZIER L, NAZARET S (1997) Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol Ecol* 24(4):321-331.