

# La microflore de boues aérobies acclimatées à des teneurs élevées en graisse

## Microflora of aerobic activated sludge acclimated to high lipid levels

P. Chappe, A. Mourey and J. Manem

Volume 7, Number 4, 1994

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/705208ar>

DOI: <https://doi.org/10.7202/705208ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (print)

1718-8598 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this article

Chappe, P., Mourey, A. & Manem, J. (1994). La microflore de boues aérobies acclimatées à des teneurs élevées en graisse. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 7(4), 395–404. <https://doi.org/10.7202/705208ar>

Article abstract

In this study, the main microorganisms involved in lipid biodegradation in activated sludge sewage treatment plants were isolated and their action on triglycerides and on fatty acids was investigated.

Six different sludge samples were studied. An activated sludge of the usual type (A) was used as reference. At the same site, activated sludge was adapted to higher lipid levels, through separation of fats reaching the sewage treatment plant, followed by their addition in higher proportion to activated sludge. In experiment B, adaptation took place in a « BIOMASTER® G » reactor, which is a new process for the elimination of fats by an aerobic treatment. Experiments C and D used the same original sludge plus lipid mixture, but with the addition of commercial bioadditives containing lipolytic bacteria. Finally, microorganisms isolated from two other systems, located at two other sites, were also studied (experiments E and F).

The control activated sludge, A, did not contain any strongly lipolytic microorganisms. On the other hand, in the new system at equilibrium, after adaptation, bacteria with a strong lipolytic potential such as *Acinetobacter calcoaceticus* and, *Pseudomonas putida* were isolated. The use of bioadditives at the start of the incubation did not afford any notable advantage, since at equilibrium microorganisms contained in these additives were not reisolated. However, other microorganisms with high lipolytic power (activity higher than 0.1  $\mu$ mole acid liberated per minute and per ml of culture broth) were isolated, such as *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus* sp. The genus *Pseudomonas* was almost always detected, regardless of the acclimated sludge studied. Conversely, Gram positive bacteria were virtually absent.

All Gram negative isolates were more or less capable of degrading fatty acids with various chain lengths. The only Gram positive isolate was inhibited, even killed, by short and medium chain fatty acids. In the present study, this might contribute to the paucity of Gram positive bacteria in the adapted sludges. The main genera encountered, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*, were able to perform both lipolysis (liberation of fatty acids) and the subsequent oxidation of the liberated fatty acids. The natural enrichment of the lipolytic microflora of activated sludges in the process leads to an acclimated microflora, able to completely biodegrade lipids.

# La microflore de boues aérobies acclimatées à des teneurs élevées en graisses

Microflora of aerobic activated sludge acclimated to high lipid levels

P. CHAPPE<sup>1</sup>, A. MOUREY<sup>1</sup> et J. MANEM<sup>2</sup>

Reçu le 14 mars 1994, accepté le 20 septembre 1994\*.

## SUMMARY

In this study, the main microorganisms involved in lipid biodegradation in activated sludge sewage treatment plants were isolated and their action on triglycerides and on fatty acids was investigated.

Six different sludge samples were studied. An activated sludge of the usual type (A) was used as reference. At the same site, activated sludge was adapted to higher lipid levels, through separation of fats reaching the sewage treatment plant, followed by their addition in higher proportion to activated sludge. In experiment B, adaptation took place in a « BIOMASTER® G » reactor, which is a new process for the elimination of fats by an aerobic treatment. Experiments C and D used the same original sludge plus lipid mixture, but with the addition of commercial bioadditives containing lipolytic bacteria. Finally, microorganisms isolated from two other systems, located at two other sites, were also studied (experiments E and F).

The control activated sludge, A, did not contain any strongly lipolytic microorganisms. On the other hand, in the new system at equilibrium, after adaptation, bacteria with a strong lipolytic potential such as *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas putida* were isolated. The use of bioadditives at the start of the incubation did not afford any notable advantage, since at equilibrium microorganisms contained in these additives were not reisolated. However, other microorganisms with high lipolytic power (activity higher than 0.1  $\mu$ mole acid liberated per minute and per ml of culture broth) were isolated, such as *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus* sp. The genus *Pseudomonas* was almost always detected, regardless of the acclimated sludge studied. Conversely, Gram positive bacteria were virtually absent.

