



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Institut National
Polytechnique de Lorraine

École Nationale Supérieure des Industries Chimiques

École Doctorale RP2E

Caractérisation morphologique et physiologique de la biomasse des boues activées par analyse d'images

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 10 janvier 2006

pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
(spécialité Génie des Procédés et des Produits)

par

Denis Pandolfi

Composition du Jury

Président : Mme. T. GÖRNER

Rapporteurs: M. N. ROCHE
M. H. VIVIER

Examineurs : Mlle. M.N. PONS
M. D. DUMAS

Résumé

Les réacteurs des stations d'épuration des eaux usées par boues activées mettent en oeuvre un écosystème hautement complexe, où se rencontrent des bactéries, des algues, des protozoaires, des métazoaires... Un bon équilibre entre ces différents microorganismes permet une bonne décantation des floes des liqueurs mixtes (mélange des boues activées et d'eau à traiter) et empêche les phénomènes de « bulking » ou moussage. Les floes sont composés de bactéries zooglées productrices d'exopolysaccharides et de bactéries filamenteuses qui en constituent l'ossature. Des méthodes basées sur l'analyse d'images ont été développées pour détecter et caractériser de façon automatique ces dernières ainsi que la teneur en exopolysaccharides. Elles utilisent des images monochromes ou couleurs obtenues par microscopie optique avec des colorants classiques (Gram, Neisser, Noir de Soudan) et fluorescents (*BacLight*, FISH). La validation des différentes procédures a été réalisée sur des installations situées en Lorraine. Des expériences complémentaires ont été faites sur des réacteurs pilotes de type boues activées en mode continu ou séquentiel, afin de voir l'effet de la nature du substrat, de la température et la famine sur le comportement des microorganismes filamenteux. La comparaison entre une aération continue ou séquentielle pour un même substrat protéique indique que les populations qui se développent sont différentes en terme de caractéristique Gram. L'étude réalisée sur les polysaccharides extracellulaires pour différents rapports carbone/azote montre qu'un excès de matière carbonée favorise la production des polysaccharides indispensables dans la biofloculation des floes. Les résultats obtenus avec les procédures de caractérisation Gram et de mise en évidence des lipides dans des conditions de stress environnementaux (famine et température) ont montré que les populations subissaient des modifications structurelles de la membrane. Nous avons constaté également que, pendant des périodes de famine aérobie, les inclusions lipidiques étaient consommées à température ambiante alors qu'en anaérobiose ce sont les polyphosphates. En absence ou présence d'oxygène à 4°C, il semblerait que les microorganismes filamenteux stockent plus aisément ces deux métabolites. La coloration *BacLight* a permis de quantifier la viabilité des boues en famine aérobie et a démontré que les bactéries filamenteuses ou zooglées étaient affectées contrairement à la microfaune (ciliés).

Abstract

The biological reactors of wastewater treatment by activated sludge are hosting a complex ecosystem, composed of different types of bacteria (filamentous, non filamentous), protozoa and metazoa. A good balance between the different types of bacteria is essential to achieve good settleability properties for the flocs in the clarifier. The flocs are formed by filamentous bacteria and exopolymers produced by zooglear bacteria. When filamentous bacteria are in excess, the flocs do not settle correctly (bulking and foaming phenomena). Methods based on image analysis have been used to detect and characterize automatically filamentous bacteria as well as the abundance of exopolymers. Monochrome or colour-images have been obtained by optical microscopy with classical (Gram, Neisser, Sudan Black) and fluorescent staining (*BacLight*, FISH). The validation of the different procedures was achieved on various full-scale treatment plants in Lorraine. Further experiments were carried out on lab-scale continuous and sequential reactors, in order to observe the effect of substrates, of temperature and starvation on the behavior of filamentous microorganisms. Under continuous or sequential aeration, for the same substrate, different Gram characteristics are observed. The study carried out on extracellular polymers with varying carbon/nitrogen ratios reveals that an excess of carbonaceous substance favors the production of polymers, which are essential for flocculation. The results obtained with the Gram and PHB (presence of lipids) procedures in condition of environmental stress (starvation and temperature) have shown that the populations have experienced structural alterations of their membranes. We have noticed that in periods of aerobic starvation the lipids which were present were used in ambient temperature, whereas in anaerobic conditions the polyphosphates were consumed. In absence or presence oxygen at a temperature of 4°C, it seems easier for filamentous bacteria to store those two metabolites. The *BacLight* coloration has shown that it was possible to quantify the viability of sludge under aerobic starvation and that filamentous or zooglear bacteria were affected, as opposed to the microfauna.

à Sylvie

*à Axelle
à Céline*

AVANT- PROPOS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur **Michel Sardin**, directeur du laboratoire des Sciences du Génie Chimique de m'avoir accueilli pour réaliser ce travail.

Je remercie Madame **Tatiana Görner** (maître de conférence INPL) d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie Monsieur **Nicolas Roche** (professeur à l'université d'Aix-Marseille), Monsieur **Hervé Vivier** (professeur à l'université de Saint Etienne) d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Monsieur **Dominique Dumas**, ingénieur de recherche (faculté de médecine), pour ses conseils et pour sa participation à ce jury.

Toute ma reconnaissance va à Mademoiselle **Marie Noëlle Pons**, directeur de recherche CNRS au LSGC, pour la qualité de ses conseils, pour le soin qu'elle a apporté à la direction de ce travail et pour la confiance qu'elle a su me témoigner.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont collaboré à ces travaux de thèse : Les professionnels de l'eau **David, Sylvie, Virginie, Stéphanie, Olivier Heyob** et mes stagiaires **Isabelle, Carole, Nathalie, Angeline et Andréa**.

Mes remerciements vont également aux permanents et doctorants du groupe SYSPOL (**Jean-Pierre, Abderrazak, François, Michel, Isabelle, Djalal, Nicolas**, du groupe GP2E (**Mehdi, Maria Magdalena, Farida, Ouadiaa, Ali, Ibrahim, Jean- François**) et du DCPR (**Francis**).

Aux "anciens" **Mauricio, Virginie, Farouk** sans oublier **Sébastien** pour ses cours de maintenance informatique.

Je ne saurais oublier mes amis, **Jéjé et Lina, Cathy, Sébastien et Houda**.

Enfin, je remercie toute **ma famille** pour son soutien et particulièrement mon amie, **Sylvie** pour sa patience, sa confiance en moi et ses précieux encouragements.

Table des matières

Nomenclature	
Introduction Générale	1
1. Revue Bibliographique	5
1.1 Principe du traitement biologique	6
1.1.1 Présentation succincte de la biomasse épuratrice des boues activées	7
1.1.2 Evolution d'une culture bactérienne	8
1.1.3 Le métabolisme microbien des boues activées	9
1.1.3.1 Structure des enveloppes bactériennes	9
1.1.3.2 Nutrition bactérienne	11
1.2 Les microorganismes et la microfaune des boues activées	12
1.2.1 La microfaune	12
1.2.1.1 Les protozoaires	12
1.2.1.2 Les métazoaires	13
1.2.3 Les principales communautés bactériennes des stations d'épurations	13
1.2.3.1 Les microorganismes responsables de l'élimination de l'azote	13
1.2.3.2 Les microorganismes responsables de l'élimination du phosphore	15
1.2.3.3 Les bactéries filamenteuses	16
a) Classification	16
b) Taxonomie des principales bactéries filamenteuses	17
1.2.4 Les substances de réserve chez les microorganismes des boues	21
1.2.4.1 Les poly- β -hydroxyalkanoates	21
1.2.4.2 Les polyphosphates	23
1.2.4.3 Le glycogène	23
1.3 Caractérisation des floccs biologiques	23
1.3.1 Les bactéries filamenteuses et la biofloculation	23
1.3.1.1 Modèle de formation des floccs (Erikson et al, 1984)	23
1.3.1.2 Modèle de formation des floccs (Jenkins et al, 1993)	25
1.3.2. Les composés extracellulaires contenus dans les floccs	25
1.3.2.1 Leurs origines	25
1.3.2.2 Le rôle et la composition des EPS	26
1.3.2.3 Mise en évidence des EPS	27
1.4 Les problèmes de décantation des boues	28
1.4.1 La croissance dispersée	28
1.4.2 Le bulking zoogléal	28
1.4.3 Le bulking filamenteux	28
1.4.4 Le moussage	29

1.5	Les méthodes d'observation appliquées à la biomasse bactérienne	30
1.5.1	Les méthodes de microscopie	30
1.5.1.1	Microscopie optique simple	30
1.5.1.2	Principe de la fluorescence	31
1.5.1.3	Microscopie à épifluorescence	32
1.5.1.4	Microscopie confocale à balayage laser	33
1.5.1.5	Microscopie confocale multi-photons	33
1.5.1.6	Micro autoradiographie (MAR)	34
1.5.2	Cytométrie de flux	34
1.5.3	L'analyse d'images	36
1.5.3.1	L'analyse d'images en biotechnologie	36
1.5.3.2	L'analyse d'images en traitement de l'eau	37
1.6	Coloration microscopique appliquée aux microorganismes des boues activées	38
1.6.1	Les colorations classiques en microscopie optique ou d'épifluorescence	38
1.6.1.1	Les colorations Noir de Soudan et Bleu du Nil	38
1.6.1.2	Colorations de Neisser, Loeffler et DAPI	39
1.6.1.3	Coloration à l'INT	40
1.6.1.4	Coloration classique de Gram	40
1.6.1.5	Coloration de viabilité	41
1.6.2	Les marqueurs moléculaires	41
1.6.2.1	Les sondes oligonucléotidiques	41
1.6.2.2	Colorations immunofluorescentes	43
1.6.2	Autres méthodes de biologie moléculaire	44
	Conclusion	46
2	Matériels et méthodes	47
2.1	Présentation des sites de prélèvements et des appareils pilotes	48
2.1.1	Station d'épuration de Nancy-Maxéville	48
2.1.2	Station d'épuration de Pont-à-Mousson	50
2.1.3	Station de Baccarat	50
2.1.4	Les petites stations de traitement d'eau usée	51
2.1.5	Pilote de boues activées	51
2.1.6	Les réacteurs discontinus séquentiels de laboratoire	52
2.1.6.1	Le réacteur discontinu séquentiel de type 1	52
2.1.6.2	Le réacteur discontinu séquentiel de type 2	53
2.1.6.3	Les colonnes à bulles	53
2.1.7	La biomasse épuratrice et les alimentations en substrat	54
2.1.7.1	Origine de la biomasse	54
2.1.7.2	Les alimentations	54
2.2	Les méthodes analytiques	55
2.2.1	Les concentrations des boues	55
2.2.1.1	Les matières sèches : MS	55
2.2.1.2	Les matières en suspension : MES	55
2.2.1.3	Les tests de décantation	55
2.2.1.4	L'indice de Mohlman (<i>IM</i>)	56
2.2.1.5	L'indice de boues (<i>IB</i>)	56
2.2.2	pH et potentiel redox	56
2.2.3	Mesure du carbone organique total	56
2.2.4	Le dosage des polysaccharides des boues	56

2.2.5	La spectrophotométrie d'absorption UV-Visible	58
2.2.6	Spectro-photocolorimètre HACH 2400	58
2.2.6.1	Turbidité	58
2.2.6.2	L'ammonium	59
2.2.6.3	La DCO	60
2.3	Les préparations microscopiques	61
2.3.1	Préparations sans coloration	61
2.3.1.1	Etat sec	61
2.3.1.2	Etat frais	61
2.3.2	Préparations avec les colorations classiques	62
2.3.2.1	La coloration de Gram	62
2.3.2.2	La coloration de Neisser	63
2.3.2.3	La coloration de Loeffler	63
2.3.2.4	La coloration Noir de Soudan	64
2.3.2.5	La coloration à l'encre de chine (India ink)	65
2.3.2.6	La coloration à l'INT	65
2.3.2.7	La coloration au DAPI	66
2.3.2.8	La coloration <i>BacLight</i>	67
2.3.3	Préparation avec un marqueur moléculaire (FISH)	68
2.3.3.1	Coloration FISH	68
2.4	Les systèmes d'acquisition des images	70
2.4.1	Les échantillons	70
2.4.2	Système d'acquisition en microscopie optique	70
2.4.3	Système d'acquisition en microscopie d'épifluorescence	71
2.4.4	Logiciel de traitement d'images	71
2.5	L'analyse d'images	72
2.5.1	Les caractéristiques des images	72
2.5.1.1	Les images monochromes	72
2.5.1.2	Les images couleurs	72
2.5.2	Les principales transformations d'analyse d'images	73
2.5.2.1	Seuillage	73
2.5.2.2	Erosion et dilatation	73
2.5.2.3	Ouverture et fermeture	74
2.5.2.4	Erosion et reconstruction	74
2.5.2.5	Squelettisation	74
2.5.3	Les programmes d'analyse d'images appliqués aux boues activées	75
2.5.3.1	Transformation des images couleurs en images monochromes	75
2.5.3.2	Programme Noir sec (annexe A)	75
2.5.3.3	Programme Gram (annexe A)	77
2.5.3.4	Programme PHB (annexe A)	80
2.5.3.5	Programme EPS (annexe A)	82
2.5.3.6	Programme Viabilité (annexe A)	82

3	Etudes morphologiques et physiologiques des boues par analyse d'images	83
3.1	Validation des différentes méthodes d'analyse d'images	84
3.1.1	Validation de la méthode de caractérisation Gram	84
3.1.2	Validation de la méthode d'analyse d'images pour quantifier les polymères extracellulaires (EPS)	86
3.1.3	Etude comparative de la morphologie par deux méthodes : état sec et frais	86
3.1.4	Validation de la méthode « Noir sec » pour l'étude de la morphologie des floes et des bactéries filamenteuses	87
3.1.5	Viabilité de la biomasse des boues	89
3.2	Problèmes rencontrés au cours de certaines colorations	90
3.2.1	Les méthodes classiques de coloration : INT, Loeffler et DAPI	90
3.2.2	La méthode FISH appliquée aux boues activées	91
3.3	Etude technico-économique et avantages sur les différentes colorations	92
3.4	Les méthodes d'analyse d'images appliquées aux suivis de stations d'épuration	92
3.5	Influence des substrats sur les différents réacteurs	98
3.5.1	Pilote de boues activées	98
3.5.1.1	Alimentation continue S1 et alimentation alternée (un jour sur deux S2)	98
3.5.1.2	Etude comparative entre l'alimentation continue S1 et l'alimentation S3 (amidon, glucose)	101
3.5.1.3	Etude de l'alimentation alternée S4 : ((extrait de viande), (amidon, glucose))	103
3.5.2	Les réacteurs séquentiels continus	106
3.5.2.1	Les différentes phases du cycle	106
3.5.2.2	Comportements de différents substrats sur un réacteur SBR	106
3.5.2.3	Influence des milieux composés de protéines S1, d'acétate S5 ou d'effluent brut S6	106
3.5.2.4	Etude du rapport C/N sur les bactéries filamenteuses des boues activées	113
3.5.3	Evolution de la biomasse des boues pendant des périodes de famine	117
3.5.3.1	Evolution des boues en conditions aérobie ou anaérobie à 20°C ou 4°C	117
3.5.3.2	Etude du comportement des microorganismes filamenteux avec un ajout d'acétate suivi d'une famine aérobie	122
3.6	Etude de la viabilité bactérienne et du comportement de la microfaune en condition de famine aérobie	125
	Conclusion générale et perspectives	129
	Références bibliographiques	133
	Annexes	

Nomenclature

Abréviations et sigles

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
CMF	Cytométrie de flux
COT	Carbone organique total
DBO5	Demande Biochimique à 5 jours
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DGGE	Electrophorèse à gel dénaturant
EH	Equivalent Habitant
EPS	Exopolysaccharides
FISH	Hybridation de fluorescence in situ
FTU	Unité Formazine de Turbidité
GAO	Glycogen accumulating organisms
IB	Indice de boue à 30 minutes
IM	Indice de Mohlman
Lf	Longueur des filaments
Ls	Longueur du squelette filamenteux
MES	Matières en Suspension
Nf	Nombre de filament
NTK	Azote total Kjeldahl (azote organique + N-NH ₄ ⁺)
NTU	Unité Néphélométrique de Turbidité
PAO	Organisme accumulant le phosphore
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Poly-hydroxyalcanoate
PHB	Poly-β-hydroxybutyrate
PHV	Poly-β-hydroxyvalerate
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RPM	Rotation par minute
S1, S2 ...	Substrats
SBR	Réacteur discontinu séquentiel
Sf	Surface des floccs
St	Surface totale des floccs
STEP	Station d'épuration
UA	Unité arbitraire

Symboles latins

A	Absorbance
Deq	Diamètre équivalent
dx/dt	Vitesse de croissance
M _{2x} , M _{2y}	Moment de 2 nd ordre sur l'axe X ou Y

p Proportion de pixels
rg Rayon de giration

Symboles grecs

λ Longueur d'onde
 γ Grandissement

INTRODUCTION GENERALE

D'ici le milieu du 21^{ème} siècle, en seulement cinquante ans la population mondiale aura augmenté de cinquante pour cent, passant de six milliards fin 1999 à près de neuf milliards en 2050 (Conseil Mondial de l'Eau). La consommation quotidienne en eau par habitant dans les zones résidentielles s'élève à 600 litres en Amérique du Nord et au Japon et entre 250 et 350 litres en Europe. Concernant les pays d'Afrique la répartition est toute autre, puisque l'on estime la consommation moyenne par habitant et par jour entre 10 et 20 litres. La nécessité de protéger l'eau de l'impact des activités humaines devient incontournable puisque la pollution porte atteinte à sa capacité d'auto-épuration. Pour maintenir ou améliorer la qualité de la ressource en eau, il est donc nécessaire de lutter contre la pollution, par l'assainissement des eaux usées domestiques et des rejets industriels ou agricoles.

Les procédés d'épuration des eaux sont très nombreux que ce soit dans le domaine urbain ou industriel. La technique la mieux adaptée à chaque situation (bassin aérobie, anaérobie, lit bactérien, disques biologiques...) doit être choisie. Le traitement par lagunage a été dans un premier temps mis à l'écart, mais il retrouve de nos jours une nouvelle vie. Ce type de procédé peut très bien permettre un traitement principal (minéralisation complète de l'effluent), ou compléter le traitement d'un effluent qui a été au préalable traité par des procédés sus-cités.

Les premiers procédés par boues activées ont été conçus par les Anglais Arden et Lockett à Manchester en 1913. Cette technique ne s'est pas développée immédiatement en Europe, mais les Etats-Unis l'ont utilisée dès 1918. Elle est réapparue en Europe après la guerre de 1939-1940. De constantes améliorations ont ensuite été apportées depuis les années 1980 car la pollution organique n'est plus la seule à être éliminée. Le sont également les pollutions azotée ou phosphorée.

Le principe général consiste à cultiver des microorganismes principalement aérobies, capables de consommer la pollution organique contenue dans les effluents. Les bassins d'aération sont des écosystèmes très complexes contenant des bactéries filamenteuses ou non filamenteuses, des protozoaires et des métazoaires. Cette microfaune est mise en contact avec de l'eau usée pour former la liqueur mixte qui est ensuite acheminée vers un décanteur où l'on sépare la biomasse de l'eau épurée.

L'étape de séparation entre la biomasse (boues) et l'eau épurée est prioritaire pour le bon fonctionnement d'une exploitation. Sous l'influence de facteurs chimiques (richesse du milieu en glucides et lipides) ou physiques (aération...) les bactéries filamenteuses ont la faculté de se multiplier rapidement, provoquant des enchevêtrements entre les floes et empêchant les boues de décanter.

La prolifération de ces microorganismes est donc « un cauchemar » pour l'exploitant d'une station d'épuration. Les principaux dysfonctionnements rencontrés sont généralement le foisonnement (bulking) et le moussage. Mais on peut se heurter à d'autres phénomènes comme le floc tête d'épingle dû à la présence de très petits floccs, qui provoque une perte de la biomasse par la surverse du décanteur : ce désordre est lié cette fois-ci à la quasi absence des bactéries filamenteuses.

La quantification des microorganismes filamenteux se fait généralement de manière manuelle. Sezgin et al (1978) ont développé une procédure pour mesurer la longueur totale des filaments. Cette procédure utilise huit classes selon l'abondance des bactéries filamenteuses. Plus récemment l'identification manuelle des espèces filamenteuses a été réalisée à l'aide de colorations de Gram ou de Neisser. Elle prend également en compte la morphologie des microorganismes (Jenkins et al, 1993). Toutes ces méthodes demandent cependant beaucoup de temps d'observation pour les opérateurs. Des techniques de biologie moléculaire comme, l'hybridation in situ (FISH) couplées à la microscopie optique sont apparues pour l'identification et l'énumération des espèces (Blackall et al, 1996 ; Pernelle et al, 2001), à condition de disposer des sondes propres à chaque espèce.

De nos jours, il manque encore des dispositifs automatiques capables de suivre l'état physiologique des bactéries filamenteuses dans les boues activées avant ou pendant des dysfonctionnements biologiques. D'une manière générale, les méthodes de coloration « classique » (figure n°1) telles que celles de Gram ou Neisser, à base de Noir de Soudan, *Bac* Light (colorant de viabilité) ou avec un marqueur moléculaire (figure n°1) permettent de mettre en évidence les différentes activités des microorganismes. La quantification du signal « couleur » permet de caractériser l'état physiologique des bactéries.

La présence de macromolécules biologiques (exopolymères) dans ces boues, qu'elles soient produites par les microorganismes ou présentes dans l'effluent brut joue également un rôle important dans la stabilité du floc biologique (Eriksson et al, 1984). Jusqu'à présent, seuls des procédés d'extraction de ces polymères étaient envisagés (Lui et al, 2002 ; Frolund et al, 1996). L'utilisation de l'analyse d'images nous a permis de développer une nouvelle technique de quantification des exopolymères à partir d'une coloration classique à l'encre de Chine.

Le lecteur trouvera dans ce manuscrit les différentes techniques d'analyse d'images qui ont été développées à partir d'images monochromes ou couleurs. Ce travail est basé initialement sur les résultats de Da Motta et al (2001) portant sur l'étude morphologique des floccs par analyse d'images. Une des principales différences repose sur la préparation des échantillons. En effet, les critères morphologiques ont été révélés non par une observation à l'état frais comme chez Da Motta mais par fixation à chaleur douce. Pour aller au-delà de la caractérisation morphologique, une quantification physiologique basée sur des colorations cytoplasmiques a été développée.

Un ensemble de colorants (Gram, Neisser, Noir de Soudan) permet une caractérisation physiologique rapide et peu coûteuse, contrairement à la technique d'hybridation in situ par sondes d'oligonucléotides fluorescents (FISH).

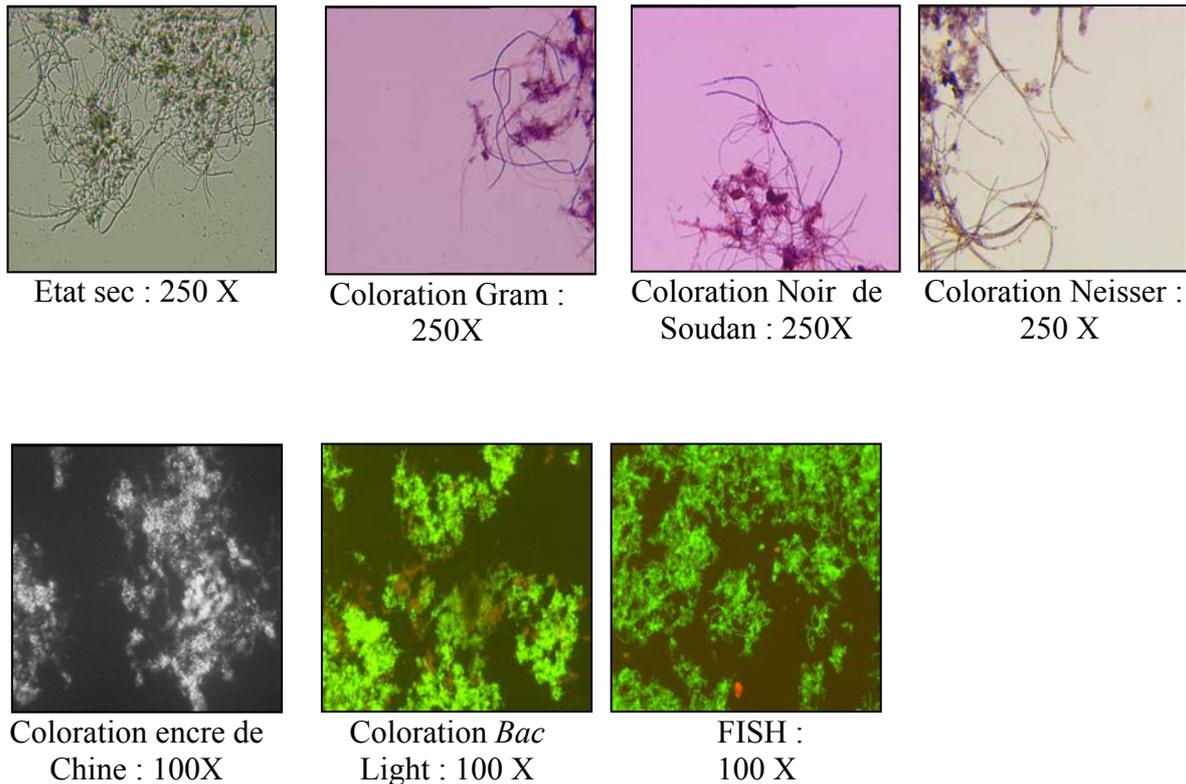


Figure n°1 : Présentation des différentes colorations microscopiques.

L'objectif de ce travail est double: dans un premier temps, développer des procédures automatiques d'analyse d'images qui puissent permettre de quantifier les microorganismes filamenteux, suivre le métabolisme microbien (poly- β -hydroxybutyrates, polyphosphates, polymères extracellulaires) et mesurer la viabilité de la biomasse des boues de façon rapide et facile. Dans un second temps, mettre en application ces méthodes sur site ou sur des unités pilotes pour déterminer s'il est possible de les utiliser en routine pour détecter les changements biologiques.

Plan d'étude

Le premier chapitre de ce mémoire présente une brève introduction du principe du traitement biologique par boues activées. Il nous renseigne également sur l'identification des différentes espèces de microorganismes et de la microfaune présente dans cet écosystème. Le lecteur trouvera dans les parties qui suivent des renseignements concernant le rôle des biopolymères extracellulaires (EPS), sur la structure biologique des floes et les techniques de colorations microscopiques applicables aux bactéries des boues activées.

Le second chapitre présente les matériels et méthodes employés pour la réalisation de ces études. Dans un premier temps sont présentées les différentes installations pilotes (réacteur continu à recyclage de boues, réacteur séquentiel discontinu), ainsi que les méthodes analytiques nécessaires aux expérimentations et les programmes d'analyse automatique d'images utilisés.

Le troisième chapitre est consacré à la validation des différentes procédures d'analyse d'images. Afin de vérifier la robustesse de la démarche, nous avons réalisé des tests sur des boues activées provenant de plusieurs installations de traitement d'eaux usées.

Les stations d'épuration ne rencontrent pas toujours des problèmes de dysfonctionnements biologiques. Il était donc nécessaire de créer sur des réacteurs pilotes des conditions de croissance particulière (stress environnementaux induits par l'alimentation, la température, l'oxygénation, les bactéricides...) pour visualiser les variations morphologiques ou physiologiques des bactéries filamenteuses à partir de nos procédures.

CHAPITRE 1

Revue Bibliographique

La revue bibliographique à laquelle est consacrée ce chapitre est divisée en six parties.

La première partie (1.1) est une introduction au principe du traitement biologique par boues activées. Sont également décrits l'évolution de la biomasse bactérienne et le métabolisme microbien.

La seconde partie (1.2) nous renseigne sur l'identification et la classification des différentes espèces de microorganismes et de la microfaune présentes dans les boues activées.

La caractérisation des floccs est décrite dans la partie (1.3). Cette dernière présente les différents modèles permettant d'expliquer la formation et la structure des floccs ainsi que le rôle des composés polymériques extracellulaires (EPS) situés à l'intérieur et l'extérieur de ceux-ci.

La partie (1.4) résume l'ensemble des problèmes de décantation des boues : croissance dispersée, bulking, moussage et la partie (1.5) présente les techniques d'analyse (microscopies biologie moléculaire, analyse d'images) appliquées à l'identification de la biomasse bactérienne.

Enfin dans la dernière partie (1.6), le lecteur trouvera l'ensemble des colorations classiques ou fluorescentes utilisées pour l'identification des microorganismes des boues en microscopie optique et d'épifluorescence.

1.1 Principe du traitement des eaux par boues activées

Le procédé d'épuration par boues activées consiste à mettre en contact dans un réacteur biologique aéré des effluents chargés en polluants avec une biomasse épuratrice. L'organisation générale d'une station d'épuration est schématisée sur la figure n° 1.1.1.

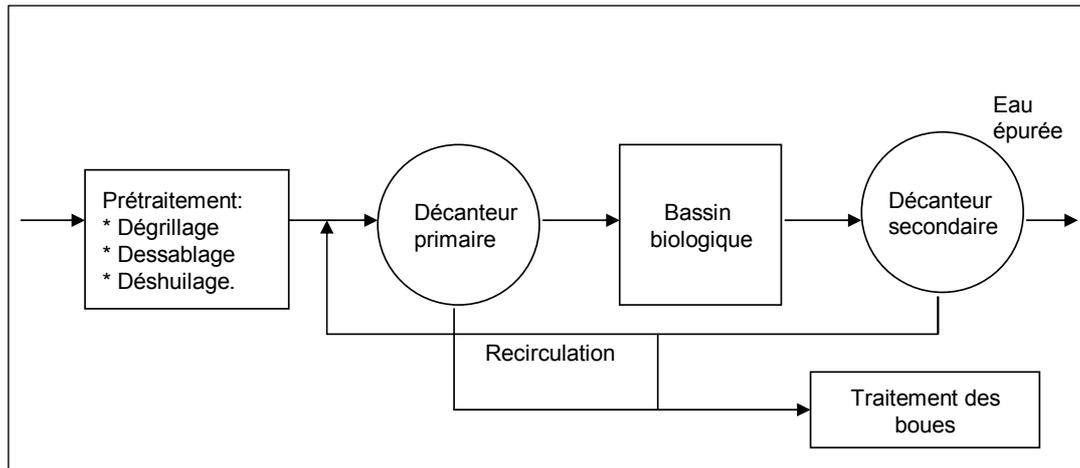


Figure n° 1.1.1 : Schéma simplifié d'un système d'épuration par boues activées

- Le prétraitement

Il permet d'éliminer les matières les plus grossières susceptibles d'endommager les appareillages ou de perturber les étapes ultérieures. On trouve au niveau du prétraitement des systèmes mécaniques (dégrilleur, tamis) et des systèmes physiques qui font appel à des procédés de décantation pour les sables (désableur) et de flottation pour les graisses.

- La décantation primaire

Il s'agit d'une décantation qui permet d'éliminer les matières en suspension décantables et donc de diminuer la concentration en pollution à l'entrée du bassin biologique. Dans certains procédés on utilise des réactifs chimiques pour favoriser la décantation des petites particules. Les boues soutirées du décanteur sont dirigées vers le traitement de boues (digestion anaérobie, centrifugation, séchage).

- Le bassin biologique

La plupart des procédés destinés à l'épuration des eaux usées d'origine urbaine ou industrielle font intervenir une phase biologique aérobie (figure n°1.1.2). Au cours de cette phase, les microorganismes dégradent la matière organique par oxydation et les matières en suspension (MES) sont retenues par les bioflocs. Les bactéries retirent de cette opération l'énergie nécessaire à leur survie et la synthèse de composés de réserve. L'alternance d'un bassin d'anoxie et d'un bassin d'aération permet de réaliser l'élimination des matières azotées. C'est dans le bassin d'anoxie qu'a lieu la dénitrification. Il reçoit la liqueur mixte qui assure

l'apport en nitrates formés dans le bassin d'aérobie, les eaux brutes et les boues recirculées qui maintiennent la concentration en flore dénitrifiante.



Figure n°1.1.2 : Bassin biologique
(station d'épuration de Toul (54))

La présence des microorganismes dans le bassin biologique entraîne le développement d'une microfaune composée principalement d'organismes prédateurs (protozoaires et métazoaires). L'ensemble de tous ces microorganismes représente ainsi l'édifice biologique de la station. Les bactéries et la microfaune sont spécifiques du type de traitement de l'installation. De nombreuses espèces de bactéries filamenteuses existent normalement en faibles quantités dans les boues. Elles ne présentent une gêne pour l'exploitant que lorsque leur développement est excessif et qu'elles envahissent le milieu.

- La décantation secondaire

Cette phase du traitement permet de séparer par décantation les floccs bactériens formés dans le bassin et l'eau épurée. Une partie des boues épaissies au fond du décanteur est recirculée vers le bassin biologique pour maintenir une concentration optimale en boues. L'excédent des boues est extrait et envoyé vers le traitement des boues. L'apparition éventuelle des phénomènes de bulking ou de moussage provoque des dysfonctionnements importants au cours de cette étape. Le bon fonctionnement de l'étape de décantation secondaire conditionne donc l'efficacité du procédé de boues activées.

1.1.1 Présentation succincte de la biomasse épuratrice des boues activées

Les boues sont essentiellement composées de bactéries vivantes et mortes, aérobies facultatives de petite taille allant du micromètre au millimètre. A titre d'exemple, le dénombrement de la population prélevée sur une station de boues activées donne le type de valeurs présentées dans le Tableau 1.1.1.

Tableau 1.1.1 : Populations des boues activées (d'après Canler et al, 1999)

Population par litre de boues	Espèces
De 1 à $5 \cdot 10^5$ / L	Métazoaires (rotifères, nématodes)
10^7 / L	Protozoaires (flagellés, ciliés)
10^{12} / L	Bactéries (floculées, filamenteuses)

Les boues activées forment donc un écosystème très complexe où cohabitent différentes souches bactériennes et une microfaune. Les bactéries trouvées dans les boues peuvent être :

- de type unicellulaire de forme sphérique ou cylindrique (0,5 et 5 μm)
- de type pluricellulaire dont la taille est souvent comprise entre 10 et 500 μm .

Un classement en fonction de la source carbonée est possible :

- les bactéries utilisant à la fois la matière organique comme source de carbone et comme source énergétique pour le métabolisme appelées hétérotrophes.
- les germes autotrophes utilisant le carbone des bicarbonates et du CO_2 comme source de carbone.

Dans les procédés de boues activées, ces deux populations cohabitent alors que leurs métabolismes sont très différents.

1.1.2 Evolution d'une culture bactérienne

L'évolution progressive de la masse totale des microorganismes présents dans des procédés biologiques aérés ou anoxiques peut se représenter par une courbe spécifique (figure n° 1.1.3). On distingue quatre phases principales souvent précédées d'une phase préliminaire (Phase 1).

- Phase (1) de latence (adaptation) : les bactéries synthétisent des enzymes nécessaires à la métabolisation du substrat. Durant cette phase, il n'y a pas de production cellulaire et la vitesse de croissance est nulle : $dx/dt = 0$, x étant la concentration bactérienne.
- Phase (2) de croissance exponentielle : pendant cette période, les bactéries se multiplient à une vitesse donnée par leur temps de génération et leur affinité pour le substrat non limitant.
- Phase (3) de ralentissement : elle se caractérise par une diminution de la vitesse de croissance. Ce phénomène peut s'expliquer par un épuisement du milieu nutritif ou par l'accumulation de produits inhibiteurs provenant du métabolisme bactérien.
- Phase (4) stationnaire : la vitesse de croissance devient nulle.
- Phase (5) de déclin (ou phase endogène) : la population de bactéries vivantes diminue du fait du taux de mortalité. Au cours de cette phase, les bactéries consomment de l'oxygène nécessaire à leur maintenance : on parle de phase endogène.

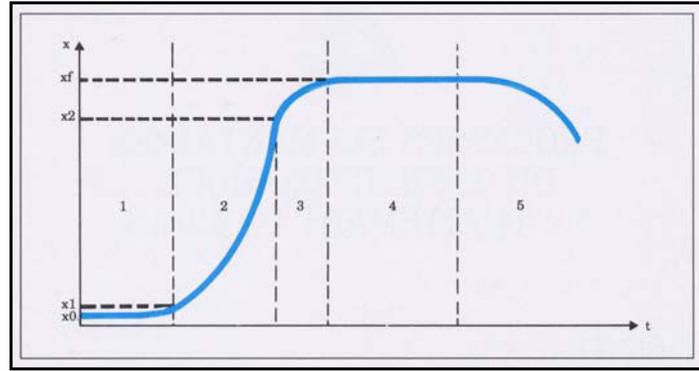


Figure n° 1.1.3 : Courbe de croissance des microorganismes (Degrémont, 1989)

1.1.3 Le métabolisme microbien des boues activées

1.1.3.1 Structure des enveloppes bactériennes

- La paroi

C'est une enveloppe rigide qui assure la forme de la bactérie. La structure de la paroi est différente selon qu'il s'agit de bactéries Gram positif ou Gram négatif. Toutefois on trouve dans les deux éventualités un constituant commun, le peptidoglycane.

C'est une macromolécule qui entoure la bactérie et qui est composée de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des petits peptides qui lui donnent une structure réticulée. La chaîne polysaccharidique est faite de l'alternance de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acetyl-muramique. Le peptidoglycane peut être dégradé par une enzyme comme le lysozyme qui rompt la chaîne polysaccharidique.

La méthode de Gram permet de classer les bactéries en deux groupes : Gram+ et Gram-. Cette technique repose sur les différences existant au niveau de la paroi bactérienne (épaisseur du peptidoglycane). Après l'application du protocole de coloration adéquat, les bactéries Gram+ sont colorées en bleu alors que les bactéries Gram- le sont en rose, à partir du cristal violet et de la safranine.

La paroi des bactéries Gram positif est relativement épaisse (figure n° 1.1.4) et constituée en majeure partie par le peptidoglycane. Cette barrière empêche toute sortie du cristal violet et colore en bleu les microorganismes (Beveridge, 1999). On trouve également d'autres constituants en moins grande quantité, notamment les acides teichoïques.

La paroi des bactéries Gram négatif est constituée d'une fine couche de peptidoglycane et elle est recouverte par une autre couche contenant des protéines, des lipides et des lipopolysaccharides (figure n° 1.1.5). La perméabilité de la paroi à l'alcool explique le caractère Gram négatif des bactéries.

- La membrane cytoplasmique

Elle est située sous la paroi, et contient des protéines et des lipides. Les fonctions de la membrane cytoplasmique sont nombreuses. Elle forme une barrière osmotique et contient des systèmes de transport qui assurent la pénétration sélective de substances (sucres, ions, acides aminés...). On y trouve également les systèmes enzymatiques qui interviennent dans le métabolisme énergétique.

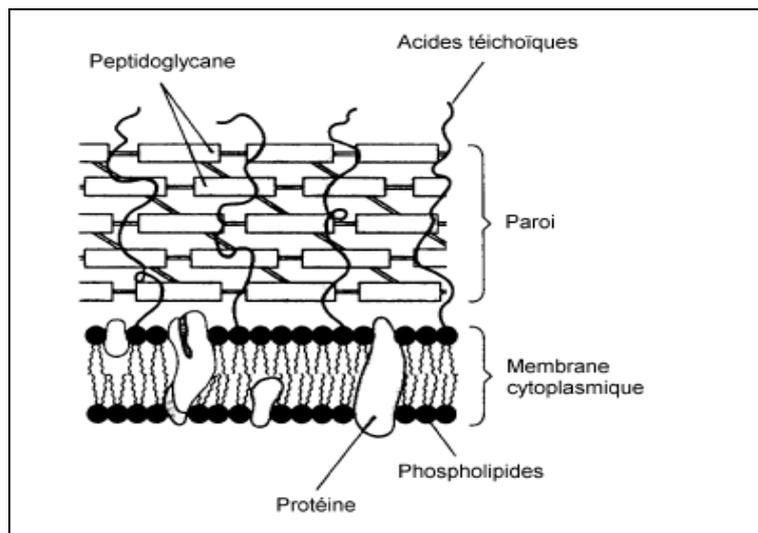


Figure n° 1.1.4 : Structure de la paroi Gram+ (Moreda, 2004)

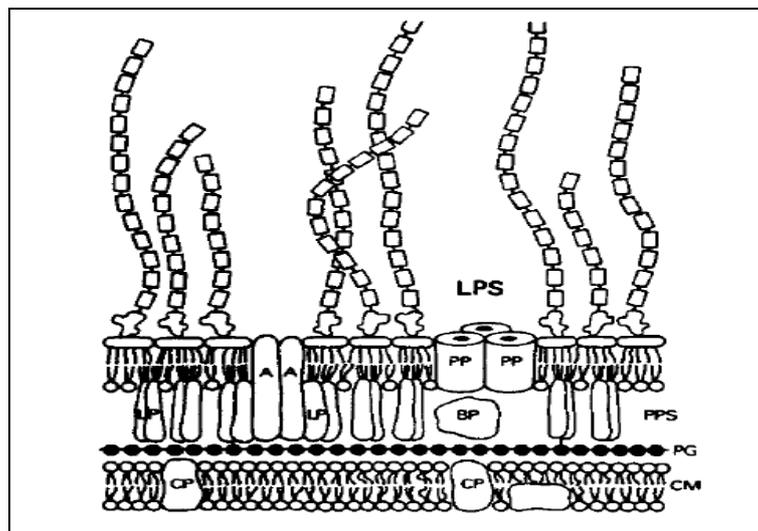


Figure n° 1.1.5 : Structure de la paroi Gram- (Moreda, 2004) :

LPS : lypopolysaccharide ; A : protéine ;
 PP : porine ; LP : lipoprotéine BP : protéine Fixatrice ;
 PG : peptidoglycane ; CM : membrane cytoplasmique

1.1.3.2 Nutrition bactérienne

La dégradation de la pollution est composée de deux grandes étapes :

- Transport des substrats vers la bactérie
- Métabolisation du substrat

Les molécules simples ou de petite taille peuvent diffuser à travers la paroi bactérienne, alors que les molécules plus complexes doivent être au préalable hydrolysées par des systèmes enzymatiques extracellulaires (sécrétés par les microorganismes) avant d'être absorbées. Le schéma de la figure n°1.1.3 résume le métabolisme nutritionnel bactérien. Cette étape de biosorption est relativement rapide par rapport à celle de métabolisation.

Après la phase d'absorption les molécules subissent une oxydation soit pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (ATP = Adénosine Tri Phosphate), soit pour synthétiser de nouveaux constituants cellulaires. Ces différents constituants servent à l'élaboration et au stockage des granules lipidiques, de polyphosphates ou de polysaccharides qui peuvent être sécrétés ou excrétés de la cellule pour former du mucilage (Edeline, 1993).

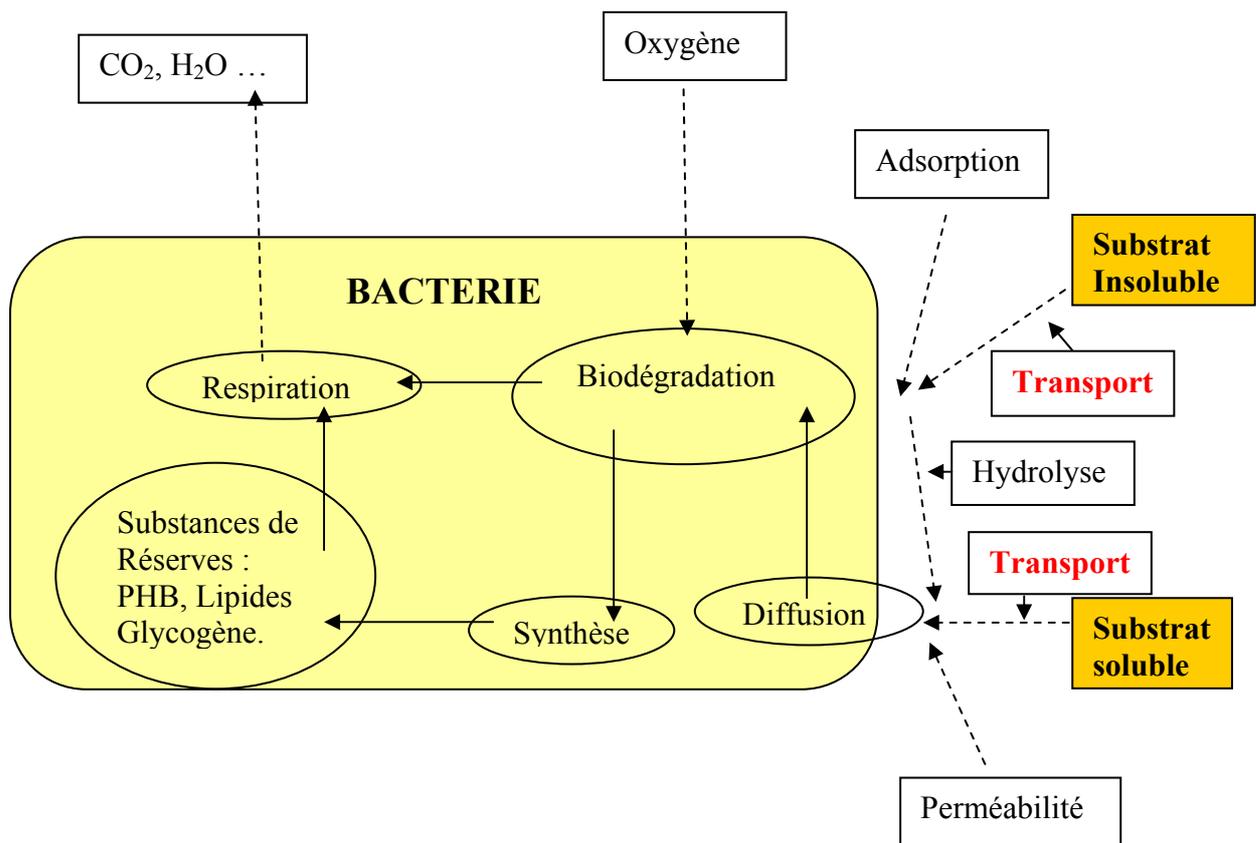


Figure n ° 1.1.6 : Schéma de nutrition bactérienne (d'après Edeline, 1993)

1.2 Les microorganismes et la microfaune des boues activées

L'observation rapide et simple par microscopie optique permet d'identifier les protozoaires, métazoaires et bactéries filamenteuses de morphologies particulières comme par exemple *Nocardia sp.* Les bactéries filamenteuses des boues activées recouvrent une grande diversité de genres bactériens qu'il est nécessaire de pouvoir distinguer. L'utilisation de colorations « classiques » telles que Gram, Neisser, Noir de Soudan va donc permettre de caractériser facilement la morphologie et la physiologie de ces microorganismes.

1.2.1 La microfaune

Elle représente une quantité de cellules de l'ordre de 10^5 à 10^7 individus (Canler et al, 1999) par litre de boues activées. Cette microfaune joue un rôle de prédateur des bactéries isolées et des bactéries mortes et ainsi participe à la clarification des effluents. Selon l'organisation cellulaire des microorganismes, on distingue deux familles principales :

- Les protozoaires
- Les métazoaires.

1.2.1.1 Les protozoaires

Ce sont des organismes eucaryotes, unicellulaires, mobiles et de taille pouvant aller de 1 à 500 μm . Ils se nourrissent essentiellement de bactéries (Gerardi et al, 1990) et de molécules organiques dissoutes. Le rôle principal de ces protozoaires est avant tout la clarification de l'effluent par prédation des bactéries libres. Les protozoaires sont de très bons indicateurs du fonctionnement des stations d'épuration. En effet cette microfaune est très sensible aux modifications environnementales : substrats, oxygène dissous, toxiques... (Degrémont, 1989). La prédation peut être effectuée par broutage des bactéries à la surface des floes par des protozoaires rampants. De plus, certains auteurs notent que le rôle bactériophage au niveau des floes permet de maintenir des populations bactériennes jeunes pouvant assimiler plus facilement la matière organique (Rejsek, 2002).

Il existe un grand nombre d'espèces de protozoaires fixés ou mobiles au niveau des floes. D'après Madoni et al (1994), ce sont en général des ciliés (*Vorticelles*, *Epistylis*...) de l'ordre de 10^6 individus /L. L'âge des boues est un facteur important intervenant au niveau de la croissance des protozoaires. La figure n° 1.2.1 nous présente l'évolution des différents groupes de microorganismes.

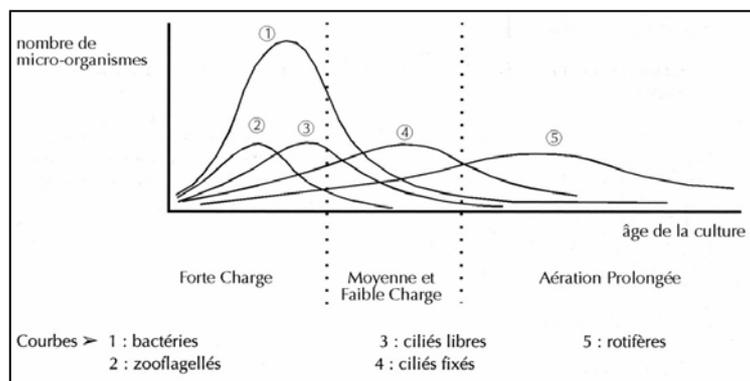


Figure n° 1.2 .1 : Evolution des microorganismes en fonction de l'âge des boues (Canler et al, 1999)

1.2.1.2 Les métazoaires

Les métazoaires sont des organismes pluricellulaires dont la taille peut aller de 100 µm à 1 mm. Leur organisation cellulaire est plus complexe que celle des microorganismes unicellulaires et leur cycle de croissance est très lent. On les trouve essentiellement dans des installations avec des âges de boues élevés (stations à faible charge ou aération prolongée).

Parmi les principaux métazoaires présents dans les boues activées des stations d'épuration, on retrouve essentiellement deux familles :

- Les nématodes
- Les rotifères.

Les nématodes sont présents dans les boues subissant une digestion aérobie. On les trouve dans les floes (Canler et al, 1999) et leur rôle de prédateur bactérien leur permet de contribuer au renouvellement de la biomasse épuratrice.

Un âge de boue élevé est favorable au développement de rotifères. Leur présence stimule l'activité et la décomposition de la microflore (algues). Assez sensibles aux composés toxiques, ils se développent dans des boues âgées et bien oxygénées. (Degremont, 1989).

1.1.2 Les principales communautés bactériennes des stations d'épuration

L'examen microscopique des boues montre qu'il s'agit d'un milieu hautement complexe où se rencontre un grand nombre de bactéries libres, filamenteuses ou flocculées. Cette microflore représente 10^{11} à 10^{12} bactéries par litres de boues activées (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*...).

1.2.2.1 Les microorganismes responsables de l'élimination de l'azote

a) Au cours de la nitrification

Les approches moléculaires et plus particulièrement le séquençage des acides nucléiques ont permis d'établir les caractéristiques phylogénétiques de ces bactéries.

Les bactéries nitrifiantes se répartissent en deux groupes :

- Un groupe oxydant l'ammonium en nitrites : les bactéries nitritantes
- Un groupe oxydant les nitrites en nitrates : les bactéries nitratantes

Ces bactéries se présentent en agrégats sous forme de zooglées. Leur taille est de l'ordre du µm. Les cellules ont généralement des formes de sphère, de bâtonnet, d'ellipse et peuvent être mobiles (existence de flagelles) ou non. Parmi les deux groupes de microorganismes, on trouve (figure n° 1.2.2) :

- Chez les nitritantes : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Mitrosovibrio*.
- Chez les nitratantes : *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*

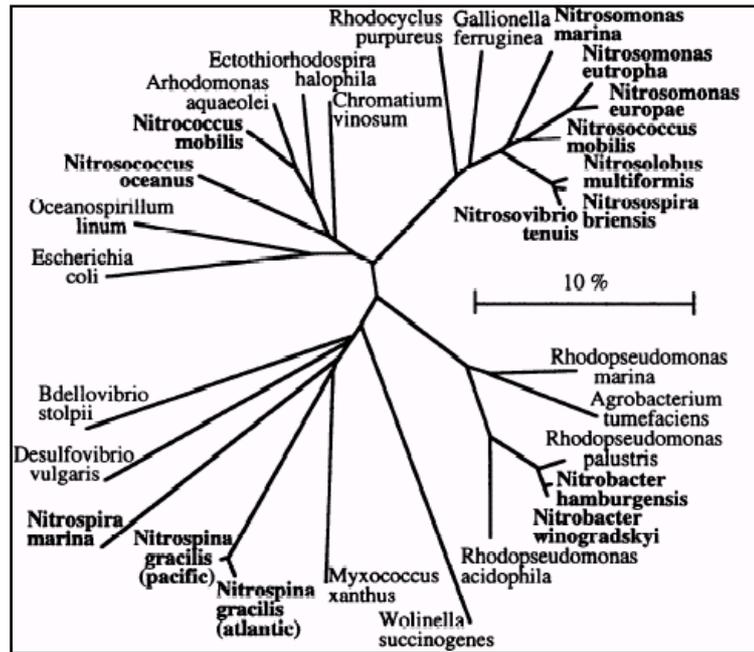


Figure n° 1.2.2 : Arbre phylogénique des protéobactéries (Teske et al, 1994)

De manière générale, les bactéries responsables de la nitrification appartiennent aux genres *Nitrosomonas* (Suwa et al, 1994) et *Nitrosococcus* (Juretschko et al, 1998) et celles responsables de la nitrification appartiennent aux genres *Nitrobacter* et *Nitrococcus*. Elles sont lithotrophes et utilisent de l'énergie dégagée pour assimiler le carbone minéral (autotrophe) sous forme de CO₂.

La réaction de nitrification se décompose en deux étapes :



L'enthalpie libre dégagée lors de la réaction permet la resynthèse de l'ATP. La nitrification nécessite l'intervention de deux enzymes : l'ammoniaque mono oxygénase et l'hydroxylamine oxydase.

b) Au cours de la dénitrification

Au cours de la dénitrification l'ion NO₃⁻ est l'accepteur final d'électrons au niveau de la chaîne de respiration. Les principales bactéries concernées sont : *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Thiobacillus* et *Pseudomonas*.

Elles sont hétérotrophes et présentent une vitesse de croissance élevée.

La réaction globale de dénitrification s'écrit :



Il est à noter que les vraies bactéries dénitrificatrices possèdent un système enzymatique (nitrate réductase) permettant la réaction du protoxyde d'azote :



En réalité la dénitrification nécessite quatre systèmes enzymatiques (Tableau 1.2.1).

Tableau 1.2.1 : Système enzymatique intervenant dans la dénitrification (Cardot, 1999)

Enzyme	Nitrate réductase	Nitrite réductase	Oxyde nitrique réductase	Oxyde nitreux réductase
Réaction	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

1.2.2.2 Les microorganismes responsables de l'élimination du phosphore

Les bactéries impliquées dans la déphosphatation sont répertoriées dans la littérature en deux grandes familles (Wagner, 2002).

- Les PAO : (Polyphosphate Accumulating Organisms)

Ce sont des organismes capables de stocker des PHA (polyhydroxyalkanoates) en anaérobiose en utilisant de l'énergie issue de l'hydrolyse des phosphates et de consommer les orthophosphates en condition aérobie en hydrolysant les PHA.

Les récents travaux de Seviour et al (2003) montrent que les principales bactéries appartenant au groupe des PAO sont : *Acinetobacter spp*, β - *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Rhodocyclus* (figure 1.2.3).

On trouve parmi les espèces bactériennes responsables du phénomène de déphosphatation biologique, majoritairement, le genre *Acinetobacter spp*. C'est un coccobacille aérobie strict, Gram négatif, utilisant comme substrat carboné, l'acétate, l'éthanol et le succinate mais en aucun cas le glucose et le lactose.

- Les GAO : (Glycogen Accumulating Organisms):

Ces microorganismes peuvent consommer du glucose et stocker des PHA grâce à l'hydrolyse du glycogène. On recense de manière générale parmi ces bactéries, les *Gamma-proteobactéria* et les *G-Bacteria* (figure 1.2.3).

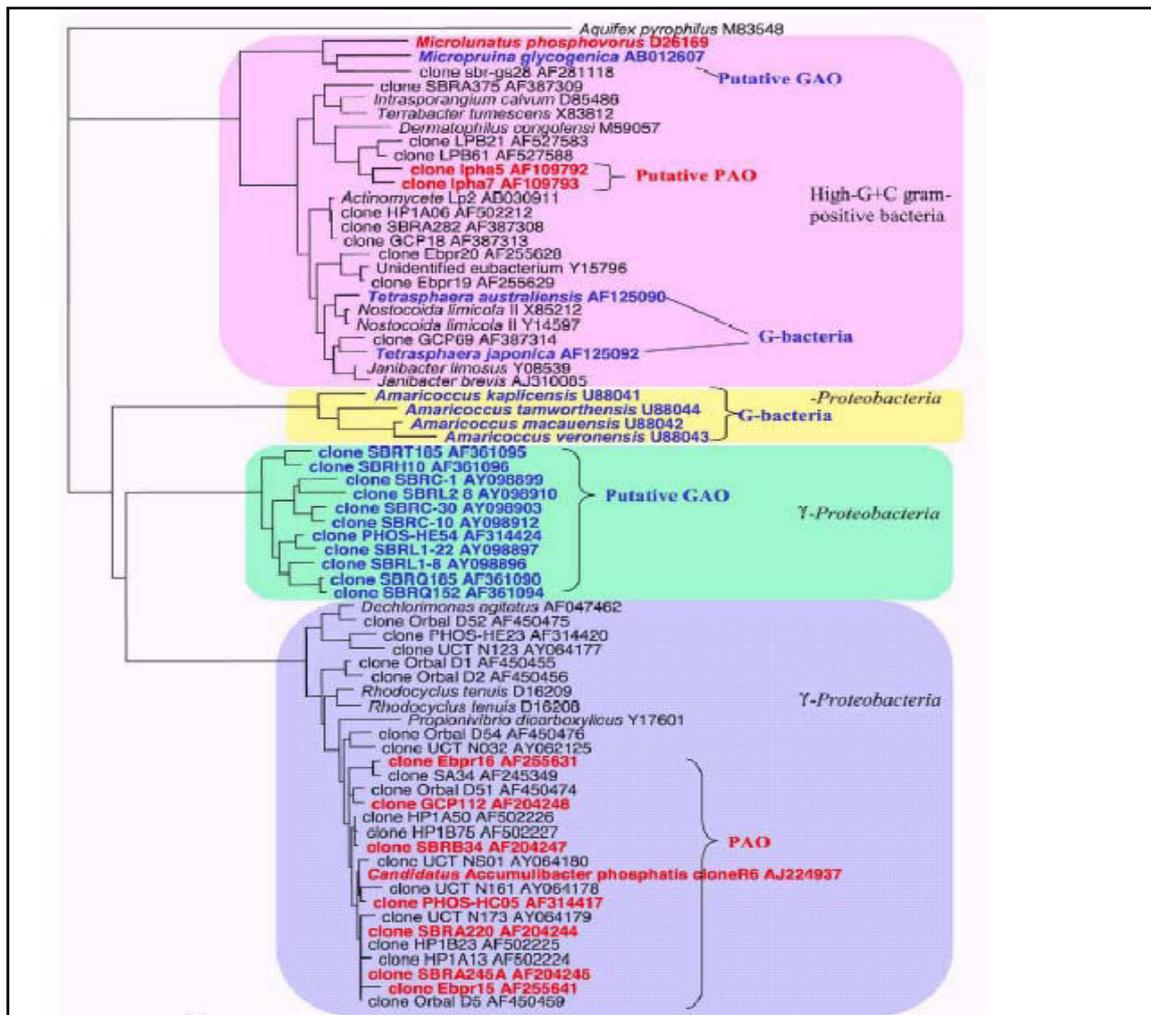


Figure n° 1.2.3 : Arbre phylogénique des PAO et GAO (Seviour, 2003)

1.2.2.3 Les bactéries filamenteuses

a) Classification

Eikelboom (1975) a observé un grand nombre de bactéries filamenteuses (26 espèces) dans différentes stations d'épuration, et a bâti une classification comprenant sept groupes (tableau n°1.2.2).

Les différents échantillons sont observés par microscopie optique en illumination directe ou contraste de phase. Cette classification est basée d'une part sur la morphologie des filaments (vraies ou fausses ramifications, filaments mobiles, coloration de Gram...) et d'autre part sur l'absence ou la présence d'inclusions cellulaires (granules de polyphosphates, de poly-β-hydroxybutyrate et de soufre (tableau n°1.2.3)).

