

## Sélection de clones résistants appartenant aux genres *Klebsiella*, *Serratia* et *Pseudomonas* afin de suivre leur implantation dans un biofiltre

Selection of resistant clones belonging to genera *Klebsiella*, *Serratia* and *Pseudomonas* in order to follow their implantation in a biofilter

S. ZINEBI<sup>1</sup>, C. HENRIETTE<sup>1</sup>, E. PETITDEMANGE<sup>1</sup>, J.-C. JORET<sup>2</sup>, N. SAVEANT<sup>2</sup>, M. QUITTELIER<sup>1</sup>

Reçu le 15 janvier 1992, accepté pour publication le 3 juillet 1992\*.

### SUMMARY

Comparison with free cell system, fixed process applied for biological wastewater treatment have been shown to offer numerous advantages. The Biocarbone process, an aerobic down flow immersed bed reactor (ODA patent n° 78-30246), has been selected for many industrial and municipal wastewater treatment facilities.

From this type of aerobic fixed-bed reactor, made of expanded schist as a granular support and fed with clarified domestic wastewater, eighty-eight strains were isolated (ZINEBI *et al.*, 1992). Three of the bacterial strains were chosen for their abilities to express high levels of glucidolytic, proteolytic or lipolytic activities and to grow on the granular support as microcolonies which developed into a film of organisms over the whole surface.

Our objective was to initiate biofilm formation by feeding the clean support with these selected strains named : *Klebsiella oxytoca*, 501 ; *Serratia marcescens*, 532 and *Pseudomonas putida*, 601. In order to follow attachment kinetics of these selected strains of this biofilter, and to verify their perenity within the biofilm in non sterile conditions (mixed with indigeneous flora from the influent), a specific labelling method was required.

As antibiotic-resistant mutants are easily isolated and the resistances can often serve as convenient genetic markers for use in characterizing bacterial strains, a direct selection of cells acquiring resistance to various antibiotics (ampicillin, streptomycin, nalidixic acid and rifampicin) has been performed. Selected antibiotic-resistant strains were further incubated in presence of growth inhibitors or suicide substrates in order to select again spontaneous arising mutants well characterized by two distinct markers. From the two bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, mutants having lost the nitrate

1. Laboratoire de Chimie Biologique 1, Faculté des Sciences de Nancy I, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-les-Nancy Cedex.
2. Anjou Recherche, Centre de Recherche de la Compagnie Générale des Eaux, Chemin de la Digue, B.P. 76-78600 Maisons Laffitte.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 15 juin 1993.

reductase have been isolated under anaerobic growth conditions in the presence of chlorate. In the case of *Pseudomonas* strain, mutants resistant towards substrate halogen analogues were obtained.

Colonies resistant to antibiotics and resistant to lethal substrates were isolated: thus, colonies of *Klebsiella* resistant to streptomycine at 2 g/l, to rifampicin at 1 g/l and chlorate at 2 g/l; colonies of *Serratia* resistant to streptomycine at 2 g/l or to rifampicine at 1 g/l and chlorate at 2 g/l and colonies of *Pseudomonas* resistant to nalidixic acid at 0.5 g/l and to bromoacetate at 2 g/l or to fluorouracil at 40 mg/l, were obtained. We have selected strains showing the same doubling time as well as the same final population than the parental strains when growths were performed with or without the markers. The three strains retained were: *Klebsiella oxytoca*, 501 R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> which grew on the Mac Conkey medium added with 1 g/l of rifampicin, 2 g/l of streptomycine and 2 g/l of chlorate; *Serratia marcescens*, 532 S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (on Mac Conkey plus 2 g/l of streptomycine and 2 g/l of chlorate) and *Pseudomonas putida*, 601 NB<sub>2</sub> (on King plus 0,5 g/l of nalidixic acid and 2 g/l of bromoacetate). These specific media for the detection of selectioned clones were selective toward a fixed indigenous flora since only 0,02 % of total heterotrophic population can grow.

A column filled with grains of « Biodagen » either colonized by natural, microbial populations or with clean grains of « Biodagen » was fed with a population of the strain *Klebsiella* 501 R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The strain colonized virgin « Biodagen » and maintained population of 4.10<sup>6</sup> CFU per grain for 9 days with new material and 10<sup>5</sup> CFU for 7 days with precolonized material.

Experiment with a mixed population resulting from the three identified microbial species have been conducted with clean grains of « Biodagen », a whole population of 10<sup>7</sup> CFU per grain was obtained after two days and each identified strain corresponded to 1 % of the entire bacterial population. The relative concentrations of the three strains did not decrease feeding the column with a mixture of the three strains and of wastewater but slightly decreased when the column was fed with wastewater only.

**Key-words :** Biofilter, fixed-biomass, selection, resistance to lethal substrates, resistance to antibiotics, implantation.

## RÉSUMÉ

Des souches appartenant aux espèces : *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas putida*, isolées d'un biofiltre utilisé pour le traitement d'effluents urbains ont été choisies parmi une centaine d'autres pour être réimplantées dans un réacteur du même type. Dans le but de suivre leur fixation en réacteur ouvert, une méthode spécifique de sélection a été développée. Des clones de ces souches résistant naturellement à des antibiotiques (rifampicine, streptomycine, acide nalidixique) et à des substrats suicides (chlorate, bromoacétate, fluorouracile) ont été recherchés. Cette sélection a permis d'obtenir des clones de *Klebsiella* et de *Serratia* résistants à 2 g/l de streptomycine, 1 g/l de rifampicine et à 2 g/l de chlorate ainsi que des clones de *Pseudomonas* résistants à 0,5 g/l d'acide nalidixique et à 2 g/l de bromoacétate ou à 40 mg/l de fluorouracile.