1. Laboratoire de Microbiologie ENSTIB, Université Henri Poincaré Nancy 1, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy.
2. Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement, 38, Rue du Président Wilson, 78230 le Pecq.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 juillet 1995.

All Gram negative isolates were more or less capable of degrading fatty acids with various chain lengths. The only Gram positive isolate was inhibited, even killed, by short and medium chain fatty acids. In the present study, this might contribute to the paucity of Gram positive bacteria in the adapted sludges. The main genera encountered, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Aeromonas*, were able to perform both lipolysis (liberation of fatty acids) and the subsequent oxidation of the liberated fatty acids. The natural enrichment of the lipolytic microflora of activated sludges in the process leads to an acclimated microflora, able to completely biodegrade lipids.

Key-words : activated sludge, lipolysis,  $\beta$ -oxidation, fatty wastewater.

## RÉSUMÉ

Le travail présenté dans cet article a pour but d'isoler les principaux micro-organismes impliqués dans la biodégradation des lipides concentrés dans des réacteurs spécifiques de stations d'épuration des eaux et d'étudier leur action sur ce type de substrat.

La microflore d'une boue activée « classique » est comparée à celle de boues acclimatées à des teneurs élevées en lipides selon un nouveau procédé « BIOMASTER® G ». Cela montre un enrichissement en bactéries fortement lipolytiques dans le système à l'équilibre. En effet, la boue activée « classique » ne contient aucun microorganisme fortement lipolytique alors qu'à partir de la boue acclimatée du même site on a pu en isoler, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas putida* étant les constituants les plus actifs. L'utilisation de bioadditifs du commerce pour l'ensemencement des pilotes au lancement du système ne semble pas apporter d'avantages décisifs puisqu'on ne retrouve pas à l'équilibre les micro-organismes contenus dans ces bioadditifs. Par contre, d'autres micro-organismes à pouvoir lipolytique élevé sont détectés tels que *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila* et *Staphylococcus* sp. Le genre *Pseudomonas* est par ailleurs presque toujours rencontré quelle que soit la boue acclimatée examinée. De même, on peut noter la quasi absence de bactéries Gram positif.

Tous les isolats Gram négatif dégradent plus ou moins les acides gras de longueur de chaîne variée. Le seul isolat Gram positif est inhibé ou même tué par les acides gras à chaîne moyenne ou courte et cela peut contribuer à la pauvreté en bactéries Gram positif dans les boues acclimatées. Les genres principaux que nous avons rencontrés, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Aeromonas*, sont capables d'assurer à la fois la lipolyse (libération des acides gras) et l'oxydation subséquente des acides gras. L'enrichissement naturel de la microflore lipolytique des boues activées dans le procédé aboutit à une microflore acclimatée capable d'assurer la biodégradation complète des lipides.

Mots clés : boues activées, lipolyse,  $\beta$ -oxydation, eaux usées grasses.

## 1 - INTRODUCTION

L'élimination des résidus gras dans des conditions satisfaisantes pour l'environnement suscite actuellement un intérêt croissant. Parmi les techniques de biotraitement des graisses, un nouveau procédé a été récemment mis en service. Ce système utilise au départ des boues, issues du bassin

d'aération de la station d'épuration, enrichies en graisses provenant du dégraisseur situé en amont de ce bassin. La microflore des boues est progressivement acclimatée à cette charge en lipides importante. À l'équilibre, 85 % des graisses entrantes sont éliminées (GRULOIS *et al.*, 1993).

La caractérisation des microflores aérobies mésophiles de boues activées a parfois été réalisée dans des cas particuliers (SODDEL et SEVIOUR 1990). Cependant, l'identité et l'activité des micro-organismes lipolytiques des boues activées de stations d'épuration n'a pas jusqu'à présent fait l'objet de recherches importantes. Nous examinons ici la biodégradation des graisses par les principaux micro-organismes lipolytiques isolés de station d'épuration. Il est également intéressant d'examiner l'identité des micro-organismes acclimatés à une teneur élevée en lipides et leur action sur ces lipides afin de mieux comprendre, à ce niveau, le fonctionnement du système.

## 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Compositions des milieux de culture

– BYPTA : peptone 10 g, extrait de viande 3 g, extrait de levure 3 g, chlorure de sodium 5 g, tributyrine 10 ml, alcool polyvinylique 1 g, agar 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 7,2 (MOUREY et KILBERTUS 1976).