Tableau 1.2.2 : Classification I des bactéries filamenteuses (Eikelboom, 1975)

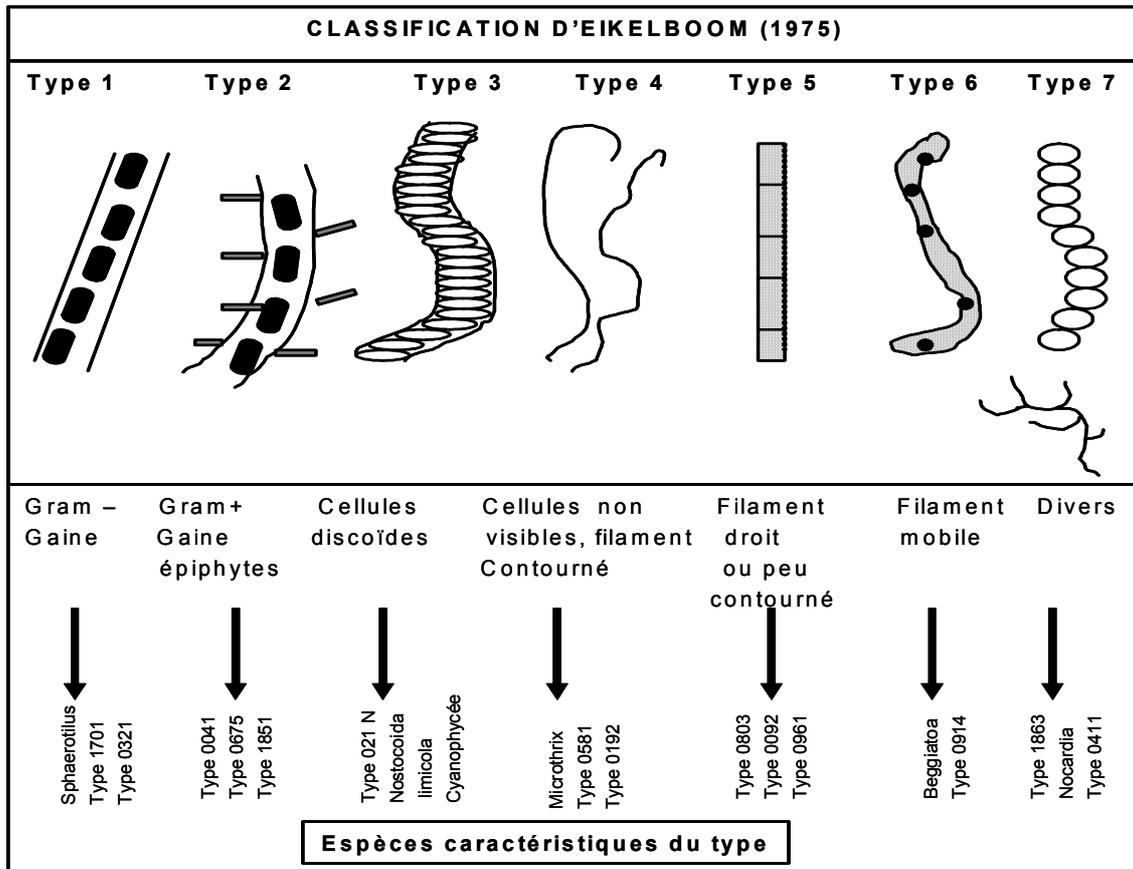


Tableau 1.2.3 : Classification II des bactéries filamenteuses (Jenkins et al, 1993)

Types de filaments	G	N	PHB	Longueur filaments µm	Gaines	Adhérences	Ramifications	Cellules
Type 1701	-	-	+	20-80	+	+	-	Discoïdes
Type 0041	+/-	+/-	-	100-600	+	++	-	Rectangulaires
Type 0675	+/-	+/-	-	60-160	+	++	-	Rectangulaires
Type 021N	-	+/-	+	60- >500	-	-	-	Ovoïdes
Type 1851	-	-	-	100- >500	-	-	+	Rectangulaires
Type 0914	+/-	+/-	+	50-200	-	+		Carrées
<i>Beggiatoa</i>	+/-	+/-	+	100- >500	-	-	-	Cloisonnement
<i>Thiothrix I</i>	+/-	+/-	+	100- >500	+	-	-	Rectangulaires
<i>Thiothrix II</i>	-	-	+	50-200	+	-	-	Rectangulaires
<i>M. Parvicella</i>	+	+	+	100-400	-	-	-	Formes souples
<i>N. Limicola II</i>	+/-	-	+	100-200	-	-	-	Souples et non Cloisonnées
<i>H. Hydrossis</i>	-	-	-	20-100	+	+	-	non Cloisonnées
<i>Nocardia spp</i>	+	+	+	10-20	-	-	+	Formes rigides
<i>S. natans</i>	-	-	+	> 500	+	-	+	Ovoïdes

G : Gram ; N : Neisser ; (+) présence ; (-) Absence

Une approche plus abordable a été mise au point par la suite : la classification de Wanner et al (1989) repose sur cinq groupes de microorganismes classés suivant les conditions du milieu environnemental (aérobies, anaérobies, sulfures, âge des boues...). Cette méthode est relativement simple d'utilisation en laboratoire et constitue en général la première méthode de caractérisation.

Pourtant cette technique a ses limites car parfois la morphologie et les colorations microscopiques des microorganismes peuvent varier suivant les conditions environnementales (Beveridge, 1990).

En effet, certaines bactéries comme *Microthrix parvicella* ou *Eikelboom 1863* sont Gram variables. De plus, une autre difficulté peut être rencontrée au niveau des microorganismes comportant des granules de sulfure. La différenciation des filaments du genre *Thiothrix*, *Type 021* ou *Leucothrix* sans les granules de sulfure reste très difficile.

b) Taxonomie des principales bactéries filamenteuses

Microthrix parvicella (d'après Richard et al, 1989)

Microthrix parvicella est une bactérie appartenant au groupe IV de la classification d'Eikelboom. Elle peut être caractérisée morphologiquement par des filaments de taille supérieure à 200 µm de longueur (tableau n° 1.2.2 et 1.2.3), avec une largeur de trichome* de 0,5 à 0,8 µm et sans adhérence. *Microthrix parvicella* est une bactérie Gram positive, Neisser positive et Noir de Soudan positive. On la trouve de manière importante en Europe, lors des phénomènes de dysfonctionnement (bulking, moussage) des stations d'épuration (Westlund et al, 1996 ; Hwang et al, 1998).

Le métabolisme de *Microthrix* est particulier car il puise ses besoins en carbone organique essentiellement dans les acides gras à courtes et longues chaînes (Virgolet, 1994). Cette souche est également capable de synthétiser dans des conditions anaérobies des poly-β-hydroxybutyrates et polyphosphates. Des fluctuations d'oxygène dissous ainsi que des aérations intermittentes ont tendance à stimuler la croissance de ce type de microorganisme (Scuggs et al, 1998).

Nocardia spp

Nocardia spp est caractérisée par de nombreuses et courtes ramifications de longueur inférieure à 100 µm et par une largeur des trichomes allant de 1 à 2 µm. Les filaments sont visibles dans un plan unique, et les réactions de coloration Gram et Neisser sont positives. La mise en évidence de granules avec la coloration du Noir de Soudan indique un stockage de poly-β-hydroxybutyrate.

Les cultures de ces souches sont relativement faciles à 25-30 °C sur des milieux comprenant une source de carbone, des extraits de levure, du glucose et du tryptophane (Soddell et al, 1996).

*Trichome : cellules très courtes qui constituent la bactérie filamenteuse.

Ce microorganisme joue un rôle important dans la formation et la stabilisation du moussage biologique dans les procédés de boues activées.

D'après Soddell et al 1996, la croissance de *Nocardia spp* peut être facilitée par la présence de substrats hydrophobes (acides gras) par rapport aux substrats hydrophiles comme le glucose. La bactérie supporte des carences en N et P. Ces actinomycètes sont considérés comme des germes aérobies stricts et ne peuvent se développer sans oxygène (G.I.S Mousses, 1993).

Sphaerotilus natans (d'après Richard 1989)

Sphaerotilus natans est caractérisée par une longueur de filament d'environ 500 à 1000 μm , par de faux branchements, et des trichomes qui contiennent des granules de PHB. On remarque souvent des organites unicellulaires accrochés aux filaments, et les réactions Gram et Neisser sont négatives. C'est un des principaux agents du bulking filamenteux.

La croissance excessive de *Sphaerotilus natans* est généralement due à une faible concentration en oxygène ou à une carence en nutriments (azote, phosphore...).

Thiothrix, *Type 1863*, *Type 021*

Thiothrix et *Type 021* sont fréquemment trouvées dans le foisonnement des boues (Terry et al 1985). De manière générale, *Thiothrix*, *Type 021* et *1863* sont des bactéries Gram négatives et possèdent des granules de sulfures. Ces sulfures peuvent provenir d'effluents industriels ou de la biodégradation de composés soufrés présents dans les stations d'eau urbaines (Tandoï et al 1994).

Ces auteurs ont réalisé des essais d'isolation par micromanipulation de bactéries filamenteuses de boues activées provenant de stations italiennes. Ils ont montré qu'il est possible de réaliser des cultures pures de souches du genre *Thiothrix* en présence d'acétate, de thiosulfate ou de bicarbonate.

Nostocoida limicola

Nostocoida limicola est une bactérie que l'on rencontre souvent au cours des phénomènes de bulking ou de moussage dans les stations d'épuration plutôt de type industriel. Trois formes de *Nostocoida limicola* sont décrites dans la littérature (Eikelboom 2000) :

- *Nostocoida limicola I* (diamètre des cellules : 0,6 - 0,8 μm)
- *Nostocoida limicola II* (diamètre des cellules : 1,2 - 1,4 μm)
- *Nostocoida limicola III* (diamètre des cellules : 1,6 - 2 μm)

Au cours de leurs travaux, Novak et al (1990) ont étudié en détail les caractéristiques de ce microorganisme. Les différences se retrouvent essentiellement au niveau de la taille des cellules et du trichome inférieur à 200 μm . La croissance de *Nostocoida limicola* peut être stimulée dans des conditions anaérobies par des composés de type hydrates de carbone ou alcools.

La coloration au Noir de Soudan indique la présence de granules de PHB, et la réaction de Neisser est négative alors que celle de Gram est positive (Blackall et al, 2000).

La figure n° 1.2.4 présente quelques images de bactéries filamenteuses et non filamenteuses des boues activées de stations de traitement d'eaux usées.

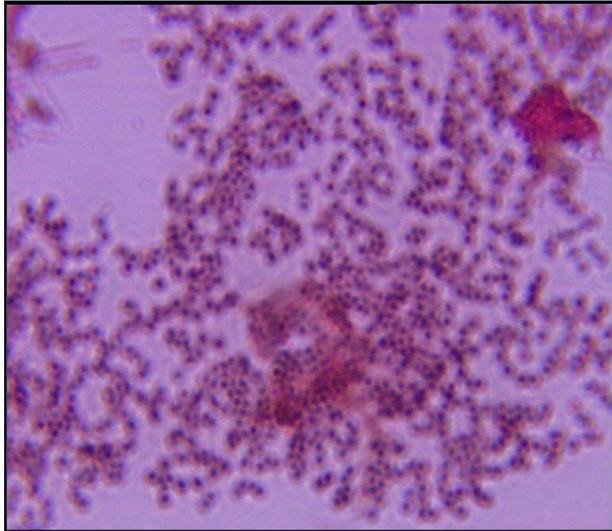


Image 1 : *Rhodococcus* (PHB)
Coloration Noir de Soudan γ : 400X

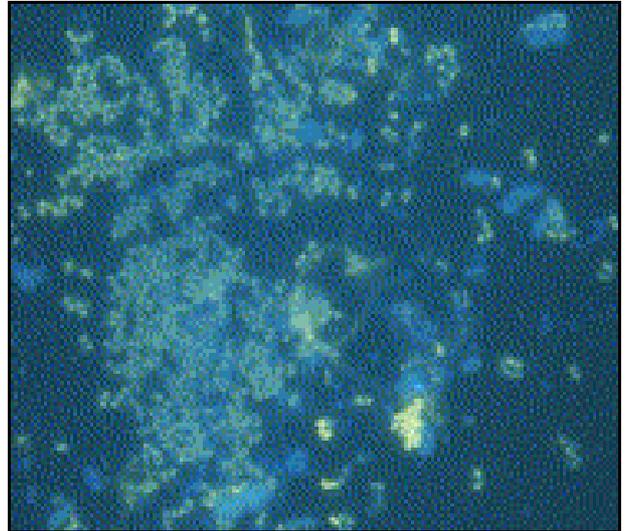


Image 2 : *Rhodococcus* (Seviour 2003)
Coloration DAPI

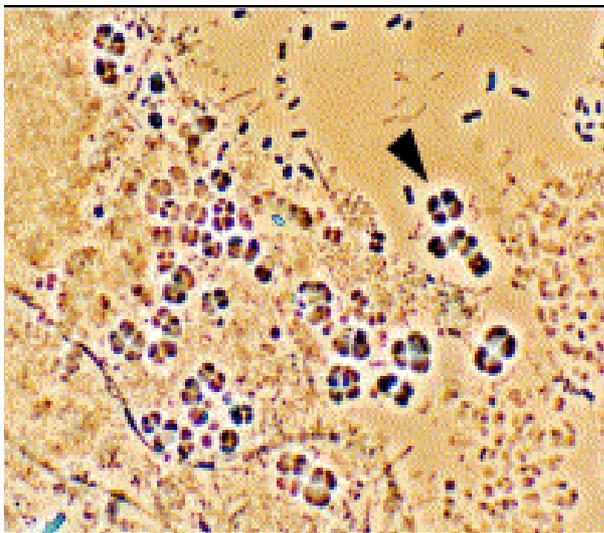


Image 3 : G- *Bacteria* (Seviour 2003)

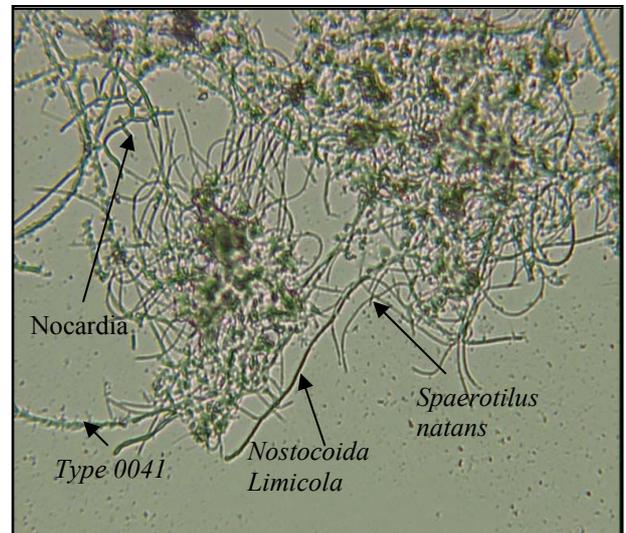


Image 4 : Bactéries filamenteuses
Etat sec γ : 100 X

Figure n° 1.2.4 : Bactéries filamenteuses et non filamenteuses des boues activées

1.2.3 Les substances de réserve chez les microorganismes des boues

La majeure partie des microorganismes filamenteux ou non filamenteux des boues activées possède des polymères de stockage comme les PHA (poly-β-hydroxyalkanoate), les PHB (poly-β-hydroxybutyrate), le glycogène, ou les polyphosphates. Les microorganismes capables d'accumuler les granules de PHA sont facilement identifiables avec les colorations Noir de Soudan et Bleu du Nil. Pour visualiser les polyphosphates, les colorations les plus utilisées sont Neisser, Loeffler et plus récemment le DAPI.

1.2.3.1 Les poly- β- hydroxyalkanoates

Les poly-β-hydroxyalkanoates sont des granules intracellulaires présents chez les procaryotes dont la taille peut varier de 0,2 à 0,5 μm. Ils constituent les réserves en carbone et en énergie. Les polymères de ce type sont en général des chaînes linéaires de longueur variable qui sont enfermées dans des granules (Dawes et al, 1973).

Au cours de leurs travaux, Steinbüchel et al (1995) ont montré l'existence d'une grande diversité de polyalkanoates chez les microorganismes non filamenteux.

La structure générale des poly-β-hydroxyalkanoates (PHA) est donnée dans la figure n° 1.2.5 (Lee et al, 1999)

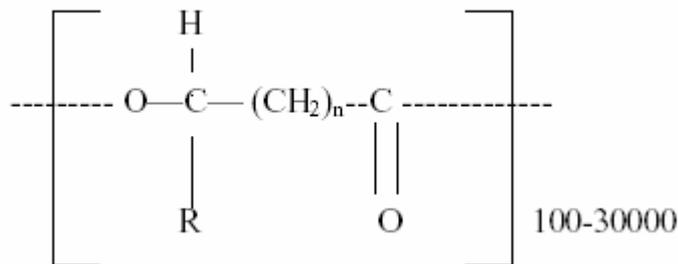


Figure n° 1.2.5 : Structure du PHA

Si n = 1 et R = CH₃ on forme un poly-β-hydroxybutyrate ou PHB (figure n° 1.2.6).

Si n = 1 et R = C₂H₅ on forme un poly-β-hydroxyvalérate ou PHV (figure n° 1.2.6).



Figure n° 1.2.6 : Structure du PHB et PHV

Dans des conditions anaérobies : les bactéries utilisent le carbone organique présent dans les boues activées pour synthétiser l'acétate. Cet acétate est converti par la suite par les microorganismes (*Acinetobacter*, *Moraxella*...) en PHB. La synthèse de six moles d'acétate est couplée à la glycolyse d'une mole de glycogène (figure n° 1.2.7).

L'énergie nécessaire au stockage des PHB provient de l'hydrolyse des polyphosphates, ce qui explique le relargage des phosphates dans le milieu.

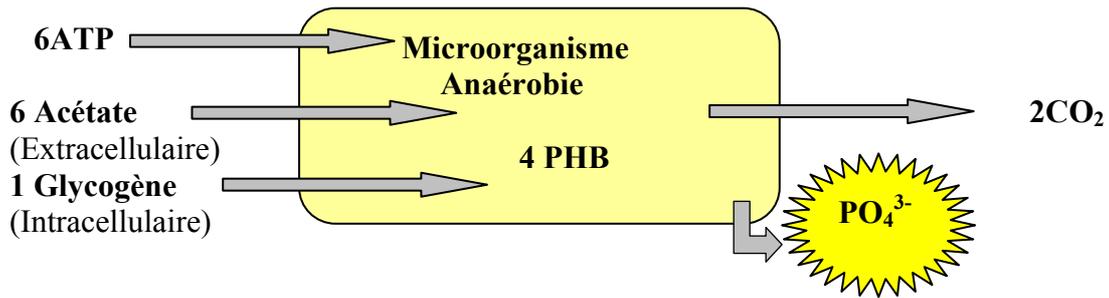


Figure n° 1.2.7 : Stockage du PHB (Mino et al, 1987)

Dans des conditions anaérobies : chez les microorganismes PAO, le glycogène peut être dégradé par des voies métaboliques différentes et produire de l'ATP et du PHV (figure 1.2.8).

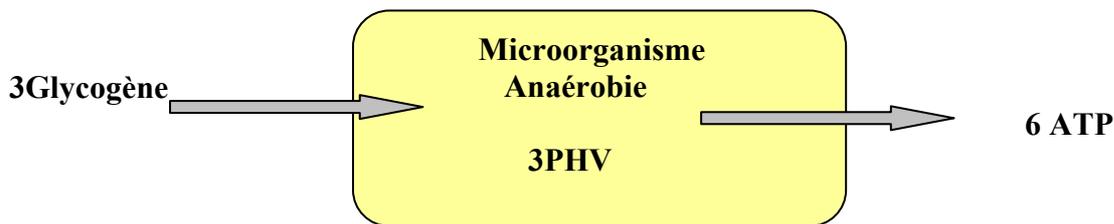


Figure n° 1.2.8 : Stockage du PHV (Mino et al, 1987)

Dans les conditions aérobies : le PHB est utilisé comme substrat organique pour la croissance et la reconstruction des réserves de polyphosphates (figure 1.2.9).

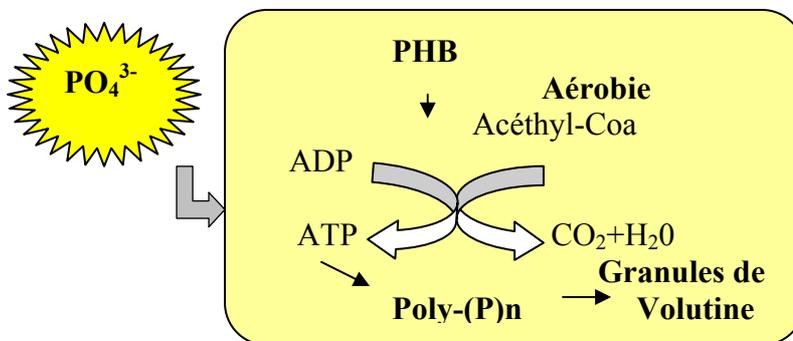


Figure n° 1.2.9 : Stockage des polyphosphates (Maurer et al, 1997)

Dans des conditions d'aération et en présence de substrat carboné (acétate) Brdjanovic et al (1998) observent une production de polyphosphates liée non seulement à la dégradation des PHB mais également aux quantités de polyphosphates existant dans la cellule initialement. Ils notent également que, dans des conditions de famine aérobie, le glycogène ne peut pas remplacer le rôle du PHB pour la synthèse des phosphates.

Les travaux effectués par Klaus et al (2001) sur le stockage et la dégradation du PHB dans des conditions aérobies en présence d'acétate, suivies d'une phase de famine, ont permis de montrer qu'il y a synthèse de PHB et consommation d'acétate pendant la phase d'ajout d'acétate et diminution du PHB et fabrication du glycogène en période de famine.

1.2.3.2 Les polyphosphates

Les granules de polyphosphates stockées chez les bactéries de type PAO, sont appelées « granules de vultine », car elles ont été trouvées pour la première fois chez *Spirillum volutans*. Les polyphosphates sont des polymères linéaires composés de monomères d'orthophosphates.

On note également que les relations entre polyphosphates et PHB sont étroites. En effet, l'énergie nécessaire pour la transformation du substrat carboné en PHB, dans des conditions anaérobies, provient de l'hydrolyse des polyphosphates intracellulaires (Maurer et al, 1997)

1.2.3.3 Le glycogène

Le glycogène est un polymère composé de monomères de glucose reliés par des liaisons α (1-4) et α (1-6). D'après Maurer et al (1997), en condition anaérobie, le glycogène est consommé afin de convertir les acides gras en phosphates.

1.3 Caractérisation des floccs biologiques

L'examen microscopique des boues activées montre qu'il s'agit d'un milieu hautement complexe, où se rencontrent des microorganismes procaryotes, des algues, des champignons, des métazoaires et des protozoaires. Les microorganismes présents dans le bassin d'aération sont maintenus sous forme de floccs bactériens, constitués d'exopolymères sécrétés par certaines familles bactériennes.

1.3.1 Les bactéries filamenteuses et la biofloculation

1.3.1.1 Modèle de formation des floccs (d'après Erikson et al, 1984)

Erikson et al (1984) ont proposé un modèle de formation des floccs basé sur des attractions et des répulsions électrostatiques. Dans ce modèle, les floccs bactériens sont formés par des bactéries se présentant sous la forme de bâtonnets et chargées négativement à pH neutre. Lorsque le procédé de formation des floccs est stable, la production de biopolymères (EPS) issus du métabolisme bactérien est beaucoup plus importante. Ce phénomène permet la création de liaisons plus fortes entre les floccs. Cependant un excès d'EPS peut provoquer à l'inverse une dispersion des floccs. Ces biopolymères sont généralement libérés au cours du métabolisme bactérien ou de la lyse cellulaire.

On les trouve également parfois dans des eaux usées en présence d'acides humiques, de cellulose ou de protéines (figure n°1.3.1). Ceux-ci jouent un rôle primordial dans la formation et la stabilité des floccs. La présence des bactéries filamenteuses peut favoriser la formation des floccs bactériens dans certaines conditions : carence en azote, phosphore ou oxygène et abaissement du pH.

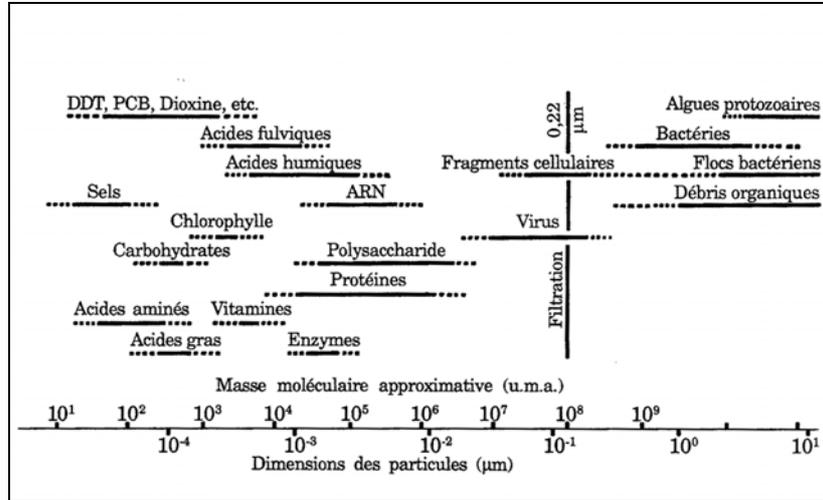


Figure n°1.3.1 : Composition des eaux usées (Degrémont, 1989)

Une bonne décantation nécessite donc un équilibre entre les microorganismes qui forment les floccs, les bactéries filamenteuses et la quantité d'exopolymères existant dans les floccs bactériens.

Jorand et al (1994) ont décrit la structure de floccs bactériens des boues activées en utilisant plusieurs méthodes :

- l'observation microscopique
- la dispersion des floccs par sonification
- l'analyse par granulométrie laser.
-

Leurs observations ont donné lieu au modèle présenté dans la figure n° 1.2.3.

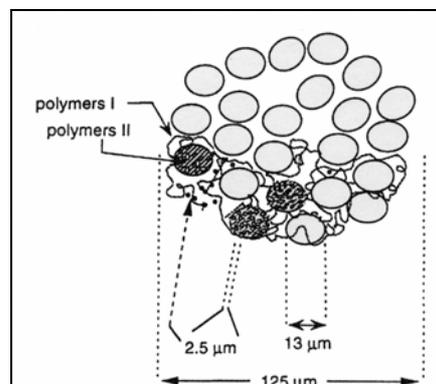


Figure n° 1.2.3 : Modèle d'un flocc de boue activée selon Jorand et al, 1994

Il est composé de trois niveaux structurels :

- les particules primaires de taille 2,5 μm
- les particules secondaires (taille 13 μm) reliées par des exopolymères
- une structure tertiaire de 125 μm .

Après observation en microscopie électronique, ils ont montré que la matrice permettant la cohésion des cellules est bien composée de polysaccharides (Polymères I et II), et qu'il existe une relation entre la taille, la densité et la vitesse de décantation des floes des boues activées.

1.3.1.2 Modèle de formation des floes (Jenkins et al, 1993)

Les floes possèdent deux niveaux de structure :

- la microstructure
- la macrostructure

La microstructure est formée de microorganismes (bactéries zooglées) produisant des exopolymères. Ces composés vont jouer le rôle de polyélectrolytes et favoriser la floculation. Ils sont composés en grande partie d'hydrates de carbone et représente 15 % du poids de la matière sèche (Frolünd et al, 1994).

La macrostructure est fournie par les bactéries filamenteuses internes aux floes.

La microstructure permet donc la formation de petits floes sphériques et compacts, alors que la macrostructure conduit à un floe plus compact, à l'intérieur duquel les microorganismes sont reliés au squelette filamenteux par l'intermédiaire de polymères extracellulaires.

1.3.2 Les composés extracellulaires contenus dans les floes

1.3.2.1 Leurs origines

D'après Urbain et al (1993), les EPS peuvent avoir deux origines :

- la première serait en relation avec le métabolisme des microorganismes et la lyse bactérienne
- la seconde serait plutôt liée à la composition du milieu de l'effluent.

Les fonctions exactes des EPS sont encore mal connues (Urbain et al, 1993) du fait de leurs compositions très hétérogènes. Ces polymères jouent un rôle considérable que ce soit en tant que réserves énergétiques, barrières défensives, agents d'agrégation bactérienne ou de floculation des boues activées (Jenkins et al, 1993).

Sutherland et al (1972) ont distingué trois types de polysaccharides d'origine bactérienne.

- Les polysaccharides intracellulaires qui sont en général des granules de réserve cytoplasmique chez les microorganismes (glycogène).
- Les polysaccharides qui constituent la paroi cellulaire (lipopolysaccharides)
- Les polysaccharides qui se trouvent dans le milieu extracellulaire: (exopolysaccharides bactériens).

Certaines souches bactériennes du genre *Pseudomonas* sont capables d'excréter des polysaccharides formant des capsules localisées sur la paroi, fournissant des sites électronégatifs pour la fixation de certains ions métalliques. Lorsque ces capsules sont libérées dans l'environnement, on parle de « slime ». On note également que les bactéries de type *Zooglea ramigera* des boues activées produisent des EPS chargés négativement formant une matrice gélatineuse.

1.3.2.2 Le rôle et la composition des EPS

Des études réalisées par Frolünd et al (1996) sur différentes stations urbaines ont permis de montrer que les polymères exocellulaires constituent la majeure partie de la matière organique des floccs et que ceux-ci représentent environ 10 à 15 % de la biomasse cellulaire.

Sponza en 2003 a montré que les EPS favorisent la croissance des floccs par le phénomène d'agglomération bactérienne et que la composition chimique des polymères contenus dans les boues est étroitement liée à la nature de l'effluent.

Laspidou et al. (2001) ont observé deux formes d'exopolymères :

- les EPS liés à la biomasse du flocc
- les EPS solubles (macromolécules solubles, colloïdes).

La majeure partie des polymères extracellulaires présents dans les floccs des boues activées des bassins d'aération est composée de polysaccharides, de protéines, de petites quantités d'acides nucléiques, d'acides humiques ou de carbohydrates (Pavoni et al, 1972).

Les EPS présentent de nombreux groupes fonctionnels de type carboxylate, sulfate, phosphate qui influent sur la charge portée par les floccs des boues et contribuent aux interactions entre floccs (Wilén et al 2003). Ces mêmes travaux montrent également que l'aptitude à la floculation est étroitement liée à la concentration en protéines, carbohydrates et ADN.

Sponza (2002) n'a pas observé de corrélation significative entre la quantité de carbohydrates et l'indice de Mohlman*, mais l'auteur a remarqué qu'une grande quantité de protéines contenues dans les EPS favorise la décantation des boues.

Des travaux récents de Jin et al (2003) ont montré que des teneurs en protéines, substances humiques, carbohydrates peuvent être corrélées positivement avec l'indice de Mohlman. Le rôle joué par les forces d'interaction dans les phénomènes de biofloculation est souvent mis en avant. De nombreux auteurs montrent que les interactions hydrophobes ont un rôle important dans la formation de floccs (Urbain et al, 1993 ; Jorand et al, 1994). Zita et al (1997) ont observé une forte corrélation entre l'hydrophobicité des microorganismes et leur degré de liaison aux floccs.

Les recherches de Higgins et al (1997) sur les protéines de type lectine (d'origine bactérienne ou virale) dans les fractions d'exopolymères ont permis d'émettre un nouveau modèle de biofloculation. En effet, cette protéine serait à l'origine de ponts entre les glucides des EPS lorsque des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) sont présents (figure n° 1.3.3).

*Indice de Mohlman : volume occupé par 1 gramme de boues après 30 minutes de décantation.

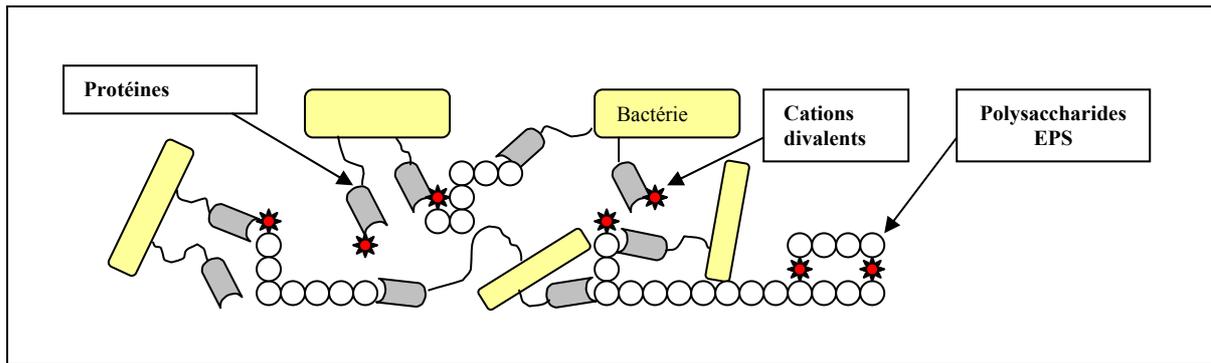


Figure n° 1.3.3 : Modèle de biofloculation (Higgins et al, 1997)

Cloete et al (2001) remarquent qu'au cours des traitements biologiques des phosphates, des clusters de cellules bactériennes associés aux EPS peuvent contenir 57 à 60 % de phosphates, alors que les EPS extracellulaires seuls n'en contiennent que 30 %. Il semble donc que le traitement des phosphates ne porte pas uniquement sur la capacité de stockage des microorganismes mais également sur le pouvoir qu'ont les exopolymères de stocker ces phosphates.

1.3.2.3 Mise en évidence des EPS

Afin d'estimer la quantité d'exopolysaccharides contenue dans les boues, de nombreuses méthodes d'extraction ont été développées. Les techniques de spectrophotométrie UV/Visible de Dubois (1956) et Lowry (1951) permettent ensuite de quantifier de façon globale les polysaccharides et les protéines.

Des résines échangeuses de cations ont été utilisées (Frolund et al, 1996) pour démontrer la variabilité des EPS contenus dans différentes stations d'épuration biologique. Un des avantages de cette méthode est le faible pourcentage d'EPS provenant de la lyse bactérienne.

La sonification réalisée dans différentes solutions (PBS, EDTA) est utilisée par Matias et al (2003) pour extraire des exopolymères extracellulaires des boues activées. Ils appliquent cette méthode pendant des temps très courts (30s) de sonification et observent l'état des boues en microscopie électronique. Il s'avère que la lyse bactérienne est minimale en présence du tampon PBS.

Liu et al (2002) ont comparé différentes méthodes d'extractions (EDTA, résines cationiques, formaldéhyde -NaOH) sur des boues issues de traitement aérobie et anaérobie, et ont montré que l'extraction des EPS par le formaldéhyde - NaOH est la plus efficace.

Les travaux récents de Görner et al (2003) ont permis de séparer par chromatographie liquide haute pression les exopolysaccharides contenus dans les boues selon leur taille ou masse moléculaire. Les quantités de matière recueillies dans chaque prélèvement ont ensuite été étudiées par micro spectroscopie infrarouge. A partir des spectres, les auteurs ont pu élaborer des bases de données chimiques des EPS présents sur différents sites.

1.4 Les problèmes de décantation des boues

La décantation des boues activées est principalement conditionnée par la qualité de la bio-floculation. De nombreux paramètres comme : le substrat, la concentration en substrat, la concentration en oxygène et la présence de bactéries filamenteuses peuvent interagir sur cette floculation.

1.4.1 La croissance dispersée

Ce phénomène est causé par l'absence de floculation au niveau de la microstructure du floc. Il peut être engendré par la présence de bactéries non floculantes ou par la faible biodégradabilité d'agents tensioactifs (Jenkins et al, 1993).

D'après Novak et al (1993), ce type de boue possède une charge massique élevée et généralement le peuplement bactérien se limite aux microorganismes libres et à quelques protozoaires.

1.4.2 Le bulking zoogléal

Dans ce type de bulking, le floc est de petite taille et sa densité est très faible. De plus, on note une vitesse de décantation très faible, avec un indice de Mohlman (volume occupé par 1 gramme de boues après 30 minutes de décantation) supérieur à 150 ml/g. On l'appelle également bulking visqueux (Al-Yousfi et al, 2000).

Les travaux de Novak et al (1994) ont montré que dans ces conditions on avait une surproduction de polysaccharides dans le milieu, une augmentation de turbidité de l'effluent et formation de mousses en surface des ouvrages.

1.4.3 Le bulking filamenteux

Le bulking filamenteux ou foisonnement (figure 1.4.1) est un phénomène qui se produit en présence d'un grand nombre de bactéries filamenteuses. Les filaments dépassent la limite du floc et créent quelquefois des jonctions entre les floes. La teneur en boue est très élevée et son indice de Mohlman est supérieur à 200 ml/g, engendrant une très mauvaise décantation.

Madoni et al (2000) ont réalisé des suivis sur 167 stations d'épuration en Italie et il s'est avéré que 81 présentaient ce problème. Les observations microscopiques réalisées ont montré la présence majoritaire de *Microthrix parvicella* dans 60 % des exploitations, *Nostoicola limicola* dans 58% et le *Type 0041* dans 44%.

Blackbeard et al en 1988 ont étudié huit installations d'Afrique du Sud présentant ce problème de foisonnement et ont isolé dans les liqueurs mixtes les microorganismes suivants : le *Type 0092* dans 82% des exploitations, les *Types 0675* et *0041* dans 39% et le *Type 0914*, et *Microthrix parvicella* dans 33%.

Richard en 1989 a étudié 270 stations de boues activées de 35 états des Etat Unis et a remarqué la présence importante du *Type 1701*, *021*, *0041* et de *Nocardia Spp*. Les facteurs pouvant déclencher de tels dysfonctionnements peuvent être nombreux :

- composition riche en hydrate de carbone,
- carences en N, P,
- présence de composés soufrés.

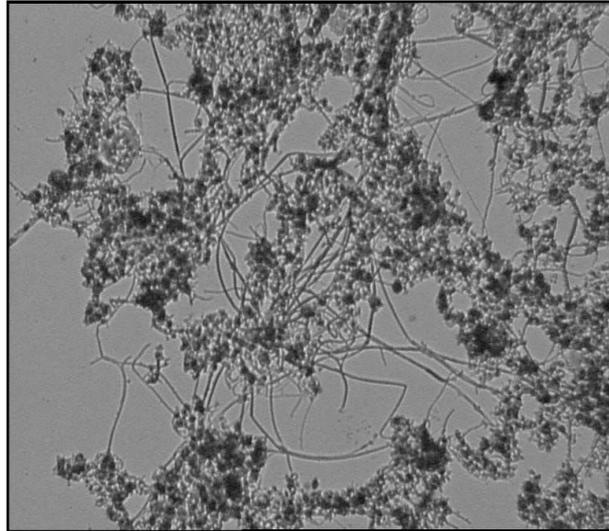


Figure n° 1.4.1 : Image de floes et filaments lors d'un foisonnement (bulking)

1.4.4 Le moussage

Le moussage se caractérise par le développement d'une écume plus ou moins épaisse en surface du bassin d'aération. Il est souvent associé à des bactéries filamenteuses qui se développent en excès et forment des floes hydrophobes. Ceux-ci emprisonnent des bulles d'air et la densité des floes diminue. Cette mousse peut induire un débordement du bassin d'aération provoquant des pertes en biomasse. Figure 1.4.2.

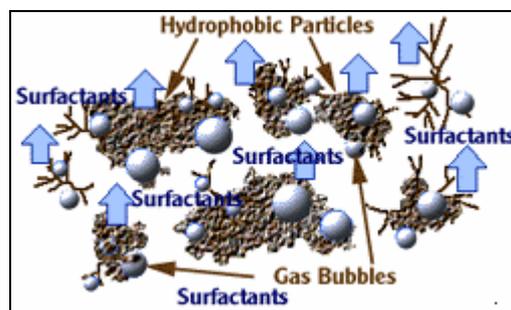


Figure n° 1.4.2 : Le moussage d'après Stratton, 1998

L'identification des bactéries filamenteuses représente une étape essentielle dans la caractérisation du moussage. Tous les microorganismes ne sont pas responsables de ce phénomène, mais dans un grand nombre de cas, ils sont en mesure de provoquer des difficultés de décantation et des débordements des bassins d'aération.

Duchène et al (1998) ont expliqué le phénomène de moussage par la présence de bactéries hydrophobes, alors que le bulking proviendrait de bactéries hydrophiles. Richard (1989) a considéré que le moussage serait dû à la présence de *Nocardiaformes*. Sodell et al (1996) ont observé que la présence de substrats hydrophobes (huile d'olive) influait favorablement sur le développement de *Nocardia pinensis* contrairement aux substrats hydrophiles (glucose).

Les travaux de Viloget (1994) sur le moussage biologique et physicochimique ont permis d'identifier différentes souches bactériennes. Il a observé la présence de *Nocardia*, bactérie aérobie à faible taux de croissance, se développant essentiellement dans des conditions d'âge de boues élevé en présence d'acide gras à courtes chaînes et de *Microthrix parvicella* puisant ses besoins en carbone organique au niveau des acides gras à courtes et longues chaînes.

1.5 Les méthodes d'observation appliquées à la biomasse bactérienne

1.5.1 Les méthodes de microscopie

1.5.1.1 Microscopie optique simple

Le microscope optique est composé de différentes parties (figure n°1.5.1). Il permet d'obtenir des grossissements pouvant aller environ de 45X à 1000X. C'est un appareil d'observation très utilisé dans le domaine des boues activées pour estimer la quantité de bactéries filamenteuses ou pour étudier la morphologie des flocs (Jenkins, Eikelboom...).

Comme nous le verrons ultérieurement, ces appareils peuvent être équipés de systèmes d'acquisition (semi) automatique. Le microscope optique est composé de trois éléments principaux, la source lumineuse, les objectifs et l'oculaire.

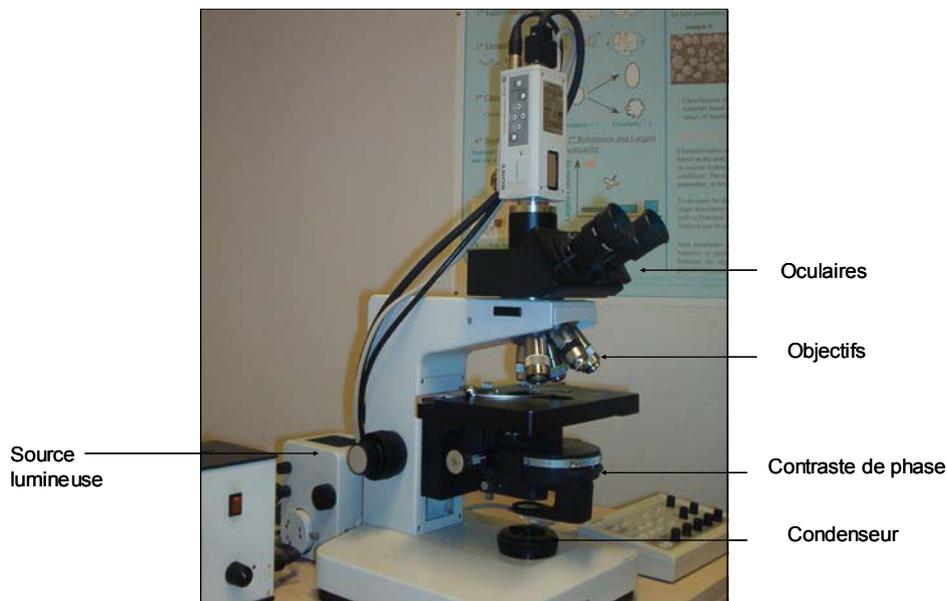


Figure n°1.5.1 : Schéma descriptif du microscope optique

Les objectifs ont des grossissements de l'ordre de 5X à 100X et sont caractérisés par leur ouverture numérique. La qualité de la lumière reçue par un objectif dépend de son angle d'ouverture et de sa résolution. La résolution est la distance minimale d , devant séparer deux lignes de manière distincte. Plus d est petit, meilleure est la résolution. On définit la limite théorique de résolution de l'objet par la relation suivante: $d = \lambda / (2 \cdot \text{ON})$ où λ représente la longueur d'onde moyenne de la lumière.

L'ouverture numérique est définie par $\text{ON} = n \sin \alpha$:

- n étant l'indice de réfraction du milieu (air ou huile à immersion)
- α le demi angle au sommet du faisceau incident objet entrant dans l'objectif.

L'ouverture numérique ON définit la limite de résolution du microscope. Plus celle-ci est grande, meilleure est la résolution. Lorsque l'on veut diminuer d , on peut modifier la longueur d'onde ou augmenter l'indice de réfraction du milieu avec une huile à immersion dont l'indice de réfraction est supérieur à 1. Le contraste est aussi important que la résolution. Il dépend de l'illumination. Il peut être amélioré par coloration sélective de l'échantillon au moyen de colorants (Gram, Neisser, Bleu de méthylène...), en employant des filtres colorés ou par contraste de phase. Le contraste de phase utilise des diaphragmes spéciaux pour séparer et recombiner les rayons directs par rapport aux rayons diffractés.

1.5.1.2 Principe de la fluorescence

Les composés fluorescents sont généralement constitués d'un noyau aromatique. Grâce à l'énergie apportée par le rayonnement, ces molécules passent à un niveau excité. Cette augmentation d'énergie est due à la délocalisation des doublets d'électrons suivant les règles de mésomérie. Une partie de cette énergie sera restituée sous forme d'énergie lumineuse, le reste étant dispersé sous forme de chaleur (figure n° 1.5.2). Le décalage entre les deux longueurs d'ondes dit décalage de Stokes est fondamental, car il permet de séparer à l'aide de différents filtres la lumière d'excitation et la fluorescence (figure n° 1.5.2).

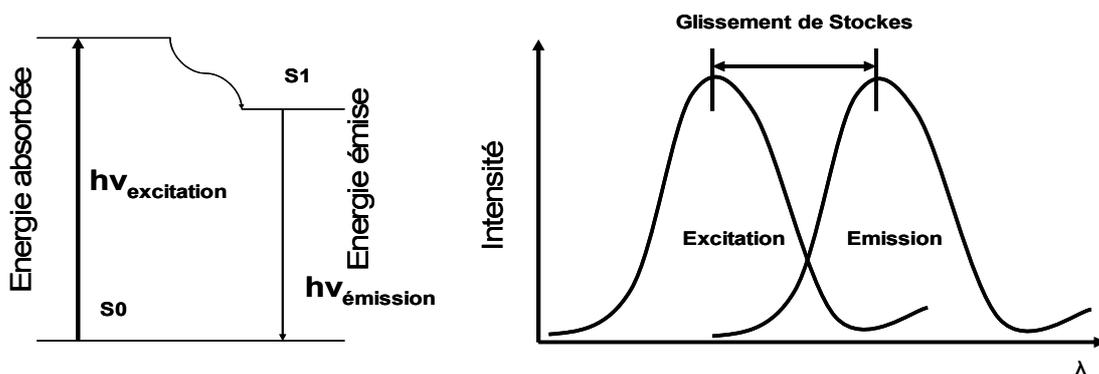


Figure n° 1.5.2: Principe de la fluorescence (Molecular Probe, 2002)

Les fluorochromes généralement utilisés sont spécifiques des compartiments cellulaires ARN, ADN, calcium (Takahashi et al, 1999 ; Kao, 1994). L'iodure de propidium par exemple possède une grande affinité pour l'ADN et l'ARN des cellules mortes. On remarque cependant que sous l'influence d'une source lumineuse, les sondes fluorescentes ont tendance à perdre de leur activité ce qui provoque un phénomène de photo-blanchiment, plus ou moins prononcé selon le type de sonde.

La figure n° 1.5.3 représente les spectres d'excitation et d'émission de trois fluorochromes utilisés fréquemment en biologie : la fluorescéine FITC, le Texas red TRITC et la Cyanine Cy5. On peut remarquer que les trois raies émises par le laser permettent d'exciter parfaitement ces trois molécules.

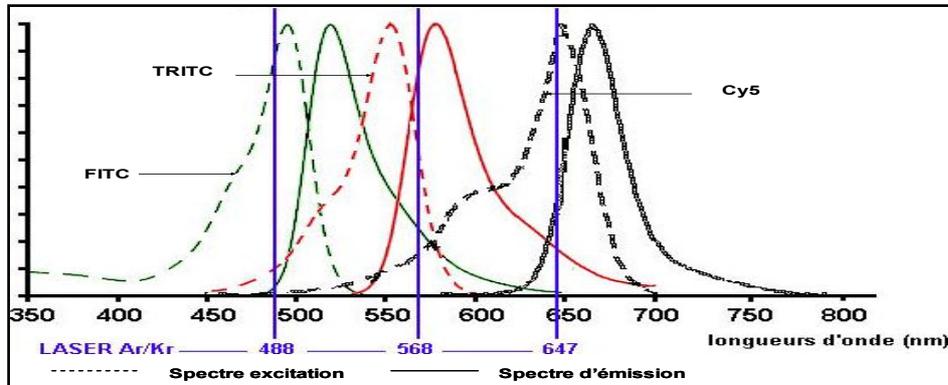


Figure n° 1.5.3 : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes FITC, TRITC, Cy5¹

1.5.1.3 Microscopie à épifluorescence

Le principe de la microscopie à épifluorescence (figure n°1.5.4) est d'illuminer un échantillon contenant un fluorochrome avec une longueur spécifique et de ne recueillir que la lumière correspondant à la fluorescence réémise, grâce à l'utilisation de filtres et de miroirs spécifiques. L'illumination de la préparation fluorescente provient généralement d'une lampe à vapeur de mercure. Cependant les molécules de fluorochrome situées en dehors du plan de mise au point sont également excitées et émettent de la lumière qui vient créer un bruit de fond sur l'image, diminuant ainsi le contraste et la résolution spatiale. La microscopie confocale à balayage laser permet d'éviter les problèmes d'interférences liées à cette lumière parasite.

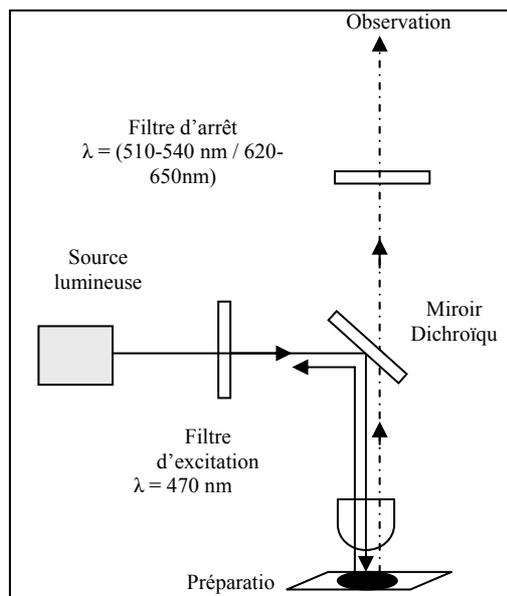


Figure n° 1.5.4 : Principe du microscope d'épifluorescence

¹ Microscopie & traitement d'images : (olan.marseille.inserm.fr/confocal/marqueurs.html)

1.5.1.4 Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser reste une technique de référence pour visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions, en éliminant la lumière parasite (Hoppert, 2003). Cette microscopie permet de déterminer des signaux émis par des sondes fluorescentes pouvant se situer à l'intérieur des échantillons. Les lasers les plus couramment utilisés sont les lasers Argon/ Krypton (488nm-568nm) et Hélium / Néon (633 nm).

Le faisceau va balayer l'échantillon point par point suivant des axes X, Y grâce à des miroirs. De plus, le balayage du faisceau permet un découpage de l'image dans des plans horizontaux et verticaux ; les sections optiques peuvent être recombinaées par informatique pour reconstituer une image en trois dimensions de l'objet.

Cette technique présente toutefois un inconvénient : le faisceau laser dont l'intensité est très élevée provoque également le phénomène de photo-blanchiment. De plus, l'excitation des sondes fluorescentes par le laser peut provoquer l'émission de radicaux libres qui peuvent devenir toxiques sur des échantillons viables.

1.5.1.5 Microscopie confocale multi-photons

La microscopie à multi-photons (n photons) est la méthode d'observation la plus récente. Elle diffère de la microscopie confocale par le fait que plusieurs (n) photons dont l'intensité est divisée par n, sont nécessaires à l'excitation du fluorochrome.

La figure n° 1.5.5 présente une comparaison des deux techniques de microscopie (confocale et deux photons).

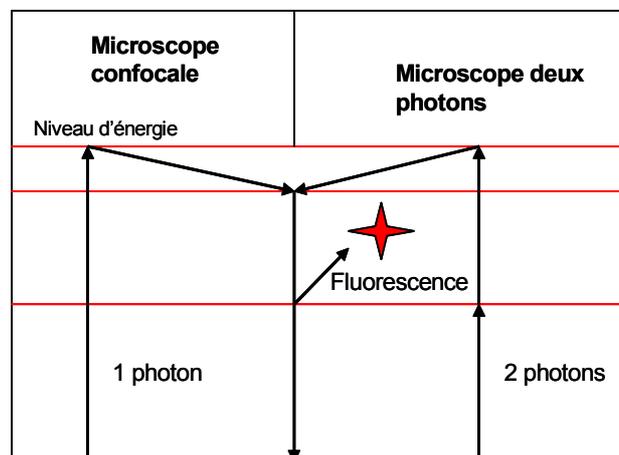


Figure n ° 1.5.5 : Microscopie confocale et deux photons

En microscopie confocale, l'excitation est due à un photon dont l'énergie doit être suffisante pour provoquer le phénomène de fluorescence. Cette lumière excitatrice qui possède toutefois une intensité plus faible hors du plan focal, traverse l'échantillon contenant le fluorochrome et va donc photolyser une partie de la sonde située hors du plan focal. Ce phénomène est particulièrement observé lors du balayage laser et limite le nombre d'images que l'on peut acquérir.

Dans la microscopie multi-photons, pour qu'un fluorochrome soit excité par plusieurs photons, il faut que ceux-ci arrivent quasi simultanément sur la molécule ce qui nécessite une densité de photons très élevée. L'excitation multi-photonique est réalisée avec des lasers dits pulsés qui délivrent des impulsions d'énergie très élevée, ce qui permet d'obtenir au point focal une grande densité de photons. Les impulsions sont de courte durée de l'ordre de 100 femtosecondes et à très haute fréquence (environ 80 MHz). En microscopie multi-photonique, seuls les fluorochromes situés au point focal seront excités, car en dehors de ce point de focalisation la densité en photons est trop faible pour que n photons arrivent sur une molécule de fluorochrome. La photodégradation et la fabrication de produits phototoxiques en dehors du plan focal sont très réduites (Dumas et al, 2001).

1.5.1.6 Micro autoradiographie (MAR)

La microautoradiographie est une méthode qui permet de suivre la consommation par les microorganismes de composants radio marqués. Cette technique est très utilisée dans le domaine médical et en microbiologie environnementale (Karner et al, 1997 ; Lee et al, 1999). Ces composants vont être absorbés par la voie métabolique et vont apparaître au niveau des cellules. L'échantillon marqué est ensuite mis en contact avec une émulsion radioactive.

Les émissions issues de la radioactivité de l'échantillon interagissent avec le bromure d'argent présent dans l'émulsion pendant plusieurs jours. La révélation de l'émulsion est réalisée ensuite par des méthodes photographiques et l'observation en microscopie fait apparaître des grains d'argents au niveau des structures ou organites. Cette méthode peut être utilisée pour quantifier un nombre de bactéries actives capables de consommer un substrat marqué (acétate, bicarbonate, glucose) et comparer ce résultat à une population totale marquée par des méthodes d'épifluorescence comme l'Acridine Orange ou le DAPI (Meyer-Reil, 1978 ; Nielsen et al, 1999).

Andreaseasen et al (1997) ont étudié la sensibilité de certaines bactéries filamenteuses (*Microthrix parvicella*, *Nostocoida limicola*, *Eikelboom type 0041* et *021N*) à différents substrats comme le glucose, l'éthanol, l'acide oléique. Ils ont observé que certaines bactéries comme *Microthrix parvicella* ont une affinité plus élevée pour l'acide oléique.

Plus récemment, Lee et al (1999) ont combiné la technique de microautoradiographie avec les méthodes FISH pour caractériser les activités microbiologiques. Ils ont montré que cette combinaison permet de corrélérer le métabolisme de certains substrats avec l'identification des microorganismes.

1.5.2 Cytométrie de flux

Moldovan en 1934 fut à l'origine de cette technique (Davey et al, 1996). L'appareil était composé d'un microscope, d'un capteur photoélectrique et d'un capillaire dans lequel était véhiculée une suspension d'hématies. Les cellules étaient comptabilisées durant le passage dans la veine liquide sous le capteur photoélectrique. Aujourd'hui la cytométrie de flux (CMF) permet d'effectuer bien plus qu'un simple dénombrement de cellules.

Elle peut également caractériser qualitativement et quantitativement des cellules. Le principe du tri en CMF consiste à amener les suspensions cellulaires dans une zone d'analyse où elles sont préparées de manière à passer les unes derrière les autres devant la source d'excitation.

Les différents signaux optiques qu'elles réémettent sont séparés par des miroirs et mesurés par des photomultiplicateurs. L'énergie lumineuse est ensuite transformée en signaux électriques analogiques, puis numériques (figure n° 1.5.6).

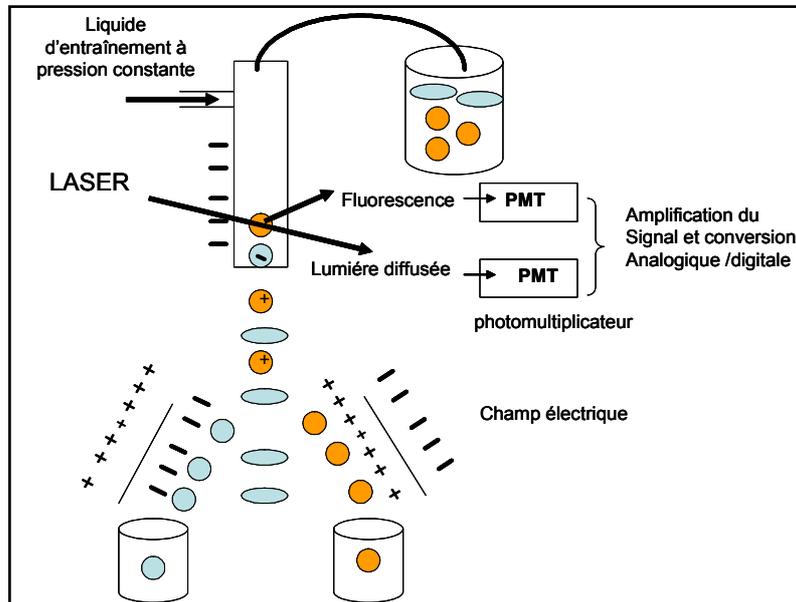


Figure n° 1.5.6 : Principe du cytomètre en flux (d'après Davey et al, 1996)

Les différentes informations récupérables peuvent être classées en deux catégories (tableau n°1.5.1).

Tableau 1.5.1 : Principaux signaux en CMF

Paramètre	Utilisation
Diffusion de la lumière aux petits angles	Morphologie des cellules
Diffusion de la lumière à angle droit	Identification morphologique des cellules
Fluorescence	Marqueurs cellulaires, ADN, ARN

De nombreuses études en écologie microbienne ont fait intervenir les méthodes de tri cellulaire par CMF avec des marqueurs immunofluorescents. Porter et al (1995) ont utilisé cette méthode pour détecter des populations bactériennes (*Escherichia coli*) contenues dans des échantillons d'eau de lac.

Récemment des travaux portant sur l'association des marqueurs fluorescents (FISH) et la cytométrie ont ouvert de nouvelles voies pour l'étude des diverses populations bactériennes de l'environnement. Ziglio et al (2001) appliquent cette technique pour caractériser la viabilité et la morphologie des bactéries (non filamenteuses) contenues dans des échantillons de boues activées.

L'application de la cytométrie de flux aux boues activées reste encore un domaine peu développé du fait de l'hétérogénéité du milieu (bactéries filamenteuses, floccs..) provoquant quelquefois des obturations de l'orifice (la buse) de l'appareil.

1.5.3 L'analyse d'images

L'analyse d'images permet d'extraire de façon précise et souvent automatique l'information contenue dans une image. Elle conduit à des mesures (nombre de cellules bactériennes, tailles) ou à des reconnaissances de formes (morphologie des bactéries ...), d'objets ou de structures à partir de leurs images.

Cette technique trouve de nombreux domaines d'applications :

- biologie,
- biotechnologie,
- traitement de l'eau ...

L'analyse d'images utilisant les outils mathématiques est relativement récente et date des années 1960. Le développement de la morphologie mathématique (Coster et Chermant, 1989) a permis de fournir un outil très puissant pour le traitement des images.

Le système d'acquisition d'images est constitué d'un microscope (optique, électronique), sur lequel est connectée une caméra couleur ou monochrome. Le signal est ensuite traité par un adaptateur et stocké sur la carte d'acquisition d'un ordinateur puis sur un support permanent. Le nombre d'images acquises reste un paramètre très important statistiquement (nombre minimal d'images).

L'image numérique est constituée de pixels (élément de base de l'image). Chaque pixel contient des informations différentes, intensité lumineuse et couleurs. La valeur d'un pixel monochrome est codée généralement sur 8 bits, soit sur $2^8 = 256$ niveaux.

Pour les images monochromes, chaque pixel a un niveau de gris pouvant prendre des valeurs allant de 0 (noir) à 255 (blanc). Ces images contiennent un seul plan de pixel alors que les images couleurs résultent de l'association d'une image en 256 niveaux de gris sur trois couleurs primaires (rouge, vert, bleu).

1.5.3.1 L'analyse d'images en biotechnologie

On distingue plusieurs grands domaines d'applications de l'analyse d'images (Wilkinson et al, 1998): le domaine médical, pharmaceutique, chimique, le monde de l'industrie agro-alimentaire et plus récemment celui du traitement de l'eau.

Les bactéries filamenteuses comme *Streptomyces* jouent un rôle considérable dans l'industrie des biotechnologies pour leur production de métabolites secondaires. Bien souvent, la biomasse représente différents états morphologiques au cours des cultures en réacteurs (filaments, enchevêtrements, pelotes).

