



HAL
open science

Screening de communautés bactériennes issues de granules aérobies épuratifs

Valérie Dossat-Letisse, Julie Foulon, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain,
Elisabeth Girbal-Neuhauser

► **To cite this version:**

Valérie Dossat-Letisse, Julie Foulon, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain, Elisabeth Girbal-Neuhauser. Screening de communautés bactériennes issues de granules aérobies épuratifs. CNRIUT 2023 Saint Pierre - La Réunion, IUT de Saint Pierre, Jun 2023, Saint Pierre (La Réunion), La Réunion. hal-04326705

HAL Id: hal-04326705

<https://hal.science/hal-04326705>

Submitted on 6 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Isolement de bactéries issues de l'épuration de l'eau
Sélection de souches productrices d'exopolymères valorisables dans l'industrie

Valérie Dossat-Létisse¹
valerie.letisse@iut-tlse3.fr

Julie Foulon¹
julie.foulon@iut-tlse3.fr

Elisabeth Neuhauser¹
elisabeth.neuhauser@iut-tlse3.fr

Claire-Emmanuelle Romain¹
claire-emmanuelle.romain@iut-tlse3.fr

¹ IUT Paul Sabatier, Université Toulouse 3
Laboratoire de Biotechnologies Alimentaires et environnementales (LBAE)
24 rue d'Embaquès
32000 AUCH

Thèmes – Biologie – Environnement

Résumé – *La gestion de la ressource en eau potable est un sujet d'actualité préoccupant. De nombreuses études portent sur l'utilisation raisonnée de cette ressource et en particulier sur le traitement des eaux usées et la potabilisation. Notre étude s'intègre dans cette problématique et s'intéresse notamment à la valorisation des sous-produits générés dans le domaine de l'épuration biologique des eaux usées. Les microorganismes vivants impliqués dans l'épuration dégradent la matière organique en formant des agrégats plus ou moins compacts, appelés boues activées, floccs ou granules. Il s'agit d'écosystèmes abritant des micro-organismes vivants enrobés dans une matrice constituée de molécules de type polymères pouvant posséder des propriétés de type gélifiant.*

Le travail de recherche présenté ici s'intéresse à un type d'agrégats issu de l'épuration : les granules. Les microorganismes provenant de cet agrégat sont capables d'adhérer sur des supports inertes (microplaques en polystyrène) en produisant des polymères. Un travail d'isolement est entrepris pour sélectionner, au sein de cette communauté microbienne extrêmement riche, une ou plusieurs souches présentant les meilleures capacités d'adhésion et produisant des polymères valorisables dans l'industrie.

Mots-Clés – *Granules aérobies, agrégats bactériens, exopolymères, adhésion*

1 Introduction

Le traitement des eaux usées est généralement réalisé par des procédés mettant en œuvre des agrégats microbiens communément appelés boues activées. Les procédés utilisant des réacteurs à biofilms granulaires, plus compacts et moins consommateurs en énergie, constituent la technologie d'avenir pour réaliser l'épuration des eaux résiduaires urbaines et des effluents industriels fortement chargés en matière organique (Pronk et al., 2015) [1]. Cette nouvelle technologie repose sur la mise en œuvre d'un réacteur biologique avec alimentation séquentielle (Sequencing Batch Reactor ou SBR) et une succession de cycles épuratoires comprenant différentes phases d'alimentation permettant la mise en place et la formation d'agrégats appelés granules.

Constitués de micro-organismes regroupés au sein d'une matrice complexe de polymères biologiques (protéines, polysaccharides) particulièrement cohésifs (Seviour et al., 2009) [2], ces granules présentent un vif intérêt pour une valorisation potentielle de la matière organique et des déchets. La caractérisation des polymères biologiques met en évidence leur potentialité et leur intérêt en tant que substituts aux polymères issus de la pétrochimie. En particulier, la valorisation des molécules ALE (Alginate-Like Exopolysaccharides), molécules aux propriétés gélifiantes similaires à celles de l'alginate, est l'une des voies ciblées dans le cadre de l'économie circulaire, encouragée par l'UE (van Leeuwen et al., 2018) [3].