– Gélose nutritive (GN) : peptone 5 g, extrait de viande 1 g, extrait de levure 2 g, chlorure de sodium 5 g, agar 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 7-7,2.

– Tryptone-soja (SO) : tryptone 17 g, peptone de soja 3 g, D(+) glucose 2,5 g, chlorure de sodium 5 g, phosphate monopotassique 2,5 g, eau distillée 1 000 ml, pH 7,2-7,4.

– Milieux gélosés avec acides gras : sulfate de magnésium 0,1 g, phosphate dipotassique 7 g, phosphate monopotassique 3 g, sulfate d'ammonium 1 g, extrait de levure 0,1 g, Triton X100 (agent tensioactif) 10 ml, agar 15 g, eau distillée 1 000 ml, acide gras 5 mg par ml, pH 7-7,2 (VUILLEMIN *et al.*, 1981).

– Gélose à l'extrait de malt : extrait de malt 15 g, agar 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 5,6.

Tous ces milieux de culture sont stérilisés par passage à l'autoclave à une température de 120 °C pendant 20 minutes.

### 2.2 Dénombrement et isolement des souches

Le dénombrement des micro-organismes aérobies, lipolytiques et fongiques est effectué par suspensions-dilutions décimales. La gélose nutritive incubée à 25 °C pendant 72 heures est utilisée pour la microflore aérobie mésophile. Le milieu BYPTA sert à la numération de la microflore lipolytique après une incubation de 72 à 96 heures à 25 °C. Les souches lipolytiques sont repérées sur ce milieu par la présence autour de la colonie d'une auréole

translucide correspondant à l'hydrolyse de la tributyrine insoluble et à la libération de produits solubles. La microflore fongique est cultivée sur la gélose à l'extrait de malt incubée à 25 °C pendant 4 jours.

### 2.3 Origine des souches

Les micro-organismes proviennent de six échantillons de boues prélevés à partir de 3 sites différents ; A, B, C, D proviennent du même endroit, E et F de deux autres. L'échantillon A a pour origine une boue activée « classique » de station d'épuration. Tous les autres ont été préalablement acclimatés à une charge en lipides importante, avec des matières extractibles à l'hexane (MEH) en quantité supérieure à 1 g/litre, ceci étant une concentration nettement supérieure à celle de la moyenne des eaux résiduelles urbaines qui est de 100 mg/l (BRIDOUX *et al.*, 1994). Les boues B, E et F ont été acclimatées selon le procédé cité par GRULOIS *et al.* (1993). Les boues C et D proviennent d'un réacteur du même type mais recevant des bioadditifs du commerce (CHAPPE *et al.*, 1994b) selon les recommandations des fabricants. Ces « bioadditifs » sont des poudres lyophilisées qui contiennent des bactéries lipolytiques,  $2,5 \cdot 10^{10}$ /g pour C et  $4 \cdot 10^5$ /g pour D. Toutes les analyses sont réalisées à partir de systèmes à l'équilibre, c'est à dire vingt jours après la mise en service.

### 2.4 Activité lipolytique des souches

Le dosage de l'activité lipolytique est réalisé à pH constant de 7,7 et à 25 °C à l'aide d'un pH stat RADIOMETER. Le substrat est une émulsion d'huile d'olive auquel on ajoute la culture de cellules en bouillon tryptone-soja au moment où la biomasse est maximum (CHAPPE *et al.* 1994a). Une unité est la quantité d'enzyme qui libère 1  $\mu$ mole d'acide par minute, pour 1 millilitre de bouillon de culture.

### 2.5 Sélection et identification des souches

Toutes les bactéries lipolytiques sont cultivées en bouillon tryptone-soja à 25 °C avec une agitation rotative de 150 rpm. Les bactéries les plus actives sur huile d'olive (activité supérieure à 0,10 unité) sont identifiées d'après le Bergey's manual of systematic bacteriology (KRIEG et HOLT 1984 ; SNEATH *et al.*, 1986) et leur action sur les acides gras est testée sur milieux gélosés.