L'analyse d'images est un des moyens qui peut permettre l'identification de ces différentes morphologies bactériennes. Certains auteurs utilisent cette technique pour établir des relations entre état physiologique, morphologique et production de métabolites (Drouin et al, 1997).

Higashiyama et al (1999) ont étudié la morphologie de *Mortierella alpina*, lors de la synthèse de l'acide arachidonique en séparant les fractions de granules de celle des filaments. Ils ont montré que la production d'acide arachidonique était plus importante au niveau des granules et que la morphologie des filaments contribuait à la viscosité de la culture.

Elle peut être également appliquée au domaine de la régulation enzymatique. Corvini et al (2000) ont établi une méthode de mesure du pH intracellulaire sur des bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* à partir de la microscopie de fluorescence couplée au traitement d'image.

Pour mieux connaître la physiologie et la morphologie des microorganismes, des colorations microscopiques sont nécessaires :

- Gram, Neisser
- Bleu de méthylène
- INT, Acridine orange

Parker et al (1992) ont estimé le volume occupé par le cytoplasme et les régions contenant des vacuoles chez *Penicillium chrysogenum*. L'application de la double coloration au bleu de méthylène et à la fushine de Ziehl a permis à Vanhoutte et al (1995) d'observer six états physiologiques au sein des hyphes de *Penicillium chrysogenum*.

Les études menées par Drouin et al (1996) sur la caractérisation de la différenciation cellulaire de *Streptomyces ambofaciens* par analyse d'image montrent qu'il est possible de corrélérer l'état physiologique, la différenciation cellulaire et la production d'antibiotique (spiramycine).

La respiration bactérienne représente une part importante dans le métabolisme de la cellule. L'application de l'analyse d'images avec la coloration à INT permet de localiser l'activité respiratoire chez *Streptomyces ambofaciens* (Mauss et al, 1997).

1.5.3.2 L'analyse d'images en traitement de l'eau

De manière générale, la méthode la plus utilisée pour caractériser la biomasse des boues activées, la surface des floccs, la longueur et le nombre de filaments bactériens est l'observation sous microscope.

Au cours de ces dernières années, l'intérêt porté à l'analyse d'images sur les boues activées des stations d'épuration s'est considérablement développé.

Grijspeerdt et al (1996, 1997) ont appliqué cette technique pour étudier la décantation des boues activées. Ils ont établi des corrélations entre la surface projetée des floccs et la concentration en boue activée. En utilisant la dimension fractale, comme un indice de la quantité de bactéries filamenteuses, ils ont constaté que l'Indice de Mohlman (*IM*) était fonction de la dimension fractale (quantité des filaments) et du diamètre équivalent des floccs.

Da Motta et al (2001) ont proposé une procédure rapide d'analyse automatique d'images pour caractériser les floccs (surface des floccs, dimension fractale) et les bactéries filamenteuses (longueur et nombre de filaments). Aucune relation entre les caractéristiques des floccs et l'indice de Mohlman (*IM*) n'a été établie.

Cependant, les variations de l'indice de Mohlman au cours des phénomènes de foisonnement ont pu être associées à des modifications de taille et de nombre des filaments bactériens.

Jenné et al (2002) ont développé une procédure automatique d'analyse d'images similaire à la précédente (Da Motta et al, 2001) pour étudier les propriétés (morphologie des floccs : rugosité, dimension fractale et quantification des filaments) des boues activées avant et après des phénomènes de bulking.

Récemment Schmid et al (2003) ont combiné la microscopie confocale laser et l'analyse d'images pour caractériser la structure des floccs. Cette nouvelle méthode réalisée sur des images en trois dimensions a permis d'étudier la composition des populations bactériennes contenues dans les boues activées et d'estimer le volume de floccs.

Au cours de leurs travaux Lopez et al (2005) montrent les limites d'application des différentes microscopies (épifluorescence, confocale à balayage laser, confocale multi-photonique). Ils constatent que la technique microscopique appropriée dépend du type d'échantillon microbien. L'utilisation du microscope confocale multi-photons est préférable lorsque les floccs contiennent une densité élevée en cellules. Cette technique permet de visualiser clairement la structure interne de ces agrégats contrairement aux deux autres méthodes microscopiques.

L'analyse d'images est un outil qui peut être également appliqué à la microfaune (Amaral et al, 1999) des boues activées des bassins biologiques. Cette procédure semi-automatique demande une sélection rigoureuse sur l'image de la zone d'intérêt où se trouve le protozoaire ou métazoaire : la taille et la forme de la silhouette sont ainsi caractérisées. Un taux de reconnaissance supérieur à 70 % a été obtenu pour la plus grande partie des espèces.

L'application de l'analyse d'images couleur reste encore très peu développée dans le domaine du traitement des eaux. Actuellement, le champ d'application de l'analyse d'images couleurs en microbiologie, biologie ne cesse de s'agrandir du fait du développement des techniques de coloration et de marquage fluorescent en biologie cellulaire. Les images couleurs deviennent donc incontournables pour connaître les états physiologiques et métaboliques des microorganismes.

1.6 Coloration microscopique appliquée aux microorganismes des boues activées

1.6.1 Les colorations classiques en microscopie optique ou d'épifluorescence

Ces colorations ont été mentionnées dans la partie concernant la caractérisation des bactéries des boues activées car celle-ci a longtemps été uniquement basée sur cette approche.

1.6.1.1 Les colorations Noir de Soudan et bleu du Nil

Les composés du type PHA, PHB (chapitre 1.2.3) peuvent être mis en évidence par les colorations classiques au Noir de Soudan (Jenkins et al, 1993 ; Eikelboom, 2002) et Bleu du Nil (Ostle et al, 1982). Le Noir de Soudan est un colorant très employé en microscopie optique à contraste de phase. Il permet de mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des microorganismes.

Ce type de colorant a l'avantage d'être très soluble dans ces granules. En revanche, il ne permet pas de différencier les composés du type PHB des autres composés lipidiques (Clark, 1981). Deux groupes d'auteurs (Ostle et al, 1982 ; Ramachander et al, 2002) ont proposé l'utilisation d'un colorant fluorescent, le Bleu du Nil (à 1%), spécifique des granules de PHA et PHB. Leurs observations ont été réalisées sur les microorganismes du genre *Bacillus megaterium* ou *Escherichia coli* en microscopie d'épifluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 460 nm.

Ces différentes méthodes de coloration demandent toutes, au préalable, une fixation à la chaleur douce, afin que les microorganismes ne modifient pas leur aspect. Quelque soit le type de réserves granulaires et de colorations, les échantillons sont généralement observés en microscopie optique à contraste de phase ou d'épifluorescence.

1.6.1.2 Colorations de Neisser, Loeffler et DAPI (4,6 diamidino-2-phénylindole)

Les méthodes les plus utilisées pour détecter les granules de polyphosphates chez les microorganismes de boues activées sont:

- la coloration de Neisser (Jenkins et al, 1993).
- la coloration de Loeffler bleu méthylène (Clark, 1981).
- la coloration au DAPI (4,6 diamidino-2-phénylindole)

Dans les colorations de Neisser et de Loeffler (cf. chapitre Matériel et Méthodes) des colorants cationiques possédant une grande affinité pour les granules anioniques sont utilisés. Lorsque le colorant se lie aux granules de polyphosphates, il y a formation d'une couleur spécifique pour chacun d'entre eux (bleu pour Loeffler et bleu noir pour Neisser).

La technique de Loeffler repose sur une coloration au bleu de méthylène décoloré en milieu acide et contre coloré avec la safranine. Les granules de polyphosphates apparaissent faiblement bleus car cette technique est très sensible à la décoloration. Elle s'avère donc moins efficace que la méthode de Neisser. Parmi les applications récentes, Serafim et al (2002) utilisent cette coloration pour identifier des granules de polyphosphates contenus chez les microorganismes présents lors des traitements biologiques du phosphore.

La coloration de Neisser est basée sur une coloration au bleu de méthylène en milieu acide acétique et contre coloré au brun de Bismark. Cette technique est beaucoup plus efficace et permet d'avoir un excellent contraste entre les granules qui apparaissent bleu noir et les cellules brun jaune. Les filaments colorés en bleu foncé ou les granules de couleur bleu noire visibles dans les filaments sont considérés comme Neisser positif. La coloration jaune brun est associée à un résultat Neisser négatif.

L'utilisation de colorants fluorescents comme le DAPI a permis de mettre en évidence non seulement les granules de polyphosphates mais également les inclusions lipidiques (Streicher et al, 1990). Les mêmes auteurs ont montré que lorsque l'on excite avec des longueurs d'ondes de 330-380 nm le complexe DAPI-polyphosphates, ce dernier émet une fluorescence jaune clair alors que le DAPI-lipides émet une fluorescence faible jaune de courte durée.

Kawaharasaki et al (2001) ont utilisé cette technique couplée à l'hybridation in situ, pour mettre en évidence les polyphosphates contenus chez certaines bactéries au cours du traitement biologique du phosphore. Les différentes observations qu'ils ont réalisées montrent qu'il est très difficile de différencier le bruit de fond du colorant et la couleur jaune très proche des deux types de granules.

1.6.1.3 Coloration à l'INT

L'activité respiratoire chez les microorganismes filamenteux peut être mise en évidence par la coloration à l'INT (chlorure de 2-p-iodophényl-3-p-nitrophényl-5-phényl tétrazolium). Zimmermann et al (1978) ont utilisé ce colorant couplé au DAPI pour quantifier l'activité respiratoire des bactéries filamenteuses présentes dans un échantillon.

Des essais réalisés par Mauss et al (1997) sur *Streptomyces ambofaciens* ont montré que la combinaison de l'INT avec le bleu de méthylène permet de mettre en évidence l'activité respiratoire de ces microorganismes. D'après Smith et al (1997) le système de transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire permet de réduire l'INT en cristaux de formazan insolubles dans les bactéries métaboliquement actives.

1.6.1.4 Coloration classique de Gram

La coloration classique de Gram est une des techniques fondamentales pour observer les boues activées (Jenkins et al, 1993 ; Eikelboom, 2000). Les principales différences existant entre les bactéries Gram reposent sur la composition de leurs parois (chapitre 1.1.3). Les boues activées des bassins biologiques contiennent un grand nombre de bactéries filamenteuses Gram+ (*Microthrix parvicella*, *Nocardia spp*, *Nostocoida*) ou Gram- (*Spaerotilus natans*, *Types 021N, 092, 1701, 1863*).

Le *Type 0041* est la plupart du temps Gram positif mais il peut exister sous forme Gram variable. Ces variations peuvent être liées à des stress environnementaux comme les variations de pH ou de milieux nutritifs (Beveridge 1990). La connaissance des caractéristiques Gram permet donc de déterminer les espèces et de prévoir un traitement adapté en cas de surcroissance bactérienne (bulking, moussage).

Sizemore et al (1990) ont développé une technique de microscopie d'épifluorescence en utilisant un marqueur fluorescent : la lectine. Le fluorochrome se fixe sur le peptidoglycane des bactéries Gram+, alors que chez les Gram- la couche de lipopolysaccharides empêche ce type de liaison. On ne visualise de cette manière que les bactéries Gram+.

Ce type de méthode a quand même ses limites car on dénombre au cours des observations microscopiques de nombreux faux positifs. En général, la quantité de bactéries Gram+ et Gram-, colorées par cette méthode classique est estimée par un comptage manuel en microscopie optique.

Saida et al (1997 et 1999) ont développé une technique d'identification de certains germes Gram présents en milieux aquatiques (*E. coli* et *S. subtilis*) et basée sur des mesures photométriques (Gram stain index) après coloration et filtration sur membrane. Des colorations de Gram réalisées par Binnerup et al (1998) sur membranes de polycarbonate et contre colorées à l'acridine orange ont montré qu'il est possible de quantifier les bactéries Gram des milieux environnementaux.

1.6.1.5 Coloration de viabilité

De nombreuses méthodes de marquage comme le CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium) utilisant la microscopie d'illumination directe ou d'épifluorescence ont été proposées pour quantifier la viabilité bactérienne. Récemment, l'utilisation de composés colorés du type *Bac Light* (Molecular Probes, 2002) constitués d'IP (iodure de propidium) et de Syto9 ont permis d'évaluer la viabilité des microorganismes.

Le Syto 9 est un fluorochrome de petite taille qui peut pénétrer les parois bactériennes intactes, alors que l'iodure de propidium est un fluorochrome de grosse taille ne pouvant passer qu'au travers des membranes abîmées. Cette double coloration a également été utilisée par Ramirez et al (2000) pour observer l'incidence de la chloration sur les bactéries de *Type 021N* des boues activées et par Boulos et al (1999) pour énumérer la viabilité bactérienne en eau potable.

1.6.2 Les marqueurs moléculaires

1.6.2.1 Les sondes oligonucléotidiques

L'utilisation de coloration microscopique classique (Neisser, Gram, Noir de Soudan...) pour caractériser la complexité de la communauté bactérienne, la morphologie, le métabolisme ne permet pas toujours de nous renseigner de manière exacte sur l'identité de chaque microorganisme. Depuis quelques années, de nouvelles méthodes dites de biologie moléculaire sont utilisées pour les études environnementales. Elles permettent entre autre, de mettre en évidence des espèces bactériennes dans un milieu et de les dénombrer grâce à la présence de gènes spécifiques (rARN) évitant ainsi toute phase de culture. En effet, les méthodes de mise en culture des microorganismes filamenteux des boues activées restent encore de nos jours difficiles à mettre en oeuvre.

L'objectif des méthodes FISH (Fluorescence par Hybridation In Situ) est de permettre la mise en évidence d'une séquence d'acide nucléique spécifique (ARN ou ADN) en utilisant une sonde constituée d'une séquence de bases complémentaires dans laquelle a été inséré soit un marqueur fluorescent (FISH), soit un marqueur radioactif (sonde chaude) ou encore un marqueur de type antigénique décelable par réaction histochimique (sonde froide).

L'ARNr semble être la cible idéale pour les sondes d'acides nucléiques pour plusieurs raisons. En effet on trouve dans ces ARN des séquences spécifiques situées dans des régions variables de l'ARN ribosomique 16S ou 23S. De plus, un grand nombre de copies de ces molécules sont présentes dans les ribosomes des microorganismes (Amann et al, 2000). Les méthodes moléculaires qui se basent sur la localisation de gènes de l'ARN ribosomique 16S ont donc permis de détecter de manière plus précise des microorganismes (Blackall et al, 1996).

Au cours de leurs travaux Snaidr et al (1997) utilisent également cet outil de biologie moléculaire pour identifier les différentes souches de protéobactéries existant dans les boues activées. On trouve dans la littérature de nombreux auteurs qui ont montré l'intérêt de cette technique : Schuppler et al (1998) (*Nocardia spp*), Wagner et al, (1994) (*Thiothrix*, *Sphaerotilus natans*) et Kanagawa et al (2000) (*Eikelboom type 021N*).

Le lecteur trouvera référencées dans le tableau n° 1.6.2 les principales sondes oligonucléotidiques pour les bactéries filamenteuses ainsi que la position des cibles sur les ARN 16 S.

Tableau n° 1.6.2 : Sondes oligonucléotidiques pour bactéries filamenteuses

Sondes	Séquences (5'-3')	16srRNA	Bactéries	Références
LDI	CTCTGCCGCACTCCAGCT	649-666	<i>Leptothrix</i>	Wagner et al, 1994
MPA60	GGATGGCCGCGTTTCGACT	66-77	<i>Microthrix parvicella</i>	Erhart et al, 1997
TNI	CTCCTCTCCCACATTCTA	652-669	<i>Thiothrix</i>	Wagner et al, 1994
SNA	CATCCCCCTCTACCGTAC	656-673	<i>Sphaerotilus natans</i>	Wagner et al, 1994
21N	TCCCTCTCCCAAATTCTA	652-669	<i>Eikelboom type 021N</i>	Wagner et al, 1994
MNP1	TTAGACCCAGTTTCCCAGGCT	152-172	<i>Nocardiaforme</i>	Shuppler et al, 1998

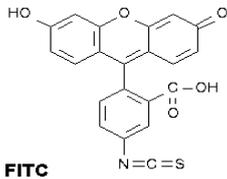
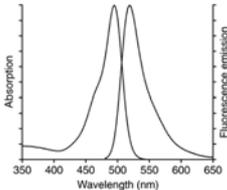
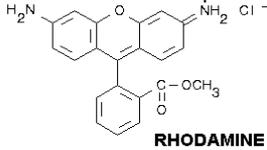
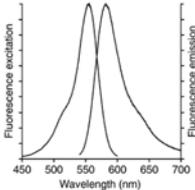
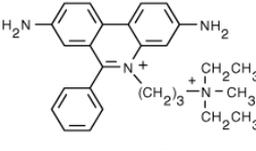
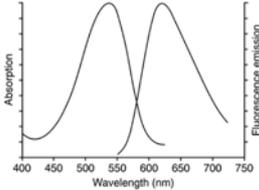
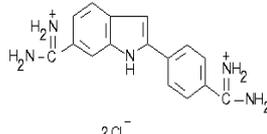
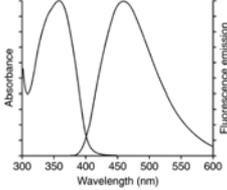
Les méthodes de type FISH impliquent au préalable une perméabilisation de la membrane bactérienne pour faciliter la pénétration de la sonde oligonucléotidique marquée. Davenport et al (2000) ont remarqué que la présence d'acide mycolique au niveau de la paroi chez certains actinomycètes (*Nocardia spp*) empêche l'introduction des sondes. Un traitement avec des composés de type para-formaldéhyde (De Los Reyes et al, 1997), acide chlorhydrique, mutanolysine (Erhart et al, 1997) est nécessaire.

De plus, si aucune cible n'est présente dans les ribosomes, les hybridations aspécifiques seront éliminées après lavage. Les sondes sont généralement constituées de 15 à 25 nucléotides avec en extrémité 5' le fluorochrome. Divers fluorochromes (tableau n°1.6.3), ayant des spectres d'absorption et d'émission différents, peuvent être utilisés et observés directement sous microscopie à épifluorescence, microscopie confocale laser ou multiphotonique.

L'application directe de la méthode FISH sur des échantillons de boues activées « vraies », reste encore quelquefois difficile à réaliser du fait de l'hétérogénéité du milieu (pigments photosynthétiques, bactéries phototrophes...). Mounteer et al (2002) ont montré que l'autofluorescence émise par les échantillons de boues pouvait interférer sur la détection des signaux spécifiques de l'hybridation. Les travaux de Muyzer et al (1995) indiquent également que la fluorescence émise par les particules inorganiques contenues dans les échantillons d'eaux usées est souvent supérieure à celle de la sonde. De manière générale l'autofluorescence pourra être minimisée par l'étape de fixation au formaldéhyde.

Quelquefois aucun signal fluorescent n'est perçu car la concentration en microorganismes ou en ARN est faible. Il a été démontré qu'il était difficile de détecter moins de 10^3 - 10^4 cellules par millilitre (Amann et al, 1995).

Tableau 1.6.3 : Spectres d'absorption et d'émission de différents fluorochromes (Molecular Probes, 2002)

Fluorochromes	Structures	Spectres	Absorption	Fluorescence
FITC (fluoresceine iso thio cyanate)	 FITC		490 nm	520 nm
TRITC (tetra méthyl rhodamine iso thio cyanate)	 RHODAMINE		541 nm	572 nm
IP (iodure de propidium)	 2 I⁻		520 nm	610 nm
DAPI (di aminido phenyl indole)	 2 Cl⁻		372 nm	456 nm

1.6.2.2 Colorations immunofluorescentes

Les techniques d'immunofluorescence utilisées par Brignon et al (1995) à partir des anticorps monoclonaux ont permis de dénombrer et d'identifier certaines souches bactériennes comme *Thiothrix spp.*

La technique d'immunofluorescence est basée sur des distinctions sérologiques c'est-à-dire que les bactéries sont marquées à l'aide d'un anticorps spécifique portant un fluorochrome. Elle permet d'identifier les bactéries individuellement et de les dénombrer. L'inconvénient majeur de ce marquage est qu'il requiert l'isolement et la culture pure de souches bactériennes pour produire l'anticorps (Oerther et al, 2001). L'isolement des germes des boues activées n'est pas toujours des plus faciles à réaliser. De plus, les anticorps ne permettent pas de différencier les bactéries viables des non viables et la présence des exopolymères dans les flocs peut freiner les interactions des anticorps (Kämpfer, 1997).

1.6.3 Autres méthodes de biologie moléculaire

De nos jours l'arrivée des techniques de biologie moléculaire utilisant les séquences d'ARNr ont permis d'évaluer la complexité et la diversité des populations bactériennes. Ces méthodes ont l'avantage de permettre l'étude du génome des microorganismes sans les cultiver, mais elles restent difficiles à mettre en œuvre sur les installations.

La PCR (Polymerase chain reaction) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences servent à synthétiser des amorces d'oligonucléotides complémentaires (de longueur 20 à 30 nucléotides). Ces oligonucléotides serviront à délimiter la portion d'ADN à amplifier.

La première étape dite de dénaturation à 94°C (figure n°1.5.7), permet de séparer les deux brins d'ADN. Un refroidissement rapide (50°C) provoque une fixation des amorces (20 paires de bases) de part et d'autre du gène à amplifier. Une augmentation de température (72°C) va permettre une dernière étape, l'élongation : au cours de cette étape, la polymérase vient se fixer au double brin possédant les amorces et ajouter les nucléotides contenus dans la solution.

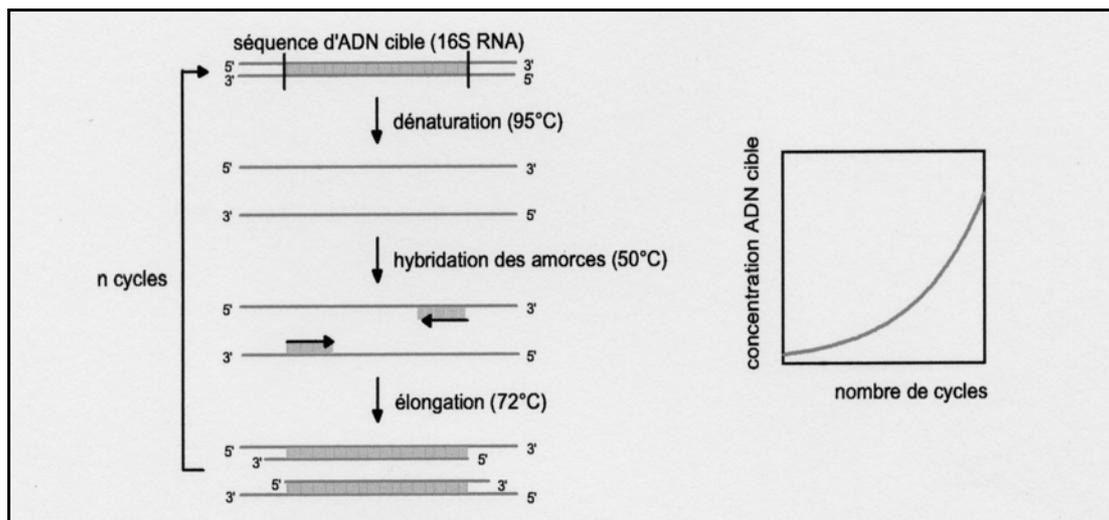


Figure n° 1.5.7 : Méthode PCR

De nombreux auteurs l'utilisent pour dénombrer ou détecter les microorganismes des boues. Juretschko et Timmermann (1998), Oerther et Pernthaler (2000), ont appliqué cette méthode pour l'étude des différentes populations bactériennes nitrifiantes (*Nitrococcus et Nitrospira*) et dénitrifiantes (*Acinetobacter spp*) des boues activées.

L'utilisation des méthodes de type PCR est très variée. Le lecteur trouvera ci-dessous quelques exemples d'utilisation :

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les séquences d'ADN sont soumises à des digestions enzymatiques (enzyme de restriction) Les populations bactériennes possèdent des génomes plus ou moins grands et la taille des fragments obtenus après digestion sera différente et décelable par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. La technique de RFLP a permis de caractériser des populations de *Nitrobacter spp* présentes dans les sols (Navarro et al, 1992) ou d'estimer les populations procaryotes des étangs salés. (Martinez-Murcia et al, 1995).

- DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Cette méthode utilise également les produits de PCR. La séparation des fragments d'ADN est basée sur la mobilité électrophorétique de la double hélice d'ADN dans un gel de polyacrylamide en présence d'un gradient dénaturant (Urée- Formamide).

Elle est tout particulièrement utilisée lorsque l'on veut observer les profils des différentes communautés bactériennes ou la dynamique des populations (Liu et al, 2000 ; Watanabe et al, 2000 ; Muyzer et al, 1993).

CONCLUSION

L'étude bibliographique a permis de rappeler des notions importantes concernant la structure des floccs, mais également le rôle que peut engendrer la prolifération des bactéries filamenteuses au cours de la décantation des boues.

De manière générale, les dysfonctionnements (bulking filamenteux, moussage) liés à ces microorganismes provoquent des augmentations de turbidité ou de DBO (Demande Biologique en Oxygène) des effluents traités, et bien entendu peuvent perturber gravement le bon fonctionnement des stations d'épuration à boues activées.

Bien souvent on remarque que l'ensemble des problèmes rencontrés sur site peut être lié à la présence d'espèces spécifiques de bactéries filamenteuses. L'identification morphologique (longueur, nombre) des bactéries filamenteuses des boues par analyse d'images réalisée par Da Motta et al (2001) a permis d'évaluer rapidement la proportion de microorganismes présents à l'intérieur des systèmes biologiques.

L'ensemble de ces bactéries étant très difficile à cultiver sur des milieux spécifiques, il était donc nécessaire de développer des techniques de colorations simples ou complexes pour identifier de manière précise l'ensemble des bactéries intervenant lors de ces dysfonctionnements.

Pour identifier les microorganismes filamenteux ou non filamenteux, nous avons donc proposé des techniques d'analyse automatique d'image couleur. Par l'intermédiaire de ces outils, nous pouvons suivre les cinétiques de croissances de certaines populations bactériennes présentes dans les stations d'épuration ainsi que les métabolismes de stockage (PHB, polyphosphates). La reconnaissance rapide de ces populations pourra donc permettre des interventions préventives sur les sites.

De nombreux auteurs ont montré que la présence des polymères extracellulaires intervenait ou n'intervenait pas sur la décantation des floccs bactériens. Une procédure automatique d'analyse d'images pour quantifier ces polymères à l'intérieur des floccs sera proposée dans ce travail. L'ensemble de ces procédures et résultats pourra donc permettre à un opérateur de mieux comprendre et d'intervenir plus rapidement sur d'éventuels problèmes rencontrés sur les stations biologiques.

CHAPITRE 2

Matériels et Méthodes

Ce chapitre est divisé en cinq parties. La première partie (2.1) présente les différentes stations d'épuration biologique étudiées, les appareillages de laboratoire et les substrats utilisés au cours des expérimentations.

La deuxième partie (2.2) traite des méthodes analytiques et des appareils de mesure qui ont été mis en œuvre pour caractériser les boues biologiques.

La partie (2.3) est consacrée aux colorations microscopiques classiques ou fluorescentes utilisées pour identifier les microorganismes filamenteux des boues activées (coloration de Gram, Noir de Soudan, Neisser, Encre de Chine, *BacLight*, FISH.....).

Enfin, les deux dernières parties présentent les principales transformations morphologiques appliquées à l'analyse d'images et les différents programmes développés au cours de ces travaux. Le lecteur trouvera également les étapes de fonctionnement de chaque programme (Noir sec, Gram, PHB, EPS, Viabilité) ainsi que les différents paramètres calculés.

2.1 Présentation des sites de prélèvements et des appareils pilotes

2.1.1 Station d'épuration de Nancy-Maxéville.

La station d'épuration de Nancy-Maxéville (figure 2.1.1) est en service depuis 1971. Elle est capable de recevoir la pollution produite par 350 000 équivalent-habitants. Chaque jour plus de 100 000 m³ d'eau sont transportés par le réseau d'assainissement du Grand Nancy jusqu'à la station. Elle assure également le traitement des effluents industriels produits par les Brasseries Kronenbourg de Champigneulle situées à quelques kilomètres au Nord de celle-ci.

L'objectif fixé par l'ensemble des stations d'épuration de France en 2005 est d'obtenir un taux de dépollution de 65%. Afin de respecter la loi sur l'eau du 3 janvier 1992 et la directive européenne de 1991, la station de la Communauté Urbaine du Grand Nancy a dû subir d'importantes modifications. En 1999, des travaux d'extension destinés au traitement de l'azote (Biolift®) et du phosphore ont débuté, et se sont terminés en 2004 pour le traitement au phosphore.

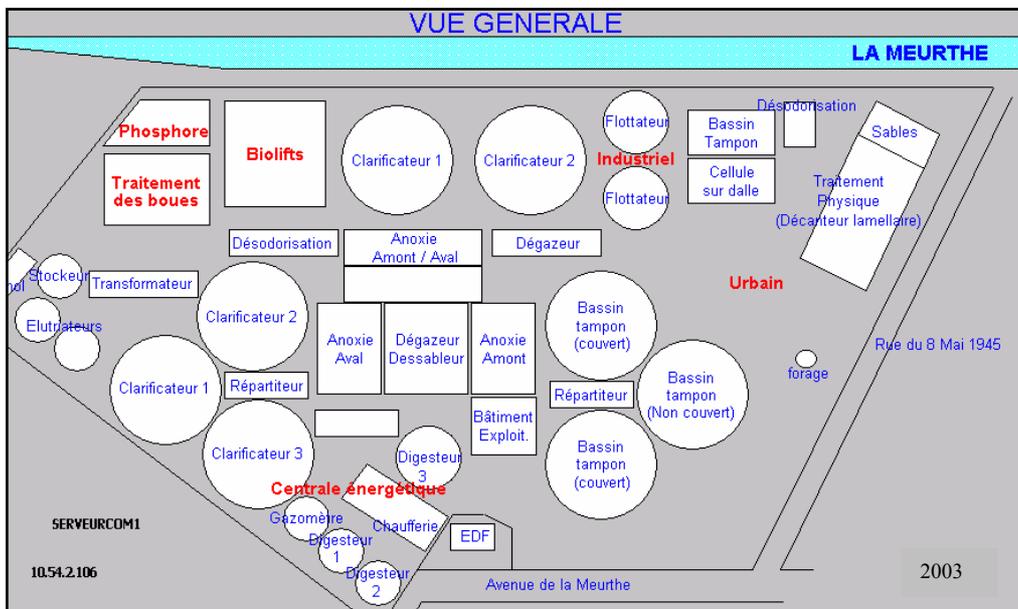
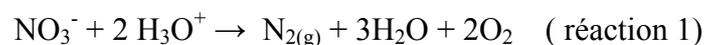


Figure n° 2.1.1 : Plan de la station de Nancy-Maxéville

Les effluents urbains sont relevés par trois vis d'Archimède et dégrillés. Ils sont ensuite dirigés vers un système où sont combinées les fonctions dessablage, déshuilage et décantation lamellaire. Les boues issues de cette première décantation sont dirigées vers le digesteur et l'eau décantée vers la zone d'anoxie amont. A ce stade une prédénitrification (réaction 1) et une dégradation de la pollution carbonée sont réalisées (environ 35% de l'effluent décanté est envoyé vers la zone d'anoxie amont mixte et 65 % vers la zone anoxie amont urbaine).



L'effluent est ensuite introduit dans le Biolift®. C'est un réacteur biologique à culture fixée sur lit de microsable fluidisé (figure 2.1.2). Il est composé de 14 cellules pour la filière mixte et 18 pour la filière urbaine. La surface spécifique de fixation des microorganismes est considérable puisqu'elle représente environ 900 à 1800 m²/m³ de réacteur. L'injection d'air par des oxytubes va permettre la nitrification :

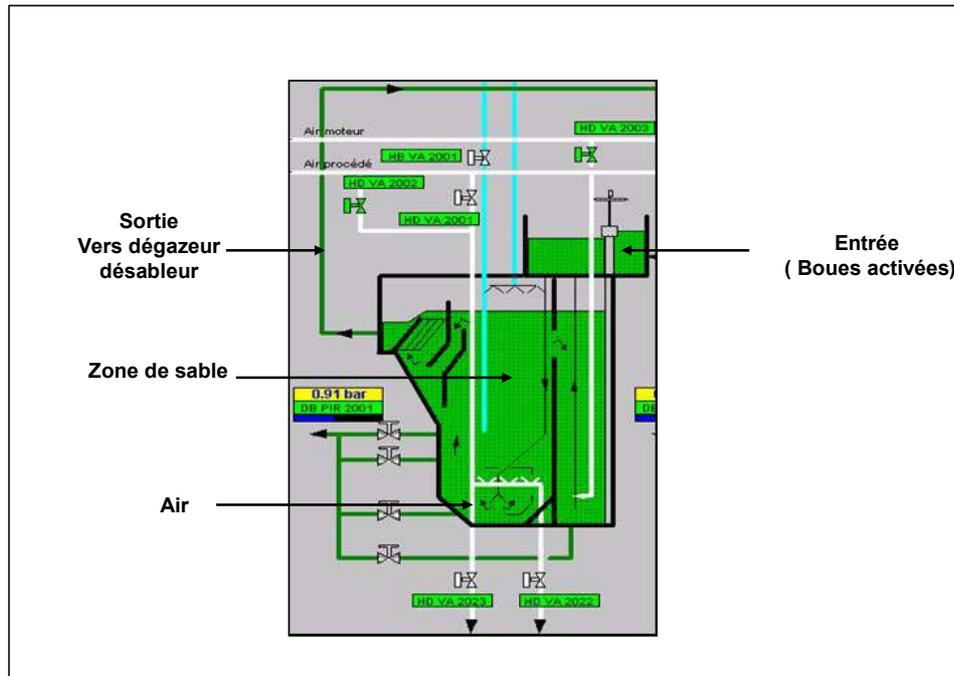


Figure n° 2.1.2 : Détail d'une cellule du Biolift®

Après passage dans le Biolift®, l'effluent est dirigé vers le dégazeur (suppression des mousses formées dans le Biolift® avec un pont racleur)/dessableur (récupération des microsables et retour vers le Biolift®). Il est ensuite envoyé vers les bassins d'anoxie aval, puis dirigé vers les clarificateurs où une partie des boues sera recyclée et l'excès sera envoyé vers les flottateurs industriels. A la sortie des clarificateurs un traitement physico-chimique permettant d'éliminer les phosphates est réalisé sur l'eau épurée avant que celle-ci ne soit rejetée à la Meurthe. Le tableau 2.1.1 présente les principales caractéristiques ponctuelles des eaux usées de Nancy-Maxéville.

Paramètres moyens journaliers	Débit : 100 000 m ³ /j
DCO	260 mg/L – 26 t/j
DBO5	120 mg/L – 12 t/j
MES	150 mg/L – 15 t/j
NTK	30 mg/L – 3 t/j
P total	10 mg/L – 1 t/j

Tableau n ° 2.1.1 : Principales caractéristiques des eaux usées urbaines de Nancy
(source: station d'épuration)

Les eaux industrielles provenant de la Brasserie Kronenbourg de Champigneulle subissent au préalable un prétraitement (dégrillage, déshuilage, neutralisation) sur site. Un procédé de traitement biologique « forte charge » équivalent à un bassin d'aération, utilisant de l'oxygène pur (turbines) permet de dégrader partiellement la pollution. La séparation des boues est réalisée sur deux flottateurs à air pressurisé (3 bars). Les boues raclées à la surface sont envoyées aux digesteurs. Les étapes suivantes du traitement sont identiques à celles de la filière urbaine.

2.1.2 Station d'épuration de Pont-à-Mousson

La station d'épuration du syndicat intercommunal d'assainissement de l'agglomération de Pont à Mousson est située chemin de la Grande Corvée sur la rive droite de la Moselle. La capacité nominale de cette station urbaine est de 15 000 équivalent-habitant. Afin de faire face à l'entrée de nouvelles communes dans le syndicat, on estime qu'elle devra être portée à 32 000 équivalent-habitant. Son prétraitement est composé d'un dégrillage, d'un dessablage et déshuilage combiné. L'eau usée est ensuite dirigée vers le traitement biologique. Il est composé par une zone de biosorption ou zone de contact dont le but est d'améliorer la décantation des boues, et par un bassin d'aération dans lequel une déphosphatation est réalisée par ajout de $FeCl_3$.

La nitrification et la dénitrification se font en alternance par séquençage de l'aération. La cellule d'aération ($V = 3500 \text{ m}^3$) fonctionne par dissociation de l'aération et du brassage. L'effluent est transporté jusqu'au dégazeur où il subit une désaération indispensable avant décantation. La séparation des boues et de l'eau épurée est réalisée par deux clarificateurs de volume 2868 m^3 et l'effluent épuré est envoyé dans la Moselle. Les boues sont dirigées vers un silo préconcentrateur et déshydratées par centrifugation (débit unitaire maximum admissible $25 \text{ m}^3/\text{h}$). La siccité des boues est de l'ordre de 21 %. Le tableau 2.1.2 présente les principales caractéristiques ponctuelles des eaux usées de Pont-à-Mousson

Volume journalier par temps sec	Débit : $5495 \text{ m}^3/\text{j}$
DCO	320 mg/L - 1758 kg/j
DBO5	160 mg/L - 879 kg/j
MES	240 mg/L - 1319 kg/j
NTK	9,6 mg/L - 220 kg/j

Tableau n° 2.1.2 : Principales caractéristiques des eaux usées de Pont-à-Mousson
(source: station d'épuration)

2.1.3 Station de Baccarat

Les eaux usées à traiter par la station d'épuration sont constituées principalement par des effluents d'origine domestique. Les réseaux sont unitaires et la technique retenue pour assurer l'épuration biologique est le bassin à boues activées. La capacité nominale de cette station urbaine est de 6000 équivalents habitants. Le tableau 2.1.3 présente les principales caractéristiques des eaux usées de Baccarat.

Volume journalier par temps sec	Débit : 1620 m ³ /j
DCO	370 mg/L - 600 kg/j
DBO5	222 mg/L - 360 kg/j
MES	296 mg/L - 480 kg/j
NTK	56 mg/L - 90 kg/j
P total	15 mg/L - 24 kg/j

Tableau n° 2.1.3 : Principales caractéristiques des eaux usées urbaines de Baccarat (source: station d'épuration)

2.1.4 Les petites stations de traitement d'eau usée

D'autres stations d'épuration ont été visitées ponctuellement (Dombasle-sur-Meurthe, Saulcy-sur-Meurthe..), afin de valider les différentes méthodes d'analyse d'images couleurs.

2.1.5 Pilote de boues activées

Le pilote de boues activées est constitué de deux bassins en plexiglas fixés sur une ossature métallique (figure n° 2.1.3). Le premier bassin représente le réacteur d'aération. Il est formé d'une base pyramidale ($l = 31,5$ cm, $h = 17$ cm) et d'un corps cubique ($c = 31,5$ cm, $h = 35,5$ cm).

Son aération est réalisée en continu par cinq diffuseurs d'air poreux disposés au fond du bassin. La présence de trois vannes localisées à différentes hauteurs du réacteur permet d'obtenir plusieurs volumes réactionnels. La sortie la plus élevée sera utilisée au cours de nos manipulations, celle-ci permettant d'obtenir un bassin d'aération d'une capacité de 35 litres. Le décanteur est cylindrique ($D = 18,75$ cm, $h = 14,25$ cm) à fond conique ($D = 18,75$ cm, $h = 8,5$ cm).

Le décanteur possède trois vannes de sortie. Celles-ci permettent d'ajuster différents volumes pouvant aller de 9 à 15 litres. Un pont racleur de vitesse de rotation 5 rpm entraîné par un moteur de 3 watts permet d'entraîner une herse qui va décoller et épaissir les boues. Les débits d'alimentation et de recyclage sont fixés à 1,5 l/h, à l'aide d'une pompe péristaltique à deux voies (Gilson Miniplus 2).



Figure n° 2.1.3 : Pilote de boues activées

2.1.6 Les réacteurs discontinus séquentiels de laboratoire

2.1.6.1 Le réacteur discontinu séquentiel de type 1

Le réacteur de forme cylindrique permet d'admettre un volume utile de 6 litres (figure n° 2.1.4). L'agitation est réalisée par un système Eurostar Power Ika[®], constitué d'une tige d'agitation à pales inclinées. Le système d'aération est réalisé par une pompe et l'air est envoyé à travers un diffuseur poreux fixé au fond du réacteur. Une vanne située en bas du cylindre permet d'effectuer la vidange de celui-ci, et deux pompes péristaltiques (Masterflex[®]) assurent l'alimentation en substrat et le refoulement du surnageant. Le débit d'alimentation et de refoulement Q_a et Q_r sont fixés à 3L/h. Des sondes placées au niveau du réacteur ont permis d'enregistrer l'évolution du potentiel redox, de la concentration en oxygène dissous, du pH tout au long des différentes expérimentations.

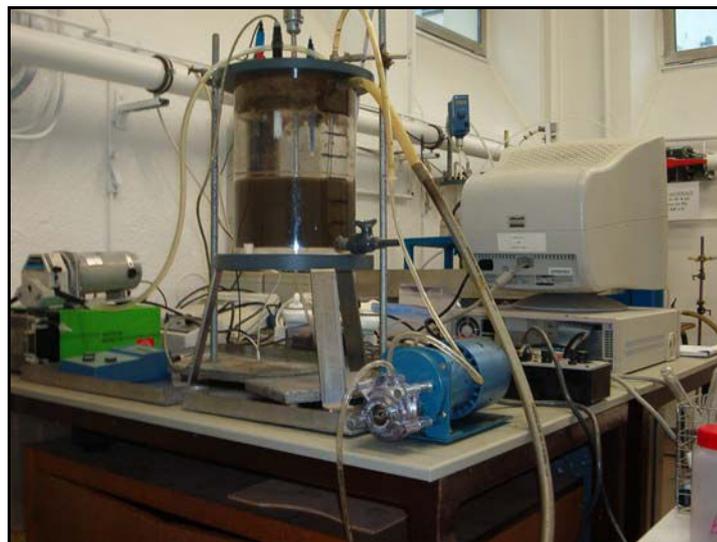


Figure n° 2.1.4 : Réacteur discontinu séquentiel de type 1

2.1.6.2 Le réacteur discontinu séquentiel de type 2 (figure n° 2.1.5)

Il est constitué d'un cône et d'un cylindre qui le surplombe. Le volume maximal du réacteur est de 3 litres. L'ensemble des manipulations a été réalisé avec des volumes de boues activées de 1,750 litres.

Deux pompes péristaltiques (Mini-pump Fisher Scientific et Vial Medical 1000 mini Becton Dickinson) assurent le débit d'alimentation Q_a et de refoulement du surnageant Q_r de 16 mL/min.

L'aération est réalisée à l'aide d'un disque poreux disposé au fond du cône. L'apport d'oxygène est assuré par une pompe à air. Le volume de boues contenu dans le réacteur étant faible (1,750 litres), cette aération permet également d'assurer leur brassage. Les expériences réalisées dans ces deux réacteurs ne comportaient pas de phase d'anoxie.

2.1.6.3 Les colonnes à bulles

Ces réacteurs (figure n° 2.1.5) sont utilisés pour les expériences en condition de famine. Ils sont constitués d'une colonne cylindrique de diamètre 15 cm et de hauteur 70 cm avec à sa base un diffuseur d'air.



Réacteur discontinu séquentiel de type 2



Colonnes à bulles

Figure n° 2.1.5 : Les réacteurs: discontinu séquentiel de type 2 et colonnes à bulles

2.1.7 La biomasse épuratrice et les alimentations en substrat

2.1.7.1 Origine de la biomasse

L'ensemencement des différents réacteurs biologiques a été réalisé par des boues activées prélevées au niveau du dégazeur ou en sortie du Biolift® de la station d'épuration de Nancy-Maxéville. Quelques prélèvements ont également été réalisés sur la STEP de Pont à Mousson dans le bassin biologique. La concentration des matières sèches de manière générale est de l'ordre de 5 g/L.

2.1.7.2 Les alimentations

Sur le tableau n° 2.1.4 sont référencés les différents substrats ainsi que les pilotes :

Substrat à base : D'extrait de viande (S1)	Substrat à base : Amidon/Glucose Acétate (S3)	Substrat à base : Acétate (S5)	Substrat à base : Effluent brut STEP Maxéville (S6)	Substrat à base : Glucose (S7)
<i>Pilote boues activées et réacteur discontinu séquentiel</i>	<i>Pilote de boues activées</i>	<i>Réacteur discontinu séquentiel</i>	<i>Réacteur discontinu séquentiel</i>	<i>Réacteur discontinu séquentiel</i>

Tableau n° 2.1.4 : Les substrats

- Préparation du substrat à base d'extrait de viande (S1) :

On utilise 628 g d'extrait de viande (Viandox®), 33,82 g de saccharose, 27,06 g de chlorure d'ammonium et 3,68 mL d'acide phosphorique par litre de substrat concentré. On répartit cette solution concentrée dans des flacons de 50 mL que l'on congèle. La dissolution d'un flacon de 50 mL dans 36 litres d'eau du réseau permettra d'obtenir le substrat 1 à 200 mgO₂/l de DCO.

- Préparation du substrat à base d'amidon (S3) : (d'après Boeije, 1999)

On dissout dans 100 mL d'eau déminéralisée 85,3 g de chlorure de magnésium, 14,64 g de sulfate de fer, 2,42 g de chromate de potassium, 1,82 g de sulfate de cuivre, 0,27 g sulfate de magnésium, 0,425 g de sulfate de nickel, 0,25 g de chlorure de plomb, 0,525 g de chlorure de zinc. 10 ml de cette solution est ajouté à 27 g de glucose, 38 g d'acétate de sodium, 34 g d'amidon, 10 g d'urée, 4g de chlorure d'ammonium, 5 g d'extrait de levure, 3 g de dihydrogène-phosphate de potassium que l'on ajuste à 100 mL d'eau déminéralisée. La dissolution de 1 mL de cette préparation dans 1 litre d'eau déminéralisée donne le substrat 2 ayant une DCO de 100 mgO₂/L.

-Préparation du substrat à base d'acétate (S5) : (d'après Krishna et al, 1999)

Ce milieu contient par litre 0,332 g de sulfate d'ammonium, 0,908 g d'acétate d'ammonium, 0,5 g di-hydrogénophosphate de potassium, 0,3 g de sulfate de magnésium et 1 mL de solution de Vishniac et Santer (1957) contenant des traces de métaux. La DCO de ce substrat est de 400 mgO₂/L.

-Préparation du substrat à base de glucose (S7) : (d'après Durmaz et al, 2001)

Ce substrat synthétique est composé de 935 mg/L de glucose, 200 mg/L de peptone, 600 mg/L d'hydrogénophosphate de potassium, 300 mg/L de dihydrogénophosphate de potassium, 225 mg/L de chlorure d'ammonium, 112,5 mg/L de sulfate de magnésium, 3,75 sulfate de fer, sulfate de zinc et de sulfate de manganèse, 15 mg/L de chlorure de calcium, 180 mg/L d'hydrogencarbonate de sodium. La DCO du substrat 7 est de 970 mgO₂/L.

2.2 Les méthodes analytiques

2.2.1 Les concentrations des boues

2.2.1.1 Les matières sèches : MS

La détermination des matières sèches ou également appelé extrait sec revient à faire sécher un volume connu de boues (25 mL) et à déterminer après évaporation totale de l'eau pendant 12h à 105°C, la masse de matières sèches restantes. Cette matière sèche correspond à l'ensemble des matières en suspension et matières solubles.

Pour cela on pèse une coupelle propre et sèche : P1 en g.
On introduit 25 mL de boues que l'on place au four à 106°C.
Après 12 h, on repèse la coupelle : P2 en g

La concentration s'exprime par : $MS (g/L) = (P1-P2).1000/25$

2.2.1.2 Les matières en suspension : MES

La mesure des MES est réalisée à l'aide d'un équipement de filtration sous vide qui permet le passage de l'eau analysée (100 mL) au travers d'un filtre de porosité 5µm. Les MES sont retenues sur le filtre et sont séchées à 105°C pendant 24 heures de manière à éliminer l'eau retenue sur celui-ci. On détermine au préalable la masse du filtre sec au départ (M1 en g) et la masse du filtre avec les résidus après séchage (M2 en g).

La concentration s'exprime par : $MES (g/L) = 1000.(M2-M1)/100$

2.2.1.3 Les tests de décantation

Ce test va permettre de déterminer un volume de floccs biologiques présent dans un litre de boues activées. Il peut être réalisé dans une éprouvette de 1 litre ou dans un cône d'IMOHF après 30 minutes d'attente.

Prélever 1 litre de boues activées et les mettre dans le cône.
Faire éventuellement des dilutions (1/4,1/2) avec de l'eau épurée du décanteur.
Mesurer toutes les 5 minutes pendant 30 minutes la hauteur de boues.

2.2.1.4 L'indice de Mohlman (*IM*)

On définit l'Indice de Mohlman (*IM*) ou Sludge Volume Index (SVI), comme étant le rapport du volume occupé par un litre de boue après 30 minutes de décantation (sans dilution) par la concentration de matière en suspension (MES).

$$\text{Indice de Mohlman (mL /g)} = (V_{30 \text{ minutes en mL/L}}) / (C_{\text{MES en g/L}})$$

La valeur moyenne de l'indice de Mohlman est située entre 90 et 150 mL/g. Au dessus de 150 mL/g des problèmes de décantation peuvent apparaître.

2.2.1.5 L'indice de boues (*IB*)

On est quelquefois amené à calculer un autre indice lorsque les boues décantent moyennement bien. Pour cela on détermine l'indice de boues en utilisant la dilution la plus faible pour laquelle le volume après 30 minutes de décantation (V_{30}) est inférieur à 300 mL.

$$\text{Indice de Boues (mL /g)} = (V_{30 \text{ de la dilution la plus faible } < 300\text{mL}}) / (C_{\text{MES en g/L}}) \cdot \text{Dilution}$$

2.2.2 pH

Ces deux paramètres ont été mesurés sur les échantillons de boues ou d'eaux usées. Ces deux mesures sont réalisées sous agitation. Le pH est mesuré avec une sonde Radiometer CL 217 LT. L'électrode de verre contenant du KCl est combinée à une électrode Ag /AgCl. Avant chaque utilisation, la sonde est étalonnée avec des tampons pH = 4 et 10. L'erreur relative sur la mesure est de 0,1 unité de pH.

2.2.3 Mesure du carbone organique total

L'appareil est un COT mètre de type Appollo 9000 (TEKMAN- DOHRMANN). Le carbone est tout d'abord converti en CO₂ dans le four à combustion. Un gaz vecteur balaie ensuite le CO₂ produit à travers un détecteur infrarouge non dispersif (NDIR). Le NDIR, sensible à la fréquence d'absorption du CO₂, génère un signal non linéaire. Ce signal est alors linéarisé et intégré sur la durée d'analyse de l'échantillon. La surface obtenue est ensuite comparée aux données de calibration mémorisées et une teneur en carbone exprimée en parties par million (ppm) est alors calculée.

2.2.4 Le dosage des polysaccharides des boues

500 mL de boues sont sonifiées pendant 3 minutes à 40 watts de façon à dissocier au maximum les floccs et ne pas lyser les microorganismes. L'appareil utilisé est un ultrasonificateur Vibracell de type 600 watts. Le choix de la puissance de sonification a été réalisé de façon à relarguer une quantité optimale de polymères extracellulaires contenus dans les floccs tout en limitant la lyse bactérienne. 50 mL de boues activées sonifiées sont centrifugées à 10 000 tours/min pendant 30 minutes et à 4°C. Le surnageant contient les polysaccharides contenus dans les floccs.

Les polysaccharides sont ensuite dosés par la méthode colorimétrique de Dubois et al (1956). Cette méthode repose sur la déshydratation à chaud des oses en milieu sulfurique et la formation de l'hydroxyméthylfurfural. Ce dernier réagit avec le phénol pour donner un composé coloré absorbant à 486 nm (figure n° 2.2.5).

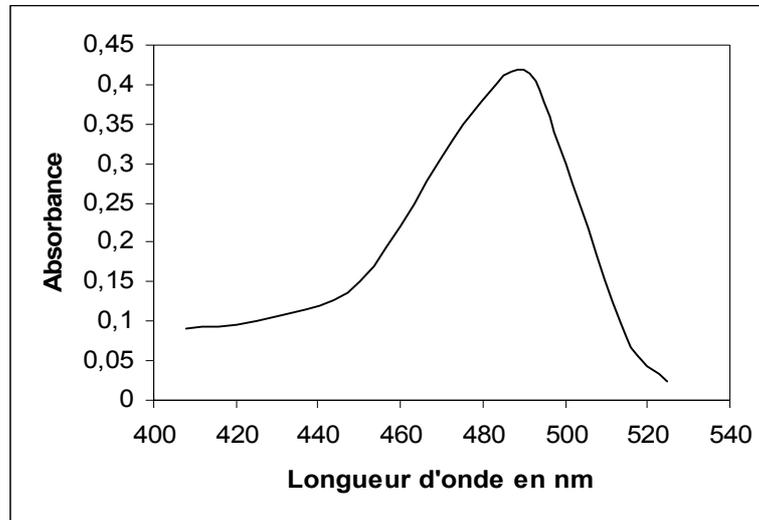


Figure n° 2.2.5 : Absorbance du complexe coloré à 486 nm

Un millilitre de phénol à 5 % est ajouté à un millilitre de surnageant (contenant de 1 à 100 mg équivalent glucose/L), avec 5 mL d'acide sulfurique concentré. Le mélange est placé au bain marie à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont repris et placés à l'obscurité pendant 30 minutes et on lit l'absorbance à 486 nm. A partir d'une courbe étalon (10-100 mg/L), on détermine la concentration en mg équivalent glucose/L (figure n° 2.2.6).

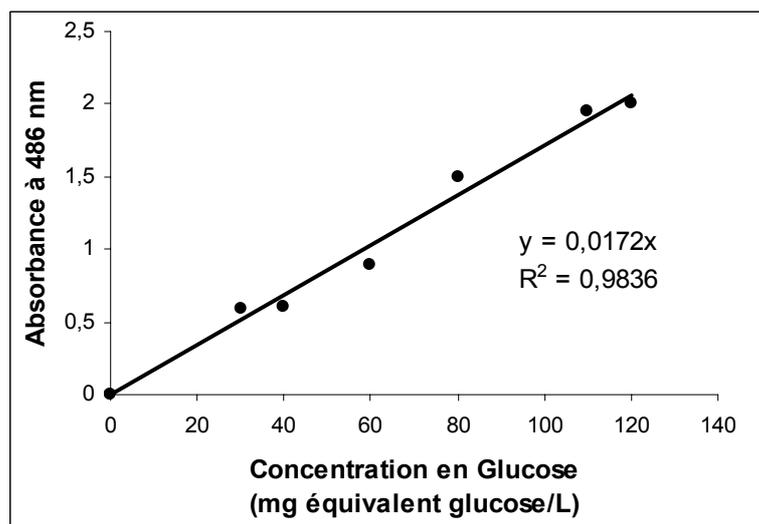


Figure 2.2.6 : Droite d'étalonnage pour la mesure du glucose

2.2 5. La spectrophotométrie d'absorption UV-Visible

Le spectrophotomètre utilisé est un SECOMAM Anthélie Light[®] (figure n° 2.2.1), possédant une gamme spectrale de 200 nm à 900 nm. La précision est de plus ou moins 1 nm et la reproductibilité de 0, 1 nm. Une cellule en quartz de 10 mm a été employée. Deux sources de lumière sont utilisées : une lampe visible tungstène halogène et une lampe UV au deutérium.

La vitesse de balayage a été fixée à 1200 nm/min. Avant chaque mesure l'échantillon est préalablement filtré pour éliminer les particules de grandes tailles qui ont tendance à diffuser la lumière incidente dans toutes les directions. Les blancs sont réalisés dans une cellule en quartz identique à la précédente avec de l'eau déminéralisée.



Figure n° 2.2.1 : Spectrophotomètre UV- Visible

2.2.6 Spectro-photocolorimètre HACH 2400

La gamme de longueur d'onde de cet appareil peut s'étendre de 400 à 800 nm (± 1 nm). La sélection de la longueur d'onde peut s'effectuer manuellement en mode signal unique ou être automatique en mode programme. La lecture des résultats peut s'effectuer en mode transmission, absorption ou concentration.

2.2.6.1 Turbidité

La turbidité permet de nous donner des renseignements sur la transparence d'un liquide. Elle traduit la présence de particules en suspension dans l'échantillon. La méthode qui a été employée mesure la lumière transmise à 450 nm avec un spectromètre DR/2400. Les résultats sont exprimés en unités FTU (Unité Formazine de Turbidité) dans une gamme de 0 à 450 FTU. Le blanc a été réalisé avec de l'eau déminéralisée. La figure n° 2.2.2 représente la courbe d'étalonnage réalisée avec différentes solutions de formazine 400, 200, 100, 50, 10, 5 FTU.

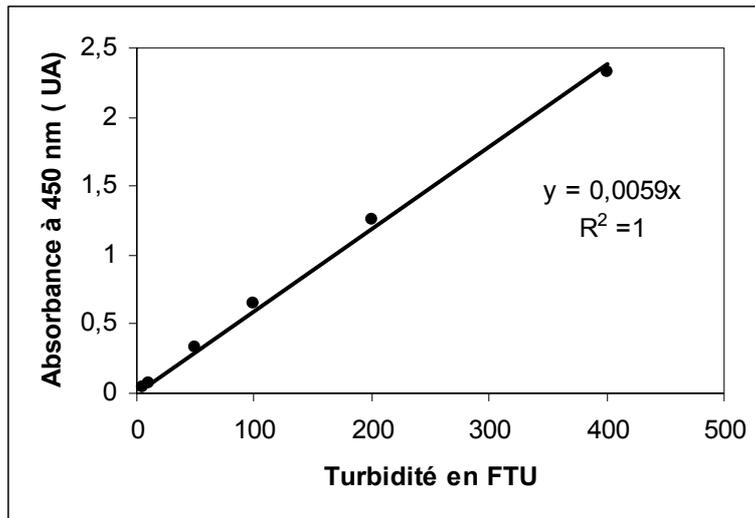


Figure n° 2.2.2 : Droite d'étalonnage pour la mesure de la turbidité

2.2.6.2 L'ammonium

La mesure de l'ammonium se fait à l'aide du spectrophotomètre Hach 2400 et du réactif de Nessler pour des gammes de 0,02 à 2,50 mg/L. Le réactif de Nessler (iodo-mercure de potassium alcalin) en présence d'ions ammonium est décomposé avec formation d'iodure de dimercuriammonium produisant une couleur jaune et absorbant à 425 nm. La figure n° 2.2.3 présente la courbe d'étalonnage réalisée avec une solution de chlorure d'ammonium. Les résultats sont toujours exprimés en mg/L d'azote N.

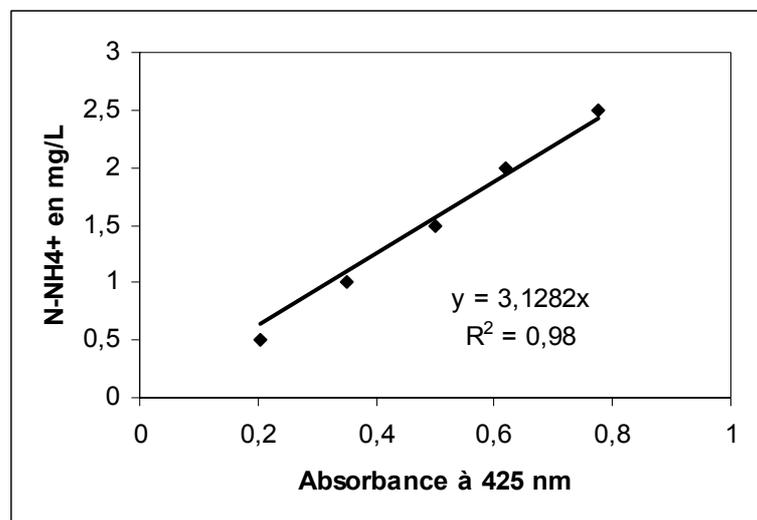


Figure n° 2.2.3 : Droite d'étalonnage pour la mesure de l'azote ammoniacal

2.2.6.3 La DCO

La DCO correspond à la quantité de di-oxygène nécessaire pour oxyder la majeure partie des composés organiques biodégradables ou non et certains sels minéraux oxydables. On réalise l'oxydation chimique des matières réductrices contenues dans l'eau par un excès de dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ en milieu sulfurique, en présence de sulfate d'argent (catalyseur) et de sulfate de mercure II (complexant des chlorures) pendant deux heures à ébullition. La demande chimique en oxygène (DCO) est exprimée en mg/L d'oxygène.

La méthode DCO utilisée au cours de ces travaux repose sur le même principe que la méthode ci-dessus. On mesure la quantité d'ion chrome Cr^{3+} provenant de la réduction de l'ion dichromate Cr^{6+} par les composés organiques oxydables. Cette quantité est mesurée par absorbance à 620 nm. Au préalable il est nécessaire de préparer une droite étalon avec une solution de potassium-hydrogène-phtalate ($C_8H_5KO_4$) correspondant à une concentration en mg/L de DCO.