Les clones résistants dont les caractéristiques de croissance et les activités enzymatiques sont identiques à celles de la souche sauvage et dont la stabilité génétique a été maintenue après de nombreux repiquages ont été retenus. Afin de valider notre méthode de reconnaissance, une numération de la flore indigène d'un effluent urbain a été réalisée sur les milieux spécifiques des clones résistants : seule une faible proportion de cette flore, à savoir 0,02 % est capable de s'y développer. Des essais préliminaires d'ensemencement du

biofiltre avec les souches sélectionnées ont été réalisés, ils montrent que celles-ci s'implantent puisqu'elles sont retrouvées sur les grains de matériau de garnissage et que chacune d'elle représente 1 % de la flore totale.

**Mots-clés :** *Filtre biologique, biomasse fixée, sélection, résistance aux antibiotiques, résistance aux substrats suicides, implantation.*

## 1 - INTRODUCTION

Les traitements d'épuration des eaux usées mettant en œuvre une biomasse fixée sur des supports granulaires sont actuellement en plein essor. Jusqu'à ce jour, ce sont les bactéries indigènes des effluents à traiter qui ont servi à l'ensemencement naturel des biofiltres. Le préensemencement du garnissage du biofiltre paraît être une technique d'avenir. En effet, il permettra peut-être l'implantation d'une ou de plusieurs espèces prédominantes aux caractères biochimiques intéressants.

Une première étape pour atteindre ce but impose les conditions suivantes :

- Pouvoir suivre la cinétique d'implantation de la souche sélectionnée dans le réacteur en fonctionnement, donc en conditions non aseptiques.
- Pouvoir vérifier sa stabilité au cours des essais d'implantation en réacteur ouvert.

L'utilisation de clones sélectionnés est le meilleur moyen de reconnaître cette souche choisie parmi la flore hétérotrophe présente dans le biofilm. La sélection s'est portée sur la recherche de doubles résistants. Pour éviter une modification non contrôlée des propriétés génétiques des souches, aucun agent mutagène n'a été utilisé et ce sont uniquement les clones résistants suite à des mutations spontanées qui ont été recherchés. En effet des mutations chromosomiques apparaissent spontanément avec une fréquence de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$  par génération selon les bactéries et les caractères considérés. Les antibiotiques et les substrats suicides, utilisés dans ce travail ne sont pas directement mutagènes, mais ils sélectionnent les mutants résistants au sein de la population sensible. Ces mutations sont stables (les fréquences de réversion sont équivalentes à celle des mutations) et héréditaires.

## 2 - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Organismes

Parmi une centaine de souches isolées à partir des grains de garnissage d'un biofiltre « Biocarbonate » (ODA Patent # 78-30246) (ZINEBI *et al.*, 1992), trois souches ont été retenues en se basant sur les critères suivants :

- activités enzymatiques élevées vis-à-vis des constituants biodégradables des effluents,
- bonne aptitude à la fixation et la capacité à former un biofilm mince et homogène,
- capacité à dégrader les graisses et les détergents.

Ainsi ont été retenues une souche de *Klebsiella oxytoca* (501), une souche de *Serratia marcescens* (532) et une souche de *Pseudomonas putida* (601).

### Milieux de cultures • -

Pour les deux genres fermentants, *Klebsiella* et *Serratia*, le milieu de culture de base est le milieu de Mac Conkey (Diagnostics PASTEUR 69087) qui constitue un milieu sélectif pour les bactéries Gram négatif et en particulier les entérobactéries et permet en plus une différenciation entre ces deux souches. En effet, *Klebsiella oxytoca* 501 fermente le lactose présent dans le milieu ce qui confère aux colonies une coloration rose-rouge due au virage du rouge neutre, alors que les colonies de *Serratia marcescens* 532, qui ne fermentent pas le lactose, ont une coloration rose très claire.

La souche *Pseudomonas putida* 601 est cultivée sur milieu de King B (Bio-Mérieux, 51802). Sur ce milieu, cette espèce comme toutes celles du groupe « fluorescens » produit un pigment vert (pyoverdine), ce qui constitue un critère supplémentaire pour la différencier parmi une population hétérotrophe totale.

Le milieu de repiquage pour toutes les souches est le milieu R<sub>2</sub>A (REASNER et GELDREICH, 1985), (Difco 1826.17.1).

### Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques testés sont l'ampicilline, la streptomycine, l'acide nalidixique, le chloramphénicol, la rifampicine (SERVA, Ref. 13397, 35865, 29971 et 34514 respectivement) et la tétracycline (BCEHRINGER, 109355). Pour chaque antibiotique une solution aqueuse est préparée, stérilisée par filtration puis ajoutée aux milieux de culture stériles de façon à obtenir des concentrations finales de 0.25, 0.5, et 1 g/l. Les clones résistants sont repiqués sur un milieu ayant une concentration en antibiotique supérieure à celle à laquelle elles ont été isolées, afin de rechercher leur résistance maximale.

### Résistance aux substrats sulcides

Pour la préparation du milieu, le chlorate de potassium est ajouté à la concentration souhaitée avant autoclavage. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées dans une chambre anaérobie (Forma Scientific, Ohio) sous une atmosphère contenant 85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> et 5 % H<sub>2</sub> à une température de 25 °C pendant 72 h.

Une recherche préalable a été effectuée pour définir les substrats utilisés par la souche *Pseudomonas putida* 601. Pour ce test le milieu minéral de base de Palleroni (STANIER *et al.*, 1966), auquel on ajoute le substrat testé, est employé. Les analogues halogénés des substrats métabolisés sont utilisés comme substrats suicides (BISHOP et SUEOKA, 1972), BROWN *et al.* (1977).

### Tests de conservation des critères de sélection

Le test qualitatif de la nitrate réductase a été réalisé avec le réactif de Griess.