### 2.6 Activité des souches sur les acides gras

Les milieux gélosés avec acides gras sont coulés en boîte de Pétri. L'acide gras représente la principale source de carbone. Les acides gras C10, C16 et C18 étant sous forme solide sont préalablement solubilisés dans l'acétone (0,5 g d'acide dans 1 ml d'acétone) et rapidement introduits dans le milieu porté à 70 °C. La préparation est soigneusement agitée jusqu'à complet refroidissement afin de réaliser une suspension homogène de l'acide gras dans le milieu de culture. Après avoir coulé le milieu, les boîtes sont laissées entrouvertes (sous la hotte, et autour du bec Bunsen) quelques instants, pour laisser évaporer d'éventuelles traces d'acétone résiduelles.

Tous les essais sont réalisés en triplicata (3 boîtes pour chaque AG). Le repiquage de la souche étudiée est fait par empreinte au centre du milieu gélosé. Cette empreinte est réalisée à l'aide d'un cylindre de gélose nutritive de 1 cm de diamètre découpé à l'emporte pièce dans une boîte de préculture de 12 heures à 25 °C sur GN. Dans les cas où les acides gras de départ sont insolubles (C10, C16, C18 et C18:1), leur dégradation est mise en évidence par la libération d'acides gras à chaîne courte solubles et donc par l'apparition d'auréoles translucides. Dans les autres cas (C4 et C8), on ne peut observer que la survie (croissance importante des colonies au niveau de l'empreinte) ou la lyse (disparition des colonies au niveau de l'empreinte) des bactéries.

Les lectures de ces halos translucides se font après 8 jours d'incubation à 25 °C. Les cocci à Gram positif ne se cultivant pas dans ces conditions, le milieu minéral (carencé) a été remplacé par un milieu gélosé tryptone-soja, auquel est ajouté la même quantité d'acides gras et de Triton X100 que dans le milieu minéral.

### 3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Microfiores aérobies et lipolytiques

Les dénombrements effectués sur le milieu au malt ne sont pas reportés, la microflore fongique n'ayant jamais pu être mise en évidence (*tabl. 1*). Dans ces boues, un grand nombre de souches différentes a été isolé (*tabl. 2*) dont 10 pour A, 4 pour B, 6 pour C, 4 pour D, 7 pour E et 9 pour F, soit 40 colonies différentes plus ou moins lipolytiques.

**Tableau 1** Charges microbiennes aérobies et lipolytiques des échantillons de 6 boues.

**Table 1** *Aerobic and lipolytic microbial populations in samples of the 6 sludges.*

Boues		Bactéries aérobies (UFC/ml)	Bactéries lipolytiques (UFC/ml)
Activée classique site 1	A	$3,2 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$
Acclimatées site 1			
Sans Bioadditif	B	$1,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^7$
Avec Bioadditif 1	C	$5 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$
Avec Bioadditif 2	D	$4 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$
Acclimatée site 2			
Sans Bioadditif	E	$2,8 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^3$
Acclimatée site 3			
Sans Bioadditif	F	$1,2 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^6$

**Tableau 2** Activité sur huile d'olive des souches lipolytiques (auréole de lyse sur milieu BYPTA) isolées des 6 boues. L'activité est exprimée en micromoles de soude nécessaires pour neutraliser l'acidité libérée à pH 7,7 et à 25 °C, en une minute avec 1 millilitre de milieu de culture contenant les cellules. (BG+ = Bacille Gram positif, BG- = Bacille Gram négatif, CG+ = Coque Gram positif).

**Table 2** Activity on olive oil of lipolytic strains isolated on tributyrin medium from the 6 sludges. Activity is expressed as the quantity of NaOH ( $\mu$ moles) necessary to neutralize acidity liberated per minute, at pH 7.7 and at 25°C, by one ml of cell-containing culture. BG+ = Gram positive bacilli; BG- = Gram negative bacilli; CG+ cocci.