Une solution mère de $C_8H_5KO_4$ est préparée sur la base de 0,1280 g pour 100 mL d'eau distillée. Cette solution correspond à une concentration de 1500 mg/L de DCO et l'absorbance à 620 nm a été mesurée afin d'établir une droite étalon (figure n° 2.2.4).

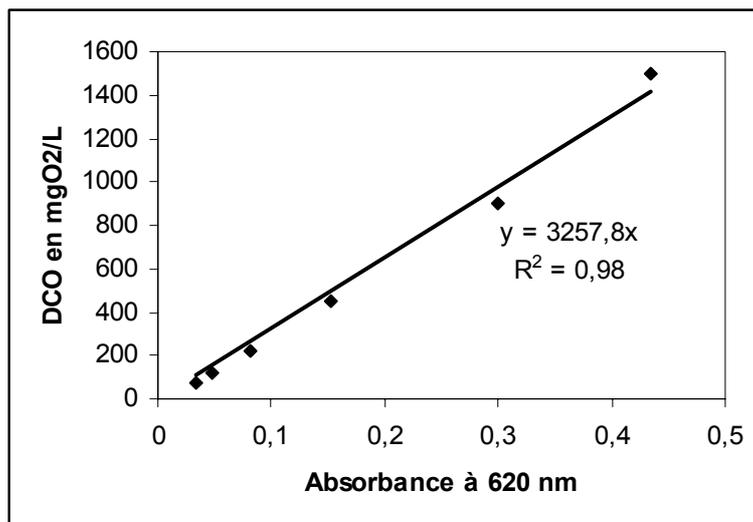


Figure n° 2.2.4 : Droite d'étalonnage pour la mesure de la DCO

2.3 Les préparations microscopiques

2.3.1 Préparations sans coloration

2.3.1.1 Etat sec

Cette préparation appelée « état sec » permet de déterminer différents paramètres morphologiques des bactéries filamenteuses et des floccs : nombre moyen et longueur des filaments, surface moyenne et « rugosité » des floccs (da Motta et al, 2001).

Procédure :

Etaler 15 μL de boues sur une lame et fixer à chaleur douce. Observer à un grandissement γ de 100X (objectif 10X). La fixation à la chaleur douce permet de figer une situation. Elle tue les microorganismes brutalement sans modifier leurs aspects morphologiques (figure 2.3.1).

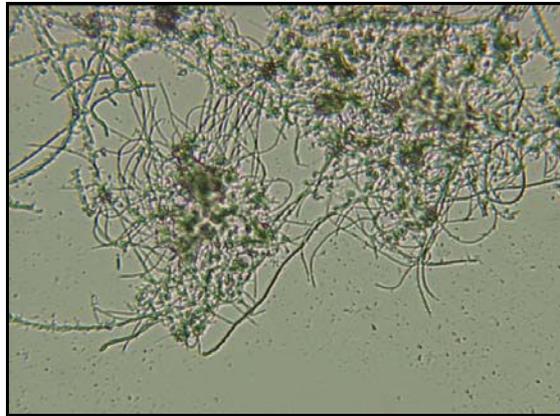


Figure n° 2.3.1
Bactéries filamenteuses et floccs : γ 100 X

2.3.1.2 Etat frais

L'état frais permet également de déterminer les différents paramètres morphologiques des floccs et des microorganismes filamenteux.

15 μL de boues sont placés sur une lame en verre et recouvert par une lamelle. On observe à un grandissement γ de 100X.

2.3.2 Préparations avec les colorations classiques

2.3.2.1 La coloration de Gram

La procédure est celle de Jenkins et al (1993).

On prépare les solutions suivantes :

Solution N°1 :

Violet de cristal	2g
Ethanol à 95 %	20 mL
Oxalate d'ammonium	0,8 g
Eau déminéralisée	80 mL

Solution N°2 :

Iodure de potassium	2g
Iode	1g
Eau déminéralisée	300mL

Solution N°3 :

Safranine O : (2,5 % dans éthanol à 95 %)	10mL
Eau déminéralisée :	100 mL

- Fixer 100 µL de boue sur une lame à chaleur douce.
- Appliquer la solution N°1 pendant une minute, rincer à l'eau distillée
- Appliquer la solution N°2 (1 minute), rincer à l'eau distillée.
- Incliner légèrement la lame et décolorer partiellement avec de l'éthanol à 95% en faisant du goutte à goutte pendant 20 secondes environ.
- Appliquer la solution N°3 une minute rincer et sécher.

L'observation est réalisée à un grossissement γ de 250 X avec de l'huile à immersion. Nos différentes manipulations avec la coloration de Gram ont été réalisées avec un kit GRAM-HÜCKER (réactifs RAL France).



Figure n° 2.3.2
Bactéries Gram (+) et Gram (-) : γ 250 X.

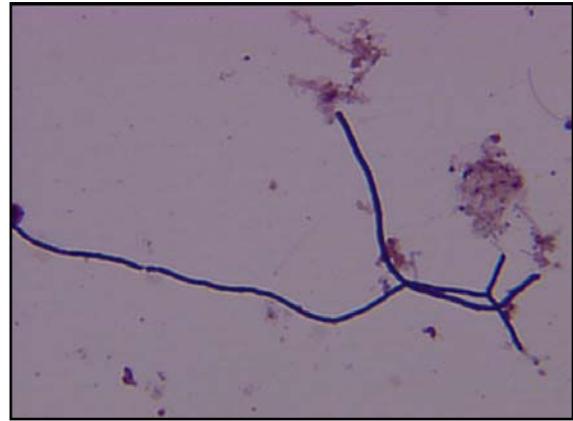


Figure n° 2.3.3
Bactéries Gram+ : γ 250X

2.3.2.2 La coloration de Neisser

Cette coloration est réalisée en milieu acide acétique en présence de bleu de méthylène et contre colorée par du Brun de Bismark. Les filaments contenant les granules de polyphosphates sont bleus foncés et considérés Neisser positif, alors que les filaments colorés en jaune brun sont Neisser négatif. Elle permet de mettre en évidence les réserves énergétiques (ATP) et de suivre l'évolution du polyphosphate sous forme de granulations bleu noir chez les bactéries filamenteuses.

La procédure est celle décrite par Jenkins et al (1993).

Solution de Bleu acétique

Bleu de méthylène	1g
Alcool absolu	20 mL
Acide acétique glacial	50 mL
Eau déminéralisée	950 mL

Solution de brun de Bismark :

Brun de Bismark	2 g
Eau déminéralisée	1000 mL

- Fixer 100 µL de boue sur une lame à chaleur douce.
- appliquer la solution de bleu acétique pendant 10 minutes environ.
- Rincer à l'eau déminéralisée
- Recouvrir avec la solution de brun de Bismark pendant 1 minute.

L'observation est réalisée en microscopie optique à contraste de phase en présence d'huile à immersion, grandissement γ de 250X (figure n° 2.3.4).

2.3.2.3 La coloration de Loeffler

Cette technique est basée sur une coloration au bleu de méthylène en milieu acide sulfurique et contre colorée en présence de safranine. Elle permet de mettre en évidence les polyphosphates sous forme de granulations bleues chez bactéries.

La procédure est celle décrite par Clark (1981).

Bleu de méthylène 1%

Acide sulfurique concentré 0,1 %

Solution d'iode similaire à la coloration Gram.

Contre coloration safranine 1%

- Fixer 100 µL de boue sur une lame à chaleur douce.
- Appliquer la solution de Bleu Méthylène Loeffler pendant 5 minutes et rincer à l'eau déminéralisée.
- Incliner légèrement la lame et décolorer partiellement avec la solution d'acide sulfurique en pratiquant du goutte à goutte pendant 10 secondes environ.
- Recouvrir pendant 1 minute avec la solution d'iode
- Rincer à l'eau distillée
- Contre colorer avec la safranine

On réalise l'observation en microscopie optique (objectif 25X) en contraste de phase. Les granules de PHB sont colorés en bleu clair et le cytoplasme en rose (figure n° 2.3.5).

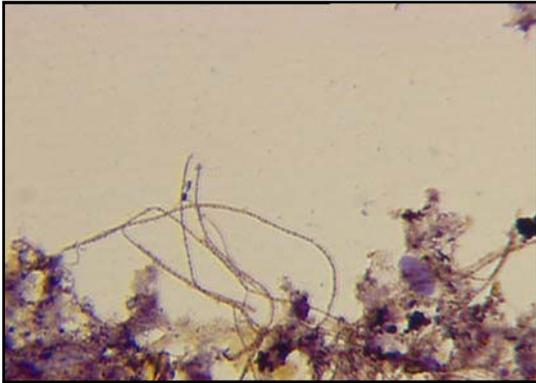


Figure n° 2.3.4
Coloration de Neisser : γ 250X

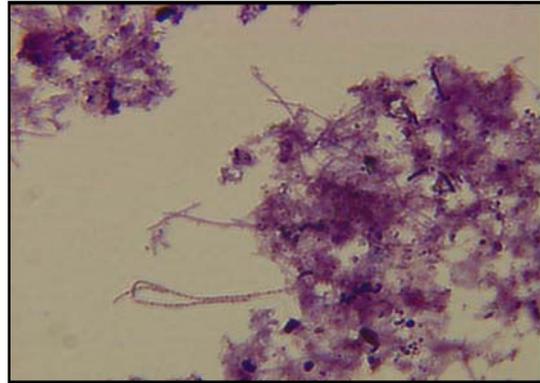


Figure n° 2.3.5
Coloration de Loeffler : γ 250X

2.3.2.4 La coloration Noir de Soudan

Elle est réalisée en présence de Noir de Soudan, composé très soluble dans les lipides et contre colorée par la safranine. Les filaments contenant du matériel lipidique (PHB) sont colorés en bleu et ceux qui n'en possèdent pas en rouge.

La procédure est celle décrite par Clark (1981).

Solution N°1 : noir de Soudan à 0,3 % (dans l'éthanol à 60 %)

Solution N°2 : safranine O à 0,5 %

- Fixer 100 μ L de boue sur une lame à chaleur douce.
- Recouvrir avec la solution N°1 pendant 10 minutes et rincer à l'eau distillée.
- Appliquer la solution N°2 pendant 1 minute
- Rincer à l'eau
- Laisser sécher
-

Les lames sont observées en microscopie optique en contraste de phase avec de l'huile à immersion au grossissement γ : 250X.

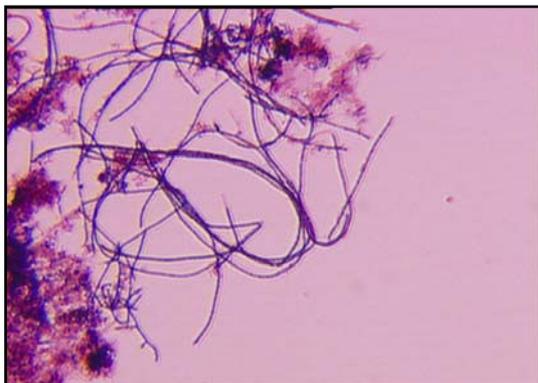


Figure n° 2.3.4
Coloration Noir de Soudan PHB+ : γ 250X

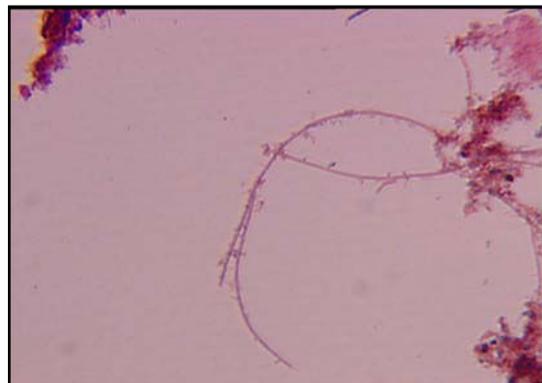


Figure n° 2.3.5
Coloration Noir de Soudan PHB- : γ 250X

2.3.2.5 La coloration à l'encre de Chine (India ink)

Le noir de carbone, composant majoritaire de l'encre de Chine, pénètre à l'intérieur des floccs si leur composition en EPS n'est pas trop élevée. En revanche les boues contenant de fortes concentrations en composés extracellulaires bloquent l'entrée des particules de carbone (figure n° 2.3.6).

La procédure décrite par Jenkins et al en 1993 est réalisée.

Solution d'encre de Chine

- Étaler sur une lame 15 μL de boues et 5 μL d'encre de Chine, recouvrir d'une lamelle et observer au grandissement γ de 100X (objectif 10X) en contraste de phase. Les floccs contenant des composés extracellulaires apparaissent en blanc.

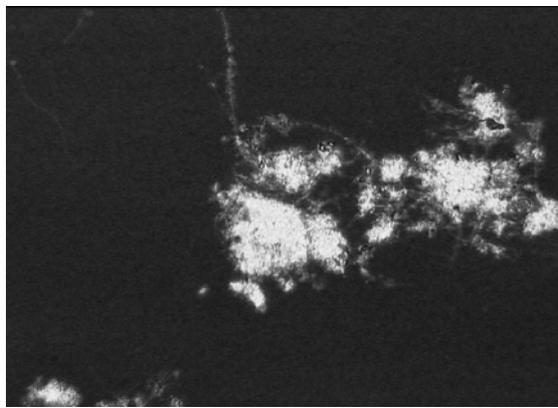


Figure n° 2.3.6
Coloration à l'encre de Chine EPS : γ 100X

2.3.2.6 La coloration à l'INT

La coloration à l'INT permet de mettre en évidence l'activité respiratoire chez les bactéries filamenteuses présentes dans les boues activées.

La procédure est celle décrite par Mauss et al (1997).

- 50 μL de boues sont mises en suspension dans 950 μL de solution d'INT à 0,02g/100mL de tampon (pH 7). La composition du tampon pH 7 pour un volume final de 100 mL (0,02 g INT, 5,3g KH_2PO_4 , 10,5 g K_2HPO_4 , 0,02 glucose).
- Faire deux lavages successifs à l'eau distillée par centrifugation pendant 2 à 3 minutes à 5000 tours par minute.
- Reprendre le culot et étaler 100 μL sur une lame, laisser sécher à chaleur douce.
- La contre coloration est réalisée avec du bleu de méthylène (0,1 %) pendant 1 minute

On observe en microscopie en contraste de phase au grandissement γ de 250X. Les granules d'INT sont colorées en noir dans les filaments.

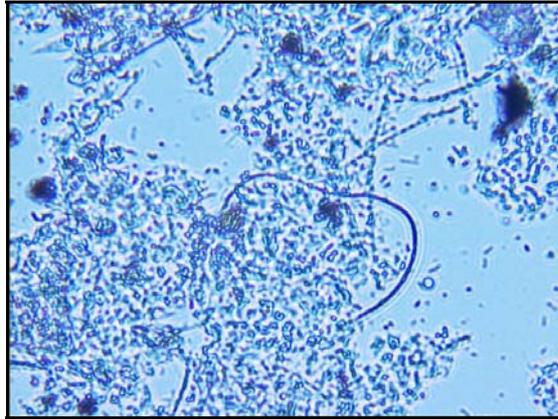


Figure n° 2.3.7
Coloration à l'INT : γ 250X

2.3.2.7 La coloration au DAPI

Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) est un colorant fluorescent très utilisé pour les méthodes FISH. C'est un intercalant spécifique de l'ADN. Le complexe ADN-DAPI excité en lumière UV à une longueur d'onde de 358 nm émet une lumière bleue pour des longueurs d'onde supérieures à 380 nm (figure 2.3.10 et 2.3.11). Le DAPI libre ou lié à des composés autres que l'ADN fluoresce très légèrement en jaune à des longueurs d'onde de 575 nm. Il permet de faire une énumération de la biomasse totale. Ce colorant pénètre aussi bien les bactéries qui ont des membranes intactes ou abîmées.

- Mélanger 1 mL de boues et 600 μ L de DAPI à 50 μ g/mL (solution de stockage à 100 μ g/mL de DMSO).
- Incuber à température ambiante pendant quelques heures.
- Etaler sur une lame 100 μ L de préparation et observer au microscope en épifluorescence, ou confocale à balayage au grandissement 100X (excitation 365 nm, émission 465 nm (bleu) et 575 (jaune)).

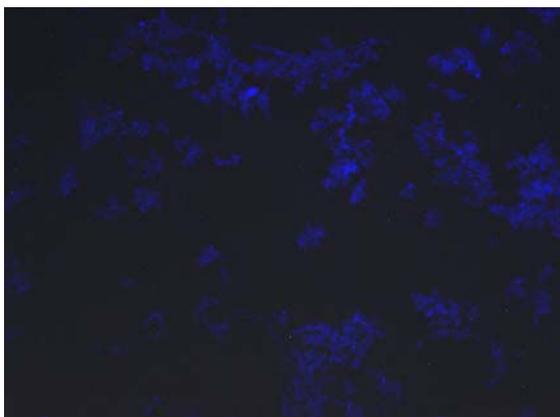


Figure n° 2.3.10 : Coloration au DAPI
(Observation : épifluorescence)

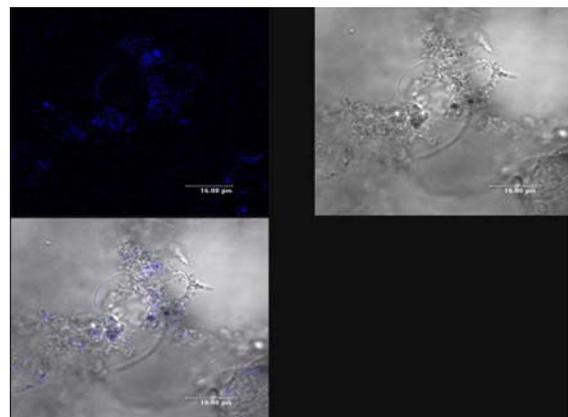


Figure n° 2.3.11 : Coloration au DAPI
(Observation : multi photons)

2.3.2.8 La coloration *BacLight*

La viabilité totale a été évaluée à l'aide de la coloration différentielle *BacLight* (Molecular Probes, Eugene, Oregon), basée sur l'intégrité de la membrane bactérienne. Ce test de coloration est composé de deux colorants fluorescents, le Syto 9 et l'iodure de propidium (IP) (se référer au tableau n° 1.6.3 du chapitre 1.6.2.1).

Le Syto 9 a pour particularité de pénétrer dans toutes les cellules mortes ou vivantes et de se fixer à l'ADN. Il émet une fluorescence verte avec un spectre d'émission à 545 nm. Le deuxième fluorochrome utilisé est l'iodure de propidium (IP) de taille beaucoup plus grosse. Il pénètre dans les cellules dont la membrane est endommagée, exclut le Syto 9 et les colore en rouge (émission 635 nm).

La procédure décrite par le fabricant (Molecular Probes, Eugene, Oregon) est utilisée.

- Prendre 1 mL de boues et ajouter 3 μ L de Bac-Light (mélanger deux volumes égaux des composés A et B).
 - Le composé A est constitué d'une solution à 1,67 mMol/L en Syto 9 et à 1,6 mMol/L en iodure de propidium préparés dans du DMSO.
 - Le composé B est constitué d'une solution à 1,67 mMol/L en Syto 9 et à 18,3 mMol/L en iodure de propidium préparés dans du DMSO.
- Mettre l'échantillon à l'obscurité pendant 5 minutes.
- Préparer entre lame et lamelle 15 μ L de solution et observer en microscopie d'épifluorescence sous un objectif de 10X (temps d'exposition 220 ms). La longueur d'onde d'excitation est de 470 nm, avec émission dans le vert à 545 nm et dans le rouge à 635 (figure n° 2.3.12).

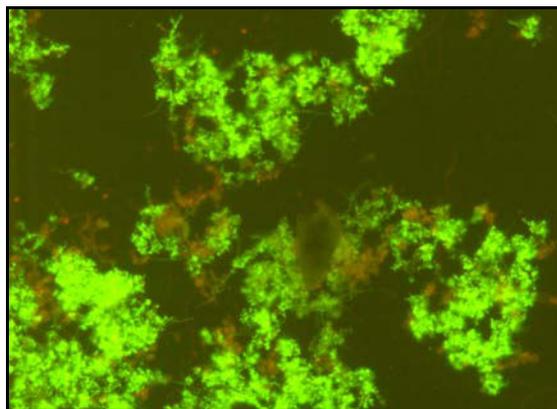


Figure n° 2.3.12 :
Biomasse vivante en vert et morte en rouge

2.3.3 Préparation avec un marqueur moléculaire (FISH)

Les différentes colorations fluorescentes ont été choisies en fonction de leurs spécificités pour les microorganismes et de leur perméabilité membranaire. L'ensemble des caractéristiques de chaque fluorochrome utilisé (spectres d'excitation et d'émission) est résumé dans le tableau n°1.6.3 chapitre 1.6.2.1. La plupart des marqueurs fluorescents proviennent de la société Molecular Probes.

2.3.3.1 Coloration FISH

La présence permanente de *Nocardia Sp* dans nos échantillons de boues activées nous a conduit à choisir une sonde spécifique à cette souche bactérienne :

FITC-5'TTAGACCCAGTTTCCCAGGCT 3' (MWG-BIOTECH SA : Courtaboeuf, France)

La procédure suivante a été utilisée: (d'après Schuppler et al (1998) et Davenport et al (2000))

Tampon d'hybridation (volume final 2 ml) :

360 µL de NaCl 5M (concentration finale 0,9 M)
40 µL 1M tris HCL (concentration finale 20 mM pH 7,2)
2 µL SDS 10%
1000 µL de formamide
598 µL eau déminéralisée stérile

Tampon de lavage (Volume final 50 ml) :

NaCl 5 M 180 µL
1 ml de 1M tris HCL (concentration finale 20 mM pH 7,2)
50 µL SDS 10%
50 ml eau déminéralisée stérile

Solution de PBS :

130mM NaCl, 10 mm sodium phosphate buffer, pH 7,2.

- Sonde : La sonde à ADN a été synthétisée par MWG-BIOTECH SA (Courtaboeuf, France). Elle est composée de 21 nucléotides avec en 5' un marqueur FITC (Fluorescéine d'isothiocyanate).
- Concentration de la sonde pour les hybridations : 67 ng /µL.

Fixation de l'échantillon :

- Mélanger un volume de boues avec 1 volume d'éthanol à 97 % et laisser 16 heures à 4°C.
- Centrifuger à 5000g et enlever le surnageant.
- Laver le culot avec un volume de PBS et le remettre dans un volume de PBS.
- Ajouter un volume d'éthanol froid à 97% et mélanger.
- Bien homogénéiser et prendre 5 µl de solution et étaler sur une lame de microscope.
- Sécher la lame avec une source de chaleur douce.
- Déshydrater la lame dans de l'éthanol à 50, 70, 90% pendant 3 minutes.
- Attendre que la lame soit sèche

Perméabilisation :

Elle peut être réalisée de plusieurs manières :

- Soit avec de l'acide chlorhydrique : Récupérer la lame et ajouter 20 μ l HCL à 1 mol/L, incuber à 48 °C pendant 50 minutes.
- Soit avec la mutanolysine (5000 U 20 μ L pendant 10 minutes à température ambiante, rincer à l'eau distillée stérile) ou du lysozyme (10mg/mL pendant 20 minutes à température ambiante). Laver la lame à l'eau stérile et refaire une déshydratation dans de l'éthanol (3 minutes) 50, 70,90% et laisser sécher.

Hybridation :

- Mettre 1 μ L de sonde et 8 μ L de tampon d'hybridation sur la lame et la recouvrir. L'introduire dans une boîte de Pétri fermée et incuber 2 heures à 46°C. (ajouter au fond de la boîte de Pétri un peu de tampon hybridation)
- Remettre la lame dans une nouvelle boîte avec du tampon de lavage pendant 15 minutes à 46°C.
- Rincer à l'eau stérile glacée

Les observations s'effectuent en microscopie d'épifluorescence et contraste de phase au grandissement γ de 100X.

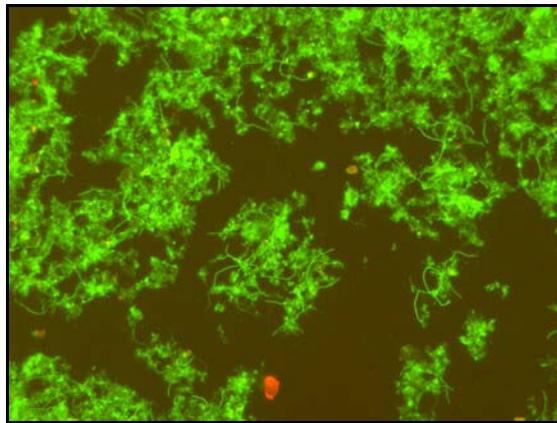


Figure n° 2.3.9 : Coloration FISH

2.4 Les systèmes d'acquisition des images

2.4.1 Les échantillons

L'échantillonnage est étape est primordiale, car elle permet d'avoir une bonne représentativité et répétitivité des résultats. Le lecteur pourra trouver les différentes méthodes de préparation des échantillons microscopiques et les différentes observations microscopiques dans le chapitre 2.3. Les lames utilisées doivent être propres et le volume de boue (15 μL ou 100 μL) doit être étalé de manière uniforme. Le balayage de la lame de manière horizontale permet d'avoir un ensemble d'images représentatives de l'échantillon. La qualité des images dépendra donc du bon réglage de l'opérateur, du système de visualisation (propreté des objectifs) et de la qualité des préparations.

2.4.2 Système d'acquisition en microscopie optique

Le système d'acquisition des images couleurs pour les échantillons avec ou sans colorant classique est composé d'une caméra Sony 3CCD EXAWAWEHAD (Tokyo, Japon), fixée à un microscope optique à contraste de phase Leitz Dialux 20 (Wetzlar, Allemagne) comportant cinq objectifs 2,5X, 10X, 25X, 40X, 100X et un oculaire 10X (figure n° 2.4.1). La carte d'acquisition Matrox (Toronto, Canada) permet de convertir l'image analogique en image numérique.

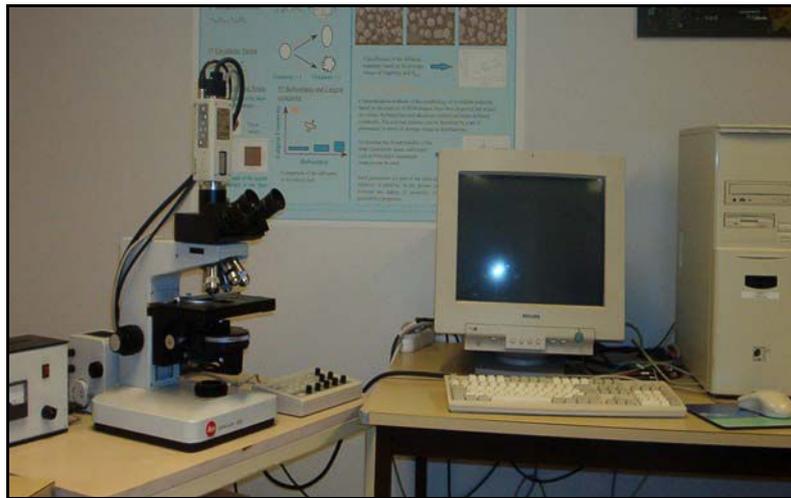


Figure n° 2.4.1 : système d'acquisition des images couleurs avec ou sans colorants basiques

Pour l'acquisition des images de morphologie bactérienne (état sec et état frais) ainsi que pour la quantification des EPS par coloration à l'encre de Chine (chapitre n° 2.3) un grandissement de 100X est utilisé. Un ensemble de filtres (Leitz, Wetzlar, Germany, 513 467) permet l'utilisation du contraste de phase avec les objectifs 25X, 40X ou 100X (filtres 2 et 3).

Des séries de 50 images sont réalisées sur les lames « état sec », « état frais », EPS, Gram et PHB. L'ensemble des acquisitions d'images (taille 768 x 576 pixels en 8 bits format tif) a été réalisé avec un régulateur de puissance lumineuse Leitz (0 à 15 volts) et d'intensité de couleur RVB Sony RM C950 composé d'une échelle comportant 11 graduations (tableau n° 2.4.1).

La taille des pixels a été étalonnée à l'aide d'une lame étalon (NPL, National Physical Laboratory, Grande Bretagne).

Préparations en microscopie optique	Objectifs	Régulateur de Lumière (0 à 15 volts)	Régulateur de couleur RVB graduations (1 à 11) rouge et bleu
Etat sec et état frais	10X	2 volts	4/11 et 9/11
Gram	25X (huile)	6 volts	3/11 et 8/11
Noir de Soudan	25X (huile)	6 volts	4/11 et 8/11
Neisser	25X (huile)	6 volts	4/11 et 8/11
Encre de chine	10X	1 volt	1/11 et 10/11

Tableau n° 2.4.1 : Paramètres de réglage en microscopie optique

2.4.3 Système d'acquisition en microscopie d'épifluorescence

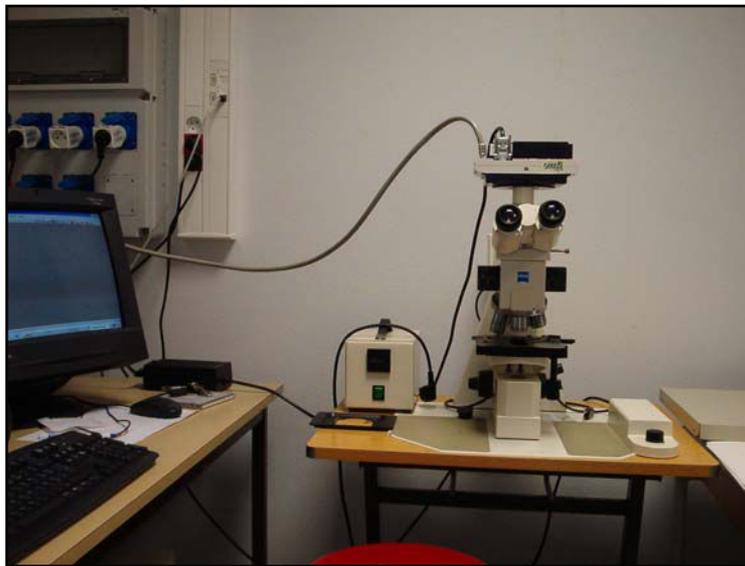


Figure n° 2.4.2 : Microscope d'épifluorescence

Ce système d'acquisition d'images est constitué d'un microscope Axiotech Zeiss (figure 2.4.1), sur lequel est connectée une caméra vidéo monochrome Photometrics Sensys KAF 1400-G2 (Roper Scientific USA). Le microscope possède cinq objectifs (5X, 10X, 20X, 40,100X) et une lampe à vapeur de mercure 50 Watts comme source lumineuse. La carte d'acquisition utilisée est de type Snapper Video et les images ont été acquises en utilisant différents jeux de filtres spécifiques des colorations fluorescentes. Pour l'étude de la viabilité de la biomasse, des séries de 40 images à l'objectif 10X ont été réalisées sur chaque échantillon de boues ainsi que pour les colorations DAPI et FISH.

2.2.4 Logiciel de traitement d'images

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Visilog 5 (Noesis, Les Ulis) à partir de routines écrites dans un langage semblable au langage C. Les résultats sont sauvegardés sous forme de fichiers texte qui peuvent être importés dans un tableur.

2.5 L'analyse d'images

2.5.1 Les caractéristiques des images

2.5.1.1 Les images monochromes

Une image monochrome est composée d'un unique plan de pixels, avec chaque valeur de pixel codant généralement pour 256 niveaux de gris : le niveau de gris 0 correspond au noir, et le niveau de gris 255 au blanc (figures 2.5.1 et 2.5.2).

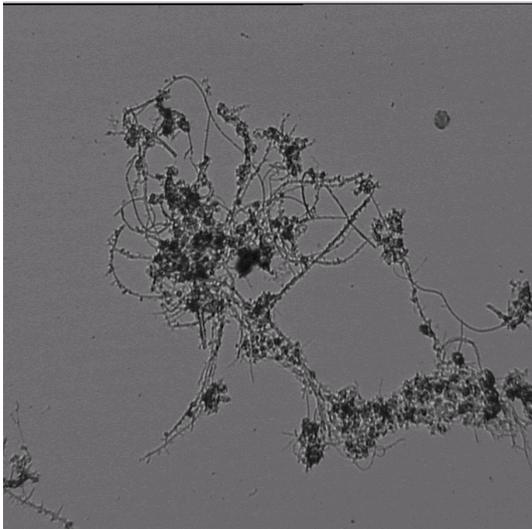


Figure n° 2.5.1 : Image monochrome

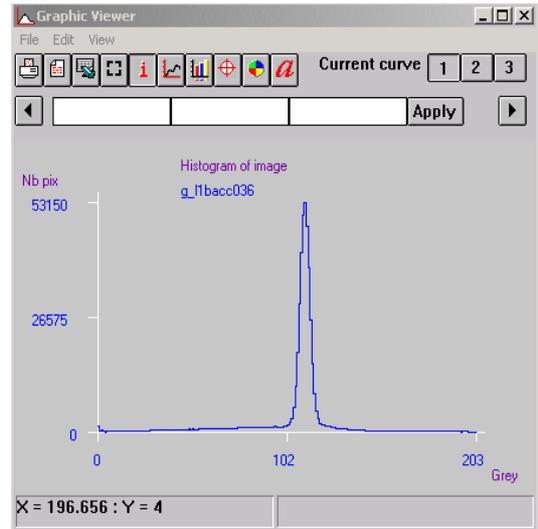


Figure n° 2.5.2 : Niveaux de gris

2.5.1.2 Les images couleurs

L'image couleur est l'association de trois plans de pixels en 256 niveaux de gris sur les trois couleurs primitives rouge, vert, bleu (figure n° 2.5.3 et 2.5.4).

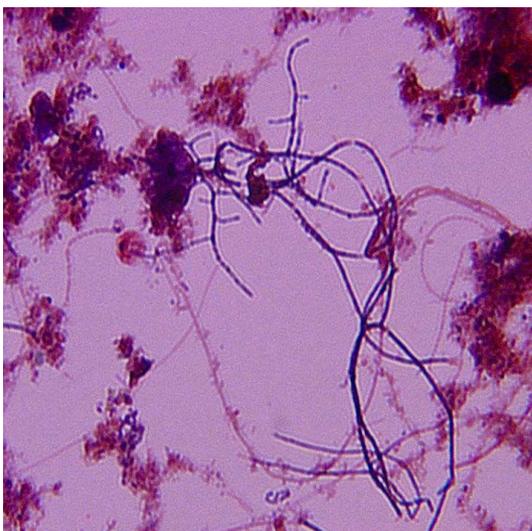


Figure n° 2.5.3 : Image couleur

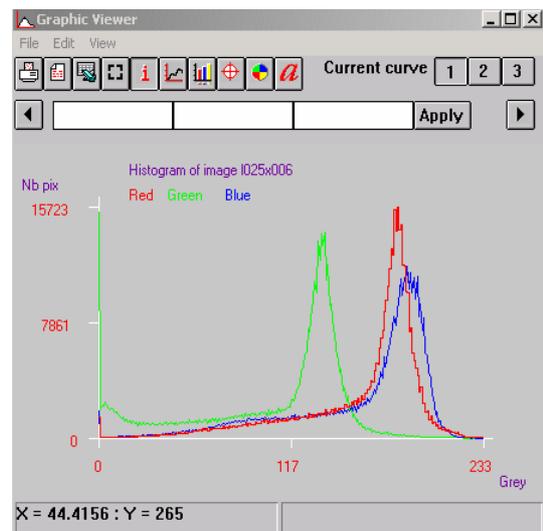


Figure n° 2.5.4 : Couleurs primitives

2.5.2 Les principales transformations d'analyse d'images

- **Principale opération non morphologique utilisée dans ce travail.**

2.5.2.1 Seuillage :

Le seuillage est une opération qui permet de transformer une image en niveaux de gris (256 niveaux) en une image binaire à deux niveaux (figure n° 2.5.5). On sélectionne les niveaux de gris pour mettre en valeur l'information désirée. Dans l'image binaire l'ensemble des pixels d'intérêt prend le niveau 1. Tous les autres pixels (fond de l'image) sont mis à 0. Le seuillage est une étape critique qui peut être faite en mode manuel ou en mode automatique. Il est réalisé par entropie (Kanpur et al, 1985) ou par factorisation (Sonka et al, 1993), algorithmes proposés par le logiciel Visilog 5.

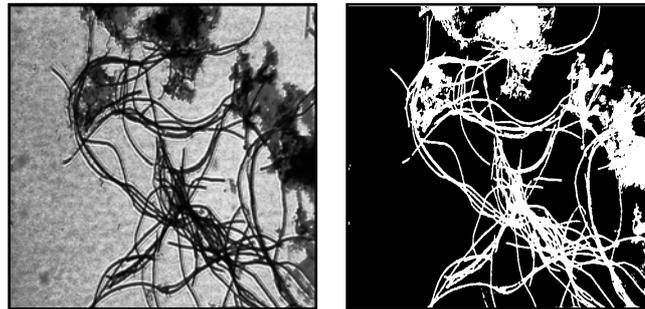


Figure n° 2.5.5 : image en niveau de gris et image binaire

- **Principales opérations morphologiques utilisées dans ce travail**

2.5.2.2 Erosion et dilatation

L'érosion d'un objet par un élément structurant est l'ensemble des points de l'objet pour lesquels l'élément structurant est totalement inclus dans l'objet. L'érosion supprime les petites particules, réduit la taille des autres (figure n° 2.5.6, image a, b, c). L'opérateur dual de l'érosion est la dilatation. Elle représente la ligne externe à l'objet. Elle augmente la taille des particules, peut combler des concavités et connecter des particules (figure n° 2.5.6, image d).

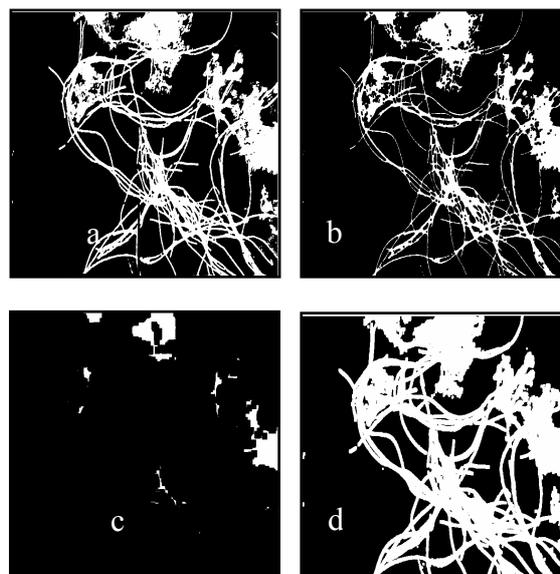


Figure n° 2.5.6 : a) image binaire, b) image érodé d'ordre 1, c) image érodé d'ordre 8, d) image dilaté d'ordre 2

2.5.2.3 Ouverture et fermeture

L'ouverture est composée d'une érosion suivie d'une dilatation par le même élément structurant B de centre X . Elle adoucit les contours, coupe les isthmes étroits et supprime les petites îles. La fermeture est une dilatation suivie d'une érosion. Cette fonction permet un remplissage des petits trous à l'intérieur des particules, élimine les petits détails par un lissage des contours de l'objet et connecte les particules proches.

2.5.2.4 Erosion et reconstruction

Cette fonction permet d'effectuer une érosion avec une taille de l'élément structurant imposé par l'opérateur. A l'aide d'une série de dilations conditionnelles la reconstruction permet de récupérer les objets qui n'ont pas été détruits lors de l'étape d'érosion dans leur état d'origine (figure n° 2.5.7).

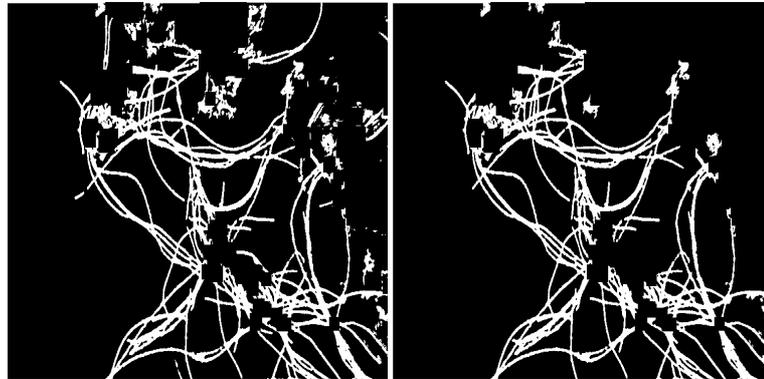


Figure n° 2.5.7 : érosion d'ordre 4 et reconstruction

2.5.2.5 Squelettisation

La squelettisation d'une image binaire permet d'extraire le squelette de l'image. Il représente en fait la quantité d'informations minimales qui décrit complètement l'image. Le squelette d'un objet est la ligne des points pour lesquels la distance du bord de l'objet est atteint par au moins deux points. Les éléments obtenus après squelettisation sont des lignes d'épaisseur d'un pixel (figure n° 2.5.8).

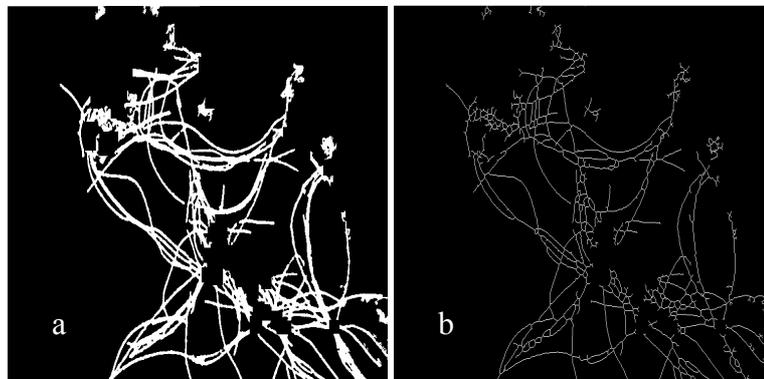


Figure n° 2.5.8 : a) Filaments binarisés, b) Squelette

2.5.3 Les programmes d'analyse d'images appliqués aux boues activées

2.5.3.1 Transformation des images couleurs en images monochromes

Les images acquises dans le système de représentation couleur Rouge-Vert-Bleu (RVB) sont d'abord transformées dans le système Teinte-Intensité-Saturation (TIS). Seule l'information contenue dans la primitive Intensité (identique à une image monochrome) est ici conservée (figure n° 2.5.9).

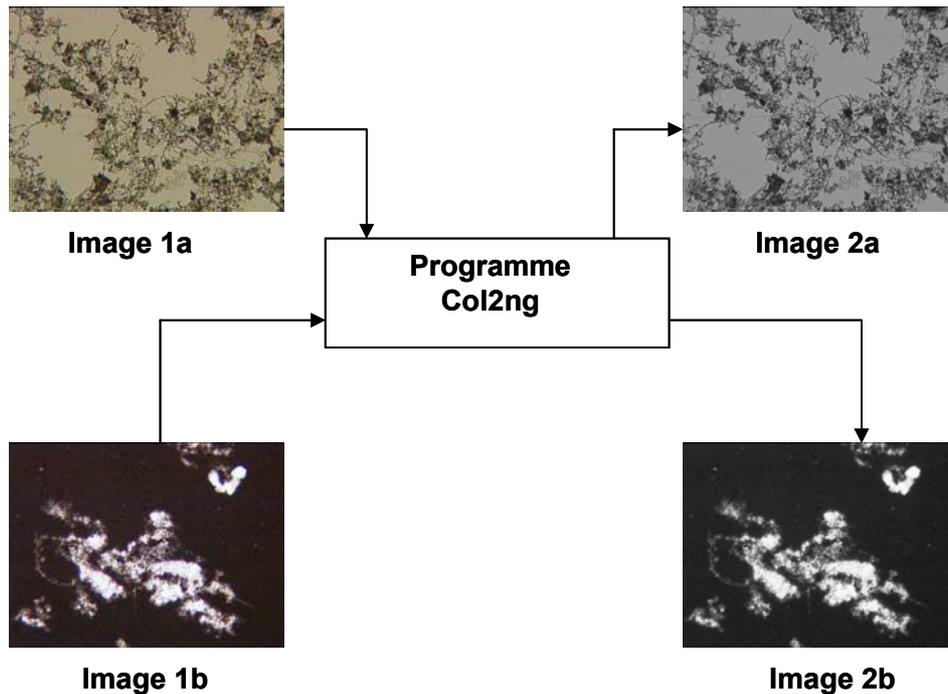


Figure n° 2.5.9 : Image 1a : état sec couleur, image 2a : état sec monochrome
Image 1b : EPS couleur, image 2b : EPS monochrome

2.5.3.2 Programme Noir sec (annexe A)

Cette méthode d'analyse d'images a été décrite initialement par da Motta et al (2001) sur des préparations de boues activées observées entre lame et lamelle (état frais) sans fixation à chaleur douce. Le programme « Noir sec » a été développé à partir de cette procédure.

Il permet de nous renseigner sur la morphologie des bactéries filamenteuses et la surface des floccs au cours de différentes conditions environnementales (foisonnement, moussage). Les principales étapes sont représentées sur la figure n° 2.5.11.

Des séries de 50 images ont été réalisées par lames (grandissement γ de 100X) après avoir fixé à la chaleur douce 15 μ L de boues (chapitre 2.3).

Les images initiales sont tout d'abord transformées en images monochromes (\rightarrow **I1**) suivant la procédure figure n° 2.5.11. Une égalisation globale de l'histogramme des niveaux de gris est réalisée afin d'augmenter le contraste de l'image (\rightarrow **I2**).

Les images résultantes sont ensuite automatiquement segmentées (seuillage par entropie) afin d'obtenir une image binaire (\rightarrow **I3**) qui permet de passer de 256 niveaux de gris à 2 (0 ou 1), et de visualiser le fond et les objets (filaments, flocs).

Sur l'image **I3** on applique les opérations d'érosion, de soustraction pour éliminer les flocs de l'image (\rightarrow **I4**).

Une discrimination selon la taille est effectuée. Celle-ci permet de distinguer les flocs d'une part **I5**, les petits débris et les filaments d'autre part **I6**. L'identification des filaments est basée sur la taille et le rayon de giration (r_g) de chaque élément (da Motta et al 2002).

$$r_g = \frac{\sqrt{M_{2X} + M_{2Y}}}{D_{eq}/2}$$

M_{2X} et M_{2Y} sont les moments d'ordre 2 de l'élément considéré. Le diamètre équivalent des flocs (diamètre d'un disque de surface égale à la surface du floc) est déterminé par la relation suivante :

$$D_{eq} = 2\sqrt{\frac{S}{\pi}}, \text{ S étant la surface projetée des flocs.}$$

Les éléments dont la surface est supérieure à 20 pixels et dont le rayon de giration est supérieur à 1,1 sont considérés comme des filaments. Chaque filament est squelettisé, c'est-à-dire qu'il est réduit à un pixel d'épaisseur. Cette approche permet de dire que la longueur en pixel est égale à la surface totale occupée par le squelette.

Au cours de cette procédure les filaments sont caractérisés par leur nombre (N), leur longueur de squelette (Ls) et la surface des flocs (Sflocs) en pixels. Après intervention d'un facteur de correction suivant le type d'objectif utilisé (objectif 10X, facteur 0,63) les valeurs sont exprimées en μm ou μm^2 .

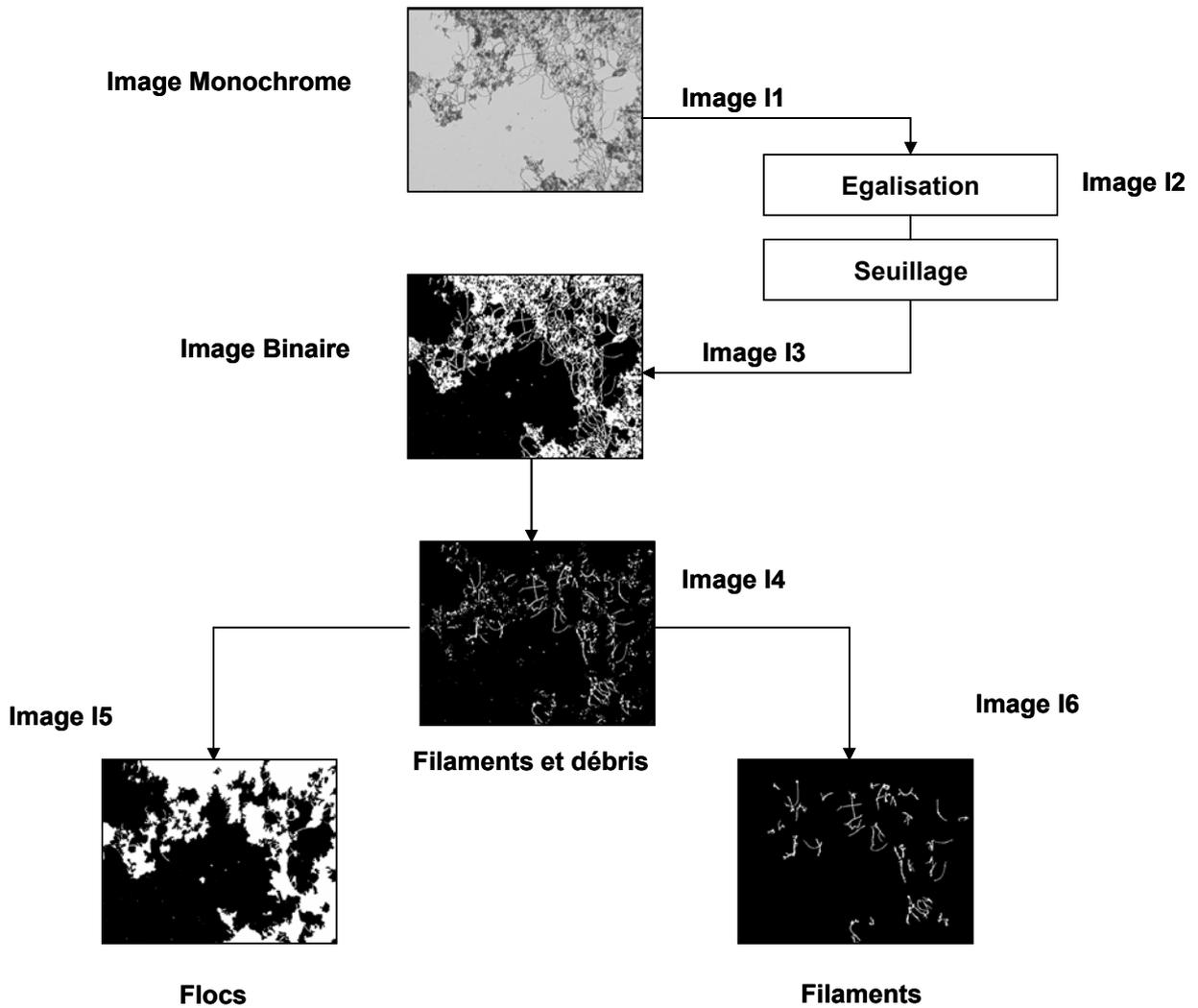


Figure n° 2.5.11 : Les étapes du programme « Noir sec »

2.5.3.3 Programme Gram (annexe A)

LA procédure "Gram" d'analyse d'images couleurs a été appliquée sur des séries de 50 images. Elle permet d'établir les cinétiques de développement des bactéries filamenteuses Gram+ (couleur bleue) et Gram- (couleur rose) se trouvant à l'extérieur des flocs.

Elle consiste dans un premier temps à isoler les bactéries non piégées dans les flocs puis à les caractériser en terme de couleur.

La première étape consiste à transformer le système de représentation de l'image couleur RGB (Red - Green - Blue) en TIS (Teinte - Intensité - Saturation). Seule la composante de saturation (S) est récupérée (image I.3) et subit une égalisation des niveaux de gris (image I.4).

L'étape suivante consiste à réaliser un seuillage par entropie. Cette opération va permettre de transformer l'image en niveau de gris en une image binaire (image **I5**). Les images et les flocs se voient affecter la valeur 1 et le fond de l'image la valeur 0. A ce stade l'image binaire comporte de nombreux débris et flocs dont il faut se débarrasser pour ne récupérer que les filaments ; à cet effet, on réalise des érosions linéaires suivies de reconstructions (image **I7**).

L'élimination des flocs est réalisée par dilatation puis par soustraction logique de ceux-ci à l'image. Afin de ne garder sur l'image que les filaments désirés, on réalise une labellisation de l'image binaire pour les étiqueter. La discrimination entre les petits débris et les filaments sera réalisée à partir de la taille et du rayon de giration des objets (image **I11**).

Les filaments sont ensuite squelettisés, c'est à dire réduit à une ligne d'une épaisseur de 1 pixel (image **I12**).

Le squelette est ensuite nettoyé des petites branches inférieures à 5 pixels. Pour cela on isole les points terminaux du squelette. La fonction « point triple » permet d'isoler les points triples du squelette (points d'intersection). Les points triples sont dilatés puis soustrait du squelette initial. Enfin on reconstruit les branches du squelette par reconstruction à partir des points terminaux. (images **I13 et I14**).

La dernière étape consiste à comptabiliser le nombre de pixels rouges (R) et bleus (B) appartenant aux bactéries filamenteuses. Un pixel sera dit bleu lorsque sa composante bleue est plus élevée que sa composante rouge ($B \text{ valeur} \geq R \text{ valeur}$) et inversement pour un pixel rouge ($B \text{ valeur} < R \text{ valeur}$). La méthode ne repose donc pas sur un seuil de couleur qu'il faudrait ajuster pour chaque image.

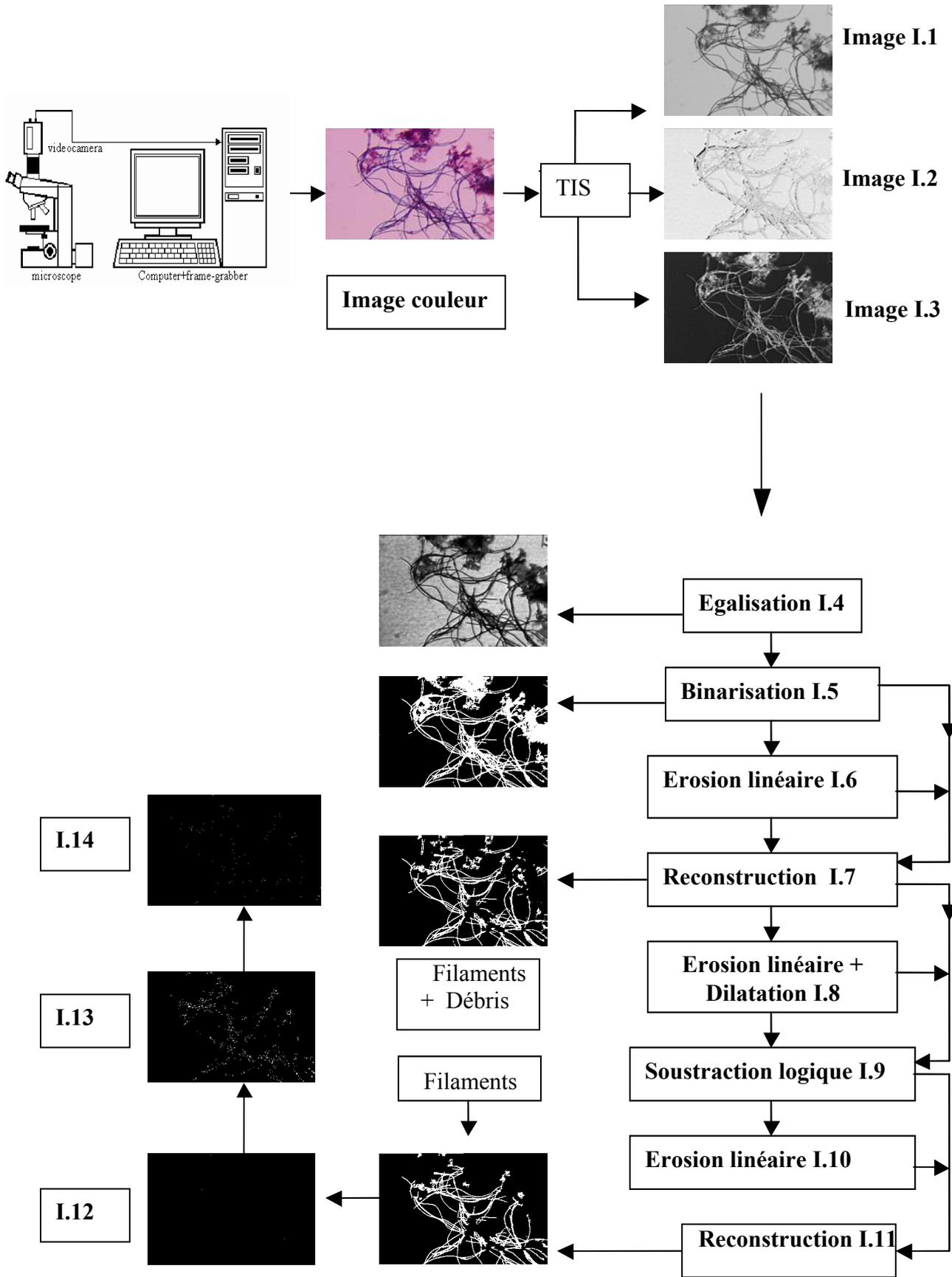


Figure n° 2.5.12 : Les étapes du programme Gram

Deux méthodes de calcul ont été réalisées pour analyser les résultats :

La Méthode « binaire » :

Pour calculer la proportion de bleus contenus dans chaque fragment de filaments, on détermine la proportion P de pixels bleus. Si la proportion $P \geq 50\%$ le filament est considéré comme bleu (Gram+). Inversement si la proportion $P < 50\%$ le fragment est considéré comme rouge (Gram-).

La Méthode « floue » :

Lorsque les fragments filamenteux possèdent un nombre de pixels bleus et rouges très proche il est difficile de déterminer la nature de ceux-ci.

On adopte dans ce cas la méthode « floue ». Un fragment sera comptabilisé comme bleu si $P \geq 66\%$ (Gram+) et comme rouge si $P \leq 33\%$ (Gram-). Lorsque P est compris entre 33% et 66% ($33\% < P < 66\%$) les fragments de filaments sont dits indéterminés.

2.5.3.4 Programme PHB (annexe A)

Cette méthode d'analyse d'images est similaire à la méthode Gram, puisque les bactéries filamenteuses contenant des granules de PHB (poly- β -hydroxybutyrate) prennent une coloration bleue et celles dépourvues de granules restent roses.

Pour ce type de filaments, on calcule la proportion de pixels bleus pour chaque fragment. Sur ces images couleurs, seuls les pixels bleus contenus dans les microorganismes nous intéressent puisqu'ils représentent les granules de poly- β -hydroxybutyrate.

Nous déterminons ensuite les fréquences d'apparition des filaments pour chaque proportion de pixel bleue. Plus les fréquences d'apparition des pixels bleus sont proches de 100 % plus les filaments seront chargés en PHB.

Les principales étapes du programme se trouvent illustrées sur l'organigramme de la figure n° 2.5.13.

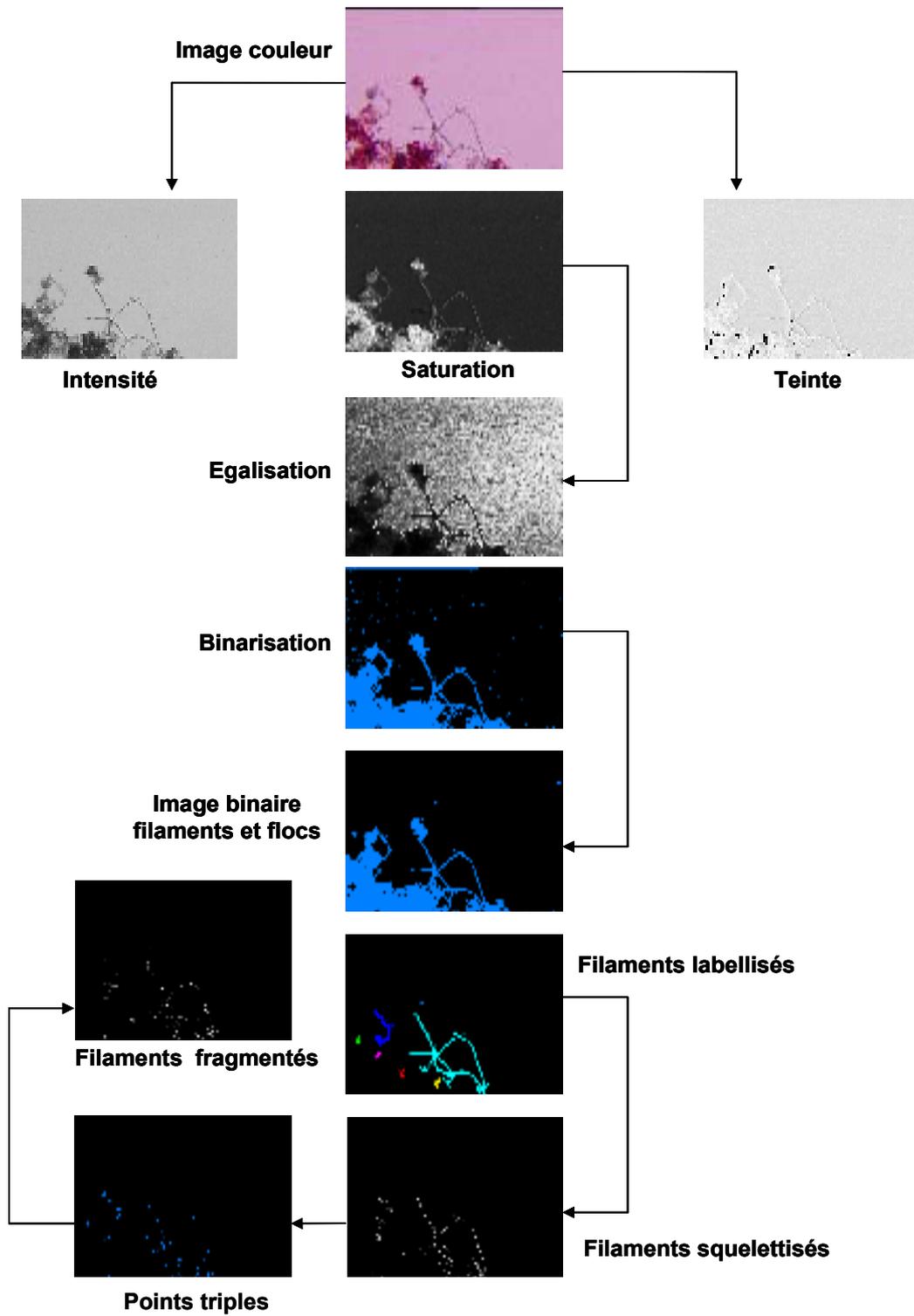


Figure n° 2.5.13 : Les étapes du programme PHB

2.5.3.5 Programme EPS (annexe A)

Le programme « EPS » permet de quantifier les EPS en "volume de blanc" (niveau de gris) contenus dans les floes des boues activées.

