

Les applications de la Cytométrie en flux en Microbiologie  
Journée thématique de la Société Française de Microbiologie et l'Association  
Française de Cytométrie  
Institut Pasteur, 28 février 2011

## **Apports de la cytométrie dans la caractérisation des communautés bactériennes des boues activées**

Jean-Jacques Pernelle

La cytométrie en flux (CMF) est principalement destinée à la caractérisation de cellules isolées en suspension dans une phase liquide. Elle est particulièrement adaptée à la description d'écosystèmes homogènes tels que l'eau de mer, de lac ou de rivière, ainsi que les fluides biologiques et certaines matrices de l'agro-alimentaire.

Les boues activées des stations d'épuration biologiques constituent un écosystème complexe se prêtant mal à l'analyse en CMF. Certaines populations bactériennes de ces boues, dites floculantes, sécrètent des exopolymères (EPS), qui agrègent des substances minérales et organiques des eaux usées. Ces biofilms dispersés, appelés floccs, vont à leur tour être colonisés par des micro-organismes bactériens et des protozoaires. La séparation gravitaire de la biomasse bactérienne et de l'eau traitée est basée sur la décantabilité de ces floccs. Leur taille moyenne de 125  $\mu\text{m}$ , constitue le premier handicap dans l'étude des communautés des boues activées en CMF. Un traitement court aux ultrasons génère des sous structures, d'une taille moyenne de 13  $\mu\text{m}$ , formées de micro colonies agrégées (Snidaro *et al.* 1997).

### **Prétraitements**

De nombreuses publications ont décrit des procédés de prétraitement mécaniques permettant de rendre compatible la taille moyenne des éléments figurés des boues activées avec les contraintes de la CMF (Wallner *et al.* 1995). L'optimum d'efficacité en terme d'abondance de cellules détectées et de viabilité, a été obtenu en combinant un traitement aux ultrasons de 2 fois 45 secondes à 100 W et 5 passages de 45 secondes dans un homogénéiseur (Falcioni *et al.* 2006). La suspension doit cependant être passée sur un filtre de 10  $\mu\text{m}$  de porosité pour éviter toute obstruction du cytomètre. Une partie de l'information n'est donc toujours pas accessible et des progrès méthodologiques restent à faire.

La CMF a permis d'étudier les populations bactériennes de l'écosystème boues activées sous un angle que ne permettaient pas les méthodes culturales ou moléculaires. Ses capacités analytiques ont pu être renforcées dans certaines études par un couplage à des méthodes moléculaires.

### **Dénombrement**

La CMF permet de dénombrier rapide des bactéries issues des boues activées, ainsi que d'évaluation des biovolumes cellulaires et d'en déduire la biomasse bactérienne totale (Foladori *et al.* 2010a).

### **Viabilité**

Ces dénombrements sont le plus souvent couplés à des marquages de viabilité utilisant l'iodure de propidium (PI), marquant les cellules à membranes altérées, et un fluorophore non spécifique pénétrant dans toutes les cellules. Cette technique a pu être utilisée en boues activées pour évaluer l'effet sur les populations bactériennes de la chloration, visant à lutter contre la prolifération de bactéries filamenteuses (Manti *et al.* 2008), celle de la sonication, mise en œuvre pour accroître la dégradabilité des agrégats (Foladori *et al.* 2007) ou encore celle des traitements physico-chimiques utilisés pour réduire les masses de boues produites en station (Foladori *et al.* 2010b).

La CMF, couplée à des méthodes de coloration espèce spécifique, telle le FISH (Amann *et al.* 1990), permet de caractériser et d'isoler des populations bactériennes impliquées dans des procédés spécifiques de dépollution.