Boues	Souche	Gram ou identification	Activité
Activée A (site 1)	A1	BG-	0,07
	A2	BG+	0,04
	A3	BG+	0,00
	A4	BG-	0,02
	A5	BG-	0,03
	A6	BG-	0,00
	A7	BG-	0,00
	A8	BG-	0,00
	A9	BG-	0,00
	A10	BG-	0,00
Acclimatée B (site 1)	B1	BG-	0,00
	B2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,10
	B3	CG+	0,07
	B4	<i>Pseudomonas putida</i>	0,20
Acclimatée C avec Bioadditifs 1 (site 1)	C1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,11
	C2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,13
	C3	BG-	0,06
	C4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,10
	C5	<i>Staphylococcus</i> sp.	0,29
	C6	BG-	0,00
Acclimatée D avec Bioadditifs 2 (site 1)	D1	BG+	0,04
	D2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,12
	D3	BG-	0,06
	D4	BG-	0,03
Acclimatée E (site 2)	E1	BG-	0,08
	E2	BG-	0,07
	E3	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,20
	E4	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,18
	E5	BG+	0,08
	E6	BG-	0,00
	E7	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,11
Acclimatée F (site 3)	F1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,15
	F2	BG-	0,00
	F3	BG-	0,00
	F4	BG-	0,03
	F5	BG-	0,03
	F6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,14
	F7	BG+	0,00
	F8	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,11
	F9	BG+	0,05

Parmi ces bactéries, 32 se présentent sous forme de bâtonnet Gram négatif, 6 sont des bâtonnets Gram positif et 2 sont des coques Gram positif. Les charges microbiennes sont assez constantes, de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$  par ml. Les résultats globaux sont comparables à ceux qui sont présentés par d'autres auteurs dont GRAY (1990) qui estime les charges bactériennes comprises entre  $10^6$  et  $10^8$  bactéries par millilitre dans des boues activées.

### 3.2 Activité lipolytique des souches isolées

Dans la boue activée A (classique), on ne remarque aucune souche à activité lipolytique supérieure à 0,10 (tabl. 2). Les boues C et D « acclimatées » appartiennent à des pilotes où ont été utilisés des bioadditifs sous forme de poudre lyophilisée. Parmi les bactéries isolées figurent quelques souches lipolytiques mais aucune ne provient apparemment des bioadditifs, leurs caractéristiques taxonomiques étant différentes (CHAPPE *et al.* 1994a). Il est d'ailleurs intéressant de constater que les souches fortement lipolytiques des bioadditifs du commerce ne survivent pas dans les boues acclimatées, l'environnement ne leur étant sans doute pas favorable.

Sur les 40 souches isolées hydrolysant la tributyrine, 13 (12 bâtonnets Gram négatif et 1 coque Gram positif) seulement ont une activité lipolytique importante. Aucune bactérie en bâtonnet Gram positif, ne figure parmi celles-ci.

Les microflores lipolytiques de ces biotopes particuliers sont donc constituées majoritairement de bacilles à Gram négatif. D'après nos résultats, on dénombre dans ces boues à teneur élevée en graisses une microflore lipolytique constituée entre autre de *Pseudomonas* (dont *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa* et *Pseudomonas* sp.), d'*Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*), d'*Aeromonas* (*A. hydrophila*) et de *Staphylococcus* sp. Sur un échantillon beaucoup plus important et plus représentatif de 352 souches lipolytiques provenant de la rivière Ottawa, BLAISE et ARMSTRONG 1973, dénombrent respectivement 51 % de *Pseudomonas*, 28 % d'*Acinetobacter* et 11 % d'*Aeromonas*. Ces 3 genres bactériens semblent donc regrouper les composants de la microflore lipolytique principale des biotopes aquatiques et celle des boues à haute teneur en graisses. D'autres auteurs publient des résultats analogues (BENEDICT et CARLSON 1971, OMAR *et al.* 1990, GRAY 1990, BRAHIMI-HORN *et al.* 1991).

Il est plus rare d'isoler des cocci à Gram positif. *Staphylococcus* sp. ne fait pas partie de la microflore habituelle des effluents et boues activées à haute teneur en graisses des stations d'épuration. BLAISE et ARMSTRONG 1973, ont isolé d'un milieu aquatique un seul coque Gram positif (*Streptococcus* sp.) sur 434 souches. La présence de cette bactérie dans les boues peut donc n'être que ponctuelle. Deux souches de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogènes opportunistes, ont été isolées de la boue F.

### 3.3 Culture des souches lipolytiques des boues sur les acides gras

La deuxième étape de la biodégradation aérobie des graisses correspond à l'oxydation des acides gras (généralement  $\beta$  oxydation). Il est indispensable



que cette étape soit réalisée pour obtenir une élimination complète des lipides. Ceci est d'autant plus important que 70 % des graisses à l'entrée de la station sont déjà hydrolysées sous forme d'acides gras avec essentiellement les acides oléique, palmitique et stéarique (BRIDOUX, 1992).