Lors de l'acquisition il est impératif que l'opérateur s'assure d'un éclairage uniforme et constant.

Une image est une entité à trois dimensions : x, y et niveau de gris. Il est donc possible de déterminer le volume en pixels "V".

$$"V(\mathbf{X})" = \int_{R^2} I(x,y) dx dy$$

Avec $I(x_i, y_i)$ étant l'intensité d'un pixel de coordonnée x_i, y_i .

La fraction volumique (%) de polymères extracellulaires par image est obtenue en formant le rapport suivant :

$$f(\text{EPS}) = "V(\mathbf{X})" \times 255 / \text{Taille de l'image}$$

2.5.3.6 Programme Viabilité (annexe A)

Le programme « Viabilité » permet d'estimer la viabilité de la biomasse des boues activées. Cette coloration permet de visualiser la biomasse morte en rouge et vivante en vert. Les images acquises pour la viabilité de la biomasse (45 images) ont été réalisées avec un microscope d'épifluorescence et un objectif 10 X (voir paragraphe 2.3.2.8). Pour chaque échantillon des séries de 45 images ont été réalisées.

La viabilité sera déterminée par la valeur moyenne de la surface totale de pixels verts et rouges pour chaque image. Le pourcentage de biomasse viable ou morte correspondra au nombre de pixels verts ou rouges (respectivement) contenus dans la surface définie par la silhouette de la biomasse. Un pixel sera considéré coloré lorsque sa composante verte ou rouge sera supérieure à ε .

La valeur ε représente le seuil coloré du fond de l'image verte ou rouge. Un pixel sera dit vert quand sa composante verte $V > \varepsilon$ et rouge si $R > \varepsilon$.

CHAPITRE III

Etudes morphologiques et physiologiques de la biomasse des boues par analyse automatique d'images.

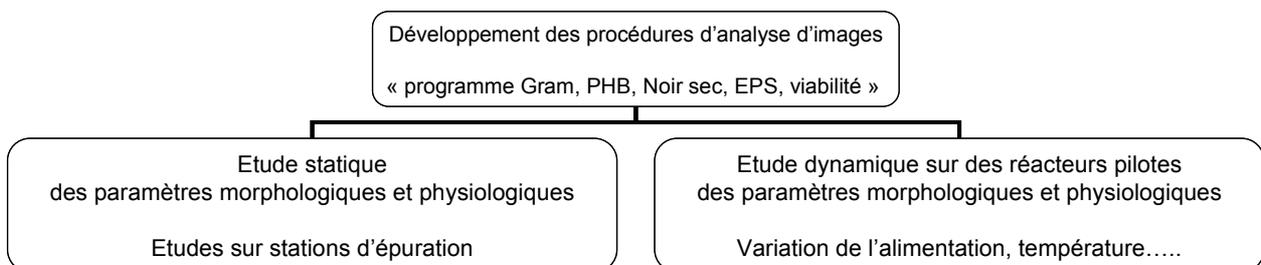
Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la reconnaissance et l'abondance des bactéries filamenteuses ainsi que la structure des flocs permettent aux exploitants des stations d'épuration de prévenir des différents dysfonctionnements biologiques.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats de l'analyse de la biomasse des boues obtenues par cinq programmes d'analyse d'images : programme " Gram " (quantification des populations Gram positifs ou négatifs), " PHB " (étude du métabolisme lipidique), " Noir sec " (étude de la morphologie), " EPS " (quantification des polymères extracellulaires), " Bac Light " (étude de la viabilité).

La première partie portera sur la validation des différentes méthodes d'analyse d'images utilisées. Deux points particuliers seront également développés: le premier mettra en avant les problèmes rencontrés avec certaines colorations microscopiques et l'autre les coûts des différentes colorations.

Les parties qui suivent seront consacrées à deux études : statique et dynamique.

L'étude statique nous renseignera sur la physiologie et la morphologie de la biomasse des boues activées de stations d'épuration en Lorraine. En se basant sur des données de la littérature (stress environnementaux causés par des alimentations diverses, la température, un bactéricide) l'étude dynamique nous permettra de suivre à partir des procédures de colorations et d'analyse d'images développées l'évolution des paramètres morphologiques et physiologiques.



3.1 Validation des différentes méthodes d'analyse d'images :

Afin de mieux cerner les études sur les floccs et les bactéries filamenteuses des boues activées, il est important de faire un choix parmi les nombreuses méthodes de colorations microscopiques (colorations classiques ou fluorescentes) existantes. La première phase du travail consista donc à tester plusieurs types de colorations et à en tirer des résultats quantitatifs.

3.1.1 Validation de la méthode de caractérisation des populations Gram

Pour valider cette méthode, nous avons dans un premier temps comparé les résultats obtenus par analyse automatique d'images avec une méthode manuelle de comptabilisation. Ce test a été effectué par un opérateur sur une série de 34 images issues de différents échantillons de boues. La méthode manuelle a été réalisée en surlignant avec la souris le squelette des bactéries filamenteuses Gram positif ou Gram négatif. Chaque longueur de filament sera exprimée en nombre de pixels (figure n° 3.1.1).

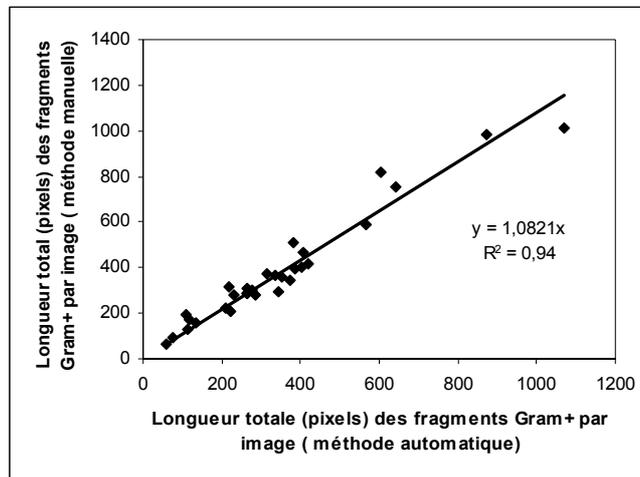


Figure n° 3.1.1 : Comparaison de la quantification des bactéries Gram + entre les méthodes manuelle et automatique (un opérateur)

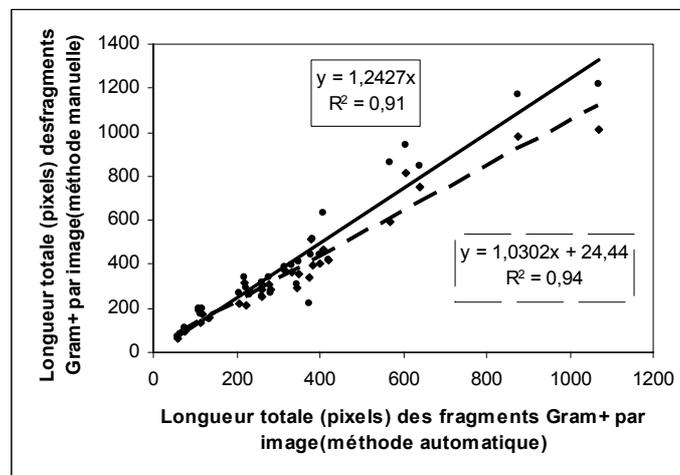


Figure n° 3.1.2 : Comparaison de la quantification des bactéries Gram + entre les méthodes manuelle et automatique (deux opérateurs).

On remarque une bonne corrélation entre la méthode de reconnaissance visuelle (manuelle) et la méthode de quantification binaire. La valeur du coefficient de corrélation obtenue entre les méthodes manuelle et automatique est de 0,94. Un deuxième test faisant intervenir deux opérateurs a été réalisé en utilisant les deux méthodes (figure n° 3.1.2). Les corrélations que l'on observe sont correctes puisque les valeurs sont de 0,91 pour le premier opérateur et de 0,94 pour le second. L'utilisation du test de Kruskal-Wallis (variance non paramétrique) a montré qu'il n'y avait pas de différence entre les trois séries de résultats pour un seuil fixé à 5 %. En effet, on remarque que pour cette série d'images le pourcentage de bactéries Gram positif est de 86 % par la méthode automatique alors que pour la méthode manuelle les valeurs obtenues par deux opérateurs sont 84 % et 85 %.

Afin d'optimiser le nombre d'images à saisir, des séries de 100 images ont été réalisées. Dans le tableau n° 3.1.1 se trouvent une série de 100 images et quatre séries de 50 images pris au hasard parmi la série initiale. Pour la méthode binaire 50 images sont suffisantes. Un test de répétitivité avec un opérateur sur trois lames d'un même échantillon est reporté dans le tableau n° 3.1.1. L'écart type mesuré pour la méthode binaire est inférieur à 5% et celui de la méthode floue pour les deux classes (% Gram indéterminé et % Gram -) est élevé. Dans le second test de répétitivité (tableau n° 3.1.1) les deux lames sont observées par des opérateurs différents. On remarque que, pour cette série de deux lames, les valeurs sont beaucoup plus proches entre les opérateurs et la méthode binaire. De manière générale la méthode binaire est beaucoup plus robuste que la méthode floue pour des séries de 50 images.

Tableau n° 3.1.1 : Tests de répétitivité et de reproductibilité des bactéries Gram +/-

Même opérateur Tableau A	Méthode binaire	Méthode floue		
	% Gram +	% Gram +	% Gram indéterminé	% Gram -
Série de 100 images	93	77	19	3
Série 1 (50 images)	94	49	30	20
Série 2 (50 images)	91	71	24	5
Série 3 (50 images)	95	70	25	13
Série 4 (50 images)	93	82	14	15
Moyenne des 4 séries	93	70	22,5	11
Ecart type	1,5	12,5	6	7

Même opérateur Tableau B	Méthode binaire	Méthode floue		
	% Gram +	% Gram +	% Gram indéterminé	% Gram -
Lame 1 (50 images)	30	19	31	50
Lame 2 (50 images)	22	10	24	66
Lame 3 (50 images)	30	13	42	45
Moyenne	27,5	14	32,5	53,5
Ecart type	4,6	4,6	9	11

Tableau C	Opérateur	Méthode binaire	Méthode floue		
		% Gram +	% Gram +	% Gram indéterminé	% Gram -
Lame 1	1	81	55	36	9
	2	83	71	20	9
Lame 2	3	86	81	13	6
	4	77	53	37	10

3.1.2 Validation de la méthode d'analyse d'images pour quantifier les polymères extracellulaires (EPS)

Des tests identiques aux précédents (reproductibilité et répétitivité) ont été effectués sur des échantillons de boues pour valider la méthode de quantification des polymères extracellulaires (tableau n° 3.1.2). Les écarts types observés sont très faibles, inférieurs ou égaux à 1%. L'examen de différentes séries d'images (50 images ou 100 images) nous indique que les fractions d'EPS sont identiques. L'acquisition de 50 images semble être suffisante pour estimer la teneur en exopolymères.

Tableau n° 3.1.2 : Tests de reproductibilité et de répétitivité des EPS

1 opérateur Une lame		1 opérateur Trois lames		2 opérateurs Lame identique	
	Fraction EPS (%)		Fraction EPS (%)	Fraction EPS (%)	
Série de 100 images	16	Lame 1	15	Opérateur 1	Opérateur 2
Série 1 (50 images)	16,5	Lame 2	17	13,5 %	14%
Série 2 (50 images)	17,5	Lame 3	16		
Moyenne	16,6	Moyenne	16		
Ecart type	0,7	Ecart type	1		

3.1.3 Etude comparative de la morphologie par deux méthodes "état sec" et "état frais "

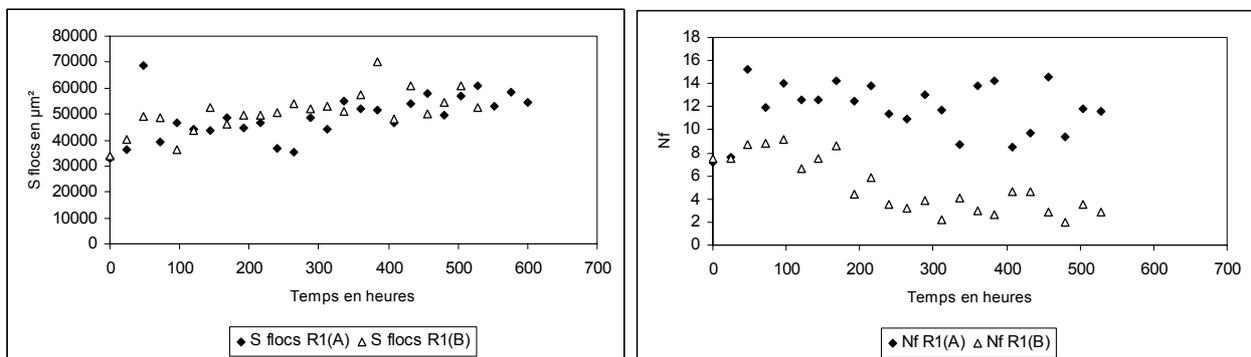


Figure n° 3.1.5 : Comparaison des paramètres morphologiques entre les deux méthodes : "état sec (A) et état frais (B)"

Au travers de cette série de résultats (figure n° 3.1.5), nous avons voulu comparer les deux méthodes d'analyse d'images applicables à la morphologie des floccs et des bactéries filamenteuses : la « méthode état sec » (échantillon fixé à la chaleur douce) et la méthode "état frais" sans fixation. Lorsque l'on compare ces deux techniques, on s'aperçoit que la surface des floccs évolue de manière identique tout au long de l'expérimentation. En revanche, le nombre de filaments comptabilisés par la méthode état sec est supérieur.

Si on examine les deux préparations d'échantillons, on voit qu'une méthode fait intervenir la fixation à la chaleur douce (état sec) et l'autre non. Ce type de fixation permet de réaliser une focalisation beaucoup plus facile. Les acquisitions d'images sont plus compliquées avec la méthode état frais (superposition de différents plans focaux, visualisation moins nette).

Lors du traitement automatique, les images acquises par la technique « noir sec » permettent de récupérer plus aisément les filaments situés à l'intérieur des floccs, contrairement à la seconde méthode. Cette étude comparative nous montre que les préparations par fixation à chaleur douce permettent de récupérer beaucoup plus facilement des informations morphologiques.

3.1.4 Validation de la méthode "Noir sec" pour l'étude de la morphologie des floccs et des bactéries filamenteuses.

Pour valider la méthode "Noir sec" (quantification et longueur des filaments, surface des floccs), nous avons procédé à différents tests de reproductibilité. Des essais ont été effectués avec un ou plusieurs opérateurs en réalisant des séries d'images sur une lame identique ou différente (tableaux n° 3.1.3). On observe de manière générale, que les erreurs commises avec un opérateur sur des lames différentes d'un même échantillon sont très faibles (inférieures à 2 %) et que le nombre minimal d'acquisitions nécessaire, pour utiliser cette méthode, est de 50 images.

Tableaux n ° 3.1.3 : Tests de répétitivité et de reproductibilité pour le programme "Noir sec".
(valeurs moyennes par image)

Opérateur 1 Lame 1	Surface totale (μm^2) : St	Surface des Floccs (μm^2) : Sf	Nombre de filaments : Nf	Longueur du squelette (μm) : Ls
Série (100 images)	106547	102235	33	1428
Série 1 (50 images)	106244	101819	34	1456
Série 2 (50 images)	105928	101585	34	1434
Lame 2 Série 3 (50 images)	107191	102911	33	1421
Moyenne	106454	102137	33	1435
Ecart type	657,3	707,5	0,5	17,5
% erreur	0,6	0,7	1,3	1,2

Lame 1	Surface totale (μm^2) : St	Surface des floccs (μm^2) : Sf	Nombre de filaments : Nf	Longueur du squelette (μm) : Ls
1 ^{er} opérateur 50 images	110362	106030	34	1415
2 ^{ème} opérateur 50 images	110988	106447	34	1517
Moyenne	110675	106239	34	1466
Ecart type	442,5	294,5	0,3	72,5
% erreur	0,4	0,3	0,9	5

Dans le tableau n° 3.1.3 se trouvent les différentes observations réalisées sur une même lame avec deux opérateurs. On remarque que le paramètre « longueur de squelette » (erreur 5%) est un peu plus sensible que les paramètres « surface des floccs et nombre de filaments » (inférieur à 1%). L'erreur observée sur la longueur des filaments peut être due à la procédure de traitement d'images qui parfois élimine une partie des filaments situés en bordure des floccs.

Pour aller plus loin dans l'étape de validation, nous avons également regardé l'effet de dilutions (réalisées avec de l'eau clarifiée) sur notre méthode de quantification. La figure n° 3.1.4 représente l'évolution du nombre de filaments et de la surface des floccs en fonction des matières sèches à trois dilutions : 1/2, 1/4, 1/8.

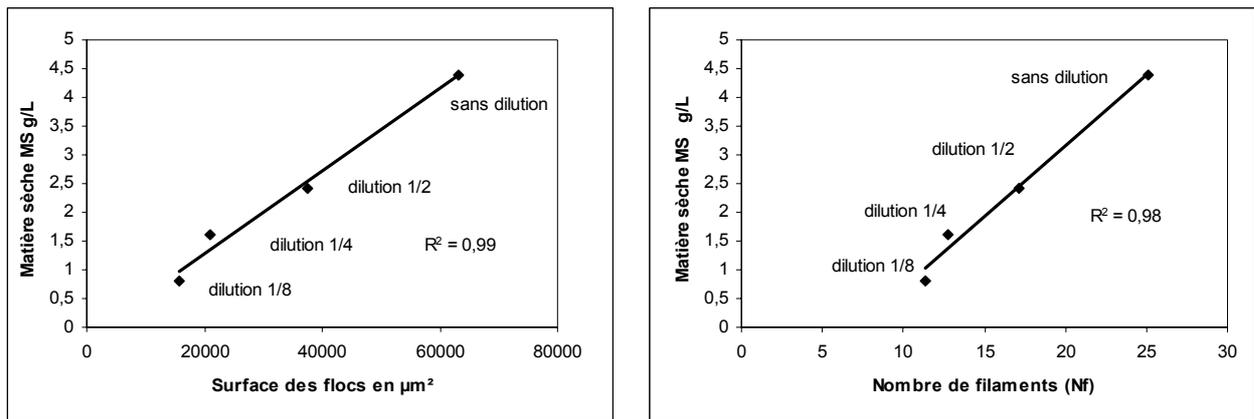


Figure n° 3.1.4 : Corrélation entre les matières sèches des boues et le nombre de filaments moyen par image ou la surface moyenne des floccs par image pour différentes dilutions.

On voit effectivement que la corrélation entre la surface des floccs et le nombre de filaments en fonction des matières sèches est relativement précise puisque le coefficient de corrélation est de l'ordre de 0,9. Les images obtenues au cours de cette manipulation nous ont montré que plus la dilution est importante plus la surface diminue (figure n° 3.1.5). On assiste à une défloculation.

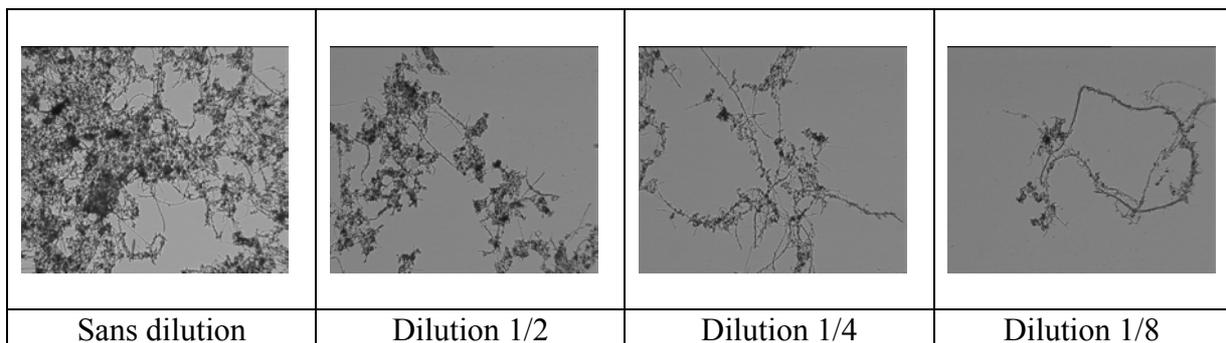


Figure n° 3.1.5 : Images de la biomasse à différentes dilutions (100X)

L'ensemble de ces tests nous permet donc de valider cette procédure appliquée à la quantification des bactéries et à la morphologie des floccs.

3.1.5 Viabilité de la biomasse

La viabilité de la biomasse a été testée dans un premier temps sur des échantillons de boues prélevés dans le bassin de dégazage de la station de traitement des eaux usées de Nancy-Maxéville.

Tableau n° 3.1.5 : Viabilité sur des boues saines et mortes.

Echantillons	% de bactéries viables (Syto 9)
Echantillon A : boues activées sans traitement	65
Echantillon B : boues activées après traitement au chlore	18

La coloration au "BacLight" nous montre que: (figure n° 3.1.6)

- Dans l'échantillon témoin (réacteur A), on trouve un taux de viabilité de 65 %. Afin de vérifier si le taux dépend de l'échantillon, nous avons réalisé des tests sur des boues de différentes stations. Les résultats obtenus nous ont donné des taux de viabilité proche de 64 %.

- La quasi totalité de la biomasse observée dans le réacteur B est morte. Les bactéries ont été lysées par le bactéricide composé de Chlorure de diméthyl, alkyl benzyle ammonium (82% mortes) et les protéines issues des cellules lysées ont favorisé le moussage avec l'aération (tableau n° 3.1.5). Cette lyse a donc provoqué une défloculation. Cette observation est confirmée par le calcul de la surface des floes : la valeur moyenne des surfaces de floes pour le témoin est de 132106 μm^2 et pour la biomasse morte de 64401 μm^2 .

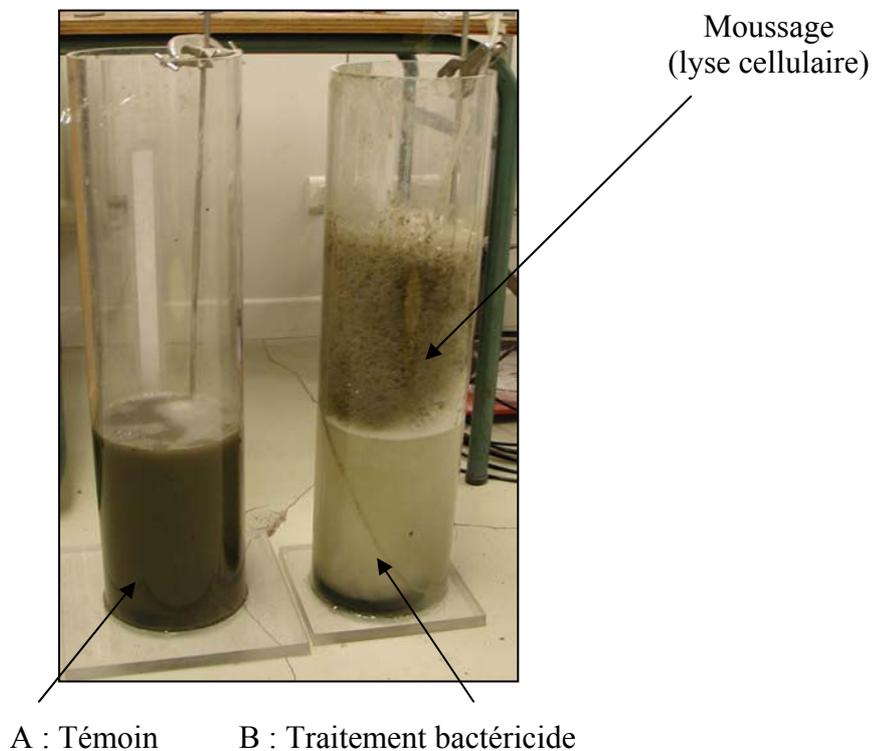


Figure n° 3.1.6 : Photographie des réacteurs expérimentaux

3.2 Problèmes rencontrés au cours de certaines colorations

3.2.1 Les méthodes de coloration classiques : INT, Loeffler, Neisser et DAPI

La coloration de Loeffler ou Neisser apporte des informations sur le stockage des polyphosphates sous forme de granules. Pour la coloration de Loeffler (image A figure n° 3.1.7), la visualisation des granules est souvent altérée par l'action de l'acide sulfurique 0,1 % au cours de la décoloration. Pendant cette étape on remarque une disparition des granules contenues dans les bactéries filamenteuses et d'autant plus si celles-ci sont peu chargées en polyphosphates (voir chapitre matériels et méthodes).

La différence entre les bactéries possédant ou ne possédant pas des polyphosphates devient donc très difficile à faire dans ce cas. Cette technique de coloration ne sera donc pas retenue pour nos différentes expérimentations.

Au cours de l'étape de coloration à l'INT (image B figure n° 3.1.7) on remarque que les filaments contenant les cristaux se fragilisent (lavage par centrifugation pour éliminer le surplus d'INT) et libèrent de ce fait les cristaux dans le milieu. La comptabilisation des granules devient donc impossible. Les cristaux de formazan observés avec la coloration à l'INT sont visibles en contraste de phase, mais il est nécessaire de contre colorer au bleu de méthylène l'échantillon pour visualiser les filaments.

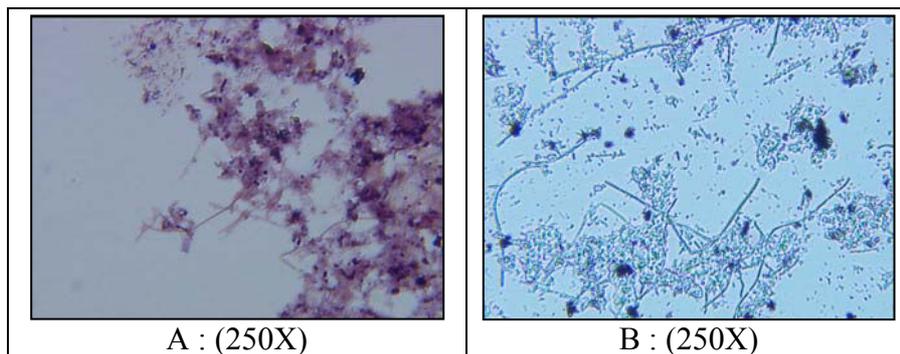


Figure n° 3.1.7 : A, coloration de Loeffler ; B, coloration à l'INT

Le DAPI est très utilisé en FISH pour contre colorer les cellules et énumérer les populations. C'est un agent intercalant spécifique de l'ADN double brin. Les bactéries apparaissent en bleu. Les premiers essais de coloration sur les bactéries filamenteuses des boues activées ne se sont pas révélés très concluants. Les filaments apparaissaient très peu colorés. Une augmentation du temps d'exposition permettait de les visualiser un peu mieux. Dès lors le signal d'émission du DAPI devenait plus court et l'acquisition des images devait être rapide. D'autres observations ont été réalisées après avoir modifié les concentrations du DAPI et le temps d'incubation. Les images obtenues étaient identiques aux précédentes.

La pénétration du DAPI à l'intérieur des bactéries filamenteuses (Gram+) est une étape importante. Elle permet de visualiser correctement les microorganismes en microscopie. De Los Reyes et al (1998), ont montré que ce type de population bactérienne contient des molécules d'acide mycolique rendant la membrane imperméable. Afin d'éviter ce problème, nous avons utilisé une enzyme permettant de fragiliser la paroi bactérienne (chapitre Matériels et Méthodes) : « le lysozyme ».

3.2.2 La méthode FISH appliquée aux boues activées

La sonde qui a été utilisée au cours de ces différentes manipulations est une sonde MNP1 à ADN simple brin spécifique de *Nocardia sp*, qui s'hybride sur les sous unités 16S des ARN ribosomiques. Pendant nos préparations nous nous sommes heurtés à différents problèmes : la perméabilité de la paroi bactérienne et les hybridations aspécifiques. Concernant la perméabilité, le traitement à l'acide chlorhydrique suivi d'une incubation à 48°C pendant 50 minutes s'est avéré efficace ainsi que le traitement au lysozyme. L'hybridation est réalisée avec un tampon à 50 % de formamide.

Les figures n° 3.2.1 et 3.2.2 montrent respectivement une image en contraste de phase et l'image en épifluorescence qui lui est associée. Si on observe uniquement les bactéries filamenteuses on se rend compte qu'elles sont pratiquement toutes détectables sur l'image en épifluorescence alors que leur morphologie n'est pas celle de *Nocardia sp* (filaments courts et très branchés). Pour vérifier que ces hybridations aspécifiques ne sont pas dues à notre méthode nous avons dans un premier temps modifié le temps des phases de lavage et/ou augmenté la température d'hybridation de la sonde.

Les résultats ont montré que malheureusement cette sonde s'hybride avec de nombreuses souches bactériennes présentes dans les boues activées. Celle-ci ne semble donc pas très spécifique. Des résultats similaires ont été obtenus par Schuppler et al (1998). En effet, ils observent que certaines sondes s'hybrident de manière aspécifique sur les plasmides de nombreuses bactéries.

La perméabilité des parois des microorganismes et la spécificité de la sonde oligonucléotidique vis-à-vis des ARN ribosomiques restent les points majoritaires pour obtenir une bonne hybridation. Il s'agit là bien sûr, de premiers tests qui devront être réitérés pour améliorer cette procédure.

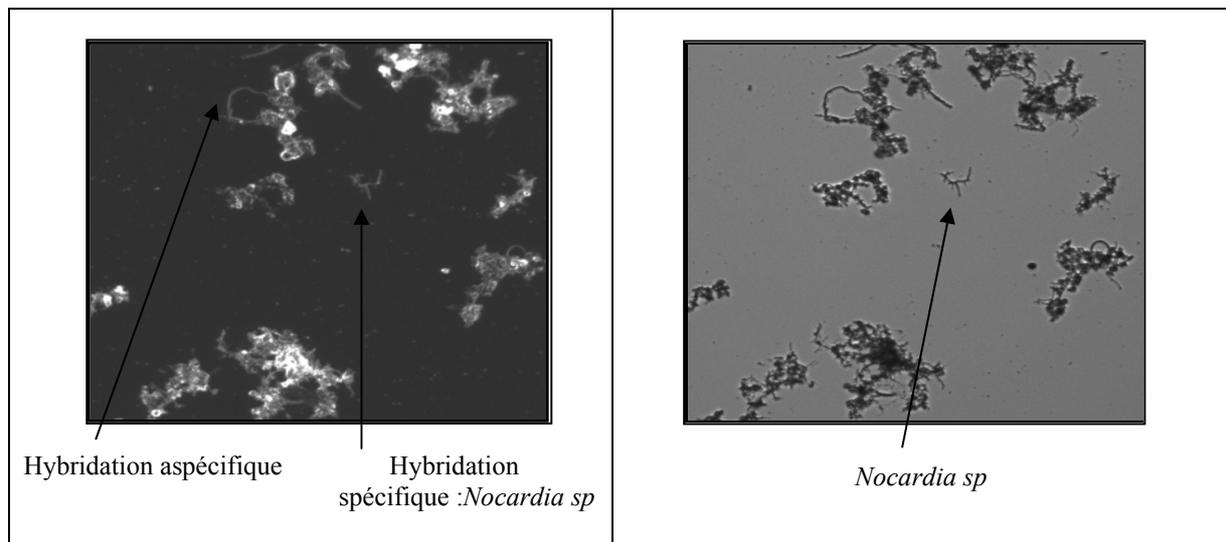


Figure n° 3.2.1 : Image FISH (400 X)

Figure n° 3.2.2 : Image en contraste de phase (400X)

3.3 Etude technico-économique et avantages sur les différentes colorations

Une étude technico-économique nous a permis d'évaluer le coût financier de chaque coloration microscopique (tableau n° 3.3.1). Il s'est avéré que les colorants classiques (Gram, PHB, EPS, Neisser) ont des prix de revient nettement plus abordables que les colorants fluorescents. On note également qu'en plus de leurs prix d'achats élevés, les marqueurs fluorescents ont un nombre plus limité de préparations d'échantillons (entre 25 et 2000 essais). Si on compare les deux méthodes (colorations classiques et fluorescentes), on constate qu'environ 2 g de chaque réactif sont nécessaires pour composer une coloration classique et réaliser 1000 essais.

Globalement, les colorations microscopiques classiques sont techniquement beaucoup plus faciles à réaliser et nécessitent moins de temps de préparation. A ceci vient s'ajouter le matériel utilisé pour ces observations. La probabilité de trouver un microscope optique pour les observations en routine dans les laboratoires des stations d'eaux usées sera beaucoup plus grande que celle d'un microscope à épifluorescence.

Tableau n° 3.3.1 : Prix et points positifs des colorations microscopiques pour 100 essais

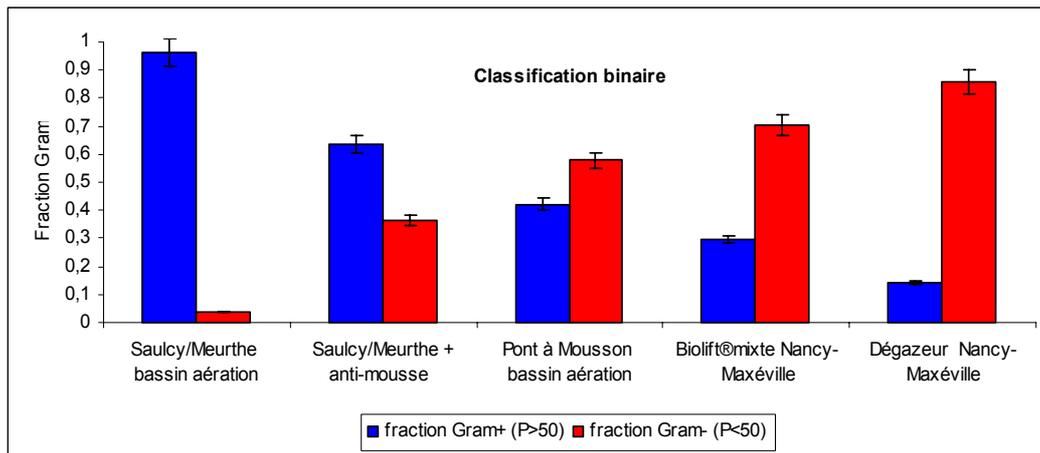
Réactifs	Colorations	Prix pour 100 essais	Points positifs
Kit Gram Hücker Pour 100 essais	Gram	3,8 €	Temps de préparation : 7 minutes microscope optique
Noir de Soudan et Safranine Pour 100 essais	PHB	0,01€	Temps de préparation : 15 minutes microscope optique
Encre de Chine Pour 100 essais	EPS	0,03 €	Temps de préparation : 5 minutes : microscope optique
Bleu de méthylène Brun de Bismark Pour 100 essais	Neisser	0,2 €	Temps de préparation : 15 minutes microscope optique
DAPI (100 µg/mL) Pour 100 essais	DAPI	10 €	Temps de préparations : 1 heure microscope d'épifluorescence
Sonde 21 nucléotides pour <i>Nocardia sp</i> Pour 100 essais	FISH	204 €	Temps de préparation : 10 heures microscope d'épifluorescence
Bac Light (Syto 9 et iodure de prodium) Pour 100 essais	Viabilité	34,7 €	Temps de préparation : 15 minutes microscope d'épifluorescence
Vermicon Kit hybridation pour <i>Microthrix</i> Pour 100 essais	FISH	3000 €	Temps de préparation : 30 minutes

3.4 Les méthodes d'analyse d'images appliquées à différentes stations d'épuration

Dans cette partie sont présentés les résultats des méthodes d'analyse d'images obtenus sur différents sites. Cette campagne d'analyse a eu lieu au cours de la période d'octobre 2003 à juillet 2004. Toutes ces observations ont été réalisées sur des boues biologiques urbaines ou industrielles.

L'ensemble de ces stations d'épuration sont situées en Lorraine : Nancy-Maxéville, Pont-à-Mousson, Saulcy-sur-Meurthe, Baccarat, Dombasle, Custine. Les différents échantillons de boues activées sont acheminés au laboratoire et conservés à 4°C. L'observation microscopique est effectuée immédiatement afin de ne pas trop modifier les différents paramètres morphologiques ou physiologiques de la biomasse.

Les résultats obtenus par la méthode Gram pour caractériser les populations sont présentés sur les figures n° 3.4.1 a et b. Les valeurs moyennes que l'on observe sont obtenues pour des séries de 50 images couleurs par échantillon.



Figures : n° 3.4.1 a : Estimation des populations Gram sur différentes installations

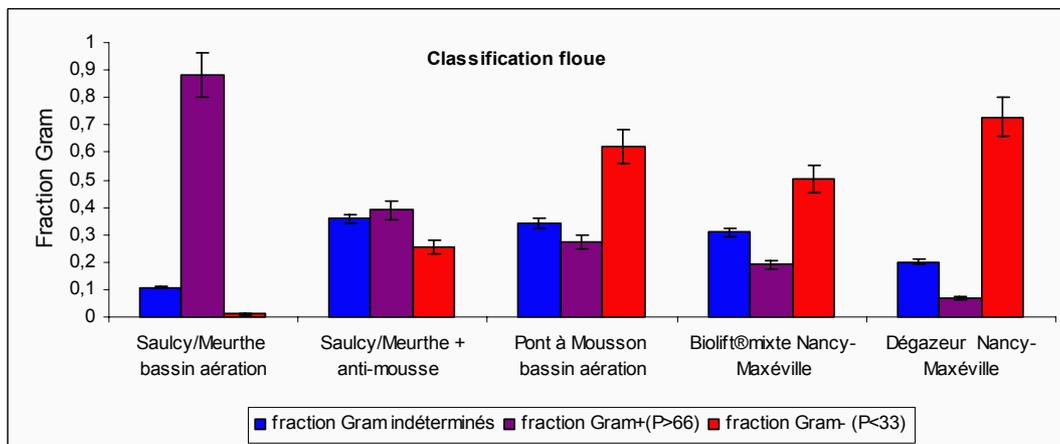
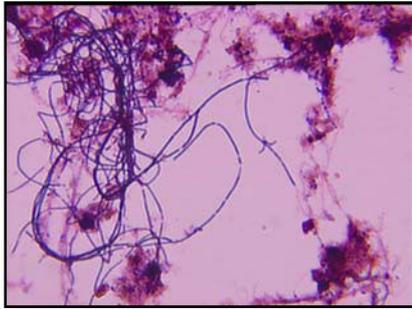


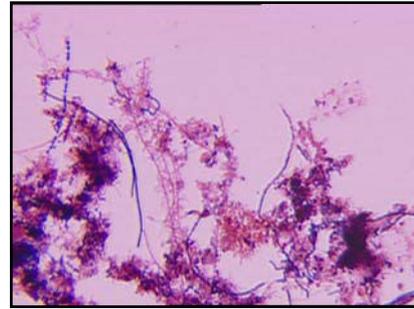
Figure n° 3.4.1 b : Estimation des populations Gram sur différentes installations

L'ensemble de ces résultats montrent que la plupart des sites observés sauf celui de Saulcy-sur-Meurthe présentent une prédominance des populations Gram- (figure n° 3.4.1 b). L'observation morphologique et physiologique des boues de Saulcy-sur-Meurthe (avec traitement « anti-moussage » ou sans) nous indique un développement important des bactéries filamenteuses Gram + (*Microthrix, type 041*) synonyme d'un moussage ou d'un bulking. L'hypothèse du moussage sera confirmée par la présence d'une épaisse mousse à la surface du bassin d'aération. Il semblerait donc que le dysfonctionnement du type moussage pourrait être lié à une prolifération des populations bactériennes Gram+ (figure n° 3.4.2 image a).

Les auteurs comme Eikelboom (1975), Lechevalier et al (1974), Jenkins et al (1993) ont effectivement montré que *Microthrix parvicella* et *Nocardia sp* étaient les microorganismes Gram + les plus rencontrés dans les boues activées des stations d'épuration présentant le phénomène de moussage.



Microthrix parvicella (a) 400X
Gram positif (majoritaires)



Type 1701 (b)
Gram négatif (majoritaires)

Figure n° 3.4.2 : Microorganismes, lors d'un moussage (a), en condition « normale » (b)

Des essais ont été réalisés sur quatre stations de traitement d'eaux usées (Nancy-Maxéville, Baccarat, Custines, Saulcy-sur-Meurthe) pour suivre l'évolution des Poly- β -hydroxybutyrates. Les résultats (figure n° 3.4.3) indiquent que la majorité des filaments (60%) de la STEP de Custines qui présentait un dysfonctionnement biologique sont chargés de granules de PHB. Dans des conditions normales de fonctionnement (stations Nancy-Maxéville, Pont-à-Mousson, Saulcy-sur-Meurthe) la quantité de PHB est faible (environ 10% des filaments sont chargés).

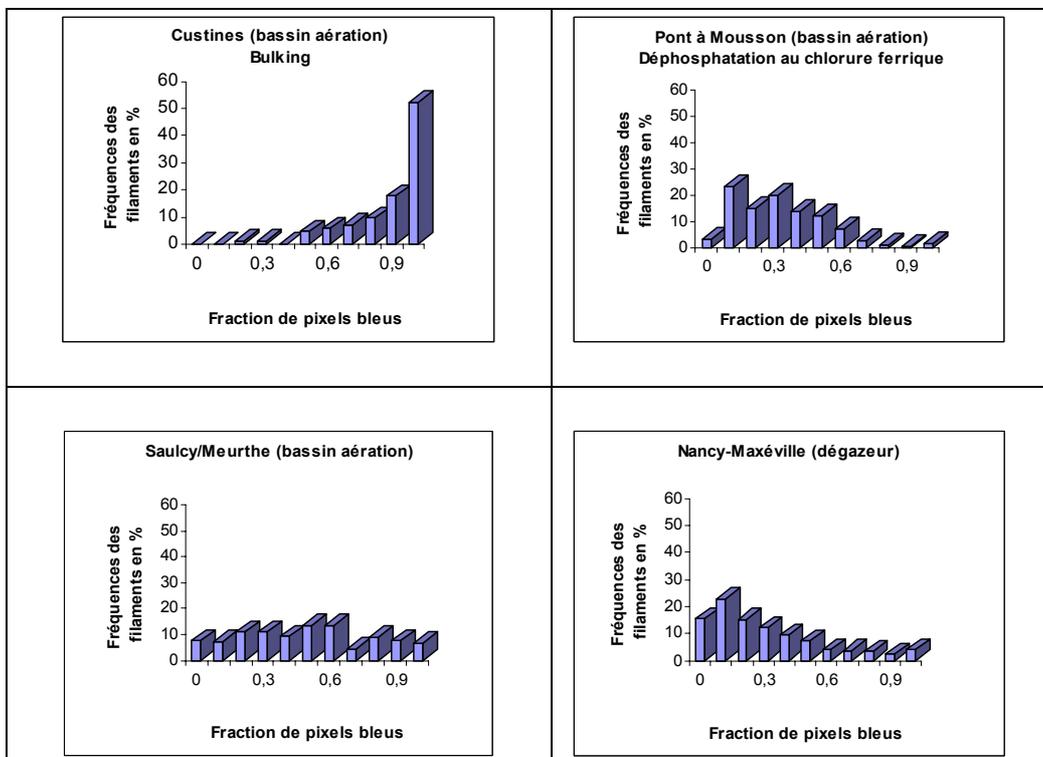


Figure n° 3.4.3 : Evolution du PHB de différents stations d'épuration d'eaux usées.

La figure n° 3.4.4 représente l'évolution des polymères extracellulaires présents dans cinq stations d'eaux usées et mesurée par la méthode automatique d'analyse d'images EPS. Les prélèvements de boues ont été réalisés pour la station de Nancy-Maxéville à deux endroits, sortie Biolift® et recyclage). Pour les quatre autres stations, les prélèvements sont faits dans les bassins d'aération.

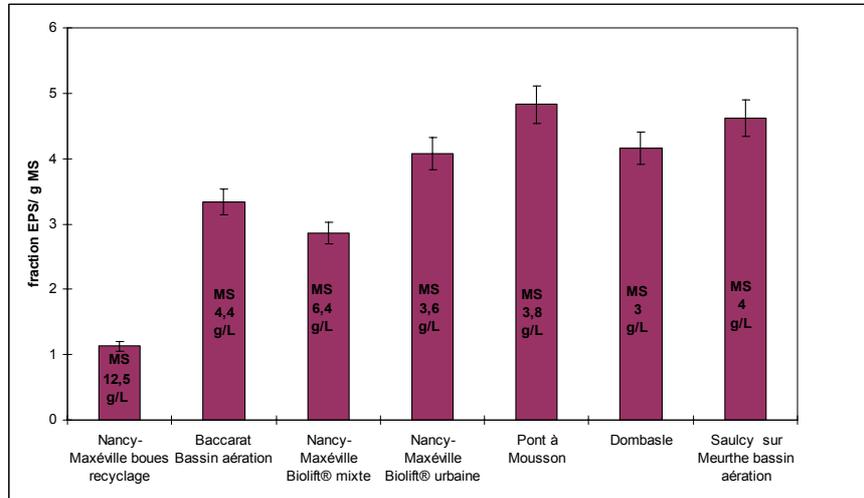


Figure n° 3.4.4 : Fraction de polymères extracellulaires sur différents sites.

Les fractions d'exopolymères de chacune des exploitations ont été calculées en faisant le rapport de la surface d'EPS (déterminée par analyse d'images) par gramme de MS (matière sèche). Les prélèvements des différentes stations d'épuration urbaines ont été réalisés dans les bassins biologiques, à l'exception d'un échantillon concernant la STEP de Nancy-Maxéville effectué au niveau du recyclage des boues. On observe que pour des gammes de concentrations en MS comprises entre 3 et 6,4 mg/L la fraction d'EPS/g MS se situe entre 3 et 5. Par contre la fraction d'EPS/g MS obtenue au recyclage des boues reste beaucoup plus faible (1) du fait de la forte concentration en MS (12,5 mg/L). Les mesures effectuées sur la deuxième filière du Biolift® « mixte », nous indiquent que la fraction de polymères extracellulaires par gramme de MS est moins élevée (2,9) que la filière « urbaine » (4) car la valeur de MS est plus forte. Les résultats obtenus concernant les fractions d'EPS (contenant à la fois polysaccharides, protéines, acides humiques...) ont été comparés à la méthode de Dubois qui permet de doser uniquement les carbohydrates, mais aucune corrélation n'a été observée. Cette procédure reste donc un outil permettant d'évaluer les EPS de manière globale et pour des concentrations en MS avoisinant les 3 ou 6,5 g/L.

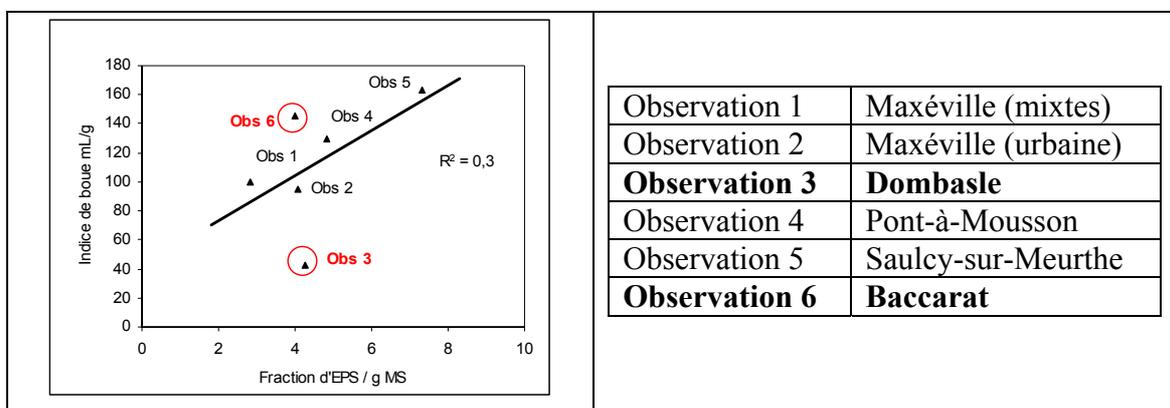


Figure n° 3.4.5 : Corrélation entre les exopolymères et l'indice de boues

Da Motta et al (2001) ont observé que pour des boues concentrées l'indice de Molhman n'est plus significatif. L'eau interstitielle aura des difficultés à remonter à la surface de l'éprouvette du fait de la densité importante des particules en suspension. C'est pour cette raison que l'on utilise un indice de Molhman modifié : l'indice de boues (IB).

La figure n° 3.4.5 présente la corrélation entre la fraction de biopolymères obtenue par analyse d'images et l'indice de boue de plusieurs stations. Cette corrélation reste très médiocre puisque r^2 est de 0,30. On s'aperçoit que la fraction d'EPS augmente avec l'indice de boues.

Les installations n° 6 (station de Baccarat) et n° 3 (Saulcy-sur-Meurthe) rencontraient le jour du prélèvement des problèmes de dysfonctionnement. Les deux stations se heurtaient à une prolifération de bactéries filamenteuses du type *Sphaerotilus natans* et *Thiothrix*. Si on supprime ces deux points on obtient une meilleure corrélation puisque le coefficient est de 0,82.

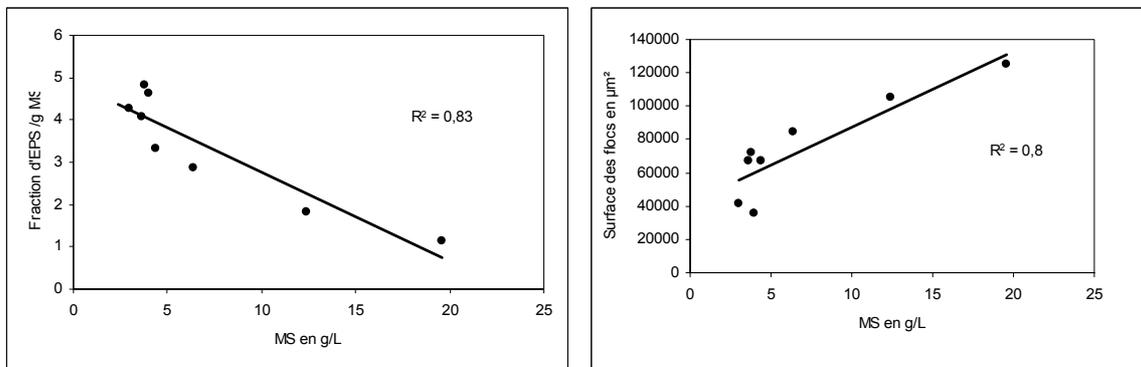


Figure n° 3.4.6 : Corrélation entre matière sèche et fraction d'EPS ou surface des floccs.

Les relations établies entre les matières sèches (MS) et les fractions de polymères extracellulaires ou la surface des floccs sont correctes puisque les valeurs des coefficients sont de 0,83 et 0,79 (figure n° 3.4.6). Les matières sèches représentent l'ensemble des matières en suspension et des matières dissoutes. Cette matière sèche (MS) contient donc les matières organiques, qui constituent les floccs. Celle-ci est composée en majorité d'exopolymères, de protéines de bactéries filamenteuses ou non formatrices des floccs.

Une augmentation de cette matière sèche peut donc être synonyme d'une augmentation de la surface de floccs comme nous le montre la corrélation de la figure n° 3.4.6. Les résultats concernant la morphologie des floccs et des filaments (méthode "Noir sec") des principales exploitations étudiées sont référencés dans le tableau n° 3.4.1. On y trouve les analyses de matière sèche (MS), d'indice de boue (IB) et les différents paramètres de morphologie.

Tableau n° 3.4.1 : Morphologie des floccs et filaments des différents sites :
(Nancy-Maxéville, Baccarat, Saulcy-sur-Meurthe, Dombasle, Pont-à-Mousson)
(valeurs moyennes par image)

Exploitations	Surface totale (μm^2) : St	Surface des floccs (μm^2) : Sf	Nombre de filaments : Nf	Longueur du squelette (μm) : Ls	Matière sèche en g/L	Indice de boues IB à 30 minutes
Série 1 Recyclage Maxéville-Nancy	105067	995230	43	1875	12	nc Taux de boues > 90 % à 30 mn
Série 2 Bassin brasseries Maxéville-Nancy	125009	1218810	26	1023	20	nc Taux de boues > 90 % à 30 mn
Série 3 Baccarat	53060	48430	31	1388	4	160 mL/g
Série 4 Saulcy-sur- Meurthe	35685	34176	28	535	4	88 mL/g
Série 5 Maxéville-Nancy Biolift®(urbaine)	66039	64648	11	389	4	90 mL/g
Série 6 Maxéville-Nancy Biolift® (mixte)	84310	81459	23	935	6	149 mL/g
Série 7 Dombasle	41193	39378	14	508	3	40 mL/g
Série 8 Pont-à-Mousson	71984	69849	18	728	4	131 mL/g

Dans la plupart des cas, la concentration en boues étant supérieure à 3 g/L, nous avons préféré évaluer la décantation des boues en utilisant l'indice de boue après 30 minutes. Cette mesure est réalisée avec dilution en utilisant de l'eau décantée. Lorsque les indices de boues sont voisins de 150 mL/g (séries 1, 2 et 3) des problèmes de décantation peuvent apparaître.

Dans les cas 1 et 2 l'indice de boue n'a pas pu être déterminé car les boues étaient trop épaisses (matière sèche : 12,4 et 19,6 g/L). Le taux de boues après 30 minutes de décantation était supérieur à 90 %. Ce taux élevé de boues est confirmé par une mesure très importante de la surface des floccs et du nombre de filaments.

La station de Baccarat possède un indice de boue élevé (160 mL/g). Les valeurs morphologiques nous indiquent un nombre important de filaments et des longueurs de squelette relativement élevées (bulking). Des analyses microscopiques complémentaires avec les colorations classiques (Gram, Neisser) ont révélé une prolifération du microorganisme *Sphaerotilus natans*.

Les autres stations (séries 4, 5, 7 et 8) possèdent des indices de boues corrects, synonymes d'un bon équilibre entre les bactéries filamenteuses et zooglées formant des floccs sains. L'examen microscopique des boues de Pont-à-Mousson indique une structure de floccs très compacte due au traitement physico-chimique du chlorure ferrique (pour le phosphore). Son indice de boue reste correct puisqu'il avoisine les 130 mg/L.

3.5 Influence des substrats sur différents réacteurs

D'après la littérature (Eikelboom, 2000) l'alimentation de la station d'épuration influe sur le développement des bactéries filamenteuses. Afin de tester s'il est possible de suivre des dynamiques à partir des procédures de coloration et d'analyse d'images développées nous avons soumis les microorganismes à différentes alimentations.

Au travers de cette partie nous avons voulu comparer le fonctionnement de différents réacteurs de boues activées : pilote de boues activées constitué d'un bassin d'aération, d'un clarificateur et réacteur discontinu séquentiel (SBR) alimenté par différents substrats. Les alimentations utilisées pour ces expériences sont au nombre de sept (cf matériels et méthodes) :

Substrat S1 (extrait de viande) ; substrat S2 (extrait de viande) un jour sur deux ; substrat S3 (amidon et levures) ; substrat S4 (substrat alterné S1 ou S3) ; substrat S5 (acétate) ; substrat S6 (effluent brut station de Nancy-Maxéville).

Ces manipulations ont également pour but de voir si le réacteur ou le substrat choisi peuvent influencer le développement ou le métabolisme bactérien. Au cours de ces manipulations, des prélèvements d'échantillons sont effectués régulièrement sur le pilote de boues activées pendant plusieurs jours. L'évolution de la biomasse de ces boues sera suivie par les tests : matières sèches, Indice de Molhman et analyse d'images (morphologie des floccs et des bactéries, population Gram).

3.5.1 Pilote de boues activées

Au cours de cette étude nous décrirons dans un premier temps les variations morphologiques puis les variations physiologiques.

3.5.1.1 Alimentation continue S1 et alimentation alternée (un jour sur deux : S2)

L'étude mise en œuvre sur le pilote de boues activées soumet les microorganismes au sein du bassin d'aération à des phases successives d'alimentation et de diète en aérobiose pendant des durées de 24 heures.

La surface des floccs et le nombre de filaments évoluent avec une tendance très proche quelque soit le type de substrat S1 ou S2 (figure n° 3.5.1). Par contre, si on examine la structure des floccs issus des deux substrats, on s'aperçoit que celle-ci est différente. En fin d'alimentation S2 vers 192 heures, la forme des floccs bactériens devient plus compacte et les filaments commencent à disparaître (figure n° 3.5.1). On peut supposer que dans ce cas, l'absence de bactéries filamenteuses à l'extérieur des floccs permet de rendre disponible le substrat aux bactéries zoogléales localisées à l'intérieur de ceux-ci. De cette façon leur structure devient donc plus compacte et résistante (figure n° 3.5.4).

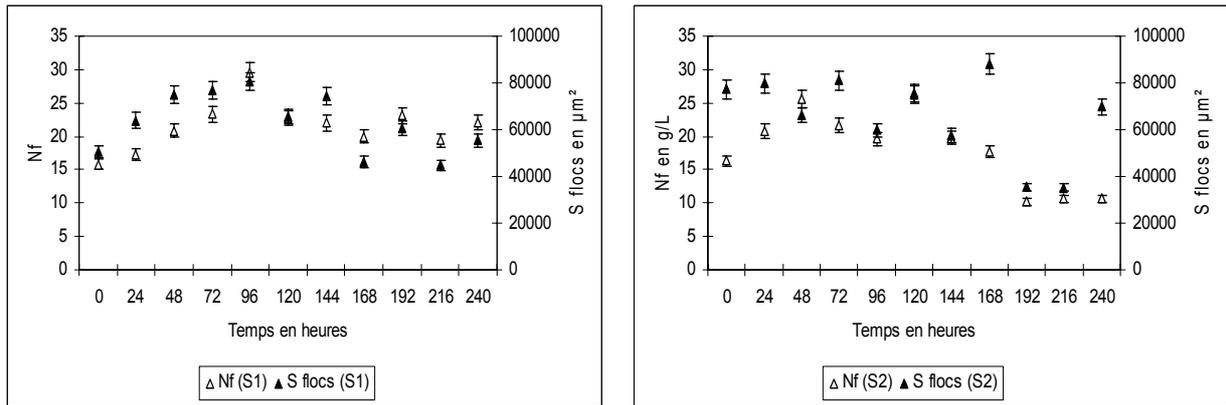


Figure n° 3.5.1 : Suivis des surfaces des floccs et du nombre de filaments (valeurs moyennes par image) avec les substrats S1 et S2 (les barres d'erreurs représentent l'erreur commise sur des séries de 70 images)

Dans la situation 1 (S1) la structure des floccs reste aérée et les filaments contribuent à l'élaboration des ponts inter-floccs. L'indice de Mohlman reste élevé en fin d'étude (supérieur à 150 ml/g) synonyme d'une décantation moyenne. Dans la situation 2 (S2) on se dirige plutôt vers une modification de la forme des floccs (figure 3.5.4) induisant une meilleure décantation des boues (figure n°3.5.2).

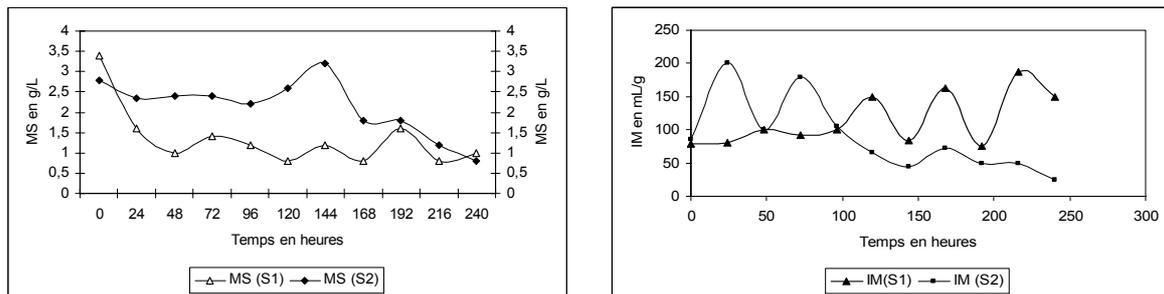


Figure n° 3.5.2 : Suivis des matières sèches et l'indice de Molhman en présence de S1 et S2

L'évolution du nombre de filaments (figure n° 3.5.1) au cours du temps nous montre dans les deux cas une période d'adaptation au substrat (24h) suivie d'une première phase de croissance plus ou moins longue suivant le milieu. Le maximum de croissance est obtenu dans la situation 1 (S1) à 96 heures et pour la situation 2 (S2) à 48 heures, alors que l'alimentation est moins importante dans ce cas. La biomasse qui se développe semble être différente car l'une conduit à une croissance lente et l'autre plus rapide. L'hypothèse qui peut être avancée est la suivante. Les dates entre les deux prélèvements étant de plusieurs mois, on peut supposer que la biomasse rencontrée ne soit pas tout à fait identique. D'après Edeline en 1993, trois groupes de bactéries peuvent être impliqués dans la bioflocculation des boues activées.