Dans cette étude, des granules microbiens produits au laboratoire Toulouse Biotechnology Institute de l'INSA Toulouse (Durieux S., 2022) [4], ont fait l'objet d'une analyse approfondie. Un criblage des capacités d'adhésion sur des supports inertes a été réalisé (microplaques polystyrène). La biodiversité microbienne a ensuite été explorée afin d'isoler une ou plusieurs souches bactériennes productrices d'exopolymères d'intérêt industriel.

2 Test d'adhésion en microplaques 96 puits

Le granule G47 a été prélevé d'un procédé d'épuration de l'eau après 90 jours de fonctionnement. Des tests d'adhésion en microplaque ont été effectués et comparés selon trois conditions nutritives différentes.

Après une nuit d'incubation, la microplaque est vidée, rincée puis colorée au crystal violet. Les cellules adhérentes dans la microplaque se colorent en violet et on mesure ainsi l'intensité de l'adhésion proportionnelle à l'intensité de la coloration (figure 1) grâce à un spectrophotomètre.

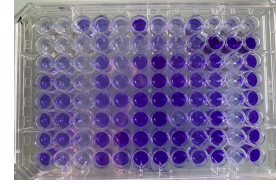


Fig 1 – Coloration de l'adhésion au Crystal violet

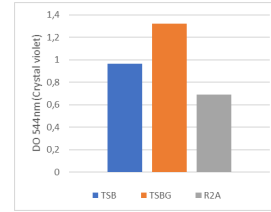


Fig 2 – Adhésion de G47

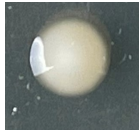

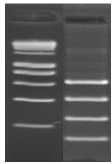
Pour chaque condition d'incubation testée correspondant à un mode d'alimentation de l'agrégat (TSB, TSBG, R2A), on mesure l'intensité de l'adhésion du granule G47. La figure 2 montre que quel que soit le mode d'alimentation, l'écosystème microbien G47 possède des capacités d'adhésion prometteuses.

3 Isolements

A partir de l'écosystème microbien G47, une série d'isolements est entrepris. L'objectif est de récupérer sous forme d'isolat pur, un maximum de souches bactériennes différentes afin de potentiellement en sélectionner une (ou plusieurs) qui sera(ont) valorisable(s) en tant qu'organismes producteurs de polymères d'intérêt.

Dans une première étape, une collection de 58 isolats a été confectionnée. Chaque isolat a été caractérisé d'un point de vue macro, microscopique et moléculaire (empreinte ADN_r16S digéré). (Tableau 1)

Tableau 1 – Caractérisation de l'isolat C4.21 isolé de G47.

Macroscopie	Microscopie	Empreinte moléculaire
		
Circulaire, convexe, bord régulier, opaque, blanchâtre, muqueuse	Coccobacilles Gram -	- Nombre de fragments : 4 - Taille : 650kb, 400kb, 300kb, 200kb

Après analyse des différents critères, un certain nombre de souches en doublons ont été éliminées et le nombre d'isolats a été restreint à 11.

4 Adhésion des isolats sélectionnés

Dans la perspective de sélectionner une ou plusieurs souches bactériennes surproductrices d'EPS d'intérêt, les capacités d'adhésion d'une part, et de production de polysaccharides extracellulaires d'autre part, ont été mesurées sur les 11 isolats.

4.1 Formation d'un biofilm

La capacité d'adhésion des 11 isolats ainsi que celle du consortium G47 et d'une souche pure témoin L17 isolée au LBAE en tant que productrice d'EPS, ont été testées en microplaques.

Après traitement au Crystal violet, l'intensité de l'adhésion a pu être quantifiée pour chaque échantillon (figure 3).

4.2 Production de polysaccharides

En parallèle, le dosage des polysaccharides extracellulaires a été réalisé pour chacun des 11 isolats, ainsi que pour G47 et L17. Cette analyse est une première étape de caractérisation de la nature des polymères produits par les isolats. Il est réalisé après rinçage de la microplaque et coloration au réactif de Schiff. Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent dextrane/puits (gamme étalon en dextrane réalisée extemporanément).