Toutes les souches lipolytiques des 6 échantillons de boues survivent sur les milieux contenant des acides gras à l'exception de la souche C5 (*Staphylococcus* sp.) (tabl. 3). Les différents acides gras ont sur celle-ci une action soit bactéricide (C4, C8, C10, et C 18:1), soit bactériostatique (C16 et C18). Les résultats des travaux sur ce genre bactérien (*Staphylococcus*) varient d'un auteur à l'autre. VADHERA et HARMON 1967, ont noté qu'une souche de *Staphylococcus aureus*, non seulement survit sur différents acides gras, mais est aussi susceptible de les dégrader. KODICEK et WORDEN 1945, NIEMAN 1954, ont observé une létalité des bactéries du genre *Micrococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* en contact avec la plupart des acides gras.

En général, il semble d'après les différents travaux publiés, que les acides gras ont des effets bactéricides sur les souches Gram positif (VUILLEMIN *et al.*, 1981, WANG et JOHNSON 1992), cet effet étant variable avec la longueur de la chaîne carbonée (NIEMAN 1954).

À part *Staphylococcus* sp., des bactéries appartenant à 3 genres différents et présentant une activité lipolytique intéressante sur huile d'olive ont été isolés des boues des stations pilotes. Ces différentes souches sont des *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Aeromonas*. Elles survivent toutes en présence des acides gras testés et les dégradent.

**Tableau 3** Effets des acides gras sur les souches les plus lipolytiques des 6 échantillons de boues. (+ = survie, - = mort, E = mobilité, L = lyse ; les valeurs indiquées représentent le rayon (mm) de l'auréole de lyse après 8 jours de culture).

**Table 3** Effects of fatty acids on the most lipolytic strains isolated from the 6 sludges. + = survival; - = death; E = motility; L = lysis; values indicated represent the radius (mm) of the lysis ring after 8 days of culture.

Acides gras	C4	C8	C10	C16	C18	C18:1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (B2)	+	+	1	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> (B4)	+	+	10	E	E	3
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (C1)	+	+	1	1,3	2	4
<i>Aeromonas hydrophila</i> (C2)	+	+	1	3,3	3	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (C4)	+	+	10	7,3	4	3
<i>Staphylococcus</i> sp. (C5)	-	-	-	+	+	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (D2)	-	+	2	1,6	2	5
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (E3)	+	+	5	LE	2	2E
<i>Pseudomonas</i> sp. (E4)	+	+	10	LE	LE	3
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (E7)	+	+	6,7	4E	3E	4E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F1)	+	+	7E	LE	+	4E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F6)	+	+	7	LE	E	5E
<i>Pseudomonas</i> sp. (F8)	+	+	+	+	1	2,3

On constate deux formes d'inhibition des souches sensibles : l'inhibition totale par tous les acides gras, constatée avec *Staphylococcus* sp. (C5) et une inhibition partielle avec *Pseudomonas* sp. (F8). En effet, cette dernière dégrade les acides gras à chaîne longue (C18:1, C18), puis est inhibée par les produits de son catabolisme (acides en C16) ainsi que par les acides en C10, C8 et C4 qui semblent développer des effets bactériostatiques sur la souche.

Des représentants de ces trois genres bactériens ont déjà été isolés de boues activées classiques (BENEDICT et CARLSON 1971) ou à teneur élevée en graisses (BRAHIMI-HORN et al. 1991). Ils constituent la microflore dominante de ces boues et ils ne sont pas inhibés par les métabolites intermédiaires de la biodégradation des lipides. Des essais similaires ont été effectués dans des pilotes en laboratoire. Ils nous ont permis d'isoler des souches de ces trois genres dominants, mais nous avons mis aussi en évidence des bactéries telles que des *Bacillus* sp., *Vibrio fluvialis* ou des souches fongiques (*Aureobasidium*). Ces souches ont pu profiter de conditions mieux régulées (température, pH, apport de substrat) des fermenteurs (BRIDOUX 1992) par rapport à celles des boues acclimatées pour se développer. Seul le genre *Vibrio* peut faire partie des microflores minoritaires des boues activées. La survie des autres dans des conditions naturelles plus drastiques est hypothétique.