- * Les bactéries flocculantes à croissance rapide : α
- * Les bactéries filamenteuses à croissance lente, résistant au manque de substrat : γ
- * Les bactéries filamenteuses à croissance rapide, sensible au manque de substrat : β

Il semblerait donc que les bactéries filamenteuses présentes dans la culture alimentée par le substrat S2 aient une croissance plus rapide. Celle-ci pourraient appartenir à la classe « α ou β ».

Ce groupe de population α (bactéries floculantes) serait peut-être à l'origine de l'évolution particulière des flocs et de leur forme très compacte. A l'inverse, l'autre échantillon contiendrait plutôt des microorganismes de la classe « γ » à croissance lente.

Si on étudie la variation de la surface des flocs en fonction de l'indice de Molhman (IM) pour le substrat S1, on voit que deux nuages de points semblent se distinguer sur la figure n° 3.5.3. L'élimination des quatre points pour lesquels $IM > 150 \text{ mL/g}$ permet d'obtenir un coefficient de corrélation moyen ($r^2 = 0,63$) pour des valeurs comprises entre : $50 \text{ mL/g} < IM < 150 \text{ mL/g}$. La corrélation entre des IM élevées et la surface des flocs semble donc être difficile.

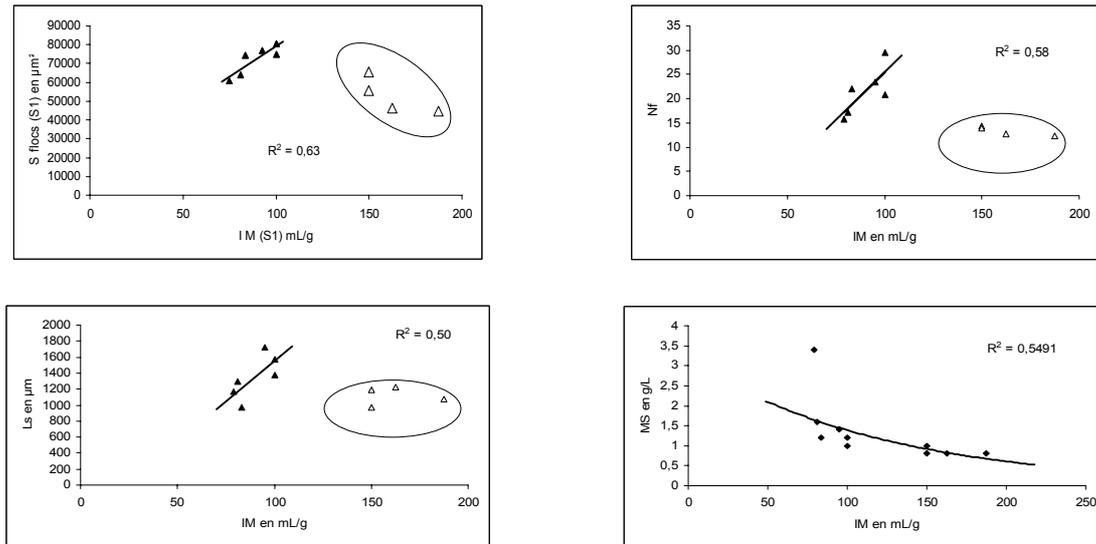


Figure n° 3.5.3 : Corrélations entre la surface des flocs, nombre de filaments, longueur du squelette (valeurs moyennes par image), matière sèche et Indice de Molhman pour S1.

Des observations identiques ont été obtenues entre les corrélations du nombre de filaments (Nf), longueur du squelette (Ls), matière sèche (MS) et l'indice de Molhman.

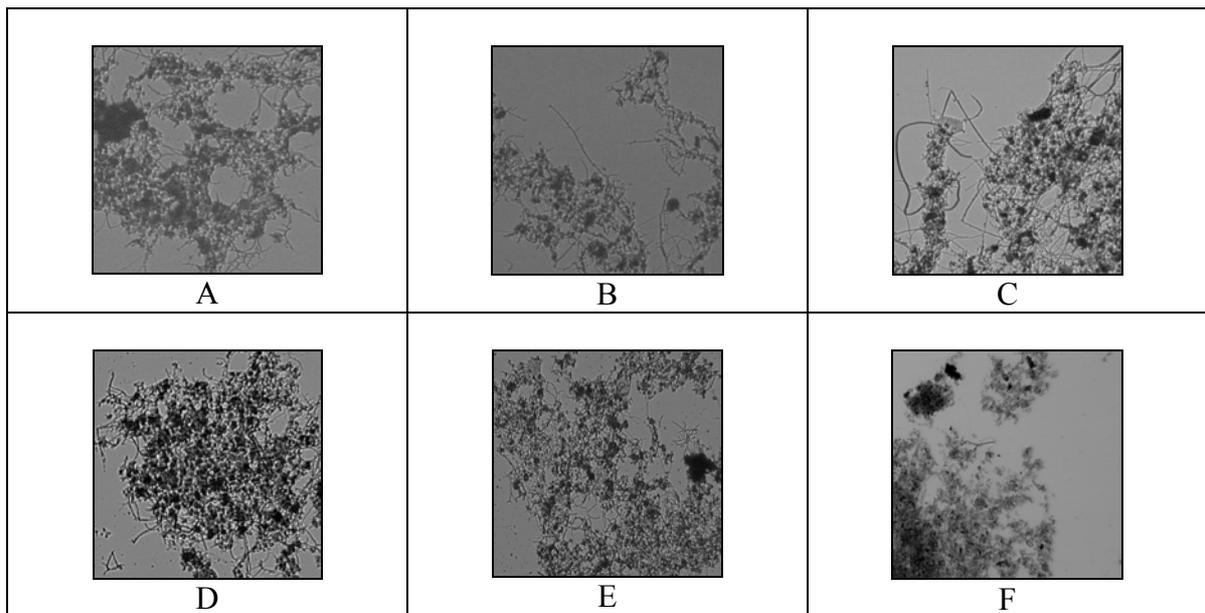


Figure n° 3.5.4 : Images de l'évolution des flocs pour les substrats S1 (A, B, C) et S2 (D,E ,F)

3.5.1.2 Etude comparative entre l'alimentation continue S1 (extrait de viande) et l'alimentation S3 (amidon, glucose)

Le suivi réalisé en présence de substrat S3 (riche en glucides), nous a permis de voir si cette alimentation influençait la croissance de la biomasse des boues.

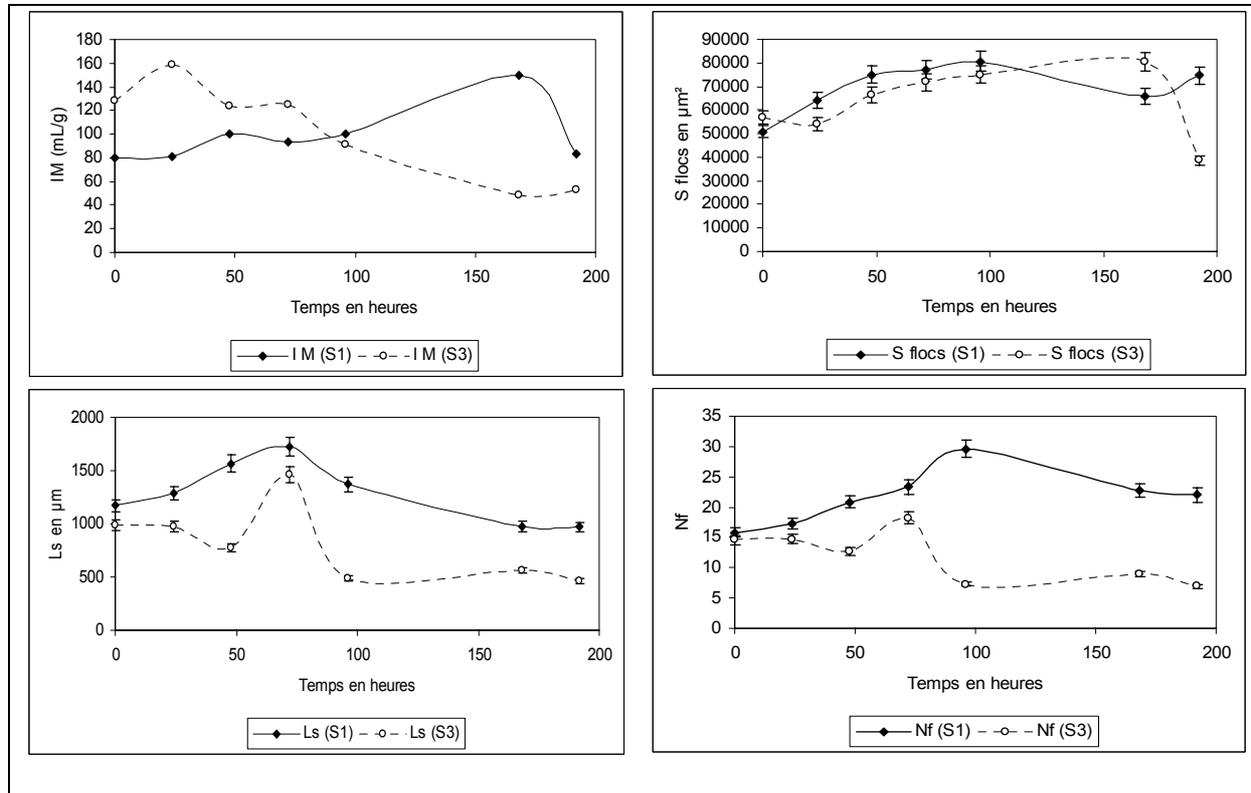


Figure n° 3.5.5 : Suivis morphologiques de la biomasse en présence de l'alimentation S1 et S3 (Surface des floes (Sfloes), Longueur de squelette (Ls), Nombre de filaments (Nf), valeurs moyennes par image)

La culture alimentée par S3, possède au départ un IM de 120 mL/g et atteint 55 mL/g après 200 heures de fonctionnement (figure n° 3.5.5). Ce comportement traduit une très rapide décantation des boues. La chute de la longueur du squelette et du nombre de filaments indique une diminution des germes filamenteux au profit des bactéries zoogléales (figure n° 3.5.6 image C). Les observations microscopiques nous indiquent que *Sphaerotilus natans* reste présente au cours de notre étude. La forme des floes dits en doigts de gants (figure n° 3.5.6, image C) et la présence de ces colonies de bactéries sont synonymes d'effluents riches en sucre (Drakides, 1978).

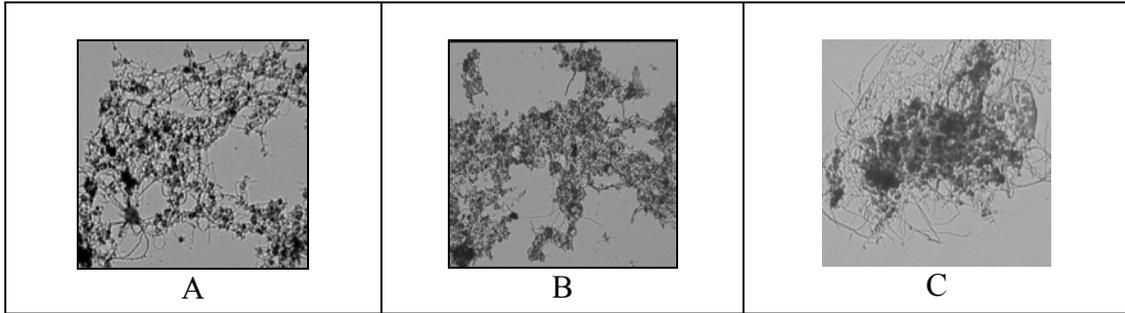


Figure n° 3.5.6 : Images de l'évolution des floccs avec le substrat S3

Les mesures de COT contenu dans les échantillons filtrés d'eau décantée nous ont permis de connaître la composition en carbone organique dissous contenu dans les substrats S1 (85 ppm de carbone) et S3 (135 ppm de carbone).

Les résultats de la figure n° 3.5.7 nous indiquent que l'alimentation à base d'extrait de viande contient beaucoup moins de carbone organique biodégradable (CODB) que S3 (amidon, glucose...). La fraction moyenne de CODB consommé pour S1 est de 76 % et 90 % pour S3 (figure n° 3.5.7). Cette fraction de CODB très importante dans l'alimentation S3 riche en sucre (Drakides, 1978) pourrait être à l'origine du développement des bactéries zooglées (figure n° 3.5.6).

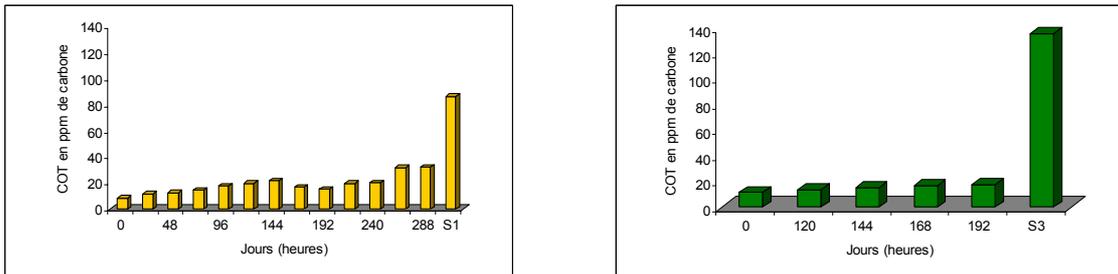


Figure n°3.5.7: Carbone organique total pour le substrat S1 et S3

3.5.1.3 Etude de l'alimentation alternée S4 : (extrait de viande), (amidon, glucose)

Les figures n° 3.5.8 nous indiquent une diminution de la surface des floccs, de la matière sèche mais une augmentation du nombre de filaments. La mise en évidence de *Sphaerotilus natans* en fin de test avec les colorations classiques Gram, Neisser, noir de Soudan confirme cette prolifération. De manière générale, on retrouve ce microorganisme filamenteux dans des effluents synthétiques biodégradables (Heikelboom, 2000) induisant des indices de Mollman élevés, ici de l'ordre de 500 mL/g (figure n° 3.5.8).

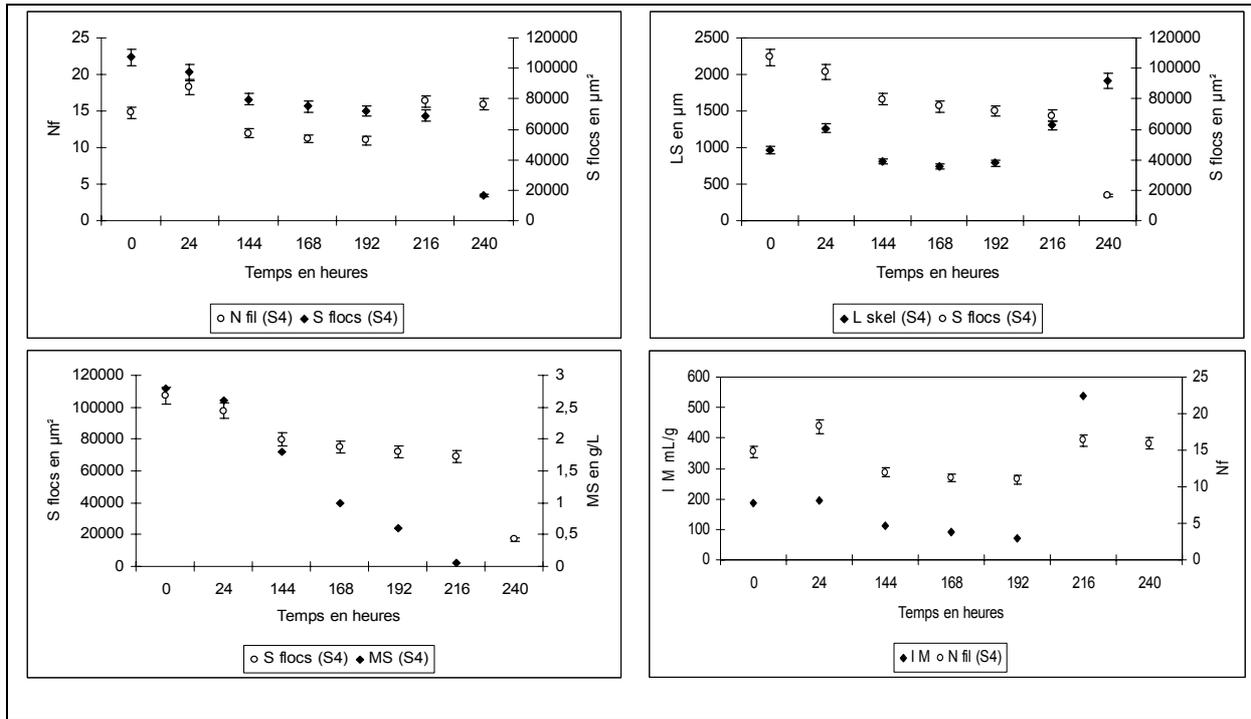


Figure n° 3.5.8 : Suivis morphologiques de la biomasse en présence de l'alimentation S4 : (Surface des floccs (Sfloccs), Longueur de squelette (Ls), Nombre de filaments (Nf) valeurs moyennes par image)

Les images réalisées en microscopie optique nous permettent de visualiser plus facilement la structure des floccs et la présence des filaments bactériens. On observe sur l'image B figure n° 3.5.9 une forme particulière de floccs, similaire à la précédente dit « en doigts de gant » spécifique d'une alimentation riche en glucides (Drakides, 1978).

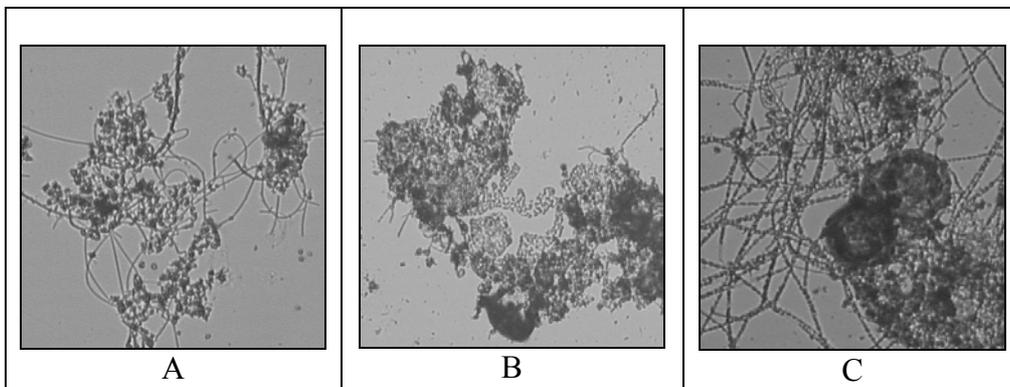


Figure n° 3.5.9 : Images de l'évolution des floccs sur le substrat S4

- Suivi des microorganismes filamenteux Gram en présence de S3, S2, S1

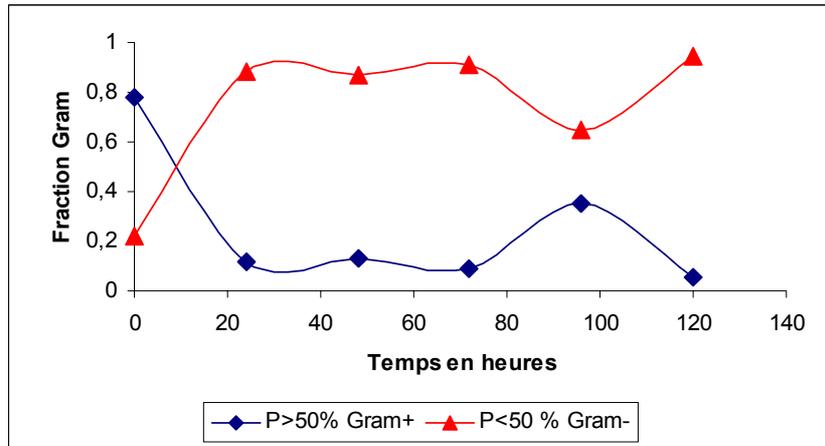


Figure n° 3.5.10 : Alimentation S3 (amidon et glucose)

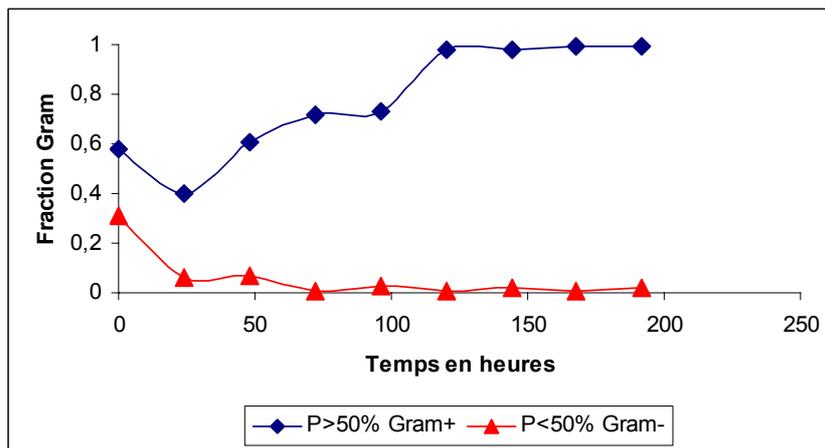


Figure n° 3.5.11 : Alimentation S2 (extrait de viande, saccharose et diète)

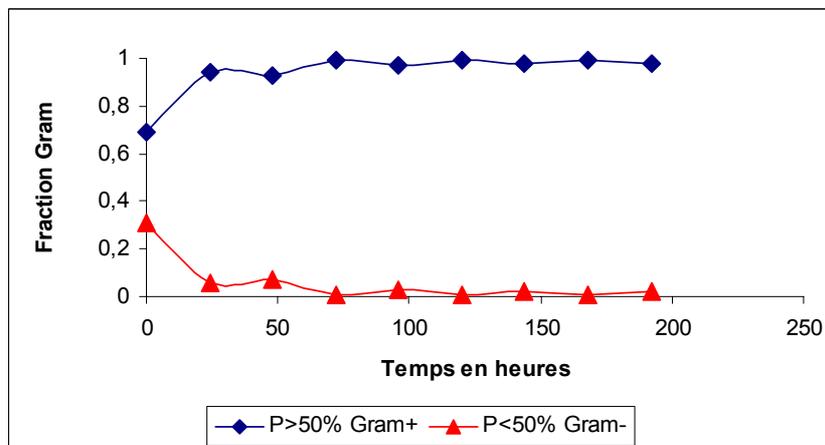


Figure n° 3.5.12 : Alimentation S1 (extrait de viande : protéine et saccharose)

Les figures n° 3.5.10 à 3.5.12 présentent les variations des populations Gram + et Gram -, au cours des alimentations en continu avec des substrats synthétiques (S1 et S3) et discontinu (extrait de viande et diète). Dans les cultures contenant le substrat à base d'extrait de viande on voit que la croissance des bactéries Gram + est favorisée. Cette augmentation est moins marquée avec l'alimentation S2 car les bactéries sont alimentées un jour sur deux. D'une manière générale, la proportion des microorganismes Gram - est beaucoup plus faible dans les deux études avec S2.

Si on observe les différentes caractéristiques physiologiques (PHB, polyphosphates...) de ces populations Gram +, on s'aperçoit que les principaux microorganismes filamenteux en présence de S1 sont *Microthrix parvicella*, *Nocardia sp* et *Nostocoidia limicola*. Ce résultat peut être confirmé par les figures n° 3.5.11 et 3.5.12 où les populations Gram + atteignent 80 % à partir de la 50^{ème} heure.

La composition du milieu S1 (extrait de viande, saccharose) peut être à l'origine de la prédominance de *Microthrix*. Knoop et al (1998) indiquent que la croissance de ce microorganisme est favorisée par des eaux urbaines contenant des protéines, carbohydrates et acides gras à longues chaînes. Slijkhuis (1983), montre également que la L-méthionine contenue dans les protéines est un acide aminé indispensable pour le développement de *Microthrix parvicella*.

Lorsque l'on regarde les résultats obtenus en présence du substrat S3, le phénomène est inverse. Les populations Gram- sont favorisées : 80 % des bactéries ont des caractéristiques Gram - à partir de la 24^{ème} heure. La présence de glucides (amidon) et d'acétate dans le milieu peut être un facteur favorable au développement des bactéries Gram négatif comme *Sphaerotilus natans* (Yi- Chen et al, 1998 ; Contreras et al, 2000).

Les différentes expérimentations « Gram » réalisées sur le pilote de boue activée aérobie en présence de différents substrats synthétiques nous indiquent que la nature du milieu favorise la croissance de certaines populations bactériennes. Un milieu riche en sucre (S3) développerait favorablement les microorganismes filamenteux Gram négatif, à l'inverse un milieu protéique influencerait plutôt des populations Gram positif. L'ensemble de ces résultats confirme la littérature mais également la conformité entre suivis par analyse d'images et observations visuelles.

3.5.2 Les réacteurs séquentiels discontinus

3.5.2.1 Les différentes phases du cycle :

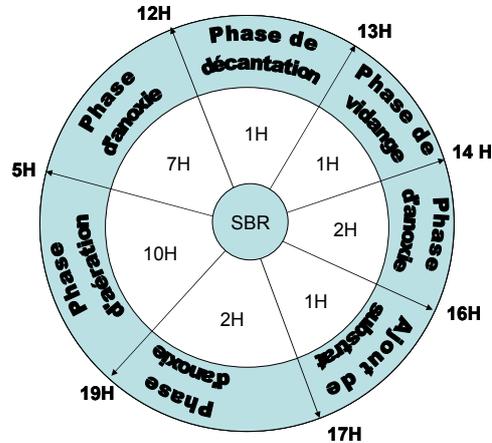


Figure n° 3.5.11 : Phase du réacteur séquentiel discontinu

3.5.2.2 Comportement de différents substrats sur un réacteur SBR

Pour compléter l'étude de l'influence de différents substrats sur la croissance et le métabolisme des microorganismes filamenteux, trois expériences ont été réalisées sur un réacteur batch séquentiel. D'après la littérature, ce type de réacteur ne favorise pas la production de bactéries filamenteuses. Pendant ce cycle, des prélèvements de boues et de surnageant sont réalisés régulièrement, soit pendant la phase d'anoxie, soit pendant la phase de décantation. L'évolution des différents paramètres physico-chimique (turbidité, redox, matières sèches, DCO) et d'analyse d'images (morphologie, Gram, PHB, EPS) est suivie quotidiennement. La température des liqueurs mixtes varie entre 19 et 20 °C.

Cette étude est faite sur des boues provenant de la zone de dégazage de la station d'épuration de Nancy-Maxéville. Les substrats synthétiques ($Q = 3L/j$) avec lesquels on alimente le pilote sont préparés à partir de solutions concentrées. Des dilutions sont effectuées pour obtenir des concentrations en DCO pouvant évoluer de 100 mg DCO/L à 500 mg DCO/L. L'effluent (dégrillé, dessablé et déshuilé) provient du prétraitement de la station.

3.5.2.3 Influence des milieux composés de protéines S1, d'acétate S3 ou d'effluent brut S6

Deux études ont porté sur des cultures de boues activées alimentées par deux substrats S1 (protéine et saccharose) et S3 (glucose et acétate). Les résultats sont présentés sur les figures n° 3.5.11. Dans cette partie le lecteur trouvera les variations de : turbidité, polymères extracellulaires, DCO, surface de floccs, longueur de filaments, nombre de filaments au cours du temps. L'augmentation progressive de la concentration des deux substrats (de 100 à 500 mg/L de DCO), nous a permis également, de voir si la quantité d'EPS pouvait être influencée (figure n° 3.5.11).

- **Etude de la morphologie**

L'ensemble de ces résultats se trouve sur la figure n° 3.5.11.

La surface des floccs reste plus stable en présence de l'alimentation S3. Une explication peut être envisagée : en effet, dans ce milieu on trouve des cations polyvalents qui peuvent participer à la stabilité des floccs. Lorsque les bactéries se mettent à produire des exopolymères en présence de ces cations, il y a formation de ponts avec les charges superficielles négatives des microorganismes (Urbain et al 1993).

Le premier maximum concernant la production de ces macromolécules (EPS), est atteint plus rapidement en présence du substrat S3 (48^{ème} heure) que pour S1 (72^{ème} heure), car l'alimentation S5 est plus riche en composés glucidiques.

Une légère diminution des polymères contenus dans les floccs (substrat S1) est observée vers la 72^{ème} heure. Les valeurs de turbidité nous indiquent que pendant cette période, le surnageant se trouble légèrement. On peut supposer que ces composés sont relargués dans le milieu interstitiel. De plus si on observe la surface des floccs, on s'aperçoit que celle-ci diminue, pouvant provoquer une libération des composés polymériques.

Sur le milieu S5, la quantité d'EPS augmente brusquement puis se stabilise. Ceci est sans doute dû à la nature du milieu riche en carbohydrates. La surface des floccs reste constante ainsi que le nombre de filaments. On peut supposer que dans ce cas, il y aurait plutôt un stockage intracellulaire sous forme de glycogène pour le métabolisme bactérien (substances de réserve). Dans ces conditions, les réserves assurent le métabolisme de maintenance ou de croissance. L'expérience montre que les polymères extracellulaires n'évoluent presque plus lorsque la DCO devient supérieure à 200 mg O₂ /L.

Les deux fortes augmentations de turbidité localisée aux environs de la 200^{ème} heure (S1) et de la 100^{ème} heure (S3) ne sont pas synonymes du relargage des EPS, mais provoquées par la concentration en substrat qui passe à 400 mg/L de DCO. On constate que les variations de concentration des substrats appliquées à nos tests SBR n'ont pas réellement provoquées de modification des quantités d'EPS contenus dans les floccs. L'étude de la structure des floccs en présence du substrat à base d'extrait de viande nous indique une défloculation vers la 80^{ème} heure ainsi qu'un léger relargage des polymères extracellulaires.

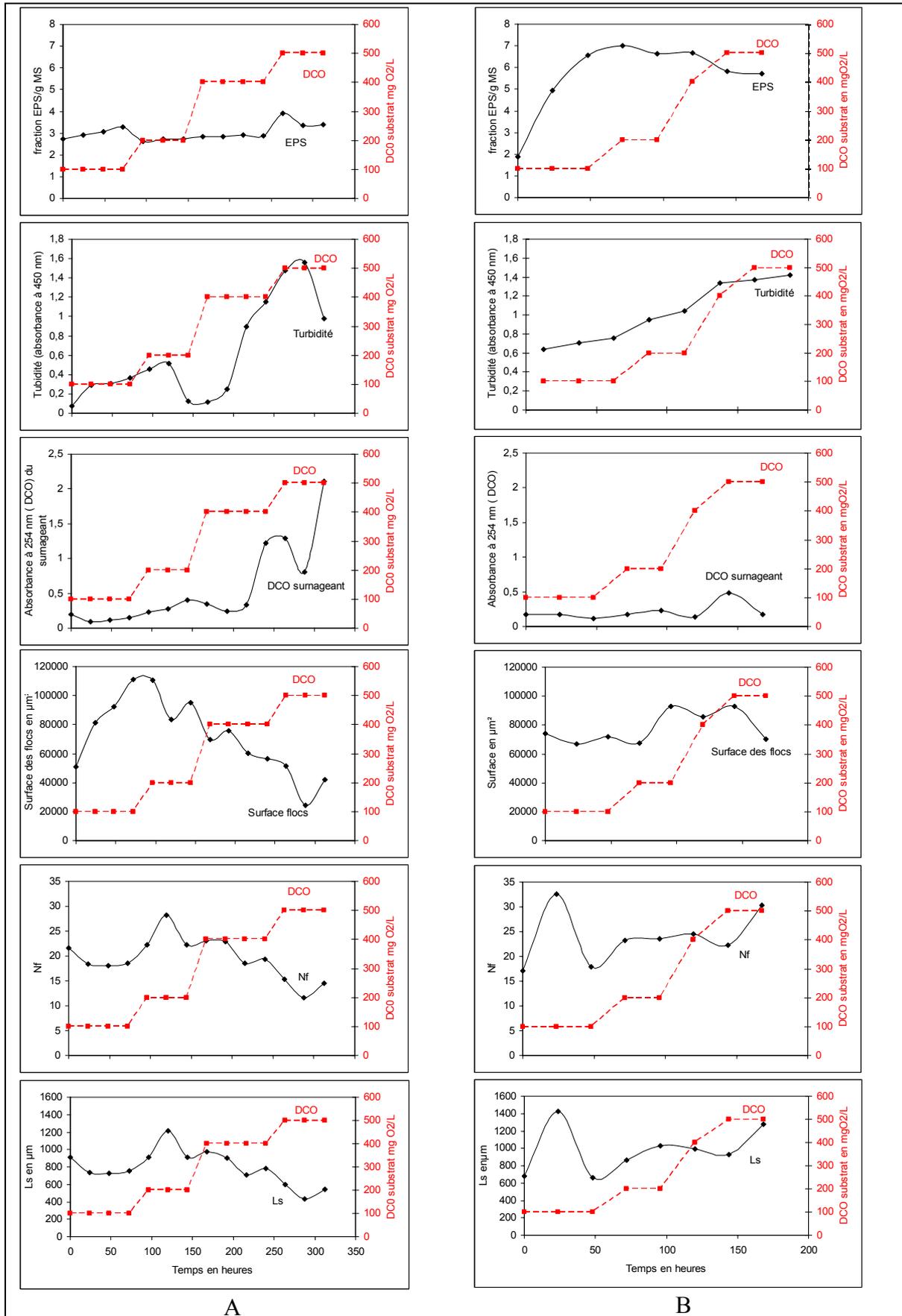


Figure n° 3.5.11 : Suivis du nombre de filaments, surface des floccs (valeurs moyennes par image), turbidité (absorbance à 254 nm) et des EPS en présence de S1 (A) et S3 (B)

Des essais réalisés sur des boues activées, alimentées par un substrat naturel (S6) sont référencés sur la figure n° 3.5.12. L'alimentation journalière ne permet pas de visualiser une production de polymères extracellulaires mais au contraire une diminution de ces macromolécules: Dans ces conditions, les microorganismes consomment ou libèrent les polymères dans le milieu, provoquant une diminution de la surface des floccs sur 72 heures. La composition de l'effluent est peut être insuffisante pour la production des EPS. A partir de la 96^{ème} heure un arrêt de l'alimentation a été réalisé pour étudier le comportement de la biomasse face à une situation de stress. La figure n°3.5.12 indique une légère production des polymères et un nombre de filaments constant permettant de stabiliser la structure des floccs.

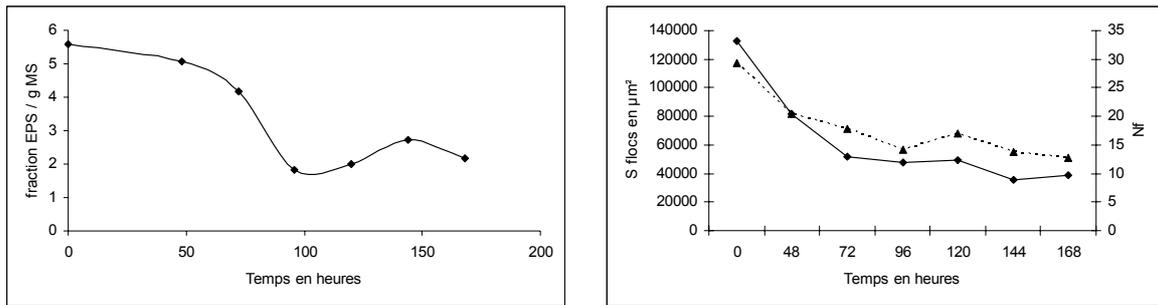


Figure n° 3.5.12 : Evolution des EPS, surface des floccs, nombre de filaments (valeurs moyennes par image) avec S6

- Les composés de réserve: les poly-β-hydroxybutyrates

Les figures n° 3.5.13 et 3.5.14 relatent les différentes évolutions des PHB (poly-β-hydroxybutyrates) stockés chez les bactéries filamenteuses.

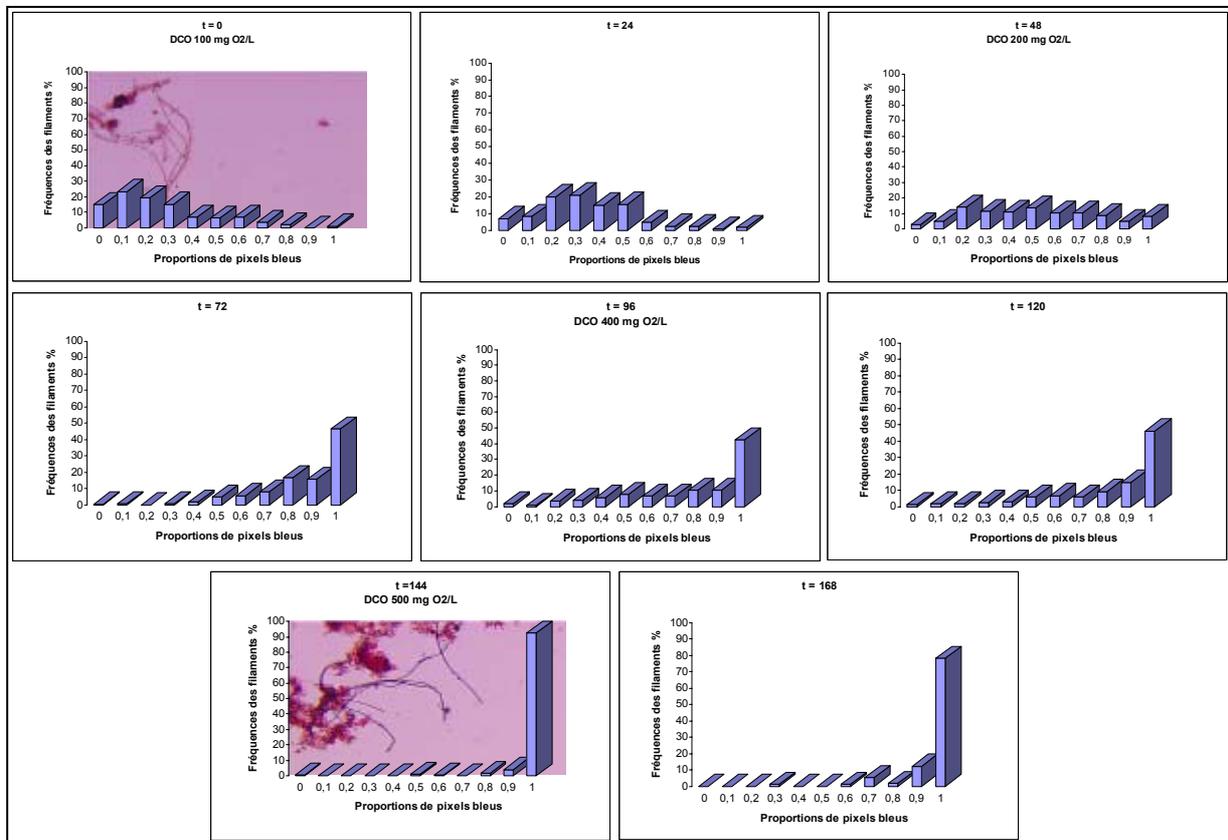


Figure n° 3.5.13: Evolution du PHB avec le substrat S3

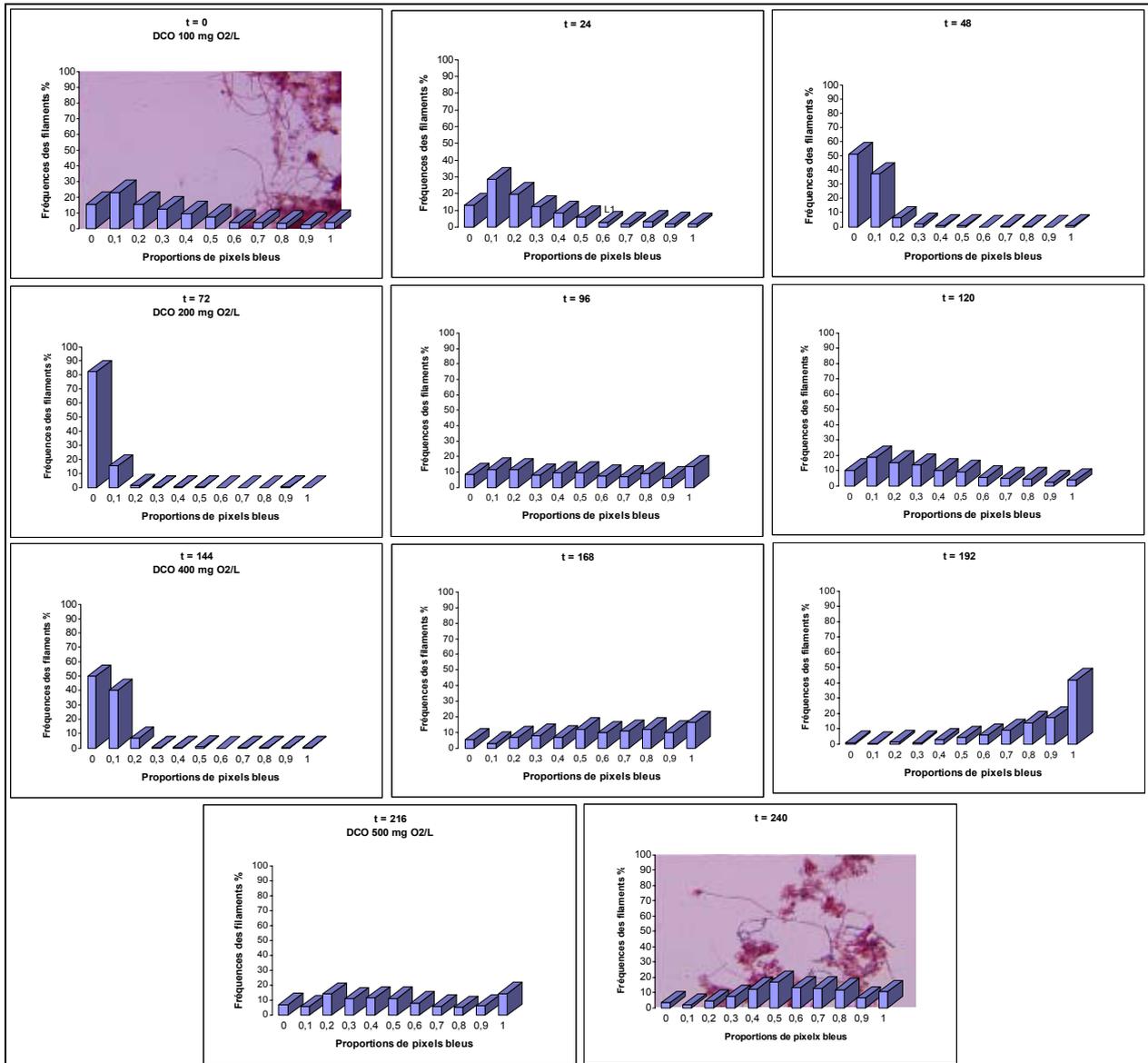


Figure n° 3.5.14: Evolution du PHB avec le substrat S1

On considère que lorsque la fraction de pixels bleus est comprise entre 0,7 et 1, les filaments bactériens sont très chargés en PHB et inversement si la fraction est entre 0 et 0,6 très peu chargés. L'utilisation successive de ces trois substrats différents (S1, S3, S6) de par leur composition, nous apporte des renseignements sur le métabolisme de stockage des lipides sous forme de PHB. Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre I, en conditions aérobies, l'acétate ou le glycogène peuvent être dégradés par des voies métaboliques pour former des poly- β -hydroxybutyrates. Le substrat synthétique S3 contient essentiellement de l'acétate (38 g/L), de l'amidon à 34 g/L et du glucose (27g/L) alors que le substrat synthétique S1 est composé en grande partie d'extrait de viande (628 g/L) et de saccharose à 33,8 g/L (glucose et fructose). La dernière alimentation (S6) d'origine naturelle (effluent brut) provient de la station d'épuration de Nancy-Maxéville.

Un point remarquable est à noter pendant ces expérimentations. L'évolution de la concentration en acétate (DCO du substrat de 100 mg/L à 500 mg/L) sur la figure n° 3.5.13 nous montre bien le stockage progressif des poly- β -hydroxybutyrates (pour les fractions de pixels bleus entre 0,7 et 1) dans les bactéries filamenteuses. La fabrication de ce métabolite devient donc quasi maximum lorsque l'alimentation est réalisée avec des concentrations supérieures à 400 mg/L en DCO. D'autre part, on observe sur la figure n°3.5.14 que la fréquence de stockage des filaments très chargés en PHB est beaucoup plus faible que pour le substrat S5 et ceci à partir des concentrations en DCO inférieures à 400 mg/L.

Les réserves de PHB des boues alimentées par S1 sont très faibles pour des concentrations en substrat inférieures à 400 mg/L de DCO. Au-delà de cette valeur, le stockage des granules apparaît.

La troisième étude (figure n° 3.5.15) nous indique que le substrat naturel (S6) ne provoque pas de synthèse importante de PHB. Par contre le fait de créer un stress (arrêt de l'alimentation à t = 96 h) provoque la mise en réserve des ces composés. Des observations similaires ont également été réalisées par Klaus et al (2002) et Rossetti et al (2005).

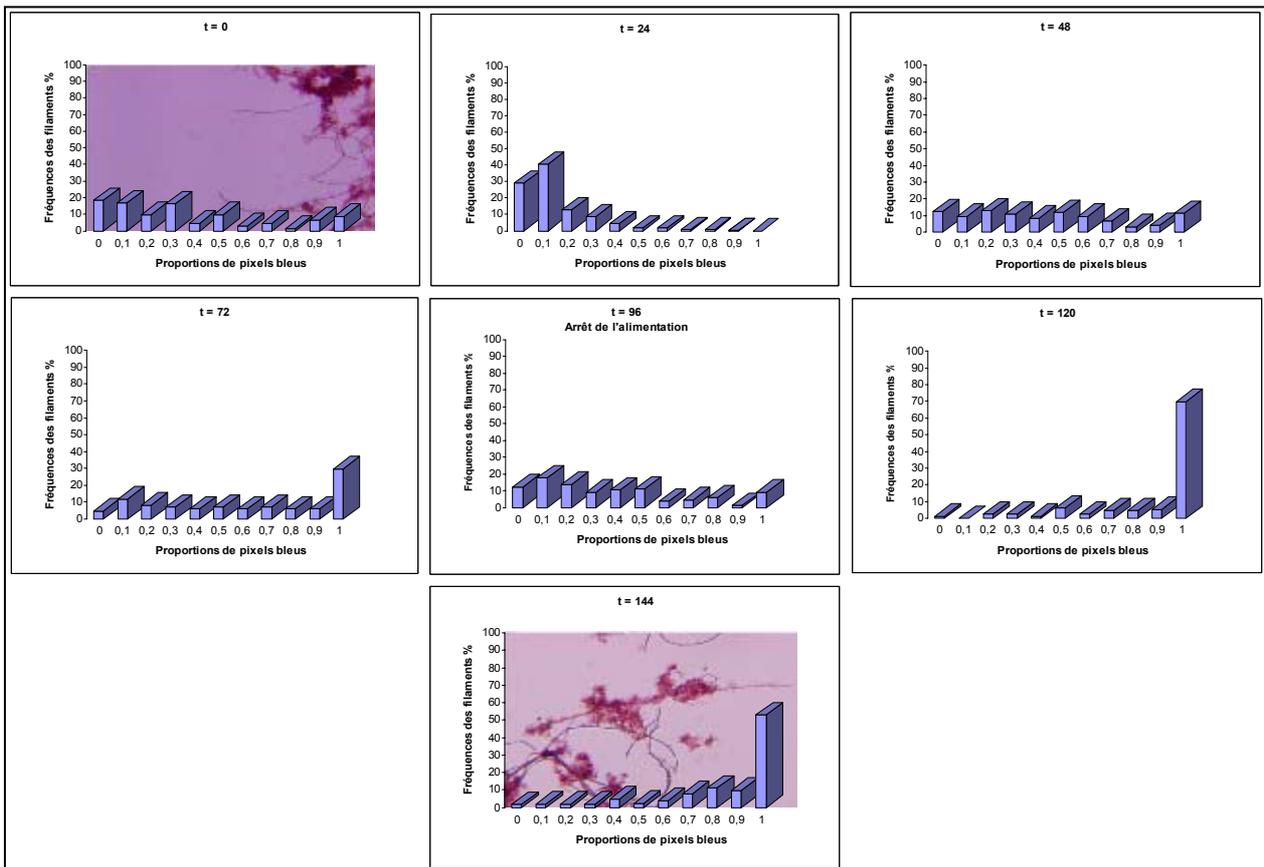


Figure n° 3.5.15 : Evolution du PHB avec le substrat S6

En résumé, le milieu supplémenté d'acétate montre bien que les microorganismes filamenteux dans des conditions aérobies sont capables de fabriquer et de stocker de manière importante les polyhydroxybutyrates. Ceci est beaucoup moins visible avec le substrat S1 à base d'extraits protéiques.

Nous constatons également qu'après une alimentation de plusieurs jours avec un substrat naturel, la mise en famine provoque chez ces bactéries une stimulation de la mise en réserve du PHB.

- Les microorganismes Gram en présence de S1, S3, S5 (méthode binaire)

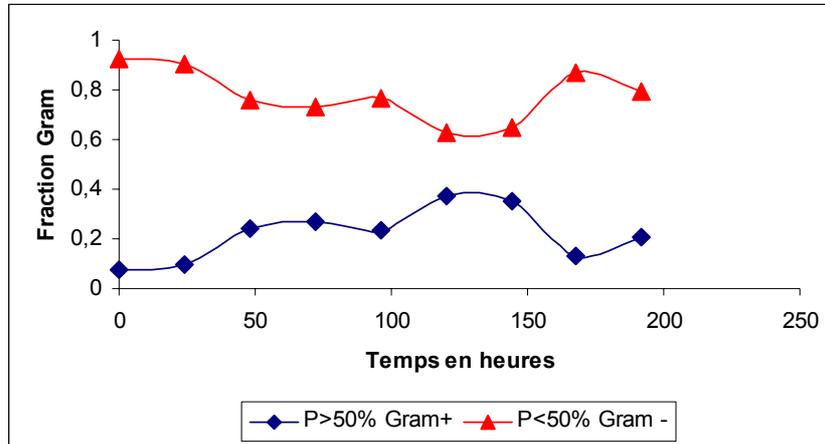


Figure n° 3.5.16: Substrat S1 (extrait de protéine et saccharose)

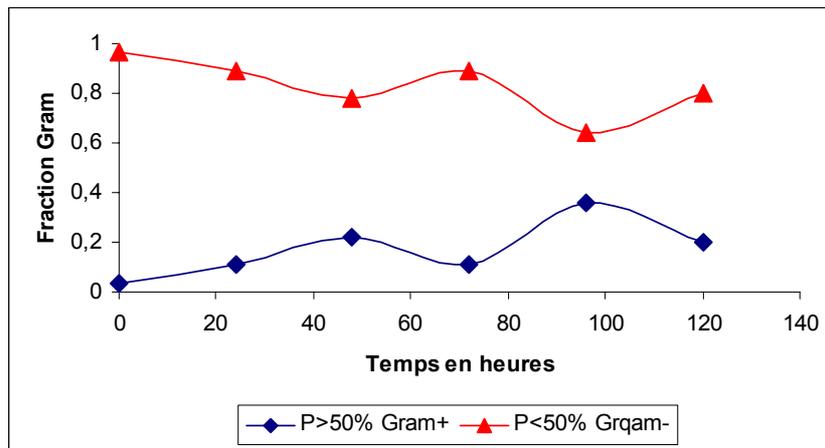


Figure n° 3.5.17 : Substrat S3 (amidon et glucose)

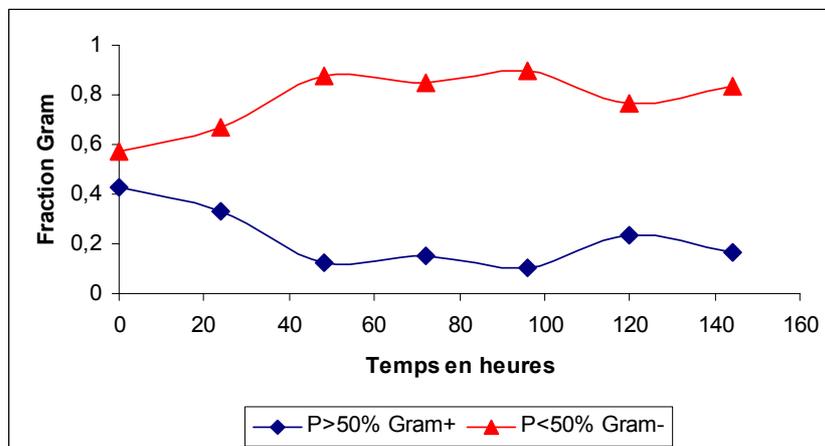


Figure n° 3.5.18 : Substrat S6 (eau brute)

Ces trois figures nous amènent à souligner les points suivants :

- La figure n° 3.5.18 indique les évolutions des populations Gram comptabilisées par la méthode binaire. Nous avons choisi de ne représenter graphiquement qu'une seule des deux méthodes (figure n° 3.5.18), car l'évolution des populations était identique. Ces deux méthodes laissent donc apparaître un bon degré de fiabilité.
- Dans les trois cas, le développement des bactéries filamenteuses Gram négatifs est observé indépendamment du type de substrat.
- Le procédé SBR (réacteur séquentiel discontinu) pourrait intervenir dans la sélection des populations Gram.

3.5.2.4 Etude du rapport C/N sur les bactéries filamenteuses des boues activées.

Le carbone est un composé qui entre dans la composition des polymères bactériens, intra ou extracellulaire. L'azote lui, est associé aux protéines et acides nucléiques. La composition en C/N des eaux usées varie entre 20 et 25. Il nous paraissait donc indispensable de suivre l'évolution des EPS en présence de différents rapports C/N (5 ou 40). Au cours des études précédentes les substrats étaient différents sur plusieurs points (compositions différentes). En revanche, dans cette étude, les composants sont identiques et seul le rapport C/N varie.

Les réacteurs SBR de type 2 (cf chapitre matériels et méthodes) ont étéensemencés par des boues activées de la station d'épuration de Nancy-Maxéville. Ils sont alimentés par un substrat synthétique contenant des ratios C/N (carbone / azote) de 5 et 40 et dont la composition se trouve dans le chapitre II. La DCO respective de chaque substrat est d'environ 970 mgO₂/L pour un C/N de 40 et 350 mgO₂/L pour un C/N de 5. Aucune période d'anoxie n'a été réalisée.

Les volumes utiles de boues sont de 1,75 L et la durée d'expérimentation est d'un mois. La température de la culture est d'environ 20°C et le pH de départ est de l'ordre de 6. Ces deux substrats ont été choisis pour visualiser l'influence des éléments carbone et azote sur la production des EPS. En parallèle des suivis de l'ammonium, pH, MS, turbidité, DCO sont réalisés ainsi que celui de la morphologie des floccs et des bactéries filamenteuses.

- **Influence du pH sur l'évolution de l'ammonium**

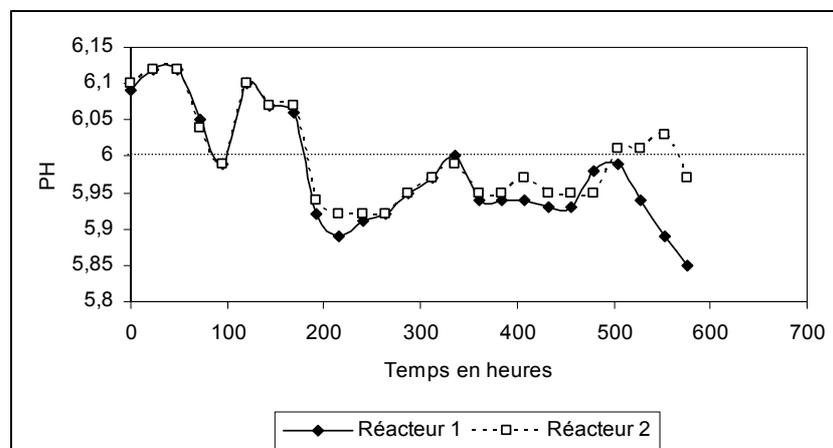


Figure n° 3.5.19 : Variation du pH en fonction du temps sur les réacteurs 1 (C/N : 40) et 2 (C/N : 5)

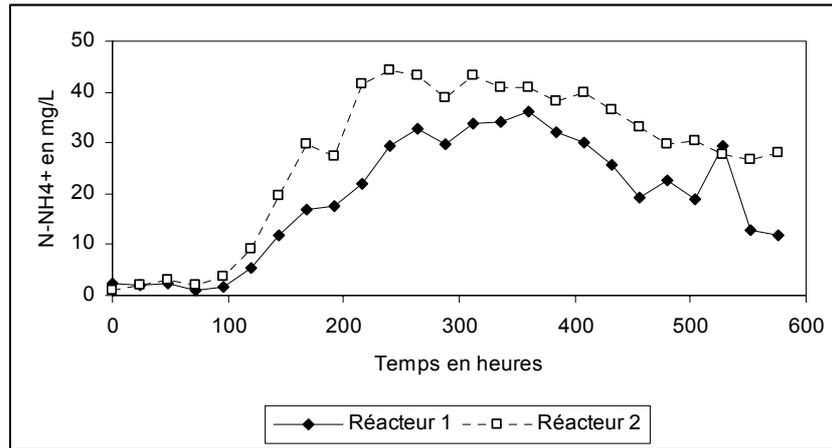


Figure n° 3.5.20 : Variation de l'ammonium en fonction du temps sur les réacteurs 1 (C/N : 40) et 2 (C/N : 5)

La concentration en ammonium est stable pendant cinq à six jours et le pH se stabilise aux alentours de 6 pour les deux manipulations (figures n° 3.5.19 et 3.5.20). Au niveau du réacteur 2 (rapport C/N et de 5), on note une plus forte augmentation de l'ammonium tout au long de l'expérience, par rapport au réacteur 1.

Comment peut on expliquer cette différence ? On peut envisager qu'un substrat riche en glucides favorise la croissance des bactéries hétérotrophes (Cecen et al, 1996) qui produisent des polymères extracellulaires. De ce fait, elles protègent les bactéries nitrifiantes à croissance lente. On a donc dans ce cas, une population plus importante de ces microorganismes (dans le réacteur 1) capables d'utiliser l'ammonium.

On peut également envisager qu'un deuxième phénomène soit à l'origine de cette accumulation d'ammonium. Nous constatons sur la figure n°3.5.19 que le pH devient plus acide (inférieur à 6), ceci est sans doute dû à la présence de composés nitreux ou nitriques. En règle générale, la vitesse de nitrification n'est pas influencée par le pH dans une gamme de 7,5 à 8. Pour les bactéries *Nitrosomonas*, le pH optimum se situe entre 7,9 et 8,2 tandis que pour les bactéries *Nitrobacter*, il se situe entre 7,2 et 7,6 (Prosser, 1989).

Par ailleurs, pour des pH inférieurs à 6, la nitrification est complètement inhibée ce qui est également le cas pour les pH basiques. La nitrification va donc être ralentie ou inhibée (pH < 6) et la concentration en ammonium va augmenter (figures n° 3.5.19 et 3.5.20).

• Evolution des polymères extracellulaires

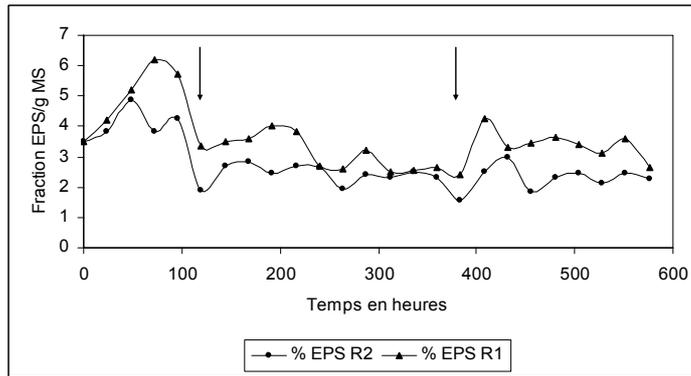


Figure n° 3.5.21 : Evolution des polymères extracellulaires dans le réacteur 1 et 2

La figure n° 3.5.21 indique l'évolution des EPS (polymères extracellulaires) sur une durée d'un mois en présence des substrats synthétiques dont les rapports C/N sont de 5 ou 40. On visualise très bien sur ces deux courbes, que la production des EPS (C/N : 5) est inférieure à celle de la culture dont le C/N est de 40. Cette observation est toute à fait cohérente puisque la concentration en glucose du réacteur 1 est plus grande que celle du réacteur 2. Dans ce cas, la quantité d'EPS du réacteur 1 sera supérieure à celle du réacteur 2. Ces résultats montrent bien que le rapport C/N influence la production des exopolysaccharides. Nos résultats sont en accord avec Dumaz et al (2001) qui au cours de leurs travaux ont montré que des rendements de C/N proche de 40 favorisent la production de carbohydrates et inversement des rapports de C/N de 5 influencent positivement la production des protéines.