### **Bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes**

L'oxydation de l'ammonium en nitrate est assurée par des groupes bactériens autotrophes à croissance lente : les bactéries nitrosantes, oxydant l'ammonium en nitrite (AOB) et les bactéries nitrifiantes, oxydant les nitrites en nitrate (NOB). La dénitrification, réduisant les nitrates en azote moléculaire, est réalisée par un ensemble hétérogène de bactéries hétérotrophes (DNB). La FISH-CMF, couplée à la DGGE et au séquençage des ADNr 16S, a permis de mettre en évidence la dynamique de ces populations en fonction des ratios C/N (Xia *et al.* 2010).

### **Bactéries sur-accumulant les phosphates**

La déphosphatation biologique repose sur des populations bactériennes hétérogènes, présentant la particularité de sur-accumuler des phosphates (PAO). Ces micro-organismes les stockent sous forme de polyphosphates, en aérobiose en utilisant les acides gras volatils (AGV) comme substrat. Les vacuoles de polyphosphates fluorescent fortement en jaune lorsque l'on utilise le DAPI à forte concentration. Cette propriété a permis d'isoler les bactéries sur-accumulant les polyphosphates par FACS-CMF et de mettre en évidence la prépondérance du genre *Rhodocyclus* parmi les PAO (Kawaharasaki *et al.* 2002).

Les PAO entre en compétition avec des micro-organismes consommant également des AGV, mais accumulant du glycogène et non des polyphosphates (GAO). L'utilisation du FACS-CMF a permis d'identifier des alphaprotéobactéries du genre *Defluviicoccus*, comme appartenant aux GAO (McIlroy *et al.* 2008). Cette même technique, couplée au marquage FISH, a permis d'isoler et de caractériser de nouvelles populations de gammaprotéobactéries, responsables d'une perte d'efficacité déphosphatante d'un réacteur biologique, en entrant en compétition avec les PAO pour les AGV. L'observation microscopique des échantillons de boue hybridés en FISH, n'avait pas permis de les mettre en évidence (Schroeder *et al.* 2009).

## Bibliographie

Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl, D.A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925 (1990)

Falcioni T., Manti A., Boi P., Canonico B., Balsamo M., Papa S., Comparison of disruption procedures for enumeration of activated sludge floc bacteria by flow cytometry. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry* **70**(3), 149-153 (2006)

Foladori P., Bruni L., Andreottola G., Ziglio G., Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-Fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Res.* **41**(1), 235-243 (2007)

Foladori P., Bruni L., Tamburini S., Ziglio, G., Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res.* **44**(13), 3807-3818 (2010)a

Foladori P., Tamburini, S., Bruni L., Bacteria permeabilisation and disruption caused by sludge reduction technologies evaluated by flow cytometry. *Water Res.* **44**(17), 4888-4899 (2010)b

Kawaharasaki M. Manome A., Kanagawa T., Nakamura K., Flow cytometric sorting and RFLP analysis of phosphate accumulating bacteria in an enhanced biological phosphorus removal system. *Water Sci. Technol.* **46**(1-2), 139-144 (2002)

Manti A., Boi P., Falcioni T., Canonico B., Ventura A., Sisti D., Pianetti A., Balsamo M., Papa S., Bacterial cell monitoring in wastewater treatment plants by flow cytometry. *Water Environment Research* **80**(4), 346-354 (2008)

Mcllroy S., Hoefel D., Schroeder S., Ahn J., Tillett D., Saint C., Seviour R.J., FACS enrichment and identification of floc-associated alphaproteobacterial tetrad-forming organisms in an activated sludge community. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**(1), 130-135 (2008)

Schroeder S., Petrovski S., Campbell B., Mcllroy S., Seviour R.J., Phylogeny and in situ identification of a novel gammaproteobacterium in activated sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**(2), 157-163 (2009)

Snidaro, D., Zartarian, F., Jorand, F., Bottero, J. Y., Block, J-C., Manem, J. Characterization of activated sludge flocs structure. *Water Sci. Technol.* **36**, 313-320 (1997)

Wallner G., Erhart R., Amann, R.I., Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(5), 1859-1866 (1995)

Xia S., Li J., Wang R., Li J., Zhang Z., Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. *Biochemical Engineering J.* **49**(3), 370-378 (2010)