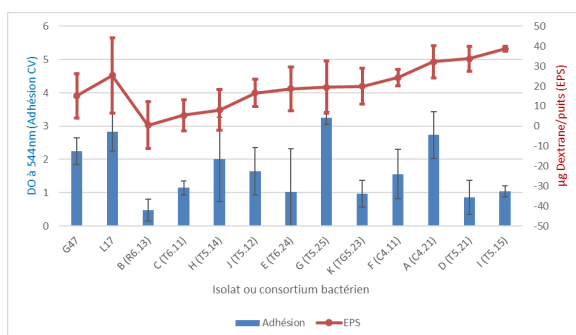


Figure 3 – Capacités d'adhésion (histogramme bleu) et de production d'exopolysaccharides (courbe rouge) des différents isolats, du G47 et du L17.

5 Discussion

La figure 3 montre que le G47 et les isolats C4.21(A) et T5.25(G) possèdent des capacités d'adhésion similaires à celles de la souche témoin L17. Par ailleurs, pour les 2 isolats pré-cités, la quantité d'exopolysaccharides (EPS) est de l'ordre de 30 et 20 μg d'eq dextrane/puits respectivement.

L'isolat T5.15(I) semble produire le plus d'EPS alors que ses capacités d'adhésion sont les plus faibles. De même, les isolats C4.11(F) et T5.21(D), peu adhérents, font partie des producteurs d'EPS les plus importants (> 25 μg d'eq dextrane/puits).

6 Conclusions et perspectives

A partir d'un écosystème microbien, appelé granule, provenant d'un procédé d'épuration de l'eau, une sélection de souches bactériennes surproductrices de polymères a été réalisée.

Dans une première étape, le travail d'isolement entrepris a permis de répertorier 58 souches bactériennes différentes, de les caractériser (examen microscopique, aspect macroscopique après croissance au laboratoire, tests biochimiques et moléculaires). Ce premier travail de caractérisation a permis de restreindre la collection de souches bactériennes de 58 à 11 isolats en éliminant les doublons. Les capacités d'adhésion et de production de polymères (EPS) ont été ensuite étudiées en microplaques. Deux isolats (nommés C4.21 et T5.25) se dégagent de l'étude en montrant des capacités d'adhésion associées à une production d'EPS équivalentes à celles d'une souche témoin du laboratoire. Trois autres isolats (T5.21, C4.11 et T5.15), même s'ils présentent une faible adhésion, produisent une quantité d'EPS notable.

Les 5 isolats pré-cités feront l'objet d'une étude plus ciblée afin, d'une part d'identifier précisément l'espèce bactérienne de chaque isolat et d'autre part, d'analyser la nature des polymères produits et de tester leurs propriétés gélifiantes en vue d'une application industrielle.

A plus long terme, la perspective de cette étude est de produire un polymère aux propriétés gélifiantes par voie biologique en recyclant la matière organique issue du traitement des eaux usées. Cet objectif a un intérêt double puisqu'il permet d'une part de recycler des déchets et d'autre part de produire des molécules biologiques se substituant à celles issues de la pétrochimie.

7 Remerciements

Les auteurs expriment leur gratitude à S. Durieux, PhD student au laboratoire TBI, INSA Toulouse qui a fourni le matériel biologique en réacteur SBR au cours de sa thèse ainsi que L. Molinier, F. Sarrazin, B. Lemelin et L.M. Lartigue, stagiaires de DUT ou BTS, pour leur soutien technique précieux.

Références

- [1] Pronk, M., Abbas, B., Al-zuhairy, S. H. K., Kraan, R., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2015). Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 5257–5268. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6358-3>
- [2] Seviour, T., Pijuan, M., Nicholson, T., Keller, J., Yuan, Z. (2009). Understanding the properties of aerobic sludge granules as hydrogels. *Biotechnology Bioengineering*, 102, 1483-1493. <https://doi.org/10.1002/bit.22164>
- [3] Van Leeuwen, K., de Vries, E., Koop, S., Roest, K., (2018). The Energy & Raw Materials Factory : Role and Potential Contribution to the Circular Economy of the Netherlands. *Environmental Management* 61, 786–795. <https://doi.org/10.1007/s00267-018-0995-8>
- [4] Durieux S. (2022). Contribution à l'étude de la granulation aérobie et à la production d'ALE : effets d'une charge organique élevée et de différents ratio DCO/N. Thèse, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse), Toulouse.