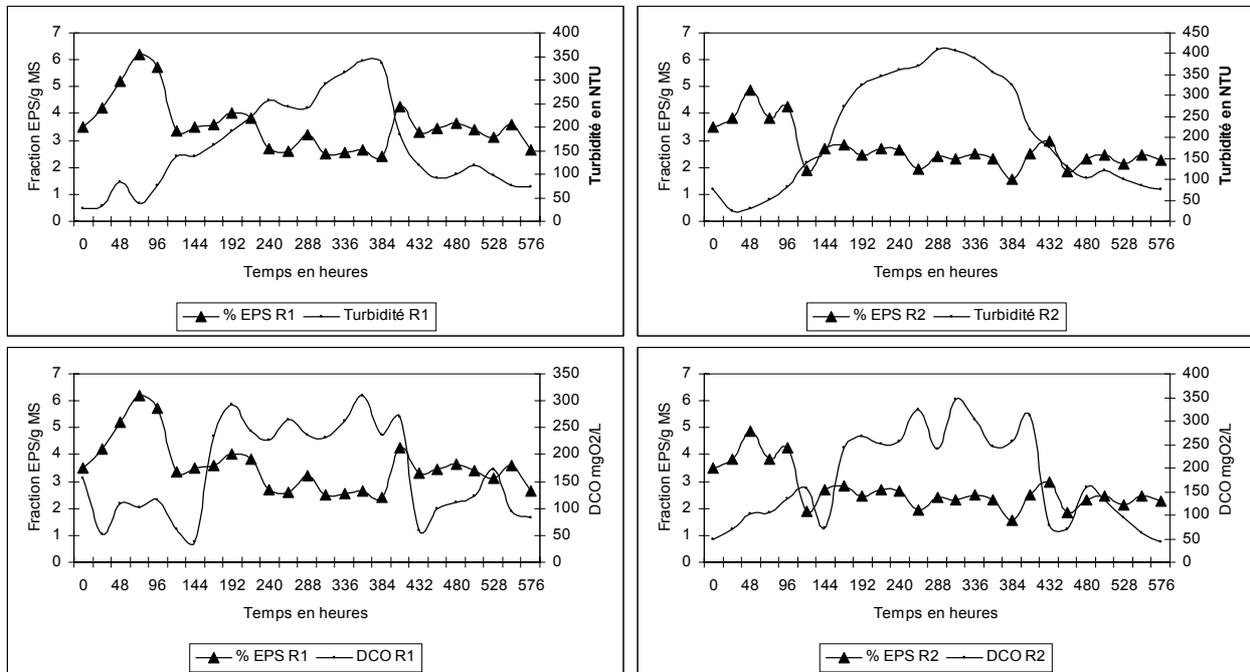
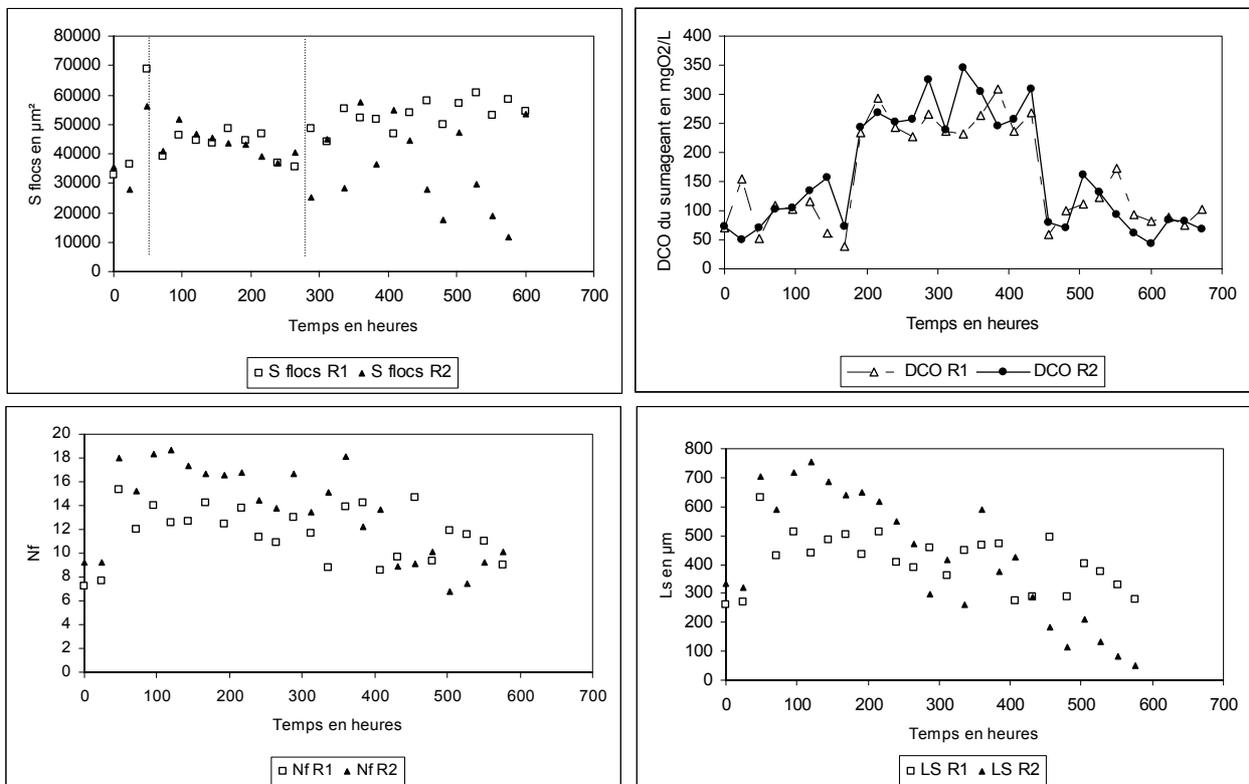


Figure n° 3.5.22 : Evolution de la turbidité, DCO et EPS en fonction du temps pour des rapports C/N de 40 (R1) et 5 (R2)

Les résultats précédents nous ont montré l'importance du rapport carbone/azote sur la synthèse des polymères extracellulaires, indispensables dans la biofloculation des floccs. Nous avons également voulu voir si d'autres paramètres telles que la turbidité ou la DCO du surnageant pouvaient indiquer des renseignements sur cette production de polymères extracellulaires (figure n° 3.5.22). On constate une augmentation importante de la turbidité au bout de six jours (sur une semaine) concernant ces deux tests et une légère diminution de la quantité de polymères extracellulaires des floccs, plus marquée dans le cas C/N = 5. Ce résultat reflète le relargage des EPS (défloculation) dans le surnageant (figure n° 3.5.24). Afin de confirmer cette hypothèse nous avons également réalisé en parallèle des mesures de DCO du surnageant. Des résultats semblables à la turbidité ont été obtenus (figure n° 3.5.23). Ce résultat semble cohérent, puisque la DCO englobe les composés polymériques relargués dans le surnageant.

L'évolution de la morphologie des floccs et des bactéries filamenteuses a été suivie par la méthode d'analyse d'images : «état sec» (échantillon fixé à la chaleur douce). La figure n° 3.5.23 présente l'évolution de la surface des floccs, des longueurs de squelette et du nombre de filaments. On visualise une légère diminution de la surface dans les réacteurs 1 et 2 du 3^{ème} au 12^{ème} jour d'expérience. La diminution de la taille des floccs (Sfloccs) et du nombre de filaments sur cette période correspond à un débobinage (défloculation) provoquant une dispersion des filaments dans le milieu interstitiel (images B et D figure n° 3.5.24). Les résultats obtenus précédemment sur les EPS viennent conforter cette hypothèse de défloculation. En effet, la quantité de polymères extracellulaires chute pendant cette période provoquant une dénaturation de la structure des floccs bactériens.



Figures n° 3.5.23 : Variation des paramètres morphologiques et de la DCO sur les réacteurs 1 et 2 (valeurs moyennes par image)

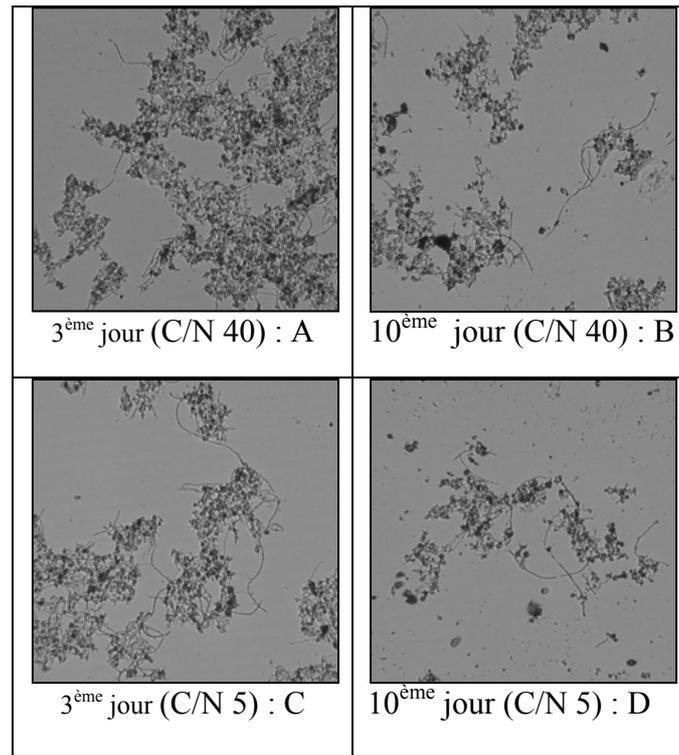


Figure n° 3.5.24 : Images des boues au 3^{ème} et 10^{ème} jours

3.5.3 Etude de la biomasse des boues pendant des périodes de famine

3.5.3.1 Evolution des boues en conditions aérobie ou anaérobie à 20°C ou 4°C

Le but de cette série de manipulations est d'étudier le comportement des microorganismes filamenteux soumis à différents stress environnementaux. La première étude portera sur une série de quatre petits réacteurs (capacité 1,5 L) contenant un litre de biomasse en famine, oxygéné ou non oxygéné à température ambiante (20°C) ou à 4°C. Un suivi par analyse d'images permettra d'évaluer les populations Gram, le stockage du PHB et des polyphosphates.

- **Influence de la température sur les populations Gram en aérobie et anaérobie**

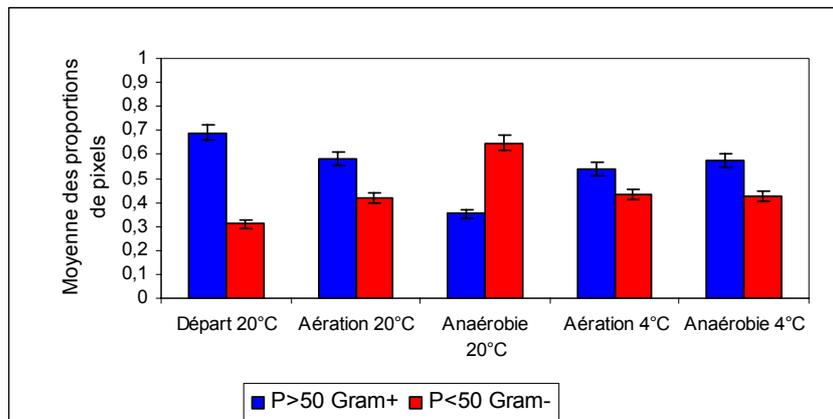


Figure n° 3.5.25 : Variations des bactéries Gram en fonction des conditions aérobie, anaérobie à 4°C ou 20°C

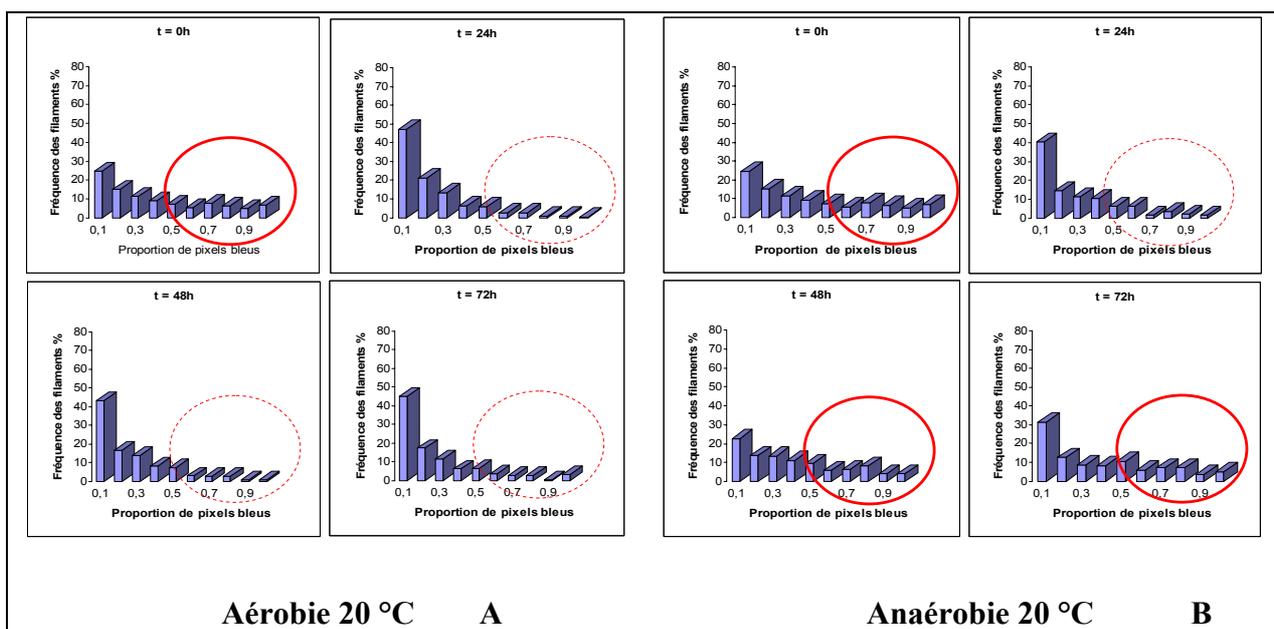
Pour cette série de tests, nous avons utilisé la méthode de comptabilisation binaire. Les résultats ont été obtenus en réalisant la moyenne des proportions de pixels (bleus ou rouges) sur quatre jours de suivi (figure n° 3.5.25). Pour les boues à 20°C, on note que les bactéries Gram + (ici *Microthrix parvicella*) sont majoritaires dans les conditions aérobies, alors qu'en anaérobie ce sont les microorganismes Gram -. Les deux expériences réalisées à la température de 4°C nous révèlent que les populations ont faiblement évolué (légère baisse des Gram +) que ce soit en condition aérobie ou anaérobie. Le profil des bactéries Gram est identique dans les deux cas.

Dans les conditions de température ambiante, tout laisse à penser que les microorganismes Gram négatifs sont favorisés par la situation anaérobie et inversement en milieu aérobie. Or les images obtenues par microscopie optique nous révèlent que les populations majoritaires (*Microthrix parvicella*), qui étaient présentes au départ, semblent avoir subi des modifications de leur paroi (fragilisation). Ces modifications structurelles sont faibles en aérobie, mais très marquées en anaérobie. En effet, les populations Gram+ de type *Microthrix parvicella* ont désormais des tendances Gram négatif.

Nous pouvons supposer que l'augmentation apparente des bactéries Gram négatif est liée à un stress environnemental. Le seul facteur qui diffère entre ces deux études à 20°C, et qui pourrait être à l'origine de cette variation serait l'oxygénation. Comment expliquer la baisse de bactéries Gram positif à 4°C : On remarque l'apparition de nouvelles souches comme le Type 0675 (Gram négatif), mais également un changement morphologique des Gram+ (*Microthrix parvicella*) à cette température.

L'hypothèse liée à la modification morphologique de la paroi chez *Microthrix parvicella* est également observée par Knoop et al en 1998 sur des boues activées soumises à des échelons de températures (12°C à 20°C). Ils remarquent que les filaments deviennent plus courts et se fragilisent au niveau de la membrane induisant une coloration Gram négatif.

- **Influence de la température sur le stockage du PHB et des polyphosphates en aérobie et anaérobie**



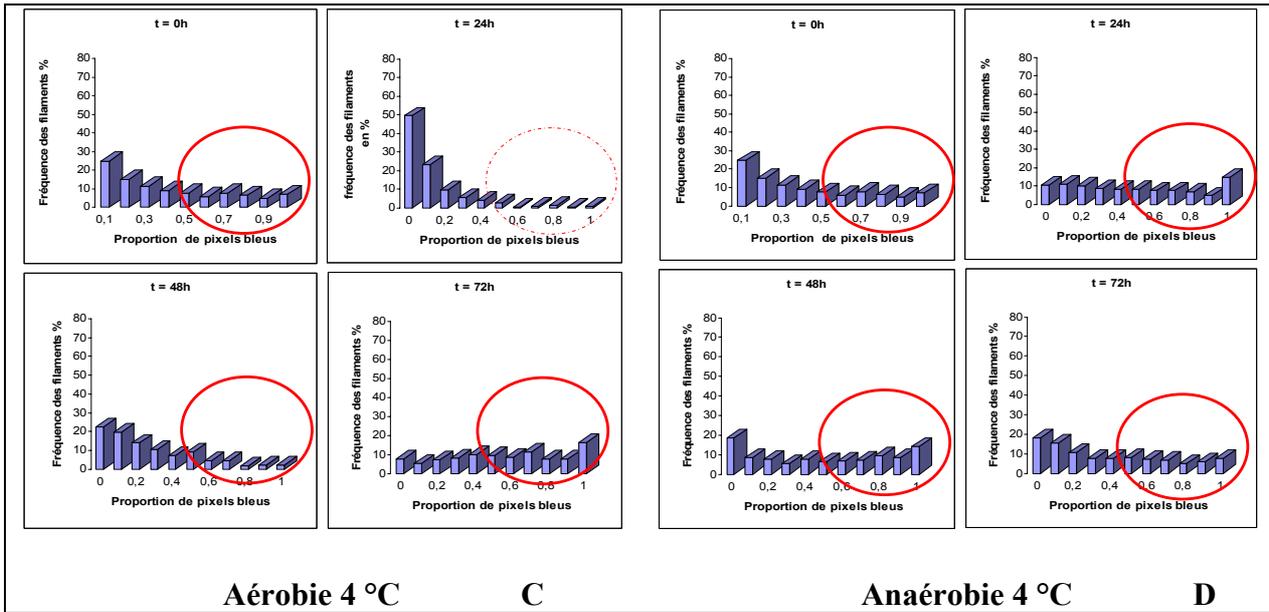


Figure 3.5.26 : Evolution de la quantité de PHB en fonction du temps : (A) aérobie 20°C, (B) anaérobie 20°C, (C) aérobie 4°C, (D) anaérobie 4°C.

Nous avons vu précédemment que les poly-β-hydroxybutyrates (synthétisés à partir de l'acétate) et les polyphosphates étaient des composés de réserves en carbone, énergie chez les microorganismes filamenteux. Les figures n° 3.5.26 et 3.5.28 indiquent la quantité de PHB et de polyphosphates sous forme de granules présents chez les bactéries filamenteuses.

Les boues fraîches prises sur site (t = 0 h) indiquent que les filaments sont plus ou moins chargés en granules de PHB. Si on compare les résultats des réacteurs à 20°C en aérobie et anaérobie, on remarque qu'en présence d'oxygène, les composés lipidiques diminuent (figure 3.5.26 A) au cours du temps et que les polyphosphates augmentent (figure 3.5.28). En absence d'oxygène on s'aperçoit que les filaments se sont chargés en PHB à 4°C (figure 3.5.26 B) et que les polyphosphates sont consommés.

Dans le cas où les boues sont placées en aérobie à 4°C, le PHB est consommé au bout de 24h (adaptation au stress), car les boues sont au départ dans des conditions standard (20°C) et passent ensuite à 4°C. A partir de 48h les réserves en PHB sont de nouveau reconstituées. Si on regarde les images de la figure n° 3.5.28 réalisées avec la coloration de Neisser, on constate qu'il y a eu stockage des polyphosphates.

A 4°C en anaérobie, on observe une stabilité des granules de poly-β-hydroxybutyrates et de polyphosphates contenues dans les filaments. Il semblerait donc qu'en condition de stress aérobie ou anaérobie (au froid), ces bactéries filamenteuses stockent plus aisément ces deux métabolites.

A partir de ces constatations, nous avons donc essayé de proposer une explication du métabolisme chez les microorganismes filamenteux. Le lecteur trouvera sur la figure n° 3.5.27 un schéma explicatif traduisant l'ensemble des relations entre PHB et Polyphosphates.

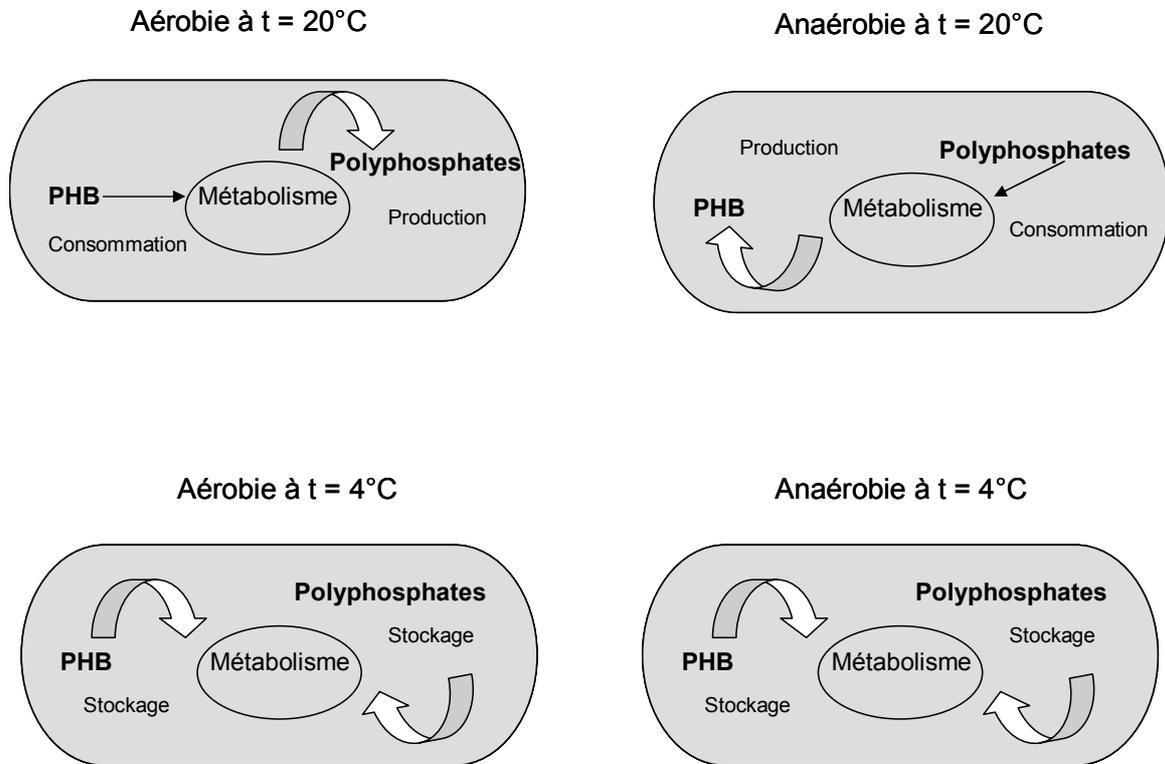


Figure n° 3.5.27 : Schéma explicatif et relations possibles entre PHB et polyphosphates

Chapitre 3 – Etudes morphologiques et physiologiques des boues

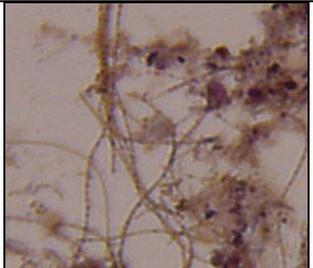
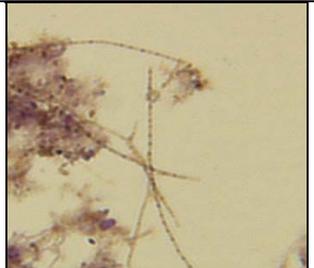
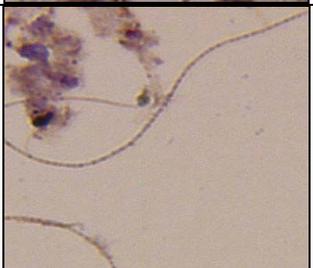
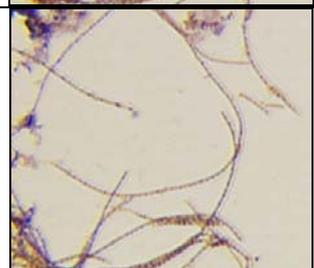
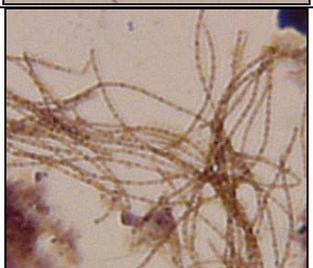
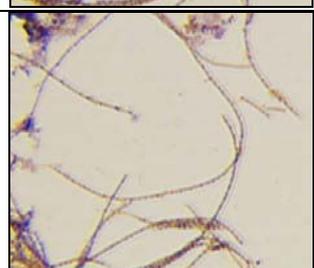
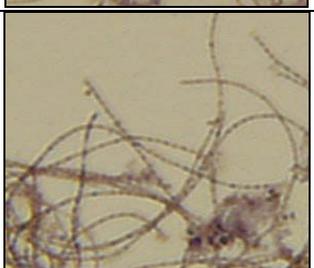
t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	Conditions
				Aérobic 25°C Stockage des granules de polyphosphates
				Anaérobic 25°C Perte des granules de polyphosphates
				Aérobic 4°C Stockage des granules de polyphosphates
				Anaérobic 4°C Stockage des granules de polyphosphates

Figure n° 3.5.28 : Bactéries filamenteuses (400X) avec la coloration de Neisser

3.5.3.2 Etude du comportement des microorganismes filamenteux avec un ajout d'acétate suivi d'une famine aérobie

- **Mode d'action de l'acétate sur les polyphosphates et poly- β - hydroxybutyrates.**

Après avoir mis en évidence les phénomènes de stockage des composés PHB et polyphosphates en aérobie et anaérobie à 4 et 20°C, nous allons, dans ce paragraphe, étudier l'influence de l'acétate sur leur synthèse. Pour cela nous allons travailler sur un réacteur SBR de 6 litres,ensemencé par des boues activées, et alimenté par un litre de S5 dont la DCO est de 400 mgO₂/L (cf chapitre matériels et méthodes) contenant de l'acétate d'ammonium. Un examen microscopique nous a permis de faire une reconnaissance globale des microorganismes présents dans l'échantillon de départ. Il s'est avéré que la majorité des bactéries étaient *Microthrix parvicella* (Gram +, PHB +) et le *Type 0041* (Gram variable, PHB-).

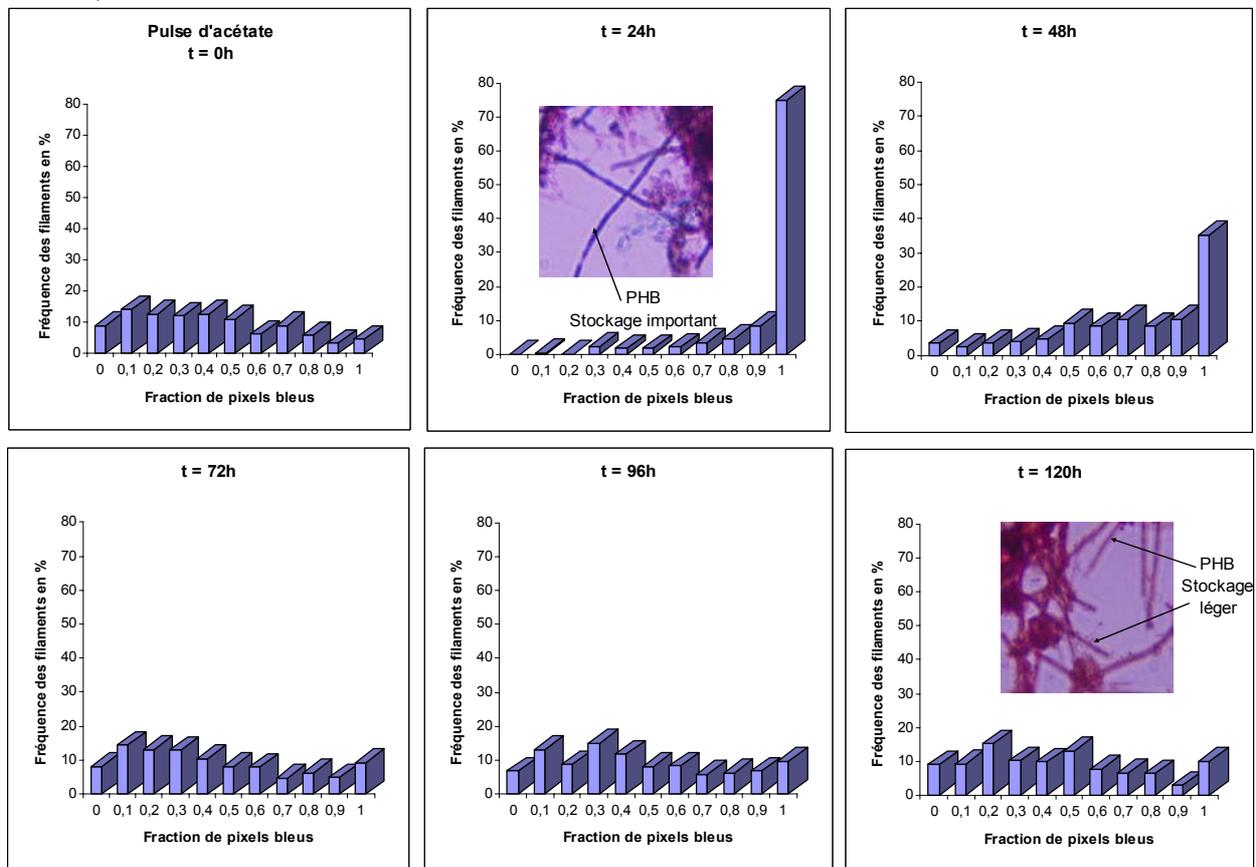


Figure 3.5.29 : Evolution du PHB en présence d'un pulse d'acétate

D'après certains auteurs (Klaus et al, 2001), un ajout d'acétate en condition d'aération suivi d'une phase de famine induit la synthèse du PHB et une consommation d'acétate. L'idée était de voir si notre technique d'analyse d'images PHB permettait d'observer les variations de ce métabolite lors de ce pulse d'acétate.

Les histogrammes de la figure n° 3.5.29 résument l'évolution des poly- β - hydroxybutyrates contenus dans les filaments sur une durée de 120 heures avec un ajout d'acétate au départ. Vingt quatre heures après l'ajout de l'acétate d'ammonium, les filaments (*Microthrix parvicella*) sont totalement chargés en granules lipidiques.

A partir de la 72^{ème} heure les bactéries commencent à consommer leurs réserves de PHB par oxydation pour leur métabolisme de croissance.

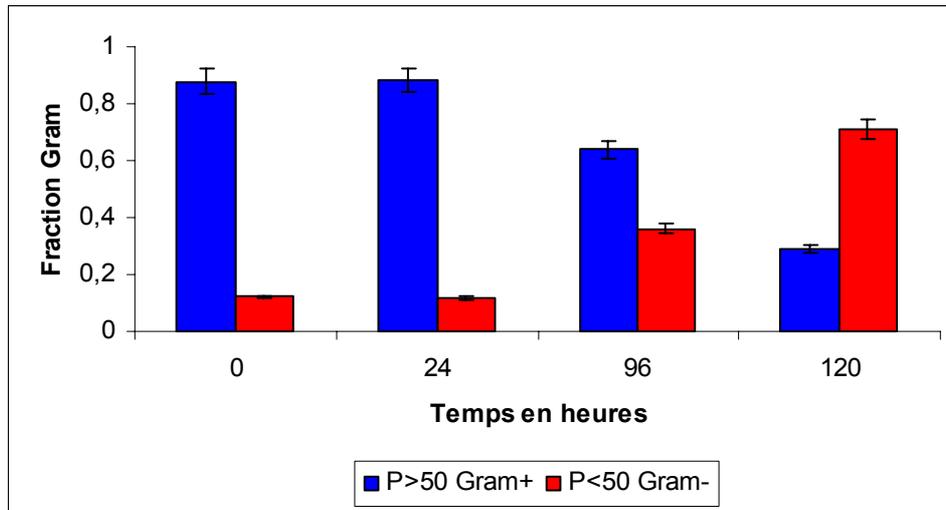


Figure n° 3.5.30 : Variation des populations Gram en fonction du temps

Les populations Gram positif sont majoritaires jusqu'à la 96^{ème} heure. Ensuite la tendance s'inverse et se dirige vers des microorganismes Gram négatif (figure n° 3.5.30). Cette évolution peut elle provenir du substrat ou des conditions de culture (famine aérobie) ?

Il est vrai que ces bactéries ont un rapport surface sur volume élevé expliquant leur possibilité à stocker plus facilement de la nourriture, même à de faible concentration. Mais il est un point important à ne pas oublier. Ces microorganismes mis en période de famine peuvent subir des modifications de structure membranaire (voir précédemment) qui les rendent plus vulnérables. On remarque l'apparition de fragments de *Microthrix* devenus Gram négatif à la coloration de Gram. On s'aperçoit que cette tendance augmente à la 120^{ème} heure et l'examen de ces boues a permis de visualiser d'autres populations bactériennes à tendance Gram négatif comme *Sphaerotilus natans* et le *Type 0041*.

- **Surface des floccs et des EPS au cours du pulse d'acétate**

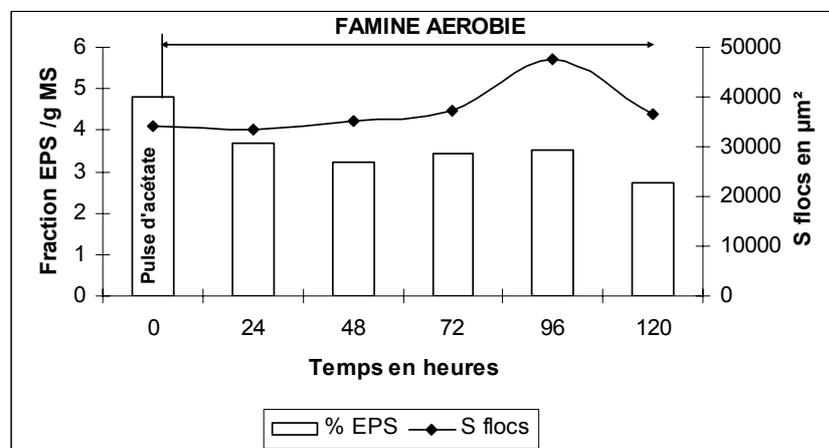


Figure n° 3.5.31 : Evolution des EPS et de la surface de floccs en fonction du temps

Pendant la période d'acclimatation du test (0 à 48 heures) nous ne notons pas de changement significatif de la surface et de la quantité de polymères (figure n° 3.5.31). De la 48^{ème} à la 96^{ème} heure nous observons une légère augmentation de la surface des floes alors que les EPS sont relativement stables. Ce pulse d'acétate suivi d'une période de diète de 120 heures ne semble pas avoir une influence notable sur ces deux paramètres.

Globalement pendant la durée de ce test nous observons que :

- Le pulse d'acétate a permis aux microorganismes filamenteux de stocker le PHB (figure n° 3.5.29)
- La croissance des populations Gram positif est majoritaire après environ 48 heures. Passé ce délai, l'épuisement du substrat et les conditions de famine aérobie ont provoqué des modifications structurelles de certaines espèces : *Microthrix parvicella* (segmentation des filaments et évolution vers des caractéristiques Gram négatif).
- La période de diète aérobie ne semble pas avoir affecté les bactéries de *Type 0041*.
- L'apparition de *Sphaerotilus natans* au cours de ce test est sans doute due à la carence en nutriments (Duchène et al, 1998).
- La structure des floes et la quantité de polymères extracellulaires sont relativement stables au cours du temps.

L'ensemble des résultats obtenus sur toutes les séries de tests précédents, en présence ou en absence d'alimentations diverses avec différents pilotes, nous permet de suivre la croissance des bactéries filamenteuses des boues activées. Les cycles d'alimentation et la composition des différents milieux mettent en évidence la formation et le relargage des produits microbiens (polymères extracellulaires). A cet effet nous avons pu montrer que les composés polymériques extracellulaires et les poly- β -hydroxybutyrates étaient représentatifs des produits du métabolisme bactérien des boues activées. Il est donc possible grâce à ces techniques de colorations en routine de suivre la morphologie, la physiologie de ces microorganismes filamenteux que ce soit sur site ou au cours d'expérimentations en laboratoire.

3.6 Etude de la viabilité bactérienne et du comportement de la microfaune en condition de famine aérobie.

Cette étude a pour but de suivre la viabilité de la biomasse des boues activées par le test *Bac-Light*, la structure des flocs et l'évolution des EPS dans des conditions de famine aérobie.

Deux réacteurs de type colonne à bulles ont été utilisés (capacité utile 10L) avec un volume total de 5 litres de boues (bassin de dégazage station de Nancy-Maxéville) en condition de famine aérée. Dans un des deux réacteurs on ajoute 2,5 litres de biomasse morte par choc thermique et 2,5 litres de biomasse saine. Le second contient 5 litres de boues saines et sert de témoin.

Différents suivis ont été réalisés sur deux semaines :

- Morphologie des flocs et des bactéries filamenteuses
- Quantification des EPS
- Viabilité de la biomasse à l'aide de la coloration Live/Dead *Baclight*

La figure n° 3.6.1 présente les variations de la biomasse totale et celle des filaments pendant les expériences de famine aérobie. Si on regarde les résultats concernant la surface des flocs au début de l'étude, on visualise très bien, la différence entre la biomasse saine et celle qui a subi un traitement thermique. Les flocs contenus dans l'échantillon soumis au traitement thermique ont subi une dénaturation, provoquant sur une période de 4 jours une défloculation.

(figure n° 3.6.2, image B)

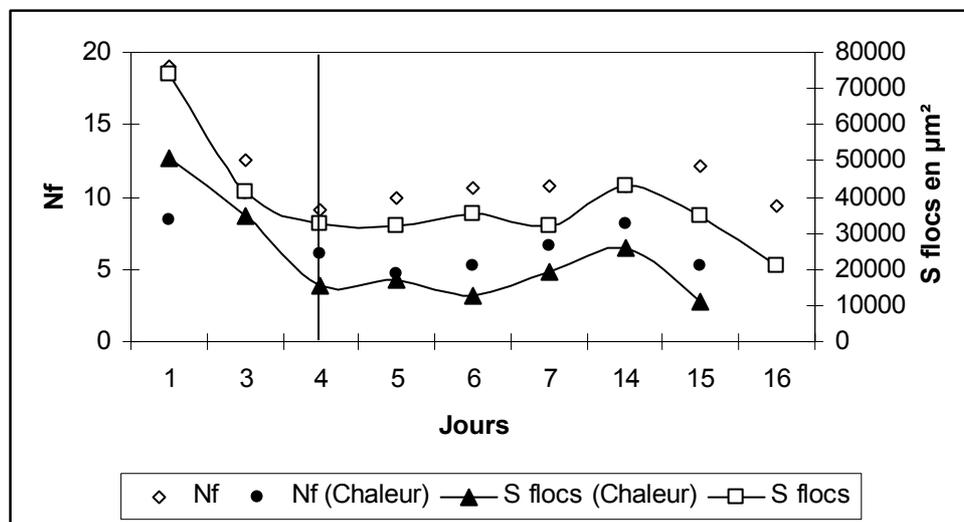


Figure n° 3.6.1 : Variation du nombre de filaments et de la surface des flocs (valeurs moyennes par image) avec ou sans traitement thermique

Le nombre de filaments comptabilisés par cette méthode d'analyse diminue également sur quatre jours puis se stabilise. Ceci est contradictoire puisque les boues déflocculent, le phénomène inverse devrait être observé. Or nos acquisitions d'images sont réalisées sur les flocs et les filaments proches et non sur les filaments situés dans le milieu interstitiel. Par conséquent, il est donc normal que les filaments situés dans les flocs bactériens diminuent. De plus, la présence en grande quantité de protozoaires et métazoaires dans ce milieu explique

également cette perte de biomasse. Au-delà du quatrième jour le nombre de filaments et la surface des floes se stabilisent dans les deux réacteurs.

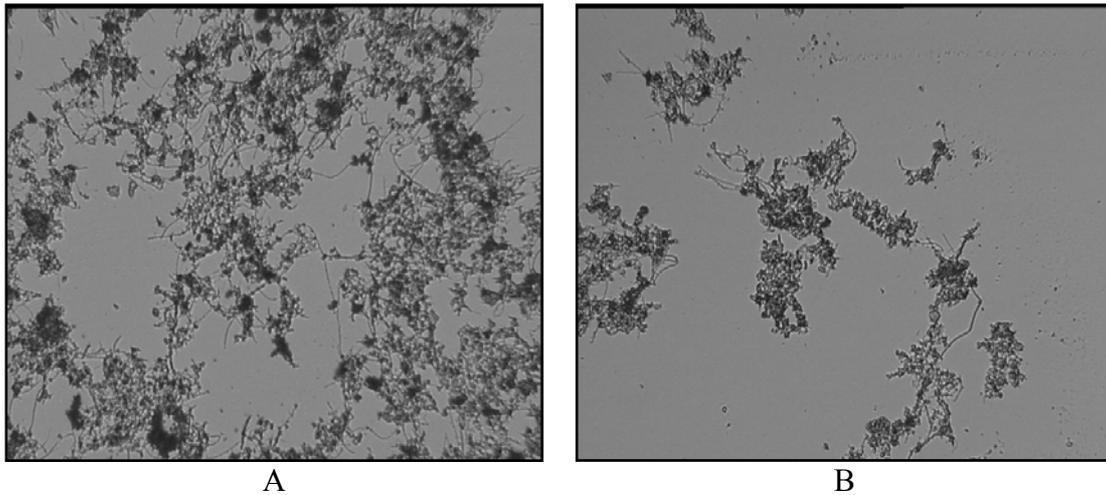


Figure 3.6.2 : Structure des floes : (A) boues saines, (B) boues avec traitement thermique

La figure n° 3.6.3 résume l'évolution des EPS en fonction du temps en condition de famine aérobie, on remarque :

- Que la quantité des biomolécules est supérieure au sein du réacteur témoin.
- Que le pourcentage d'EPS (au départ) dans le réacteur contenant la biomasse morte est environ la moitié des EPS contenus dans le témoin. Ceci confirme bien l'hypothèse de la libération des polymères au cours du traitement thermique.

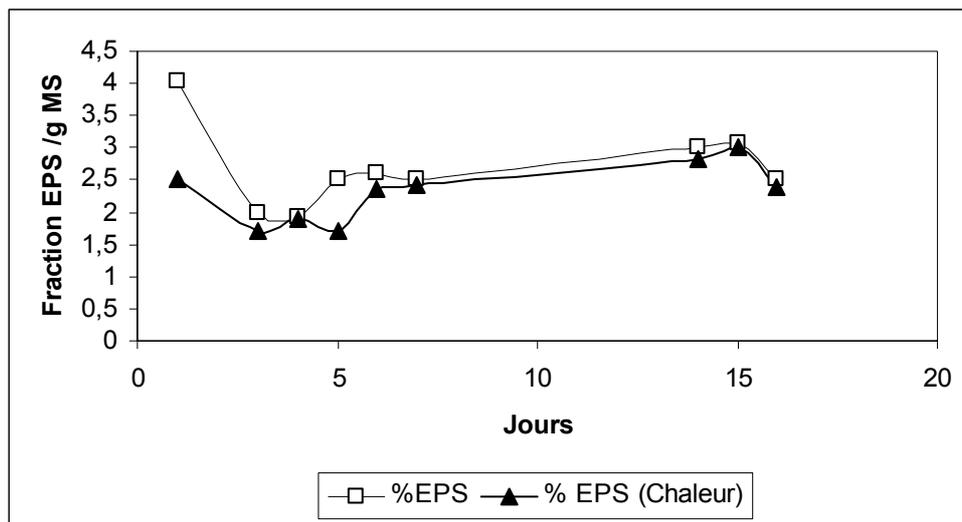


Figure n° 3.6.3 : Variations des fractions d'EPS

On constate que dès le premier jour les exopolymères contenus dans les floes bactériens sont davantage libérés lors du choc thermique (figure 3.6.3), puis chutent brutalement dans les deux cas et se stabilisent. Cette diminution peut être due d'une part à une consommation par le métabolisme bactérien ou des protozoaires, et d'autre part au relargage de ces composés

dans le milieu interstitiel. Le lecteur trouvera sur la figure n° 3.6.4 deux images révélant la quantité d'EPS contenue dans les floccs au début et en fin d'étude.

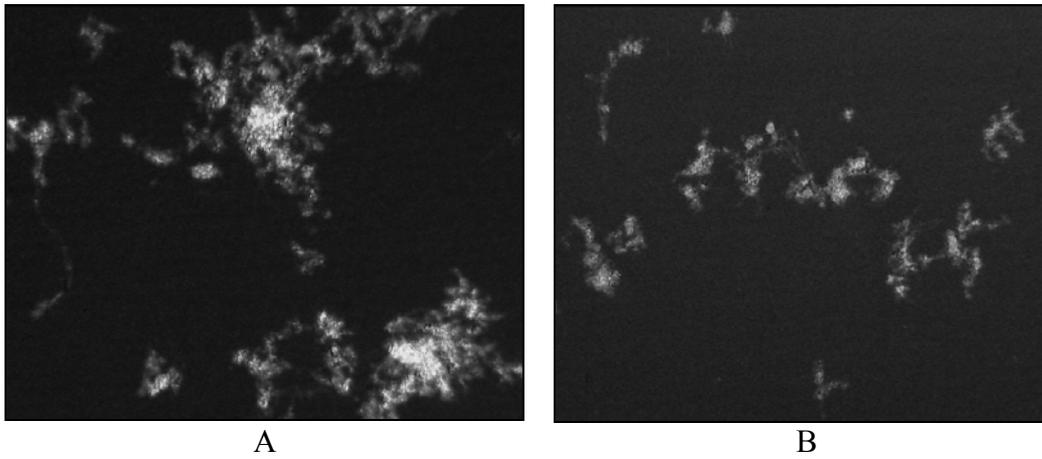


Figure n° 3.6.4 : Images des polymères extracellulaires présents dans les deux réacteurs (A sans traitement, B traitement à la chaleur)

A partir des observations de la figure n° 3.6.1 nous pouvons constater que la biomasse contenue dans les réacteurs diminue au cours du temps. Les examens microscopiques des floccs des boues ont montré de sévères changements de structure morphologique pendant 4 jours de famine.

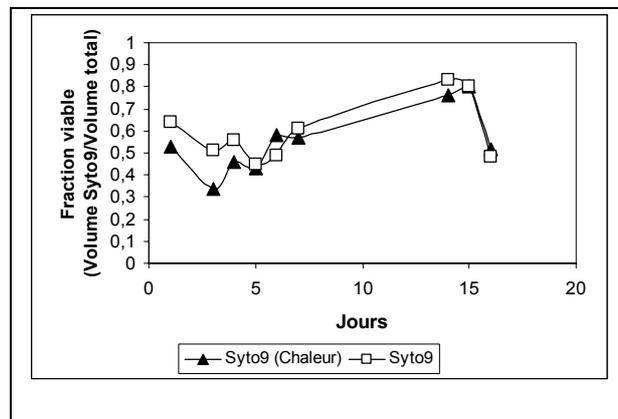


Figure n° 3.6.5 : Suivi de la viabilité par la méthode *BacLight*

La structure initiale des floccs est ouverte avec des ponts assurés par des filaments (figure n° 3.6.2 image A), et de nombreux protozoaires libres. Cette microfaune va tendre à disparaître graduellement au profit des Ciliés se nourrissant de bactéries ou protozoaires libres. Parmi ces espèces on trouve essentiellement *Trachelophyllum* (figure n° 3.6.6, image A et D), *Chilodonella cucullulus* (figure n° 3.6.6, image C), Vorticelles (figure n° 3.6.6, image B).

La viabilité bactérienne (figure n° 3.6.5) mesurée avec la méthode *BacLight* diminue faiblement les quatre premiers jours, puis ne cesse d'augmenter après deux semaines d'étude à l'exception de la dernière valeur. Cette augmentation soudaine de mortalité peut provenir d'un épuisement du milieu.

Même si les bactéries filamenteuses ou zoogléales ont été affectées par ces conditions de famine aérobie, la microfaune (Ciliés) ne l'est pas (figure n° 3.6.6). La nourriture nécessaire à leur développement est bien présente (bactéries, protozoaires libres) ainsi que l'oxygène. Tout au long de cette manipulation, la variation entre le taux de mortalité et de viabilité est relativement faible. *Trachelophyllum* et *Chilodonella* sont des protozoaires dits « brouteurs de flocs » ils se trouvent généralement à la surface de ceux-ci et consomment les bactéries qui s'y décrochent.

La capacité de survie des microorganismes des boues dans des conditions de famine peut dépendre de différents paramètres. La présence de polysaccharides intra ou extracellulaires, de protozoaires, des conditions environnementales (température, pH, oxygène) sont des facteurs très importants qui peuvent affecter la croissance des bactéries filamenteuses ou zoogléales.

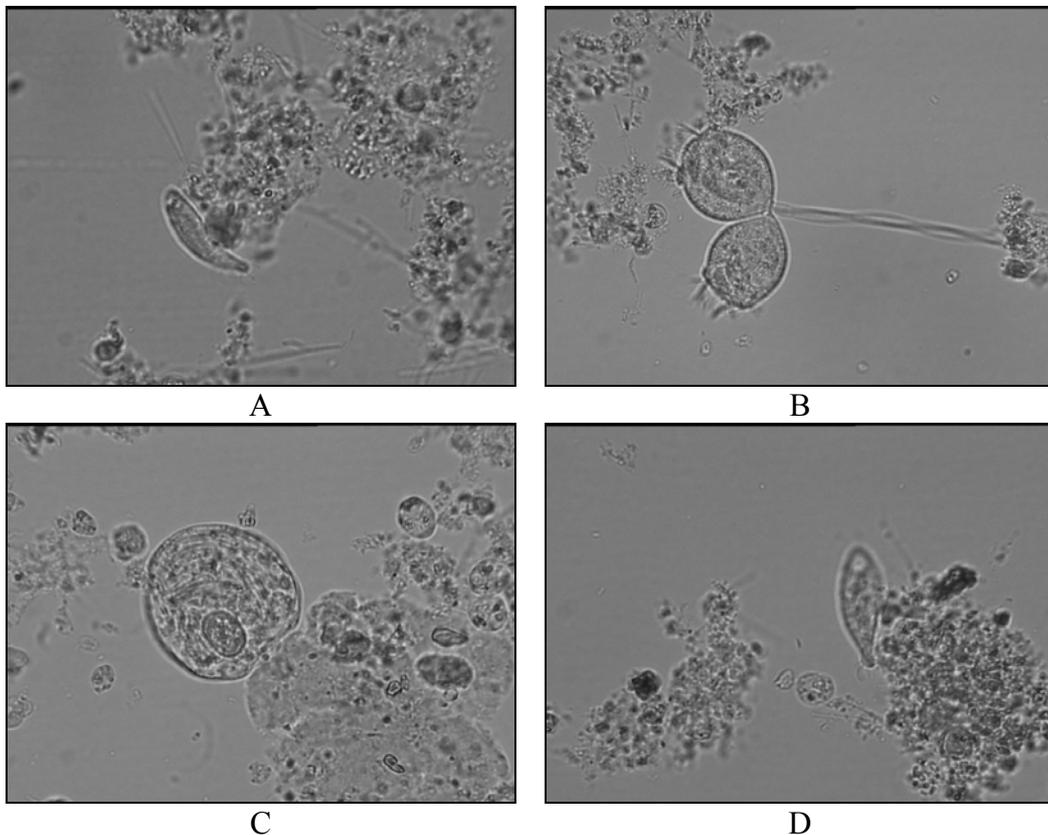


Figure n° 3.6.6 : Image de la microfaune présente dans les deux réacteurs

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de mettre au point des méthodes de colorations microscopiques d'analyse d'images couleurs ou monochromes sur la biomasse des boues activées et de valider leur utilisation que ce soit sur site ou sur des installations pilotes. Les résultats obtenus ont permis de mesurer de manière automatique différents paramètres morphologiques ou physiologiques.

Il est donc possible de :

- Déterminer le nombre de bactéries filamenteuses, la longueur des filaments et la morphologie des floccs.
- D'identifier des populations filamenteuses Gram
- De quantifier globalement la quantité de polymères extracellulaires contenue dans les floccs.
- D'étudier et d'évaluer la quantité de poly- β -hydroxybutyrates contenus dans les filaments bactériens.
- D'évaluer la viabilité de la biomasse des boues activées.

Les relations entre les paramètres morphologiques, physiologiques et les analyses physico-chimiques telles que les matières sèches, l'indice de boue, la concentration en polymères extracellulaires, la DCO ont été également vérifiées.

Les travaux réalisés sur différentes installations pilotes (pilote de boues activées, réacteur discontinu séquentiel), et substrats synthétiques nous ont permis de voir si ces paramètres pouvaient influencer la croissance des bactéries filamenteuses de type Gram. Nous avons également pu suivre l'évolution du métabolisme bactérien via le PHB, les exopolymères et la viabilité de la biomasse au cours de stress environnementaux.

Etude des microorganismes des boues :

La première partie de l'étude a permis de présenter les principales méthodes de coloration classique (Gram, noir de Soudan, Neisser, encre de Chine, *BacLight*) et les résultats des suivis : croissance des populations Gram, étude de la viabilité ou du métabolisme PHB et l'estimation de la quantité de polysaccharides dans les floccs. Toutes ces techniques d'analyse d'images ont été développées sous Visilog 5. Des essais de reproductibilité et répétitivité ont été effectués sur les méthodes Gram, EPS, Noir Sec et *BacLight*.

Pour la procédure Gram, les corrélations obtenues entre la méthode de reconnaissance visuelle et la méthode de quantification binaire nous indiquent des erreurs inférieures à 5 %. Deux méthodes de calcul ont permis d'estimer le pourcentage de bactéries Gram positif ou négatif: la méthode binaire ou la méthode floue. D'une manière générale, la méthode binaire est beaucoup plus robuste que la méthode floue pour des séries de 50 images.

Les tests de validation pour la méthode EPS ont été réalisés sur différentes lames d'un même échantillon ou en présence d'un ou plusieurs opérateurs. Ils ont montré que les erreurs obtenues étaient inférieures à 1%. D'autre part, la préparation est relativement simple (état frais plus encre de Chine entre lame et lamelle) et l'estimation des ces polysaccharides nécessite une acquisition de 50 images. La procédure « noir sec », concernant la morphologie de la biomasse a été réalisée de manière identique aux précédentes et les erreurs mesurées sont de l'ordre de 2%. Des essais sur des boues diluées ont montré une excellente corrélation ($r^2 = 0,9$) entre les dilutions de boues activées, la surface des floccs ou le nombre de filaments.

La seconde partie de l'étude a permis de mettre en avant d'une part les problèmes rencontrés lors de la préparation de certaines colorations : visualisation faible des granules de polyphosphates avec la coloration de Loeffler, libération des cristaux de formazan avec l'INT, hybridations aspécifiques avec les marqueurs FISH et d'autre part de démontrer le coût élevé des méthodes fluorescentes par rapport aux méthodes de coloration basique.

Le principal intérêt des ces méthodes d'analyse d'images est de prévenir un dysfonctionnement des exploitations. Ainsi les procédures Gram et PHB se sont avérées sensibles et efficaces face à un dysfonctionnement de stations d'eaux usées. Nous avons constaté que la proportion de bactéries filamenteuses Gram positif était plus importante lorsque les boues se trouvaient en bulking ou moussage, alors que dans des conditions « normales de fonctionnement » les populations Gram négatif prédominent. Les mesures des concentrations en poly- β -hydroxybutyrates des germes filamenteux réalisées par la méthode d'analyse d'images PHB montrent que les filaments sont très chargés en granules lors de dysfonctionnements biologiques (bulking, moussage). Les valeurs d'exopolysaccharides déterminées par l'analyse d'images et la méthode de Dubois évoluent sensiblement de la même manière. Les études réalisées sur plusieurs sites nous ont permis de constater une corrélation très moyenne ($r^2=0,3$) entre la fraction d'EPS et l'indice de boues ou entre les MS et les exopolysaccharides ($r^2 = 0$).

Afin d'étendre la validation de nos méthodes à des cas plus extrêmes, des manipulations sur réacteurs pilotes (pilote de boues activées, réacteurs séquentiels discontinus) alimentés par des substrats synthétiques ont été effectuées.

Au travers de cette troisième partie nous avons pu déterminer les informations suivantes :

Avec le pilote de boues activées :

- En présence du substrat protéique, la surface des floccs reste stable mais la structure de ceux-ci évolue de manière différente. On passe d'une forme aérée avec des ponts filamenteux à une forme compacte caractéristique des bactéries flocculantes.

- Sur le milieu composé d'amidon et de glucose, nous constatons une diminution des germes filamenteux, au profit des bactéries zoogléales. La surface des floccs reste stable mais leur structure évolue vers une forme particulière dit en doigt de gants spécifique des milieux riches en glucides.
- Les populations Gram évoluent suivant la nature du substrat synthétique. Un milieu riche en glucose favoriserait les bactéries Gram - à l'inverse un milieu protéique, les bactéries Gram +.

Avec les réacteurs séquentiels discontinus :

L'utilisation des alimentations à base d'extrait de viandes ou d'acétate n'a pas réellement affecté la quantité de polymères extracellulaires contenue dans les floccs. Une très légère déflocculation en présence du substrat S1 semble être visualisée à la fois par analyse d'images et par mesure de turbidité du surnageant. Concernant l'alimentation naturelle, on assiste à un débobinement des floccs provoquant la perte des EPS dans le milieu interstitiel. Les mesures obtenues concernant le métabolisme du PHB montrent bien qu'une alimentation riche en acétate permet aux bactéries filamenteuses d'induire le métabolisme nécessaire à la fabrication des composés lipidiques. Les microorganismes observés pendant ces études sont en majorités Gram - quelque soit l'alimentation.

La comparaison entre le pilote de boues activées (aération permanente) et le réacteur SBR (phase d'anoxie et d'aération) pour un même substrat S1 nous indique que les populations Gram qui s'y développent sont différentes. Suivant le type de procédé, nous trouverons des populations Gram - ou Gram +.

Les microorganismes ont besoin des sources nutritives élémentaires tels que le carbone (C), l'azote (N) et le phosphore (P) pour pouvoir se développer correctement. Les tests réalisés pour différentes valeurs de C/N (5 ou 40) nous indiquent que ce rapport carbone/azote influence la production des composés polymériques extracellulaires des floccs. En effet, les résultats obtenus pour le rapport C/N de 40 sont nettement supérieurs. Un excès de matières carbonées (sucres) facilement assimilables permet à la biomasse des boues de produire des polysaccharides indispensables dans la bioflocculation des floccs.

Dans la quatrième partie, on s'est attaché à suivre le comportement de la biomasse des boues face à différents stress environnementaux (famine, températures...). Il a été observé qu'en conditions anaérobie à 20°C, les populations Gram+ subissaient des modifications structurelles de leur paroi et que celles-ci avaient des tendances Gram variable. A 4°C en conditions aérobie et anaérobie, les caractéristiques Gram ne sont pas beaucoup affectées. Nous avons pu constater, que le nombre d'inclusions lipidiques (PHB) était consommé à température ambiante, en anaérobiose ce sont les polyphosphates qui disparaissent. En absence ou présence d'oxygène à 4°C, il semblerait que les microorganismes filamenteux stockent plus aisément ces deux métabolites.

L'ajout d'acétate d'ammonium suivi d'une période de famine aérobie nous a permis de suivre le métabolisme du PHB et d'étudier l'évolution des populations bactéries filamenteuses.

Ce pulse réalisé sur les boues en condition aérobie induit une augmentation des inclusions de PHB dans les filaments bactériens. On note également que ces conditions de stress apportent des modifications structurelles des parois bactériennes et provoquent le développement de nouvelles espèces.

La coloration *BacLight* a démontré qu'il était possible de quantifier la viabilité de la biomasse des boues en situation de famine aérobie. Les résultats de viabilité nous indiquent que les bactéries filamenteuses ou zoogléales ont été affectées, mais que la microfaune (ciliés) ne l'est pas car la nourriture nécessaire à son développement est toujours présente : bactéries, protozoaires...