#### 4 – CONCLUSION

Cette étude en stations pilotes permet de mieux comprendre le rôle de certains facteurs qui régissent la constitution des microflores des boues activées à teneur en graisses élevée. La biodégradation des lipides comporte deux étapes, la lipolyse et la  $\beta$  oxydation. Celles-ci peuvent conduire à la libération de produits bactéricides ou bactériostatiques pour une partie de la microflore initiale qui se trouve dans les boues activées.

La première étape (lipolyse) est effectuée par un grand nombre de souches et ne semble pas entraîner des blocages importants. Cependant elle conduit à la libération d'acides gras qui peuvent inhiber certaines bactéries lipolytiques. La deuxième étape,  $\beta$  oxydation de ces acides gras libère à chaque tour de spirale de Lynen un autre acide gras à chaîne  $n - 2$  plus courte. On constate ici que les acides gras à chaîne courte sont plus toxiques que ceux à chaîne longue, leur toxicité a donc tendance à croître au fur et à mesure de leur dégradation.

La constitution des microflores semble, du moins en partie, dépendre de cette étape de biodégradation des acides gras. Les souches dominantes des microflores de boues enrichies en graisses doivent pouvoir effectuer toutes les étapes de la biodégradation complète des lipides et ne pas être inhibées ou tuées par certains acides gras. Les bactéries que nous avons identifiées comme appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Aeromonas* répondent à ces critères.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr E. KIFFER pour l'aide apportée au cours de cette étude.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENEDICT R.G., CARLSON D.A., 1971. Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. *Water Res.*, 5, 1023-1030.
- BLAISE C.R., ARMSTRONG J.B., 1973. Lipolytic bacteria in the Ottawa River. *Appl. Microbiol.*, 26, (5), 38-44.
- BRAHIMI-HORN M.C., MICKELSON C.A., GAAL A.M., GUGLIELMINO M.L., SPARROW L.G., 1991. Lipolytic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* strains grown in wool scour effluent. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 740-746.
- BRIDOUX G., 1992. Bilan des graisses dans les stations d'épuration. Dégradation des graisses par voie aérobie. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne, 167 p.
- BRIDOUX G., DHULSTER P., MANEM J., 1994. Analyse des graisses dans les stations d'épuration, *TSM L'eau*, 89, (5), 257-262.
- CHAPPE P., MOUREY A., KILBERTUS G., 1994a. Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 40, 103-113.
- CHAPPE P., MANEM J., MOUREY A., 1994b. Les « bioadditifs » utilisés pour l'élimination des graisses en stations d'épuration. *TSM L'eau*, 89, (10) 568-571.
- GRAY N.F., 1990. *Activated sludge. Theory and Practice*. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo, 271 p.
- GRULOIS Ph., ALRIC G., BROCHON J.P., BRIDOUX G., MANEM J., 1993. L'élimination des graisses par traitement biologique aérobie. *TSM L'eau*, 88, (5), 247-251.
- KODICEK E., WORDEN A.N., 1945. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive microorganisms. *Biochem.*, 39, 78-85.
- KRIEG N.R., HOLT J.G., 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams et Wilkins, Baltimore, London. tome 1, 964 p.
- MOUREY A., KILBERTUS G., 1976. Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 40, 47-51.
- NIEMAN C., 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 18, 147-163.
- OMAR S.H., BUDECKER U., REHM H.J., 1990. Degradation of oily sludge from a flotation unit by free and immobilized microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 259-263.
- SODEL J.A., SEVIOUR R.J., 1990. Microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.*, 14, 141-176.
- SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G., 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams et Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney, tome 2, 965-1599.
- VADHERA D.V., HARMON L.G., 1965. Action of lipases of *Staphylococcus aureus* on milk fat. *Appl. Microb.*, 13, 335-339.
- VUILLEMIN N., DUPEYRON C., LELUAN G., BORY J., 1981. Etude de l'action des bactéries à Gram négatif sur les acides gras. *C.R. Soc. Biol.*, 175, 72-80.
- WANG L.L., JOHNSON E.A., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Envir. Microb.*, 58, (2), 624-629.