Les courbes de croissances des souches sélectionnées ont été effectuées sur 150 ml de bouillon R<sub>2</sub>A en fioles de 500 ml, agitées à 20 °C, la densité optique a été suivie à 600 nm.

Les galeries API ZYM ont été utilisées pour tester les activités enzymatiques.

Les propriétés dépolluantes ont été testées sur milieu R<sub>2</sub>A complété par les différents substrats : caséine, gélatine, amidon, carboxy-méthyl-cellulose, léctine et huile de tournesol (ZINEBI *et al.*, 1992).

### Présentation du pilote

Le pilote utilisé dans cette étude simule un filtre « Biocarbone » (SIBONY, 1983) c'est-à-dire un réacteur à lit immergé fixe fonctionnant en flux descendant avec injection d'air à un niveau intermédiaire. Ce pilote est constitué d'une colonne garnie du matériau support constitué de grains de « Bioda-gen ». La figure 1 représente le pilote utilisé pour les essais d'implantations.

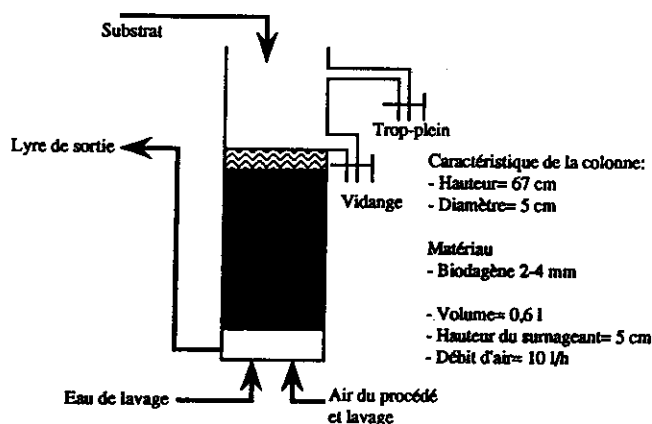


Figure 1 Colonne utilisée pour les essais d'implantation.  
Column used for implantation assays .

### Dénombrement de la biomasse fixée sur les grains

Un prélèvement est effectué dans le réacteur, dix grains de taille homogène sont ensuite choisis et rincés à l'eau distillée stérile afin d'éliminer la flore non accrochée. Ils sont ensuite immergés dans 5 ml d'eau distillée stérile et subissent un traitement aux ultrasons (50 W-55 KHz) trois fois une minute pour décrocher la biomasse fixée, méthode dérivée de celle employée par RUDD *et al.* (1982).

Le surnageant est récupéré, les grains sont rincés trois fois avec 5 ml d'eau stérile. Le dénombrement de la biomasse est effectué sur ces 20 ml, d'une part sur le milieu de référence R<sub>2</sub>A et d'autre part sur le milieu spécifique de la souche à identifier. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 25 °C pendant 72 h (Pour les milieux contenant le chlorate l'incubation s'effectue en anaérobiose comme décrit précédemment). Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC (unités formant colonies)/grain.

### Essais d'implantation

Deux essais ont été effectués :

*Essai n° 1* : La souche utilisée est la souche 501 R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Elle est cultivée dans 300 ml de bouillon nutritif agité à 20 °C pendant 18-24 h. Cette préculture est ajoutée à 20 l du même milieu qui, au bout de 18-24 heures, serviront à ensemencer la colonne. Pour cet essai deux colonnes fonctionnent parallèlement :

– une colonne d'essai qui contient des grains neufs rincés avec l'eau du réseau et qui recevra la culture seule, puis le mélange culture-eau usée et enfin de l'eau usée seule.

– une colonne d'essai qui contient des grains préalablement utilisés et donc déjà ensemencés par une flore indigène et qui recevra la culture seule, puis le mélange culture-eau usée et enfin l'eau usée uniquement.

*Essai n° 2* : Les trois souches 501 R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 532 S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1) et 601 NB (2) ont été utilisées simultanément. Le milieu de culture est un mélange (eau + lait 1 %) moins favorable que le bouillon nutritif et plus sélectif pour la flore indigène.

Le système fonctionne à partir de  $t = 0$  en circuit ouvert avec une culture de 20 l obtenue comme précédemment à partir de 300 ml de culture pour chaque souche. Pour cet essai on a utilisé une colonne d'essai contenant des grains neufs rincés avec l'eau du réseau ; qui reçoit les cultures seules, les cultures et l'eau usée simultanément et enfin de l'eau usée seule.

## 3 - RÉSULTATS

### Résistance aux antibiotiques (tableau 1)

Plusieurs antibiotiques ont été testés : l'ampicilline, la streptomycine, la tétracycline, l'acide nalidixique, le chloramphénicol et la rifampicine. Le tableau 1 représente la sensibilité des trois souches (501, 532 et 601) à ces différents antibiotiques. Ainsi les trois souches sont résistantes à l'ampicilline, donc cet antibiotique ne sera pas retenu pour la suite du travail ; de même que la tétracycline qui n'a pas permis d'obtenir des clones résistants aux concentrations testées. Pour la souche *Klebsiella* 501 des clones résistants spontanés sont apparus sur milieu à la rifampicine (5 résistants à 0,5 g/l) et à

la streptomycine (1 résistant à 2 g/l) ; le seuil de résistance de certains clones résistants à 0,5 g/l de rifampicine est en fait de 1 g/l. Des doubles résistants à la rifampicine et à la streptomycine ont pu être obtenus, en cultivant les clones résistants à la rifampicine sur milieu à la streptomycine (fig. 2).

Tableau 1 Résistance des trois souches aux différents antibiotiques.

Table 1 Resistance of the three strains to different antibiotics.

Antibiotiques	Concentrations • g/l	Souches		
		501	532	601
Ampicilline	0,25	Res	Res	Res
	0,5	Res	Res	Res
	1	Res	Res	Res
Streptomycine	0,25	S	-	Res
	0,5	S	1r	Res
	1	1r	1r	Res
	2	1r	1r	Res
Tétracycline	0,25	S	S	S
	0,5	S	S	S
	1	S	S	S
Ac. nalidixique	0,25	S	S	5r
	0,5	S	S	S
	1	S	S	S
Chloramphénicol	0,25	S	5r	Res
	0,5	S	S	Res
	1	S	S	Res
Rifampicine	0,25	> 30.r	> 30.r	5r
	0,5	5r	5r	1r
	1	S	S	S

Res : Souche résistante, S : Souche Sensible

Dans le cas d'une souche sensible r = clone résistant.

La souche *Serratia* 532 présente des clones résistants à la rifampicine (5 résistants à 0,5 g/l), à la streptomycine (1 résistant à 2 g/l) et au chloramphénicol (5 résistants à 0,25 g/l) ces derniers ont perdu leur résistance après un premier repiquage. Des clones à double résistance n'ont pas pu être obtenus, mais, le seuil de résistance de certains clones apparus à 0,5 g/l de rifampicine est en fait de 1 g/l (fig. 3).

La souche *Pseudomonas* 601 présente des clones résistants spontanés à la rifampicine (1 résistant à 0,5 g/l) et à l'acide nalidixique (5 résistants à 0,25 g/l). C'est la seule souche parmi les trois retenues dont des clones résistants à l'acide nalidixique ont émergé, ce sont les résistants à ce dernier antibiotique qui ont été sélectionnés. Le seuil de résistance, de certains clones apparus sur des milieux à 0,25 g/l d'acide nalidixique est en fait de 0,5 g/l (fig. 4).

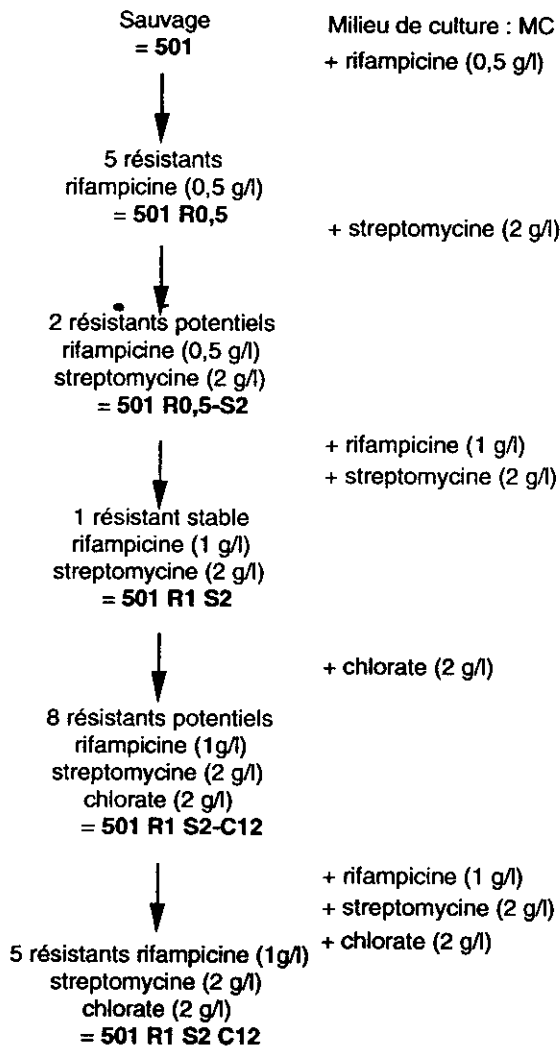


Figure 2 Méthode de sélection d'une souche marquée de *Klebsiella* 501.  
 Method of selection of labelled strain of *Klebsiella* 501.

### Résistance aux substrats suicides

Cette sélection est différente pour les souches fermentantes (*Klebsiella* et *Serratia*) et la souche *Pseudomonas* qui est oxydante vis-à-vis du glucose.

Les bactéries des genres *Klebsiella* et *Serratia* peuvent dans des conditions d'anaérobiose utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons, le nitrite s'accumule ; la réduction étant réalisée par une nitrate réductase de type A. Cette enzyme diffère de la nitrate réductase de type B qui catalyse la première étape du processus d'assimilation des nitrates.



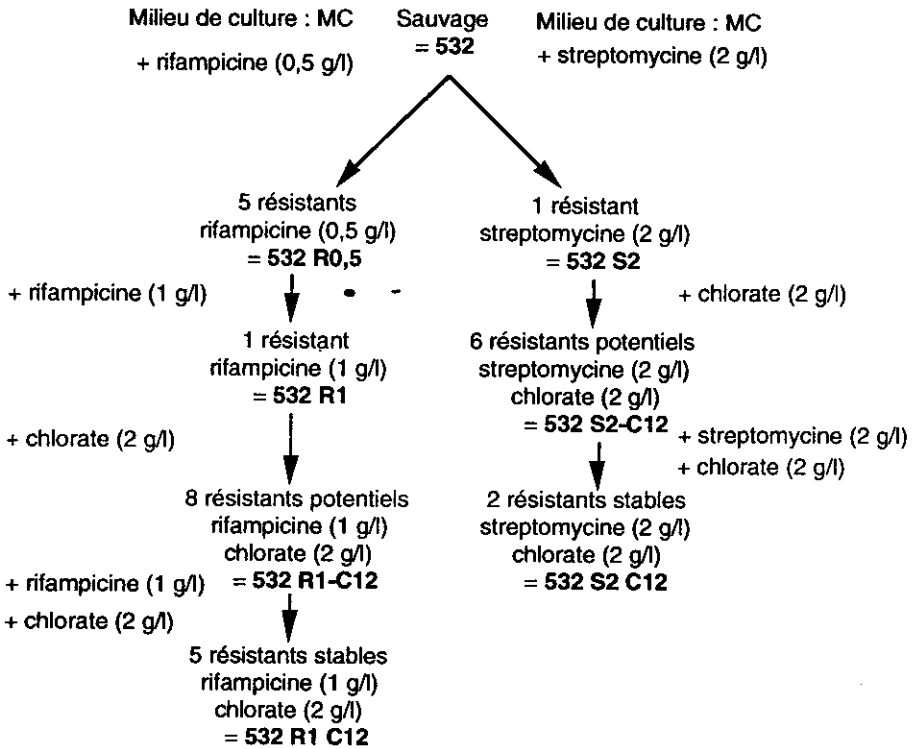


Figure 3 Méthode de sélection d'une souche marquée de *Serratia* 532.  
 Method of selection of labelled strain of *Serratia* 532.

L'analogue de substrat toxique de la nitrate réductase est le chlorate, cet anion,  $\text{ClO}_3^-$  ajouté au milieu de culture est réduit en  $\text{ClO}_2^-$  par la nitrate réductase, ce dernier, instable est doué d'un fort pouvoir oxydant et peut donc libérer du chlore, produit toxique pour la bactérie (PIECHAUD *et al.*, 1967). Seules les souches mutées ayant perdu leur nitrate réductase, incapables de réduire  $\text{ClO}_3^-$  peuvent pousser en anaérobiose en présence de chlorate alors que la souche sauvage est incapable de se développer. Les clones résistants aux antibiotiques obtenus précédemment sont ensemencés sur milieu additionné de chlorate. Ainsi des résistants potentiels aux antibiotiques et au chlorate ont été sélectionnés puis testés sur milieu additionné de tous les composés auxquels le « mutant » est susceptible d'être résistant. Pour la souche *Klebsiella* 501, 5 clones résistants à 1 g/l de rifampicine, à 2 g/l de streptomycine et à 2 g/l de chlorate ont été sélectionnés ( $501 \text{ R}_1 \text{ S}_2 \text{ Cl}_2$ ) (fig. 2). En ce qui concerne la souche *Serratia* 532, 5 clones résistants à 1 g/l de rifampicine et à 2 g/l de chlorate ( $532 \text{ R}_1 \text{ Cl}_2$ ) ainsi que deux résistants à 2 g/l de streptomycine et à 2 g/l de chlorate ( $532 \text{ S}_2 \text{ Cl}_2$ ) ont été retenus (fig. 3). Le fait que les clones sélectionnés pour les deux souches *Klebsiella* et *Serratia* aient des propriétés presque identiques n'est pas gênant puisqu'on peut les différencier sur milieu de Mc Conkey.

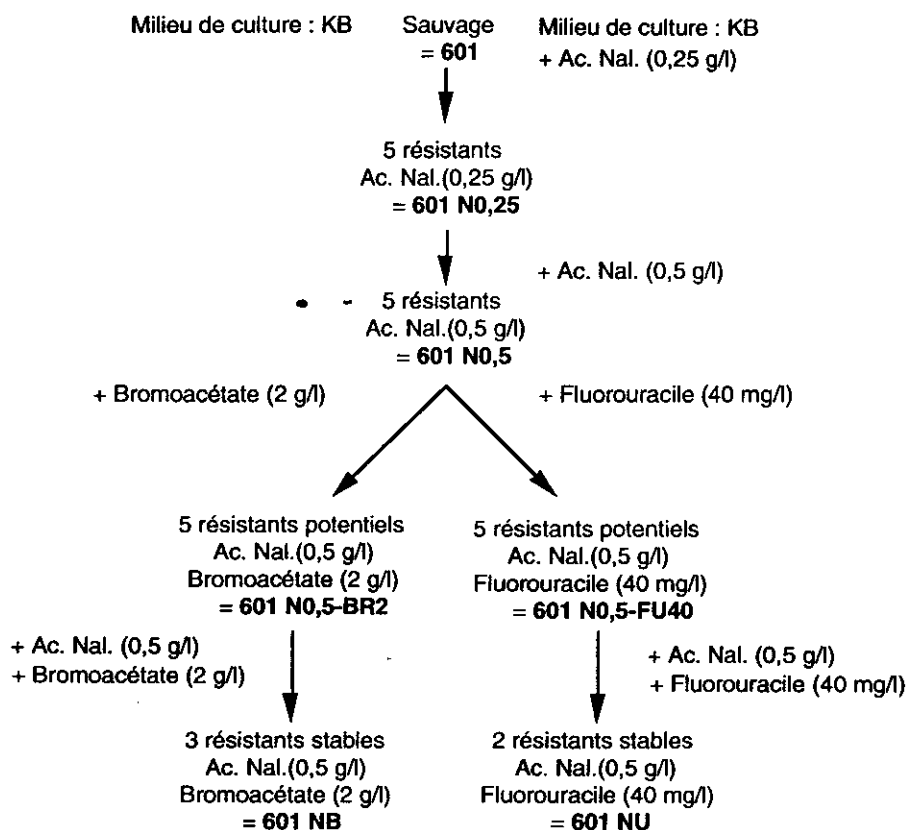


Figure 4 Méthode de sélection d'une souche marquée de *Pseudomonas* 601.  
Method of selection of labelled strain of *Pseudomonas* 601.

Pour la souche *Pseudomonas* 601, le bromoacétate et le fluorouracile sont choisis comme substrats suicides. A partir des clones résistants à l'acide nalidixique déjà obtenus, des clones doublement marqués ont pu être isolés sur milieu de King B additionné d'acide nalidixique et de l'un ou de l'autre substrat suicide. Ainsi ont été obtenus 3 clones résistants à 0,5 g/l d'acide nalidixique et à 2 g/l de bromoacétate (601 NB) et 2 clones résistants à 0,5 g/l d'acide nalidixique et à 40 mg/l de fluorouracile (601 NU) (fig. 4).

#### Conservation des critères de sélection

Tous les clones retenus (mentionnés dans le tableau 2) ont été sélectionnés à cause de leur morphologie et de leur taille comparables à celles de la colonie sauvage en présence ou en absence des inhibiteurs. Ils ont été repiqués toutes les 48 h sur milieu R<sub>2</sub>A sans inhibiteurs ; après 25 repiquages, le test de la nitrate-réductase a été effectué pour les clones résistants au chlorate afin de vérifier s'ils étaient toujours déficients en cette enzyme. Les autres caractères de résistance ont été également vérifiés.

**Tableau 2** Dénombrement des populations issues des clones résistants sur milieux avec et sans inhibiteurs. Le test a été effectué après 25 repiquages.**Table 2** *Colony counts of resistant clones in medium with and without inhibitors. The test was effected after 25 transfers.*

Souches	Nombre de UFC ( $10^7$ )/ml		Souches retenues
	MC	MC = inhibiteurs	
501 S2 C12 (1)	13 ± 2,5	7,5 ± 1,2 (a)	-
501 S2 C12 (2)	9 ± 3	13 ± 6 (b)	+
501 R1 S2 C12	24 ± 5	22 ± 6 (b)	+
532 S2 C12 (1)	49 ± 1	53 ± 5 (a)	+
532 S2 C12 (2)	20 ± 2	23 ± 3 (a)	+
532 R1 C12	30 ± 5	23 ± 1 (c)	-
	King	King + inhibiteurs	Souches retenues
601 NB (1)	22 ± 10	20 ± 8 (d)	+
601 NB (2)	16 ± 3	16 ± 2 (d)	+
601 NU (1)	51 ± 12	24 ± 7 (e)	-
601 NU (2)	16 ± 3	10 ± 2 (e)	-

MC : Milieu de Mc Conkey

MC + Inhibiteurs : (a) = MC + streptomycine (2 g/l) + chlorate (2 g/l)

(b) = MC + rifampicine (1 g/l) + streptomycine (2 g/l) + chlorate (2 g/l)

(c) = MC + rifampicine (1 g/l) + chlorate (2 g/l)

(d) = MC + acide nalidixique (0,5 g/l) + bromoacétate (2 g/l)

(e) = MC + acide nalidixique (0,5 g/l) + Fluorouracile (40 mg/l)

Après les 25 repiquages des clones résistants, une numération a été effectuée en parallèle sur le milieu de culture approprié (Mc Conkey pour les souches 501 et 532 et King B pour la souche 601) et sur le milieu sélectif c'est-à-dire le milieu de culture additionné des antibiotiques et des substrats suicides. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2. Seuls les clones ayant la même population sur milieu sélectif et sur milieu sans inhibiteurs ont été retenus et testés par la suite.

Les propriétés dépolluantes des souches issues des clones résistants et leurs caractéristiques enzymatiques ont été testées : toutes les activités ont été conservées. La croissance de ces souches sur milieu R<sub>2</sub>A a été comparée à celle des souches sauvages. Les taux de croissance maximums mesurés sont présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3** Taux de croissance maximums mesurés pour les souches sauvages et les souches résistantes aux antibiotiques et aux substrats suicides.**Table 3** *Maximal growth rate for wild strains and resistant strains to antibiotics and lethal substrates.*

Souches	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
501	0,46
501 R1 S2 C12	0,44
532	0,64
532 S2 C12 (1)	0,65
601	0,65
601 NB (2)	0,62

Numération au sein de la flore indigène hétérotrophe « totale » du biofilm des bactéries présentant les mêmes caractères de résistance que les souches sélectionnées (tableau 4).

**Tableau 4** Numération de la flore indigène fixée sur les milieux avec inhibiteurs.

**Table 4** Numeration of fixed indigenous flora on media supplemented with different inhibitors.

Essai	Flore totale UFC/grain (x 10 <sup>6</sup> )	*MC + R1 S2 C12 UFC/grain (x 10 <sup>2</sup> )	*MC + S2 C12 UFC/grain (x 10 <sup>2</sup> )	*KB + N0,5 B2 UFC/grain (x 10 <sup>2</sup> )
1	5,7	0,28	1,31	3
2	20	0	1,61	9
3	3,5	1,6	2	8
4	15	0,4	4,5	0,5
5	10	0	2	2,5

\* légende des milieux : voir tableau 2.

Les résultats de ces numérations effectuées à partir de la biomasse indigène du filtre à l'état d'équilibre sur les milieux sélectifs ont montré que les populations présentant les mêmes caractères de résistance que les souches sélectionnées ne représentaient jamais plus de 0,02 % de la population totale (le résultat le moins favorable étant obtenu avec le milieu de King B additionné de 0,5 g/l d'acide nalidixique et de 2 g/l de bromoacétate à l'essai 3). Donc si le pourcentage d'implantation de la souche sélectionnée dépasse ce seuil, sa reconnaissance s'avérera possible.

### Cinétique d'implantation des souches sélectionnées sur pilote

#### L'essai n° 1

La figure 5 illustre les essais d'implantation de la souche *Klebsiella* R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>C1<sub>2</sub> sur matériau préutilisé et sur matériau neuf. On constate que le matériau neuf porte déjà une biomasse fixée importante qui représente la flore totale de la colonne d'essai à t = 0 (environ 10<sup>5</sup> UFC/grain) et qui se multiplie pour atteindre une population totale de même ordre que celle sur le matériau préutilisé (le milieu de culture apporté avec la culture doit favoriser cette multiplication). La population totale des deux colonnes d'essai atteint l'état d'équilibre vers le sixième jour et reste constante au cours de l'essai. Pour la souche de *Klebsiella*, la numération effectuée sur les grains indique une implantation maximale de 4.10<sup>6</sup> UFC/grain au bout de 9 jours pour la colonne contenant le matériau neuf et de 10<sup>5</sup> UFC/grain au bout de 7 jours pour celle contenant un matériau déjàensemencé par la flore indigène. Après ces maxima on observe une diminution progressive de la souche *Klebsiella*, diminution qui s'accroît vers la fin de la phase d'alimentation par le mélange culture/eau usée et devient nette au cours de la phase d'alimentation par l'eau usée uniquement.

Même si l'implantation de la souche 501 se fait mieux sur matériau neuf, il apparaît que ces grains portent déjà une biomasse fixée importante et l'allure générale des deux courbes montre clairement que le taux d'implantation est supérieur dans le cas des grains neufs, ceci peut s'expliquer par le fait qu'à t = 0 les sites de fixation sur les grains préutilisés sont déjà colonisés par une

flore totale de l'ordre de  $10^7$  UFC/grain, ce qui constitue un handicap pour la fixation de la souche sélectionnée. La colonne d'essai contenant des grains déjà colonisés est supprimée dans l'essai suivant.

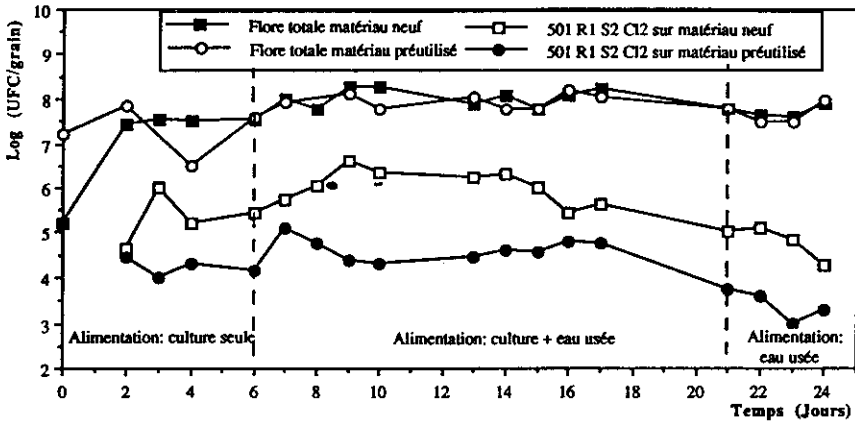


Figure 5 Implantation de la souche *Klebsiella* 501 R1 S2 Cl2 sur matériau préutilisé et neuf.  
*Implantation of the strain Klebsiella 501 R1 S2 Cl2 on a previously utilized and on a new material.*

L'essai n° 2

La figure 6 illustre les essais d'implantation simultanée des trois souches sélectionnées sur grains neufs uniquement. Pour la flore totale de la colonne d'essai on observe qu'elle passe de l'ordre de  $10^4$  à l'ordre de  $10^7$  CFU/grain pour se stabiliser à ce niveau au cours de toute la durée de l'essai : le biofiltre est en état d'équilibre. Les populations maximales dénombrées sur les grains sont obtenues au bout de 14 à 15 jours, pendant la période d'alimentation mixte : culture-eau usée (1/1), elles sont évaluées à  $1,6 \cdot 10^6$ ,  $1,7 \cdot 10^5$  et  $2 \cdot 10^5$  UFC/grain pour 501 R<sub>1</sub> S<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>, 532 S<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> (1) et 601 NB (2) respectivement.

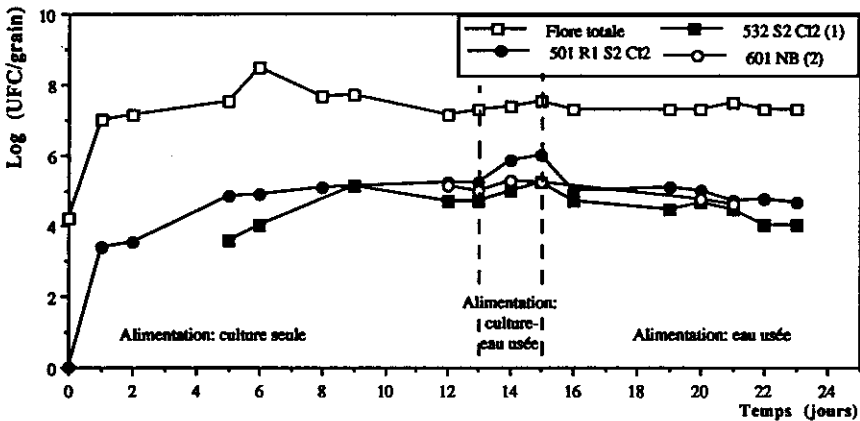


Figure 6 Implantation des trois clones résistants sélectionnés.  
*Implantation of three resistant selected clones.*

#### 4 - DISCUSSION

Dans ce travail nous avons sélectionné des bactéries par acquisition de caractères de résistances à partir de souches appartenant aux espèces *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas putida*. L'acquisition de ces résistances à un antibiotique et à un substrat suicide est vraisemblablement due à des mutations chromosomiques (ou extrachromosomique) ; en effet il ne peut pas s'agir d'une simple adaptation puisque les caractères sont conservés même après de nombreux repiquages sur un milieu dépourvu des composés sélectifs ; il ne peut pas s'agir non plus de l'acquisition d'information exogène (plasmide ou transposon) (COURVALIN et PHILIPPON, 1987) puisque les clones ont été sélectionnés au sein de cultures pures donc en absence de souche donatrice.

La reconnaissance des souches sélectionnées est rendue possible par le caractère sélectif des milieux de culture (en particulier celui contenant de la rifampicine), il n'existe qu'une faible proportion de « faux-positifs », bactéries capables de croître sur les milieux de Mac Conkey et de King B en présence des inhibiteurs, au sein de la biomasse fixée.

Les essais d'implantation ont permis de retrouver les bactéries sélectionnées, sur les grains de biofiltre ; parallèlement les observations suivantes ont pu être faites : l'implantation se fait mieux sur un matériau qui n'a pas été préalablement mis en service, ce qui traduit une concurrence pour l'occupation des sites du biofiltre.

D'autre part, il demeure un écart important entre la population marquée et la flore totale fixées sur les grains des colonnes d'essai. En effet, la flore déjà présente sur les grains est certainement très favorisée par l'apport important des nutriments encore présents dans la culture d'alimentation. Il est d'ailleurs à noter que la flore totale présente sur les grains neufs passe de  $10^5$  bactéries à  $10^7$  bactéries en 24 heures dans la colonne d'essai.

C'est pour cette raison qu'il faut utiliser un milieu de culture d'apport des souches sélectionnées beaucoup moins riche, tel que l'effluent synthétique par exemple. Il faut donc optimiser la culture bactérienne avant l'ensemencement des colonnes, sans pour cela utiliser un milieu riche qui favorise la flore indigène qui, selon certains auteurs (KEFFORD *et al.*, 1986), n'est pas propice à la fixation des micro-organismes, et diffère trop de l'effluent « naturel » que constitue l'eau usée.

La décroissance observée quand on stoppe l'alimentation est progressive, les cellules sélectionnées ne sont donc pas lessivées instantanément par l'apport d'eau usée. Elle est néanmoins significative et montre la nécessité d'appliquer des pressions de sélection biochimiques ou biologiques permettant de maintenir la souche sur le matériau dans des conditions normales d'exploitation d'un biofiltre. L'augmentation du taux de croissance qui permettrait aux bactéries que l'on souhaite implanter de « s'imposer » vis-à-vis des bactéries indigènes est un facteur possible pour avantager les souches sélectionnées. Des composés inhibiteurs de croissance, utilisés comme cribles,

permettent de sélectionner des mutants caractérisés par un temps de génération plus faible que celui de la souche sauvage. A titre d'exemples citons : des mutants de *Clostridium acetobutylicum* résistant au butanol (MATTA *et al.*, 1986), des mutants d'*Acinetobacter calcoaceticus* résistant au bromure de cetyltriméthylammonium (SHABTAI et GUTNIK, 1986) et des mutants résistant au 5-bromouracile chez *Bacillus subtilis* (BISHOP et SUEOKA, 1972).

## CONCLUSION

Lors d'un travail précédent, des souches bactériennes ont été isolées à partir d'une biomasse fixée sur un support granulaire utilisée dans l'épuration d'effluents urbains. Parmi ces souches trois ont été retenues à cause de leur forte activité épuratrice et de leur bonne aptitude à la fixation. Par sélections successives ces souches ont présentés des caractères de résistances permettant de les différencier sur des milieux spécifiques par rapport à la flore indigène. Ces caractères sont stables, en plus les milieux spécifiques (milieu + inhibiteurs) sont sélectifs vis-à-vis de la flore indigène, ce qui rend la numération différentielle des clones significative.

L'implantation des bactéries sélectionnées est notable puisqu'elle s'effectue à un taux de l'ordre de 1 sur 100. Néanmoins, elle pourrait certainement être augmentée en éliminant la biomasse déjà présente sur les grains neufs par un procédé envisageable à l'échelle du pilote et même d'une installation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BISHOP J., SUEOKA N., 1972. 5-bromouracil tolerant mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bact.*, 112, 870-876.
- BROWN T.D.K., JOHNS-MORTIMER M.C., KORNBERG H.L., 1977. The enzymatic interconversions of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 102, 327-336.
- COURVALIN P., PHILIPPON A. Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. Dans : Le Minor L., Veron M. (eds.) : Bactériologie Médicale, Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 1990, 332-355.
- KEFFORD B., HUMPHREY B. A., MARSHALL K. C., 1986. Adhesion : a possible survival strategy for leptospire under starvation conditions. *Curr. Microbiol.* 13 (5), 247-250.
- MATTA-EL-AMOURI G., JANATI-IDRISSI R., RAMBOURG J. M., PETITDEMANGE H., GAY R., 1986. Acetone butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* mutant with high solvent productivity. *Biomass*, 10, 109-119.
- PIECHAUD J., PUIG F., PICHINOTY E., AZOULAY E., LE MINOR L., 1967. Mutations affectant la nitrate réductase A et d'autres

- enzymes bactériennes d'oxydoréduction. *Annales de l'Institut Pasteur*, 112, 24-37.
- REASONER N. J., GELDREICH E. E., 1985. A new medium for the enumeration and sub-culture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1-7.
- RUDD T., STERRIT R.M., LESTER J.N., 1982. The use of extraction methods for the quantification of extracellular polymer production by *Klebsiella aerogenes* under varying cultural conditions. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 23-27.
- SHABTAI Y., GUTNIK D. L., 1986. Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium, bro-mide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 146-151.
- SIBONY J., 1983. Applications industrielles des cultures fixées en matière d'épuration d'eaux résiduaires. *L'eau, l'industrie, les nuisances*, 84, 25-27.
- STANIER R. Y., PALLERONI N. J., DOUDOROFF M., 1966. The aerobic *Pseudomonas*, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-271.
- ZINEBI S., HENRIETTE C., PETITDEMANGE E., JORET J. C., 1992. Identification and characterization of bacterial activities involved in wastewater treatment by aerobic fixed-bed reactor. Soumis à *Water Res.*