L'ensemble de tous ces programmes d'analyse automatique d'images ont démontré être d'excellents outils pour quantifier les bactéries filamenteuses, suivre leur métabolisme de réserves (PHB, polyphosphates, EPS) et prévenir des dysfonctionnements biologiques. Chaque paramètre mesuré pourra donc renseigner rapidement les exploitants sur l'aspect physiologique et morphologique de la biomasse des boues. Il est à noter que ce type d'examen peut être fait en routine sur site très rapidement avec un coût financier très abordable.

PERSPECTIVES

Les différentes procédures automatiques d'analyse d'images couleurs (Gram, PHB, viabilité) et monochromes (noir sec et EPS) sont largement envisageables sur site. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que cet outil est parfaitement adapté à des suivis journaliers des souches de bactéries filamenteuses en station d'épuration et en laboratoire de recherche.

L'acquisition des images et le traitement en tant que tel ne sont pas très compliqués. En revanche, la préparation des échantillons et les colorations requièrent un peu de pratique.

L'utilisation des programmes Gram, noir sec et EPS ne se limite pas uniquement aux réacteurs de boues aérées ou séquentiels. Elle a permis de suivre l'évolution de la biomasse des boues des stations de Baccarat et de Saulcy-sur-Meurthe lors de dysfonctionnements biologiques.

Notre protocole de mesure (méthode Neisser) portant sur l'analyse d'images des granules de polyphosphates reste encore à améliorer, car cette technique possède un seuil de détection des populations "Neisser négatives" faible.

La poursuite de travaux en biologie moléculaire (FISH) pour estimer les densités bactériennes devrait à terme pouvoir déterminer les populations de bactéries filamenteuses, à condition que les sondes moléculaires soient réellement spécifiques de chaque espèce. Parallèlement, l'utilisation de la PCR et des gels électrophorétiques dénaturant (DGGE) permettront d'identifier les profils des communautés bactériennes (Lui et al, 2000 ; Muyzer et al, 1993).

La biomasse des boues est un milieu très complexe et l'identification par analyse automatique d'images des microorganismes, sans avoir recours aux cultures, présente de nombreux avantages. Nous espérons que ces outils permettront d'anticiper les phénomènes de dysfonctionnements biologiques et contribueront à l'amélioration de la gestion des stations d'épuration.

Al-Yousfi AB, Mason SH, Romagnoli RJ, Williams JB (2000) Viscous sludge bulking due to zoogaea proliferation at an industrial wastewater treatment plant : background causes and remedies, Proceeding of the 1st World congress of IWA, Paris.

Amann R, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-Targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology, *FEMS Microbiol.Rev.*, 24: 555-565.

Amann R, Ludwig W, Schleifer K.H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol.rev.*; 59: 143-169.

Amaral A.L, Baptiste C, Pons M.N, Nicolau A, Lima N, Ferreira E.C, Mota M, Vivier H, (1999) Semi-automated recognition of protozoa by image analysis, *Biotechnol.Tech*, 13: 111-118.

Andreasen K, Nielsen PH (1997) Application of microautoradiography the study of substrate uptake by filamentous microorganism in activated sludge, *Appl. Environ . Microbiol.*, 63: 3662-3668.

Beveridge JT (1990) Mechanism of Gram variability in select bacteria, *J. Bacteriol.*, 172: 1609-1620.

Beveridge JT (1999) Structures of Gram-negative cells walls and their derived membrane vesicles, *J. Bacteriol.*, 181: 4725-4733.

Binnerup SJ, Højberg O, Sørensen J (1998) Gram characteristics determined on single cells and at the microcolony level of bacteria immobilized on polycarbonate membrane filters, *J. Microbiol. Methods*, 31:185-192.

Blackall LL, Seviour EM, Bradford D, Statton HM, Cunningham MA, Hugenholtz P, Seviour RJ (1996) Towards understanding the taxonomy of some of the filamentous bacteria causing bulking and foaming in activated sludge plants, *Water Sci. Technol.*, 34: 137-144.

Blackall LL, Seviour EM, Bradford D, Rossetti S, Tandoi V, Seviour RJ (2000) Candidatus *Nostocoida limicola*, a filamentous bacterium from activated sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 : 703-709.

Blackbeard JR, EKama GA (1988) A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa, *Water Pollut. Cont.*, 85: 90-100.

Boeije G, (1999) Chemical fate prediction for use in geo-referenced environmental exposure assessment , Thèse université de Gent .

Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) Live/dead BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *J. Microbiol. Methods.*, 37:77-86.

Brdjanovic D, Slamet A, Van Loosdrecht MCM, Hooijmans CM, Alaerts GJ, Heijnen JJ (1998) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater, *Water Res .*, 32: 200-208.

Brigmon RL, Bitton G, Zam SG, O'Brien B (1995) Development and application of monoclonal antibody against *Thiothrix spp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 :13-20.

Canler JP, Perret JM, Duchène P, Cotteux E (1999) Aide au diagnostic des stations d'épuration par observation microscopique des boues activées, Cemagref Editions, Paris.

Cardot C (1999), Les traitements de l'eau, Procédés physico-chimiques et biologiques, Ellipses Edition Marketing S.A.

Cecen F, Orak E (1996), Nitrification of fertilizer wastewaters in biofilm reactor, *J. Chemical Technology and Biotechnology.*, 65: 229-338.

Clark G (1981) Staining procedures , Fourth Edition, Williams and Wilkins Baltimore.

Cloete TE, Oosthuizen DJ, (2001) The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge, *Water Res.*, 35: 3595-3598.

Conseil Mondial de l'Eau, URL: www.worldwatercouncil.org

Contreras EM, Giannuzzi L, Zaritzky NE (2000) Growth kinetics of the filamentous microorganism *Sphaerotilus natans* in a model system of food industry wastewater, *Wat.res.*, 34: 4455-4463.

Corvini PFX, Gautier H, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P (2000) Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis, *Microbiology.*, 146:2671-2678.

Coster M, Chermant JL (1989) Précis d'analyse d'images, 2^e édition, CNRS Editions, Paris.

Davenport RJ, Curtis TP, Goodfellow M, Stainsby FM, Bingley M (2000) Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between Mycolic acid containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1158-1166.

Davey HM, Kell DB (1996) Flow cytometry and cell sorting heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses, *Microbiol. Rev.*, 60: 641-696.

Dawes EA, Senior PJ (1973) Energy reserve polymers in microorganisms, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 10 : 135-266.

Degrémont (1989) Mémento technique de l'eau, Lavoisier, Vol 1, Paris.

Dircks K, Henze M, Van Loosdrecht MCM, Mosbaek H, Aspegren H (2001) Storage and degradation of poly- β - hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions, *Water Res.*, 9: 2277-2285.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analyt. Chem.*, 28: 350-356.

- Duchene P, Cotteux E** (1998) La problématique des dysfonctionnements biologiques: bulking et moussage biologique en boue activées, *Tribune de l'eau*, 59: 59-66.
- Dumas D, Stolz JF, Viriot ML** (2001) Récents développements en microscopies de fluorescence appliquées à l'observation du vivant, *Récents Progrès du Génie des Procédés.*, Lavoisier, Paris., 78 :111-120.
- Durmaz B, Sanin FD** (2001) Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 44: 221-229.
- Drouin JF, Louvel L, Vanhoutte B, Vivier H, Pons MN, Germain P** (1997) Quantitative Characterization of cellular differentiation of *streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis, *Biotechnol.Tech.*, 11: 819-824.
- Drouin JF** (1996) Caractérisation de la différenciation cellulaire de streptomices ambofaciens En culture submergée. Etude des relations avec la production de spiramycine par analyse quantitative d'image, Thèse ENSAIA- INPL, Nancy.
- Edeline F** (1993) L'épuration biologique des eaux, Technique et documentation, Cebedoc Edition Lavoisier.
- Eikelboom DH** (1975) Filamentous organisms observed in activated sludge, *Water Res.*, 9: 365-388.
- Eikelboom DH** (2000) Process and control of activated sludge plants by microscopic investigation, English Edition Publishing by I.W.A .
- Erhart R, Bradford D, Seviour R, Amann R, Blackall LL** (1997) Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge, *system. Appl. Microbiol.*, 20:310-318.
- Eriksson L, Härdin A-M** (1984) Settling properties of activated sludge related to floc structure, *Water Sci. Technol.*, 16 (10/11): 56-68.
- Féray C** (1992) Nitrification en sédimentation douce : incidence des rejets de stations d'épuration sur la dynamique des communauté nitrifiantes, Thèse en Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon I.
- Frolünd BO, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH** (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water res.*,30:1749-1758.
- G.I.S Mousse** (1993) Guide de lutte contre les mousses biologiques stables dans les stations d'épuration à boues activées. Document technique FNDAE.
- Görner T, De Donato P, Ameil MH, Montarges-pelletier E, Lartiges BS** (2003) Activated sludge exopolymers: separation and identification using exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy, *Water Res.*, 37:2388-2393.
- Grijpspeerdt K, Verstraete W** (1997) Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge, *Water res.*, 31: 1126-1134.

- Higashiyama K, Fujikawa S, Park E.Y, Okabe M.** (1999) Image analysis of morphological change during arachidonic acid production by *Mortierella alpina*, *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 87 : 489-494.
- Higgins MJ, Novak JT** (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation, *J. Environ. Eng .*, 123: 479-485.
- Hoppert M** (2003) *Microscopic Techniques in Biotechnology*, WILEY-VCH, Weinheim.
- Hwang Y, Tanaka T** (1998) Control of *Microthrix parvicella* foaming in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 32: 1678-1686.
- Jenné R, Cenens C, Geeraerd AH, Van Impe JF** (2002) Towards on line quantification of flocs and filaments by image analysis, *Biotechnol. Lett.*, 24: 931-935.
- Jenkins D, Richard, MG, Daigger, GT** (1993) *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Lewis Publishers, 2nd Edition, Michigan.
- Jin B, Wilen BM, Lant P** (2003) A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge, *Chem. Eng. J.*, 95 :221-234.
- Jorand F, Zartarian F, Thomas F, Block JC, Bottero JY, Villemin G, Urbain V, Manem J** (1994) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Water Res.*, 29:1639-1647.
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommerening-Röser A, Koop HP, Wagner M** (1998) Combined molecular and contional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Appl. Environ .Microbiol.*, 64: 3042-3051.
- Kämpfer P** (1997) Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23:169-181.
- Kanagawa T, Kamagata Y, Aruga S, Kohno T, Horn M, Wagner M** (2000) Phylogenic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge, *Appl. Environ .Microbiol.*, 66: 5043-5052.
- Kanpur SN, Sahoo PK, Wong AKG** (1985) A new method for grey level picture thresholding using the entropy of the histogram, *comput. vis.Graphics image.*, proc. 29: 273-285.
- Karner M, Fuhrman J.A** (1997) Determination of active marine bacterioplankton: a comparaison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining, *Appl. Environ .Microbiol.*, 63: 1208-1213.
- Kao JP** (1994) Practical aspects of measuring calcium with fluorescent indicators, *Methods cell biol.*, 40: 155-181.

- Kawaharasaki M, Tanaka H, Kanagawa T, Nakamura K** (1999) In situ identification of polyphosphate accumulating bacteria in activated sludges dual staining with r-RNA targeted oligonucleotide probes (DAPI) at a polyphosphate probing concentration, *Water Res.*, 33: 257-265.
- Knoop S, Kunst S** (1998) Influence of temperature and sludge loading on activated sludge settling, especially on *Microthrix parvicella*, *Water Sci. Technol.*, 37: 27-35.
- Krishna C, Van Loosdrecht M C.M** (1999) Substrate flux into storage and growth in relation to activated sludge modeling, *Water Res.*, 33: 3149-3161.
- Laspidou CS, Rittmann BE** (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass, *Water Res.*, 36: 2711-2720.
- Lechevalier MP, Lechevalier HA** (1994) *Nocardia amarae* sp.nov., an actinomycete common in foaming activated sludge, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 24, 278-288.
- Lee N, Nielson PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Shleifer KH, Wagner M** (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography- a new tool for structure function analyses in microbial ecology, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1289-1297.
- Lee SY, Choi JI** (1999) Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment, *Waste Management* .,19: 133-139.
- Liu H, Fang HHP** (2002) Extraction of extracellular polyméric substances of sludges, *J. Biotech.*, 95: 249-256.
- Liu WT, Linning KD, Nakamura K, Mino T, Matsuo T, Forney LJ** (2000) Microbial community changes in biological phosphate removal systems on altering sludge phosphorus content, *Microbiology.*, 146: 1099-1107.
- Lopez C, Pons MN, Morgenroth E** (2005) Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge, *Water res.*, 39: 546-468.
- Lowry OH, Rosenberourgh NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Da Motta M, Pons MN, Roche N** (2001) Automated monitoring of activated sludge in pilot plant using image analysis, *Water Sci. Technol.*, 43:(7) 91-96.
- Da Motta M** (2001) Application de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées, Thèse INPL, Nancy.
- Madoni P, Davoli D, Gibin G** (2000) Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated sludge plants in Italy, *Water Res.*, 34: 1767-1772.

Martinez-Murcia AJ , Acinas SG, Rodriguez-Valera F (1995) Evaluation of procaryotic diversity by restrictase digestion of 16 rRNA directly amplified from hypersaline environments, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17: 247-256.

Matias VRF, Cammarota MC, Sant'Anna jr GL (2003) Extraction of activated sludge bacteria exopolymers by ultrasonication, *Biotechnol. Lett.*, 25:1351-1356

Mauss P, Drouin JF, Pons MN, Vivier H, Germain P, Louvel L, Vanhoutte B (1997) Location of respiration activity in filamentous bacteria by image analysis, *Biotechnol. Techniques.*, 11:813-817.

Maurer M, Gujer W, Hany R, Bachmann S (1997) Intracellular carbon flow in phosphorus accumulating organisms from activated sludge systems, *Water Res.*, 31: 907-917.

Meyer- Reil LA (1978) Autoradiography and epifluorescence microscopy combined for the determination of number and spectrum of actively metabolizing bacteria in natural waters, *Appl. Environ . Microbiol.*, 36: 506-512.

Mino T, Arum V, Tsuziki Y, Matsuo T (1987) Effect of phosphorus on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process, *In advances in water pollution control, Pergamon Press, Oxford.*, 27-38.

Molecular Probes Inc (2002) Handbook of fluorescent probes and reseach products,Eugene Oregon.

Moreda R (2004) communication personnelle, Educnet.

Mounter AH, Passos FM, Borges AC, Silva DO (2002) Detecting structural and functional differences in activated sludge bacterial communities originating from laboratory treatment of elementally and totally chlorine-free effluent, *Canadian journal of microbiology.*, 48: 245-255.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA., *Appl. Environ . Microbiol.*,59: 695-700.

Muyzer G, Ramsing N.B (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities, *Water Sci. Technol.*, 32: 1-9.

Neu TR, Kuhlicke U, Lawrence JR (2002) Assesment of fluorochromes for two-photon laser scanning microscopy of biofilms, *Appl. Environ . Microbiol.*, 68: 901-909.

Navarro E, Simonet P, Normand P, Bardin R (1992) Characterization of natural populations nitrobacter spp using PCR/RLFP analysis of the ribosomal intergenic spacer, *Arch. Microbiol.*, 157: 107-115.

Nielsen PH, Andreasen K, Lee N, Wagner M (1999) Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 39: 1-9.

- Novak G, Brown GD** (1990) Characteristics of *Nostocoida limicola* and activity in activated sludge suspension, *Res. J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, 62: 137-142.
- Novak L, Larrea L, Wanner J, Garcia-Heras JL** (1993) Non filamentous activated sludge bulking in laboratory scale system, *Water Res.*, 27: 1339-1346.
- Novak L, Larrea L, Wanner J, Garcia-Heras JL** (1994) Non filamentous bulking caused by zooglea, *Water Sci. Technol.*, 29:301-304.
- Oerther DB, Pernthaler J, Schramm A, Rudolf A, Raskin L** (2000) Monitoring precursor 16S rRNAs of *Acinetobacter* spp in activated sludge wastewater treatment systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2154-2165.
- Oerther DB, De Los Reyes FL, De Los Reyes MF, Rakin L** (2001) Quantifying filamentous microorganisms in activated sludge before during and after an incident of foaming by oligonucleotide probe hybridizations and antibody staining, *Water Res.*, 35: 3325-3336.
- Ostle AG, Holt JG** (1982) Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:238-241.
- Pavoni JL, Tenney MW, Echelberg WF.Jr** (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation, *J. Water Pollut. Cont. Fed.*, 44: 413-431.
- Parker HL , Keshawarz-Moore E, Lilly MD, Thomas CR** (1992) Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chysogenum* using image analysis, *Biotechnol.Bioeng.*, 39:384-391.
- Porter JP, Robinson J, Pickup RW, Edwards C** (1995)Recovery of bacterial sub-population from sewage using immunofluorescent flow cytometry and cell sorting, *FEMS Microbiol. Lett.*,133: 195-199.
- Prosser JI** (1989) Autotrophic nitrification in bacteria, *Adv.Microbiol.Physiol.*, 30: 125-181.
- Ramachander TVN, Rohini D, Belhekar A, Rawal SK** (2002) Synthesis of PHB by recombinat *E.coli* harboring an approximately 5 Kb genomic DNA fragment from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209, *Biological Macromolecules.*, 31:63-69.
- Ramirez GW, Alonso JL, Villanueva A, Guardino R, Basiero JA, Bernecer I, Morenilla JJ** (2000), *Water Res.*, 34 :3894-3898.
- Rejsek F** (2002) Analyse des eaux, aspects réglementaires et techniques, CRDP Aquitaine.
- De Los Reyes FL, Ritter W, Raskin L** (1997) Group specific small subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1107-1117.
- De Los Reyes MF, De Los Reyes FL, Hernandez M, Raskin L** (1998) Quantification of *Gordona amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2503- 2512.

Richard M (1989) The bench sheet monograph on activated sludge microbiology, The Water Pollution Control Federation, Virginia.

Saida H, Ytow N, Seki H (1998) Photometric application of Gram stain method to characterize natural bacterial populations in aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 742-747.

Saida H, Maeekawa T, Satake T, Higashi Y, Seki H (2000) Gram stain index of natural bacteria community at a nutrient gradient in freshwater environment, *Environmental Pollution*, 109: 293-301.

Salton MRJ (1964) *The bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.

Schmid M, Thill A, Purkhold U, Walcher M, Bottero JY, Ginestet P, Nielsen PH, Wuertz S, Wagner M (2003) Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis, *water Res.*, 37: 2043-2052.

Schuppler M, Wagner M, Schön G, Göbel UB (1998) In situ identification of nocardiaform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA targeted oligonucleotide probes, *Microbiology.*, 144: 249-259.

Scuggs CE, Randall CW (1998) Evaluation of filamentous microorganism growth factors in an industrial waste water activated sludge system, *Water Sci. Technol.*, 37: 263-270.

Serafim LS, Lemos PC, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MAM (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphates accumulating microorganisms, *J. Microbiol.Methods.*, 51: 1-18.

Seviour JR , Mino T, Onuki M (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems, *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 99-127.

Sizemore R, Caldwell J, Kendrick A (1990) Alginate Gram staining technique using a fluorescent lectin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2245-2247.

Slijkhuis H (1983) *Microthrix parvicella* , a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 832-839.

Soddell J, Seviour R (1996) Growth of an activated sludge foam-forming bacterium, *Nocardia Pinensis*, on hydrophobic substrates, *Water Sci. Technol.*, 34:113-118.

Sponza DT (2002) Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady-and unsteady-state activated sludge systems, *Process Biochem.*, 37 : 983-998.

Sponza DT (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs steady-state conditions, *Enzyme Microb Technol .*, 32: 375-385.

Smith JJ, McFeters GA (1997) Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-36(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12, *J. Microbiol. Methods.*, 29:161-175.

- Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH** (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2884-2896.
- Statton H** (1998) The role of bacterial cell surface hydrophobicity in biological foams , The activated sludge pages., 1: 7.
- Steinbüchel A, Valentin HE** (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol.*, 128:219-228.
- Streichan M, Golecki JR, Schön G** (1990) Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal, *FEMS Microbiol.Ecol.*, 73:113-124.
- Suntherland IW**(1972) Bacterial exopolysaccharides, *Adv. Micobiol. Physiology.*, 143-214.
- Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, Tashiro T, Urushigawa Y** (1994) Ammania-oxidizing bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludge, *Water Res.*, 28: 1523-1532.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B** (1999) Measurement of intracellular calcium, *Physiol rev.*, 79: 1089-1125.
- Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann E, Stahl DA** (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, *J. Bacteriol.*, 176: 6623-6630.
- Vanhoutte B, Pons MN, Thomas CR, Louvel L, Vivier H** (1995) Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis, *Biotechnol.Bioeng.*, 48: 1-11.
- Vishniac W, Santer M** (1957) The Thiobacilli, *Bacteriol.Rev.* 21: 195-213.
- Wilén BM, Jin B, Lant P** (2003) The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties, *Water Res.*, 37: 2127-2139.
- Wilkinson MHF, Schut F** (1998) Digital Image analysis microbes, John Wiley and Sons edition.
- Williams T.M, Unz R.F** (1985) Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 22:391-400.
- Urbain V, Block JC, Manem J** (1993) Biofloculation in activated sludge an analytic approach, *Water Res.*, 27: 829-838.
- Virgolet F** (1994) Réflexions pratiques sur l'influence des produits tensio-actifs sur le moussage observé sur les réacteurs biologiques, Colloque Lyon Pollutec.
- Vishniac W, Santer M** (1957) The Thiobacilli , *Bacteriol. Rev.*, 21:195-213.

Wagner M, Amann R, Kämpfer P, Assmus B, Hartmann A, Hutzler P, Springer N, Schleifer KH (1994) Identification and in situ detection of Gram negative filamentous bacteria in activated sludge, *System.Appl.Microbiol.*, 17: 405-417.

Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H (2002); Microbial community composition and function in wastewater treatment plants, *Antonie van Leeuwenhoek.*, 81: 665-680.

Wanner J, Grau P (1989) Identification of filamentous microorganisms from activated sludge: a compromise between wishes, needs and possibilities, *Water Res.*, 23: 883-891.

Watanabe K, Baker P (2000) Environmentally relevant microorganisms, *J.Bioscience Bioengineering.*, 89: 1-11.

Westlund AD, Hagland E, Rothman M (1996) Bulking and foaming caused by *Microthrix parvicella* at three large sewage treatment plants in the Greater Stockholm area, *Water Sci. Technol.* , 34: 281-287.

Wilén BM, Jin B, Lant P (2003) The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties, *Water Res.* , 37: 2127-2139.

Yi-Chen T, Chi-Mei L (1998) Substrate utilization characteristics of the predominant filamentous and floc-forming bacteria isolated from a chemical fiber factory wastewater treatment plant, *Water Sci. Technol.* , 37: 291-295.

Ziglio G, Andreottola G, Faladori P, Barbesti S, Bruni L, Ferrai M, Villa R (2001) Viability and size of bacteria present in activated sludge determined with fluorochromes staining and flow cytometry, Proceedings of the 3rd I.W.A International specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes., Rome, Italy.

Zimmermann R, Iturriaga R, Becker-Birck J (1978) Simultaneous determination of total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:926-935.

Zita A, Hermansson M (1994) Effect of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in wastewater activated sludge system, *Appl. Environ. Microbiol.* , 60:3041-3048.

ANNEXE A

Programmes

(ANNEXE CONFIDENTIELLE)

ANNEXE B

COMMUNICATION

 *Biotechnology Letters* 26: 1841–1846, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

1841

Gram-staining characterisation of activated sludge filamentous bacteria by automated colour analysis

Denis Pandolfi & Marie-Noëlle Pons*

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS-ENSIC-INPL 1, rue Grandville, BP 451, F-54001 Nancy cedex, France

*Author for correspondence (Fax: +33-3-83-175326; E-mail: Marie-Noelle.Pons@ensic.inpl-nancy.fr)

Received 25 August 2004; Revisions requested 22 September 2004; Revisions received 11 October 2004; Accepted 12 October 2004

Key words: activated sludge, colour image analysis, Gram staining, population shift

Abstract

An automated image analysis method has been developed for the monitoring of the Gram-staining characteristics of filamentous bacteria in activated sludge. The binary method of pixel classification agreed with manual estimation (level of correlation of 0.9 for Gram-positive bacteria). Its robustness has been assessed by repeatability tests. Population shifts in terms of Gram-staining characteristics have been monitored in laboratory-scale experiments with two feeding schedules using this technique.

Introduction

The biological reactor of a waste-water treatment plant using activated sludge contains a complex ecosystem, composed of different types of bacteria (filamentous, non filamentous), protozoa and metazoa. An adequate balance between the different types of bacteria is essential to ensure good settleability properties of the sludge in the clarifier.

Classical stains such as the Gram stain are fundamental techniques in the examination of activated sludge (Jenkins *et al.* 1993). Gram differentiation depends on the existence of a permeability barrier in bacteria after treatment by ethanol at high concentrations (Salton 1964). After staining by Crystal Violet and iodine, a sample is fixed on a glass slide, the smear is washed with ethanol and counterstained with safranin (Clark 1981). Gram-positive bacteria appear blue and Gram-negative ones red. The main difference between these groups is the structure and chemical composition of their cells walls.

More recently 16S rRNA and 23S rRNA targeted nucleotide probes have been proposed to monitor Gram-negative and -positive bacteria (Manz *et al.* 1992, Roller *et al.* 1994, Wagner *et al.*

1994, Pernelle *et al.* 1998). FISH techniques are certainly of great help to characterize the overdevelopment of the main filamentous bacterial species over time. However, they require a large amount of work, great care and specific equipment. Their routine use in wastewater plants on-site labs is still questionable (Pernelle *et al.* 2001).

Generally, the amount of Gram-positive or Gram-negative bacteria, as stained by the classical technique, is estimated by visual inspection and manual counting under a simple optical microscope. This is a tedious procedure that can be facilitated by automated image analysis. Automated image analysis of activated sludge have been proposed previously for filamentous bacteria abundance on monochrome images (da Motta *et al.* 2001). For Gram colour images Saida *et al.* (1998) have proposed a photometric characterisation (by Gram stain index) for bacterial population in various aquatic environments (Saida *et al.* 2000) where the bacteria were deposited on a membrane.

In this study, using the classical Gram-staining technique, a new automated colour image analysis for Gram characterization of filamentous bacteria was developed for activated sludge smears directly

deposited on glass slides. As an illustration the procedure has been applied to a pilot plant fed with synthetic substrate according to two feeding schedules in order to monitor possible shifts in the filamentous bacteria population under stress.

Material and methods

The bioreactor

The aeration and mixing of the activated sludge bioreactor (working volume of 35 l) was provided by five, fine bubble diffusers located on the floor of the tank. The clarifier, which separates the biomass from the treated effluent, had a volume of 9 l. Feeding and sludge recycle were achieved by peristaltic pumps at 15 l h⁻¹. The system was inoculated with activated sludge from a urban wastewater plant (Nancy-Maxéville, France).

The concentrated substrate contained meat extract (628 g l⁻¹) (Viadox, Amora, Dijon, France), sucrose (34 g l⁻¹), NH₄Cl (27 g l⁻¹) and H₃PO₄ 85% (3.7 g l⁻¹) corresponding to a COD of 210 O₂ l⁻¹. The dilution factor is such that the feed has a COD of 200 mg O₂ l⁻¹. Two experiments were run: Run 1 with a constant feeding and Run 2 where the biosystem was fed one day out of two.

Gram-staining protocol

The Gram Hucker staining protocol (RAL, Martillac, France) was used. A smear of bacteria (100 µl) was deposited on a glass slide and thoroughly air dried. It was stained for 1 min in Crystal Violet solution, 1 min in iodine solution, washed for 10 s in ethanol and, finally, counter-stained with safranin for 1 min.

The glass slide was examined under oil immersion at 250× magnification with direct illumination with a Dialux 20 (Leitz, Solms, Germany) microscope equipped with a 3CCD colour camera Sony 3CCD EXWAVE HAD (Aries, Châtillon, France) and connected to a PC via a Meteor (Matrox, Dorval, Quebec, Canada) grabbing board. For each sample, 50 colour images (768 × 576 pixels on 8 bits) were grabbed by a systematic examination of the slide (grabbing time = 15 min). The images were analysed using procedures embedded within Visilog 5 program (Noesis, Les Ulis, France). Statistical tests were

done using the toolbox Statlab (Addinsoft, Paris, France) for Microsoft Excel.

Image analysis

The purpose of the treatment of the Gram images is to detect filamentous bacteria outside the flocs and to quantify the amount of blue and red pixels on the filament silhouette.

In the first part the colour system of the Gram image (image A_{RGB}) (Figure 1) is changed from RGB (Red – Green – Blue) to HIS (Hue – Intensity – Saturation) (→ image A_{HIS}). The saturation primitive is enhanced by histogram equalization, in order to increase the image contrast (→ image C). Automated thresholding based on histogram entropy (Russ 1995) is applied on the image C and the result was a binary image with two grey levels: 0 for the background and 1 for the objects (filaments, flocs and debris) (→ image D) (Figure 2a). Image F is obtained by eliminating small debris and flocs with the following sequence of operations: linear erosion, reconstruction, dilation and logical subtraction from image D (Figure 2b). The discrimination between flocs, small debris and filaments is based on their size and gyration diameter (da Motta *et al.* 2001).

Each filament of interest in image F is firstly skeletonized (→ image G), i.e. its thickness is reduced to 1 pixel. The branching points and branch extremities, as well as intersections between two hyphae are detected, dilated and removed from the skeleton (→ image I). All the skeleton fragments shorter than 5 pixels and containing a branch end are eliminated from image I. The Gram characteristics of each of the remaining fragments are finally evaluated. A pixel is considered to be blue when its level (B) on the blue primitive of image A_{RGB} is higher than its level on the red primitive (R). Inversely a pixel is considered to be red when R > B. The treatment of 50 colour images takes 1 h on a Pentium 3800 MHz.

Two ways of analysing the results from the image analysis procedure were tested:

- a binary method: a fragment is considered to be Gram-positive (respectively Gram-negative) if more than 50% of its pixels are blue (respectively red).
- a fuzzy method, with which it is recognized that the decision between blue and red might

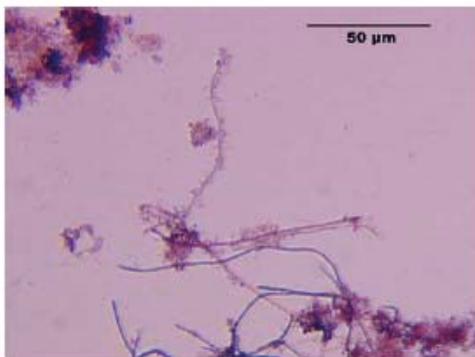


Fig. 1. Colour image of activated sludge after Gram staining (image ARGB).

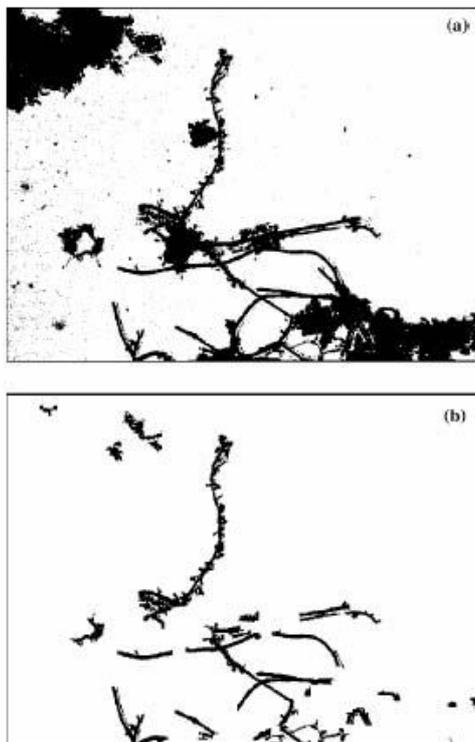


Fig. 2. Binary images (a) of filaments, flocs and debris (image D) and (b) of filaments only (image F).

be difficult to take when, in a fragment, the numbers of blue and red pixels are close: a fragment is considered to be Gram-positive

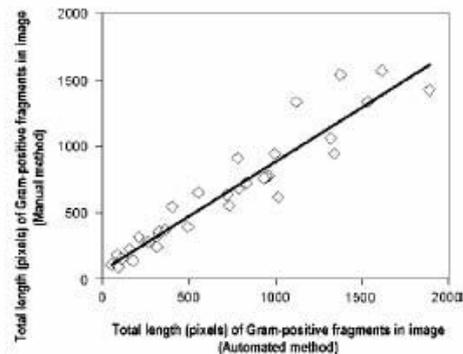


Fig. 3. Comparison between the manual and the automated quantification of Gram-positive bacteria.

(respectively Gram-negative) if more than 66% of its pixels are blue (respectively red). When the percentage of blue pixels is in the range 33–66%, the fragment is said to be Gram-undetermined.

Results

Validation

In order to validate the method the results of the automated Gram analysis were compared with those obtained by manual assessment on a set of 34 images representing a large set of Gram characteristics. The manual assessment was performed by drawing with the mouse the skeleton of filaments and assessing visually whether they were Gram-positive or Gram-negative. There is a good correlation between the visual estimation and the binary quantification method as the coefficient of correlation between the length of Gram-positive bacterial fragments measured manually and automatically is equal to 0.9 (Figure 3). A second test was performed to compare the results of the automated binary quantification method and of the manual results obtained by two separate operators. Based on the Kruskal–Wallis' non-parametric test, there was no difference between the three sets of results in terms of length of Gram-positive bacteria at a significance level of 5%. On this set of images the percentage of Gram-positive bacteria given by the automated method was 86%, which is fully in agreement with the values obtained by both operators (84% and 85%).

Table 1. Effect of the number of analysed images on the accuracy of the classification methods.

	Binary method		Fuzzy method	
	% Gram-positive	% Gram-positive	% Gram-undetermined	% Gram-negative
Full set (100 images)	93	77	19	3
Subset 1 (50 images)	94	49	30	20
Subset 2 (50 images)	91	71	24	5
Subset 3 (50 images)	95	70	25	13
Subset 4 (50 images)	93	82	14	15
Subset average	93	70	22	11
Subset standard deviation	2	13	6	7

Comparison between the results obtained on a set of 100 images and on four subsets of 50 images, selected randomly out of the 100 images. In the binary method, for a fragment to be Gram-positive, more than 50% of its pixels should be blue. In the fuzzy method, for a fragment to be Gram-positive, more than 66% of its pixels should be blue; for a fragment to be Gram-negative, less than 33% of its pixels should be blue.

Table 2. Repeatability test.

Slide	Binary method		Fuzzy method	
	% Gram-positive	% Gram-positive	% Gram-undetermined	% Gram-negative
1	30	19	31	50
2	22	10	24	66
3	30	13	42	45

One operator prepared three slides with one sample and examined each slide.

Table 3. Repeatability test.

Slide	Operator	Binary method		Fuzzy method	
		% Gram-positive	% Gram-positive	% Gram-undetermined	% Gram-negative
1	1	81	55	36	9
	2	83	71	20	9
2	3	86	81	13	6
	4	77	53	37	10

Each slide was prepared by one operator and analysed by him/herself and a second operator.

In order to optimise the number of images to be grabbed a set of 100 images was collected. Table 1 compares the results obtained on the full set and on four subsets of 50 images selected at random in the initial set. For the binary method 50 images are considered to be sufficient. The results obtained for the fuzzy method show a higher standard deviation between the four subsets, indicating that 50 images might not be sufficient. Subsequently it was nevertheless decided to grab 50 images for each sample.

A first repeatability test was run with a single operator. It includes the preparation of the three slides (Table 2). The standard deviation for the

binary method is less than 5%. It is higher for the three classes of the fuzzy method. In the second repeatability test (Table 3) each slide was examined by two operators. For the two slides tested, the agreement between operators was better for the binary method than for the fuzzy method. In all cases the fuzzy method applied to 50 images is less robust than the binary method.

Monitoring

The response of activated sludge to stress conditions related to the composition or load of

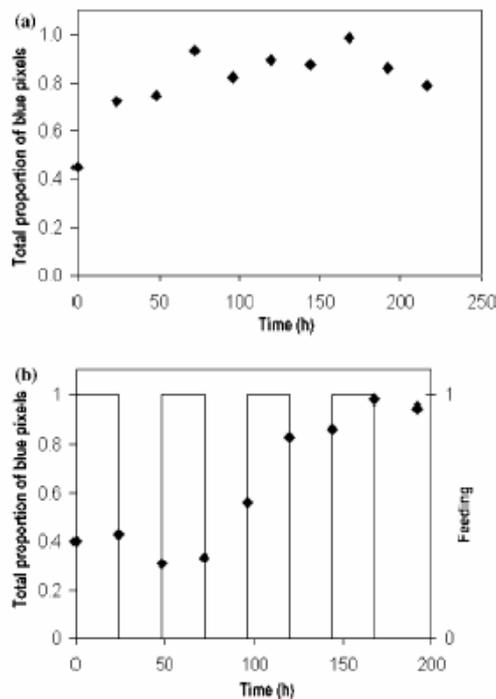


Fig. 4. Variations with respect to time of the proportion of blue pixels in filaments in Run 1 (a) and Run 2 (b).

waste-water is one of the causes reported for filamentous proliferation (Pernelle *et al.* 1998). Figure 4 presents the variations of the total number of blue pixels belonging to filamentous fragments for the run with constant feeding and the run with irregular feeding. For both experiments the inoculum contains Gram-positive and Gram-negative bacteria. Under the applied culture conditions there is an increase of the number of blue pixels. The increase was slower in Run 2, where the bacteria were fed one day out of two. The general increase of the proportion of blue pixels reflects an increase of the abundance of Gram-positive bacteria, as shown by the increase in the proportion of Gram-positive fragments (Figure 5) with respect to the total length of filaments detected in the sample.

When the fuzzy classification is applied, it appears that there is high degree of reliability in the classification in Run 1. In Run 2, the proportion of Gram-undetermined bacteria is higher in the first part of the experiment. However, the visual inspection gives the impression of a large abundance of Gram-positive filaments during this

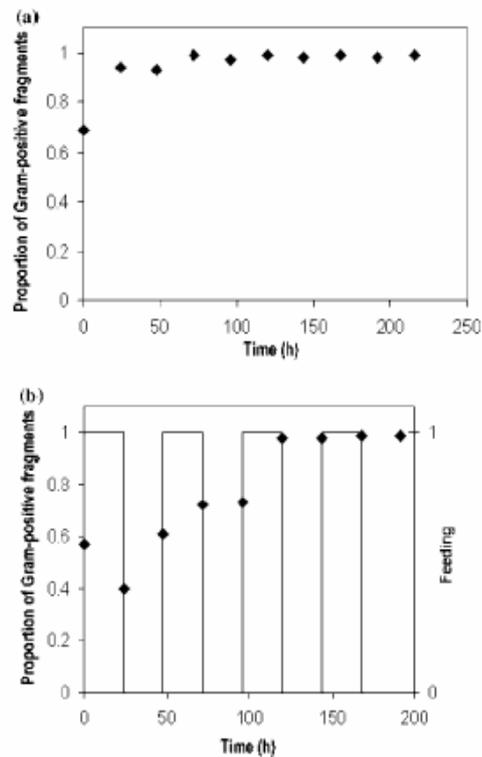


Fig. 5. Variations with respect to time of the proportion of Gram-positive fragments in Run 1 (a) and Run 2 (b) (binary method).

phase. In both runs it was possible to monitor automatically the shift in the bacterial population between a mixture of Gram-positive and Gram-negative bacteria to a pollution which contains exclusively Gram-positive bacteria. Due to the feed limitation in Run 2, the population shift was slower.

Conclusion

An automated image analysis procedure has been developed to assess the Gram characteristics of filamentous bacteria growing out of the flocs in an activated sludge ecosystem. The staining procedure needs to be well standardized. A binary method and a fuzzy method were tested to analyse the data provided by the image analysis procedure. The binary method, which give the percentage of Gram-positive filamentous bacteria in a sample based on the examination of

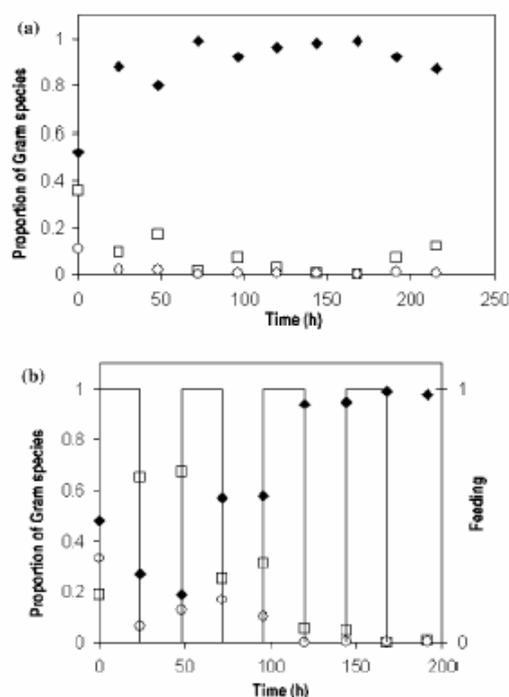


Fig. 6. Variations with respect to time of the proportion of Gram-positive (◆), Gram-negative (○) and Gram-undetermined (□) in Run 1 (a) and Run 2 (b).

50 images, is more reliable. There is a satisfactory agreement between the results produced by the automated method and the visual inspection by an operator. The procedure can be used to monitor easily population shifts regarding Gram characteristics. Combined with an automated assessment of filamentous bacteria abundance, it can be used to alert plant staff on forthcoming

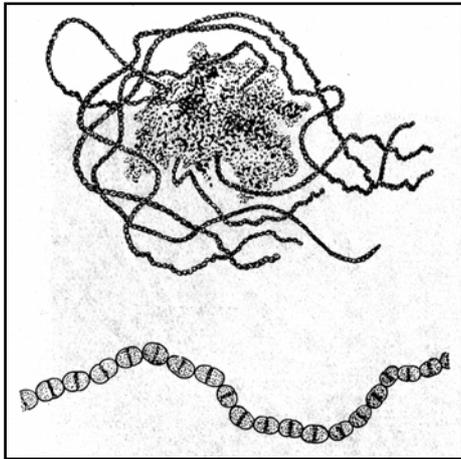
problems such as filamentous bulking or foaming.

References

- Clark G (1981) *Staining Procedures*, 4th edn. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- da Motta M, Pons MN, Roche N (2001) Automated monitoring of activated sludge in pilot plant using image analysis. *Water Sci. Technol.* **43**: 91–96.
- Jenkins D, Richard MG, Daigger GT (1993) *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**: 593–600.
- Pernelle JJ, Cotteux E, Duchêne P (1998) Effectiveness of oligonucleotide probes targeted against *Thiothrix nivea* and type 021N 16S RNA for *in situ* identification and population monitoring in activated sludges. *Water Sci. Technol.* **37**: 431–440.
- Pernelle JJ, Gaval G, Cotteux E, Duchêne P (2001) Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Res.* **35**: 129–134.
- Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH (1994) *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**: 2849–2858.
- Russ JC (1995) *The Image Processing Handbook*, 2nd edn., Boca Raton, FL: CRC Press.
- Saida H, Maeckawa T, Satake T, Higashi Y, Seki H (2000) Gram stain index of natural bacteria community at a nutrient gradient in freshwater environment. *Environ. Pollut.* **109**: 293–301.
- Saida H, Ytow N, Seki H (1998) Photometric application of Gram stain method to characterize natural bacterial populations in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 742–747.
- Salton MRJ (1964) *The Bacterial Cell Wall*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Wagner M, Ammann R, Kämpfer P, Assmus B, Hartmann A, Hutzler P, Springer N, Schleifer KH (1994) Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 405–417.

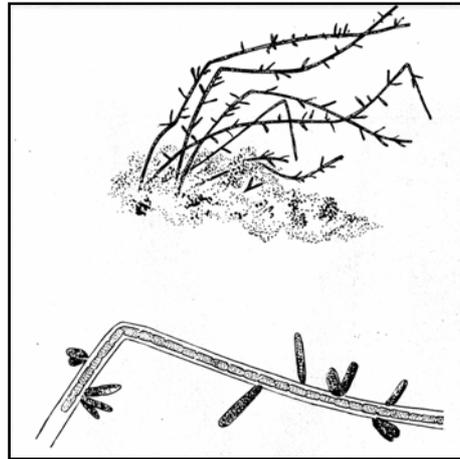
ANNEXE C

I Guide d'identification des bactéries filamenteuses des boues activées (d'après Eikeilboom, 1975)



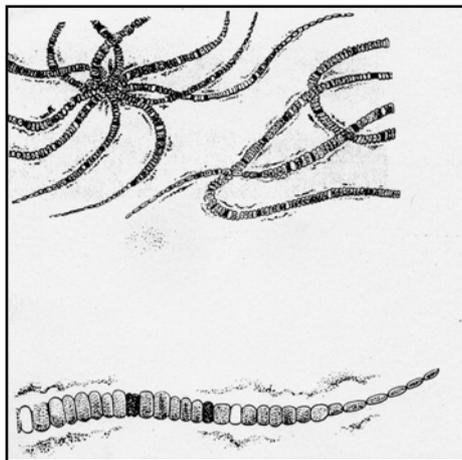
Nostocoida limicola :

Filaments non ramifiés, souples et non cloisonnés. Cellules irrégulières et longueur des filaments supérieure à 200 μm . Ils sont généralement localisés dans les floccs et contiennent des granules de PHB.



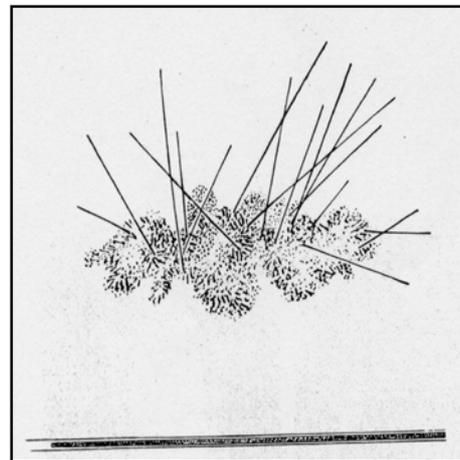
Type 1851 :

Adhérences perpendiculaires à l'axe. Les cellules sont cloisonnées et gainées, Gram positif et Neisser négatif. Les filaments ne contiennent pas de granules de sulfures.



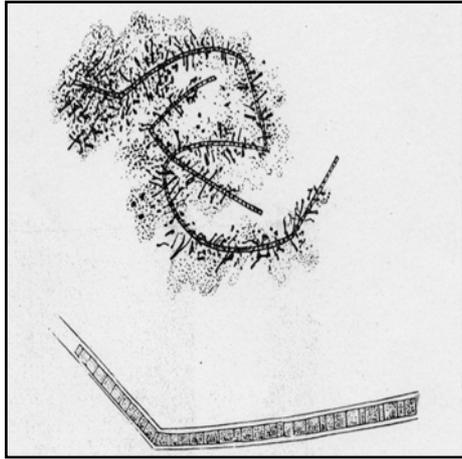
Type 021N

Ramifications absentes, cellules rigides et cloisonnées. Taille des filaments supérieure à 200 μm .



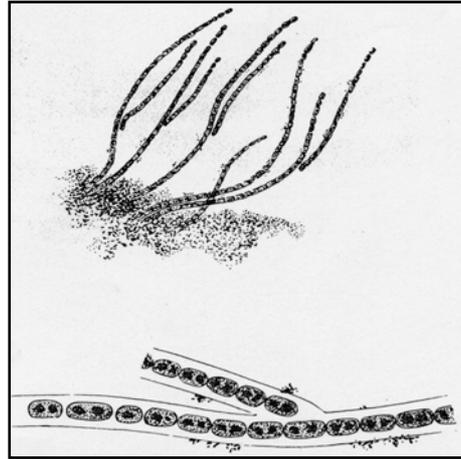
Haliscomenobacter hydrossis :

Ramifications absentes, cellules non cloisonnées mais gainées. Filaments très fin partant du flocc.



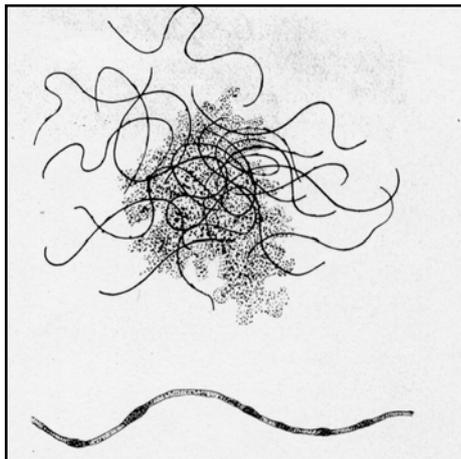
Type 0041 :

Cellules non ramifiées, rigides avec beaucoup d'adhérences au niveau des gaines. La longueur des filaments supérieure à 200 μm .



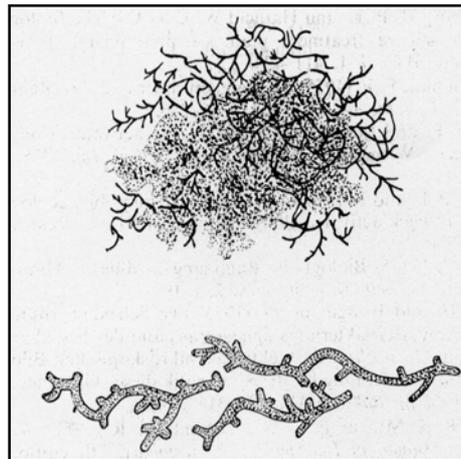
Sphaerotilus natans :

Aspect épais adhérent plus ou moins aux floes. Cellules ovoïdes nettes avec présence de PHB et de fausses ramifications, longueur des filaments supérieure à 200 μm .



Microthrix parvicella :

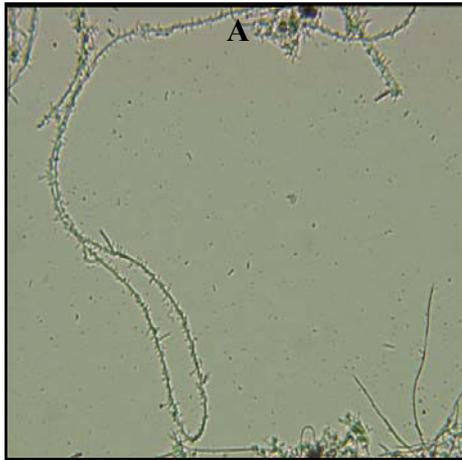
Forme souple, sans adhérences le plus souvent. Longueur des filaments supérieure à 200 μm , pas de ramification.



Nocardia sp :

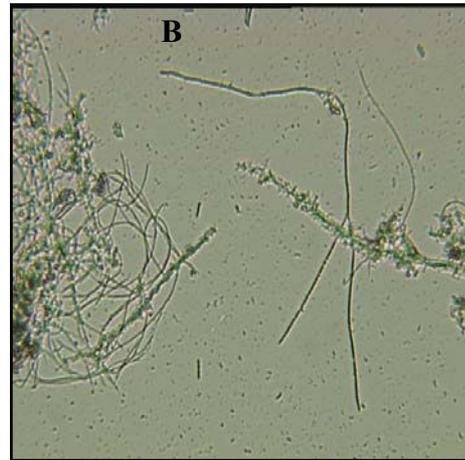
Forme rigide, ramifications vraies et courtes.

II Image de bactéries filamenteuses des boues activées
(Microscope optique grossissement γ 400X)



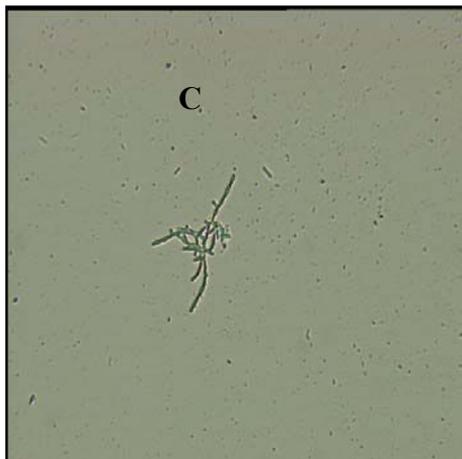
A : Type 1851

**Bactérie Gram (+) ; Neisser (-),
PHB (-), Sulfure (-).**



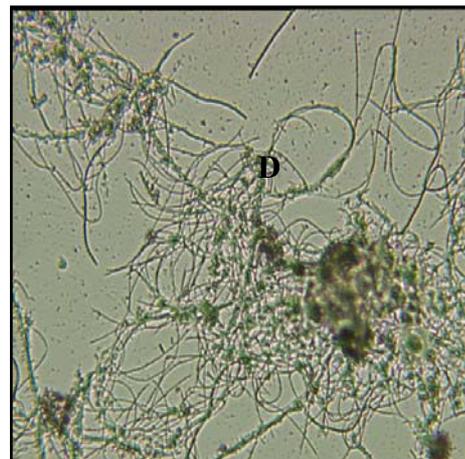
B : Spaerotilus natans

**Bactérie Gram (-), Neisser (-),
PHB (+), Sulfure (-).**



C : Nocardia sp

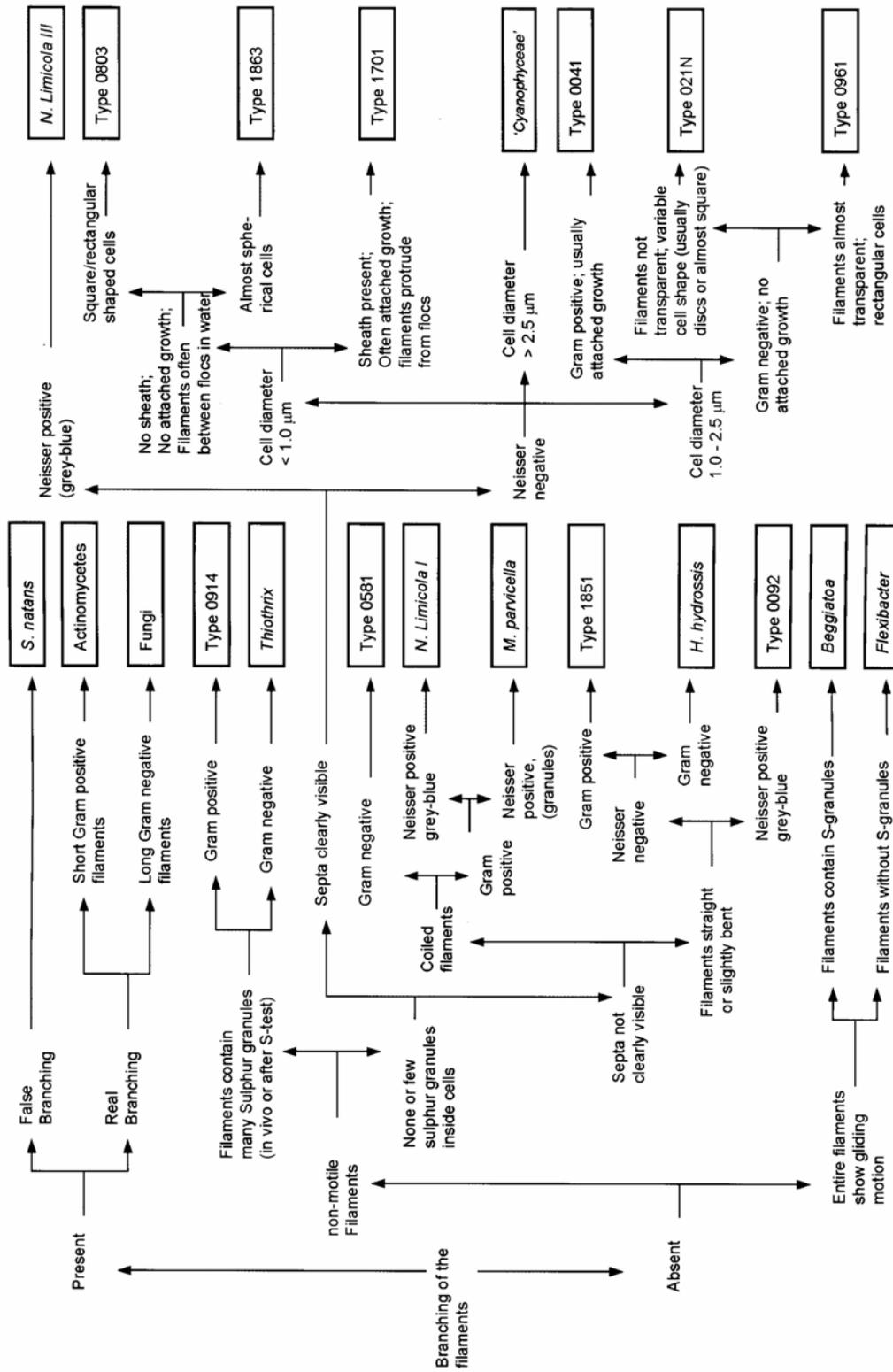
**Bactérie Gram (+), Neisser (+),
PHB (+), Sulfure (-).**



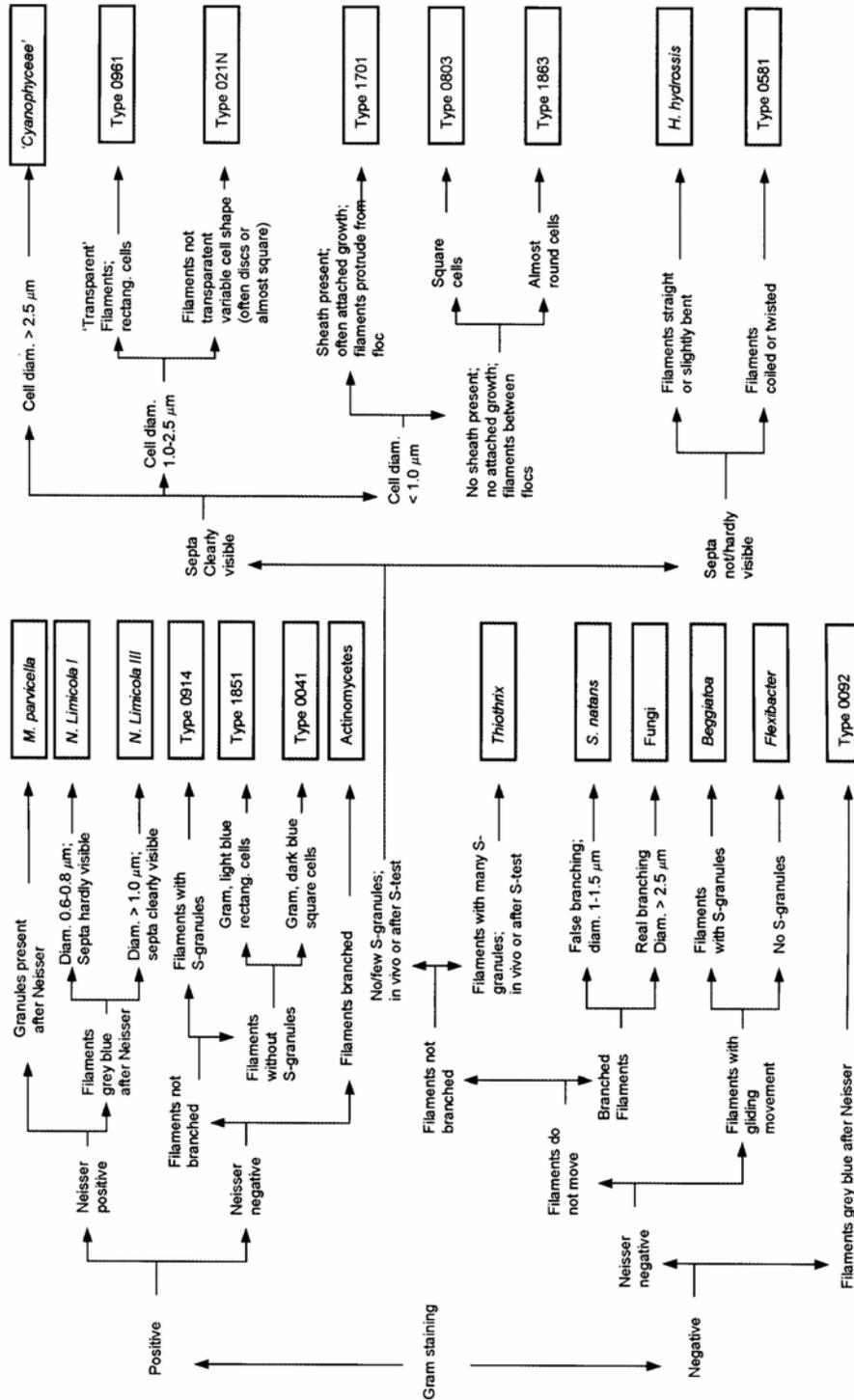
D : Microthrix parvicella

**Bactérie Gram (+), Neisser (+),
PHB (+), Sulfure (-).**

III Bactéries filamenteuses : démarche d'identification (a) d'après Jenkins et al, 1993



Les bactéries filamenteuses : démarche d'identification (b), d'après Jenkins et al, 1993



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Nicolas ROCHE, Professeur, Université d'Aix-Marseille, Aix-en-Provence

Monsieur Hervé VIVIER, Professeur, Université Jean Monnet, Saint Etienne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur PANDOLFI Denis

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Caractérisation morphologique et physiologique de la biomasse des boues activées par
analyse d'images"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des procédés et des produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 19 décembre 2005

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX