

N° Ref :.....



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

Les bactéries filamenteuses de la boue activée : origine et identification

Présenté par :

- KHALOUCHE Aida
- SIFOUR Amira

Devant le jury composé de :

BOUCHEKRIT Moufida
HADEF Sawsen
HARRIECHE Ouahiba

MCB (C.U.M)
MAA (C.U.M)
MAA (C.U.M)

Président
Examineur
Promoteur

Année Universitaire : 2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّا أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة: الآية 32

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ



Remerciement

Nous remercions tout

D'abord ALLAH le tout puissant de nos avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous nous exprimons nos plus vifs remerciements au

***M^{me} Harrieche Ouahiba**, Maître Assistante A, que sa Profonde gratitude pour avoir orienté, dirigé ce travail et également pour tous ses conseils dans l'élaboration et la Conception de ce mémoire.*

Nous remercions également :

***M^{me} BOUCHEKRIT Moufida**, Maître de conférences B, pour L'honneur qu'il nous a fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.*


***M^{lle} HADEF Sawsen**, Maître Assistante A, pour avoir accepté D'examiner ce travail.*

Un grand merci à tous Enseignants du département de biologie.

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos familles et nos amies

Pour leurs encouragements et leur compréhension

Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près où De loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvant ainsi l'expression De nos profondes grâces et respects.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts

À ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents, leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie.

*À ma trésors ma très chère mère «**Akila**» qui sacrifier leur vie et m'a poussée a lavant pour réaliser mes rêves.*

*À la source du savoir de mon père «**Ammar**», qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices.*

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le Soutient permanent venu de vous.

*À la source du bonheur de mon frère «**Nouar** » et de ma sœur «**Souad**» qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de Courage et de générosité.*

*À mes chers petits neveux et nièces **Loudjine, Zineb, Maram, Hitem, Akram.***

À ma chère et adorable camarade Ayda et sa famille.

*Et à tous mes amis ainsi que mes proches **Nihal, Djihane, Widad, Chaima.***

Amira

Dédicace

*En premier lieu, je remercie ALLAH, le tout puissant de m'avoir
donné le courage, la volonté et la santé pour terminer ce
modeste travail*

Je dédie ce travail

A Mes chers parents

*Ma mère « AKILA », qui a œuvré pour ma réussite, de par
son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses
précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence
dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il,
l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père « RABEH », qui peut être fier et trouver ici le
résultat de longues années de sacrifices et de privations pour
m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que
ce travail porte son fruit, Merci pour les valeurs nobles,
l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A Mes sœurs « Hanen, Fatiha, Zina, Nassima, Fahima,
Halima, Chaïma » pour ces encouragements et ses prières
pour moi tout le long de mes années d'étude. Et toute ma
famille qui m'a toujours encouragé au cours de la réalisation
de ce mémoire.*

A Mes amis « Mon binôme AMIRA, IMEN ».

Merci pour tous ces agréables moments passés ensemble.

*A Tous ceux et celles que j'ai rencontré et qui m'ont aidé
durant 5 ans des études universitaires.*

Aïda

Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à l'étude des bactéries filamenteuses, en particulier dans les boues activées, concernant leurs origines et leurs identifications. Selon notre recherche, il s'avère que : les bactéries filamenteuses sont à l'origine de la plupart des dysfonctionnements d'ordre biologique des stations d'épuration à boues activées malgré leurs avantages. Il existe une grande variété de bactéries filamenteuses, les plus abondantes sont les *actinomycètes* tels que *Microthrix parvicella* et *Sphartilus. natans*. Ces bactéries sont des micro- organismes très ubiquitaires dans différentes niches tels que le sol, l'air, l'eau douce et marines. Il existe des méthodes d'identification classiques. Mais, face aux difficultés et aux erreurs pouvant être induites par la méthode d'identification classique, les chercheurs ont développé des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire, qui est l'ARNr 16S comme une cible afin de caractériser au mieux la complexité de la communauté bactérienne filamenteuse.

Mots clés : bactéries filamenteuses, boues activées, origine, identification, biologie moléculaire.

Summary:

In our work, we have been interested in the study of filamentous bacteria, especially in activated sludge, regarding their origins and identifications. According to our research, it turns out that: filamentous bacteria are at the origin of most of the biological malfunctions of activated sludge treatment plants despite their advantages. There is a wide variety of filamentous bacteria, the most abundant are *actinomycetes* such as *Microthrix parvicella* and *Sphartilus natans*. These bacteria are very ubiquitous microorganisms in different niches such as soil, air, freshwater and marine. There are classic methods of identification. But, faced with the difficulties and errors that can be induced by the classical identification method, the researchers have developed identification methods based on molecular biology, which is the 16S rRNA as a target in order to best characterize the complexity of the filamentous bacterial community.

Keywords: filamentous bacteria, activated sludge, origin, identification, molecular biology.

ملخص:

في عملنا، كنا مهتمين بدراسة البكتيريا الخيطية، وخاصة في الحمأة المنشطة، فيما يتعلق بأصولها وتحديد هويتها. وفقا لبحثنا، اتضح أن: البكتيريا الخيطية هي في أصل معظم المشكلات البيولوجية لمصانع معالجة الحمأة المنشطة على الرغم من مزاياها. هناك مجموعة واسعة من البكتيريا الخيطية، والأكثر وفرة هي *actinomycetes* مثل *Microthrix parvicella* و *Sphartilus natans*. هذه البكتيريا هي كائنات دقيقة تتواجد في أماكن مختلفة مثل التربة والهواء والمياه العذبة والبحرية. هناك طرق كلاسيكية لتحديد الهوية. ولكن، في مواجهة الصعوبات والأخطاء التي يمكن أن تسببها طريقة تحديد الهوية الكلاسيكية، طور الباحثون أساليب تحديد الهوية على أساس البيولوجيا الجزيئية، وتم اختيار rRNA 16S كهدف من أجل تحديد أفضل نظرا للتعقيدات المتواجدة في المجتمع البكتيري الخيطي .

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الخيطية، الحمأة المنشطة، المنشأ، تحديد الهوية، البيولوجيا الجزيئية.

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
1	Populations des boues activées	4
2	Classification I des bactéries filamenteuses	11
3	Classification II des bactéries filamenteuses	12
4	Les herbicides produits par les Streptomyces	30
5	Habitats de certains actinomycètes	35
6	Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol	36
7	Résultat de l'examen macroscopique d'une culture de Nocardia	41
8	Programme PCR utilisé pour l'amplification de fragments d'ADN.	56
9	Amorces de PCR utilisées pour bactéries filamenteuses	56
10	Sondes oligonucléotidiques pour les bactéries filamenteuses	59

Listes des Figures

Figure N°	Titre	Page
1	Forme de filament bouclé	8
2	Forme de filament droit	8
3	Forme de filament spiralé	8
4	Forme des cellules	9
5	Forme de ramification	10
6	<i>Actinomycetes</i>	14
7	<i>H. hydrossiss</i>	14
8	<i>M. parvicella</i>	15
9	<i>Nocardia spp</i>	16
10	<i>S. natans</i>	17
11	<i>Thiothrix</i>	17
12	<i>N .limicola</i>	18
13	<i>Streptococcus</i>	19
14	<i>Filament type 0041</i>	19
15	<i>Filament type 0092</i>	20
16	<i>Filament type 021 N</i>	21
17	<i>Filament type 0581</i>	21
18	<i>Filament type 0961</i>	22
19	<i>Leucothrix</i>	22
20	<i>Filament type 0211</i>	23
21	Résumé du métabolisme de <i>M. parvicella</i>	26
22	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i>	28
23	Applications biotechnologiques des <i>actinobactéries</i>	29
24	Antibiotiques produits par les <i>actinobactéries</i>	29

25	Influence de la densité des filaments sur l'indice de Mohlman	33
26	Aspect macroscopique des colonies de <i>Nocardia sp</i>	40
27	Vue microscopique des bactéries filamenteuses à l'état sec	42
28	Bactérie Gram (+)	44
29	Bactérie gram (-)	44
30	Bactéries gram (+) et gram(-)	45
31	Coloration de Neisser (-)	46
32	Coloration de Neisser (+)	46
33	Coloration Noir de Soudan PHB (+)	47
34	Coloration noir de soudan PHB (-)	47
35	Coloration à l'INT	48
36	Principe de teste de catalase	50
37	Le principe de la PCR	55
38	Le principe de séquençage	58
39	Schéma général du principe de la technique FISH	61
40	Le principe de la DGGE	63
41	Principe de la puce à ADN ou Microarray	66

Liste des abréviations

➤ Unités de mesures

% : pourcentage

° C : Degré Celsius

cm³ : centimètre cube

g : gramme

L : litre

mg : milligramme

ml : millilitre

mm : millimètre

µl : microlitre

µm : micromètre

γ : Grandissement

➤ Autres abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

Ag : Argent

ARDRA : Analyse par restrictions enzymatiques du polymorphisme de séquence d'ARNr amplifiées par pcr de l'anglais « Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis »

ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomiques

ARNr 16S : acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S

ATP : Adénosine tri-phosphate.

Cd : Cadmium

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole,dichdrochloride

DBO5 : Demande Biochimique en Oxygène mesurée au bout de 5 jours (mg O₂ L⁻¹)

ddNTP : didésoxyribonucléosides triphosphate

dNTP : désoxyribonucléosides triphosphate

DGGE : Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant de l'anglais « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis »

EPS :exopolysaccharides

FISH : Hybridation in situ de sondes fluorescentes de l'anglais « Fluorescent In Situ Hybridization »

FNDAE : Fonds National pour le Développement des Adductions d'Eau

Fe : Fer

G- : Gram négative

G+ : Gram positive

H⁺ : proton

H₂O : l'eau

H₂O₂ : l'eau oxygénée

Igs : Intergenic Spacer

INT : Coloration à chlorure de 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophényl-5-phényl tetrazolium

LAO : lipid-accumulating organism

LCFA : long chain fatty acids

MES : Matières en suspension

Mn : Manganèse

N : azote

N₂ : Diazote

NO₂⁻ : Nitrite

NO₃⁻ : Nitrate

P : phosphore

Pb : Plomb

pH : Potentiel hydrogène

PHA : Poly-hydroxyalcanoate

PHB : poly-β-hydroxybutyrate

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase de l'anglais «Polymerase Chain Reaction»

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'anglais « Restriction Fragment Length Polymorphism »

RISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

RM : Rouge de Méthyle

SSCP : Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins de l'anglais « Single Strand Conformation Polymorphism »

TAG : Triacylglycérides

T-RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux de l'anglais « Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism »

TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

VP : Les réactions Voges-Proskauer

Zn : Zinc

Zn²⁺ : ion de zinc

Table des matières

Remerciement.....	I
Dédicace	II
Résumé	IV
Summary	V
ملخص	VI
Liste des tableaux	VII
Listes des Figures	VIII
Liste des abréviations	X
Table des matières	XIII
Introduction	1

Chapitre 1 : Les bactéries filamenteuses : caractéristiques et importances

1. La microfaune et la microflore des boues activées	4
1.1. La microfaune	4
1.1.1. Les protozoaires	5
1.1.2. Les métazoaires	5
1.2. Les bactéries (la microflore)	5
1.2.1. Les bactéries dispersées	6
1.2.2. Les bactéries floculantes	6
1.2.3. Les bactéries filamenteuses	6
2. Classification des bactéries filamenteuses	7
2.1. Critères de classification des bactéries filamenteuses	7
3. Principales bactéries filamenteuses.....	13
3.1. <i>Les Actinomycètes</i>	13
3.2. <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	14
3.3. <i>Microthrix parvicella</i>	15
3.4. <i>Nocardia spp.</i>	15
3.5. <i>Sphaerotilus natans</i>	16

3.6.	<i>Thiothrix</i> , Type 1863, Type 021	17
3.7.	<i>Streptococcus</i>	18
3.8.	<i>Filament</i> type 0041 et type 0675	19
3.9.	<i>Filament</i> Type 0092	20
3.10.	<i>Eikelboom</i> type 021N ou <i>Thiothrix eikelboomii</i>	20
3.11.	<i>Filament</i> Type 0581	21
3.12.	<i>Filament</i> Type 0961	22
3.13.	<i>Leucothrix</i>	22
3.14.	<i>Filament</i> Type 0211	23
4.	Le rôle des bactéries filamenteuses dans les boues activées	23
5.	Condition favorisant le développement de bactéries filamenteuses	24
5.1.	Le taux de croissance	24
5.2.	L'équilibre en substrats nutritifs	24
5.3.	La concentration en oxygène dissous	24
5.4.	La métabolisation du soufre	25
5.5.	Le type d'écoulement	25
5.6.	Le rôle de matières en suspension	25
6.	Le métabolisme d'une bactérie filamenteuse (Exemple: <i>M. parvicella</i>)	25
7.	Physiologie de développement d'une bactérie filamenteuse (exemple : <i>S. natans</i>)	26
7.1.	Sources de carbone et d'énergie	26
7.2.	Sources d'azote	27
7.3.	Température	27
7.4.	pH	27
7.5.	Besoins en oxygène	27
8.	Le cycle de développement d'une bactérie filamenteuses (exemple : <i>Streptomyces</i>)	27
9.	Les applications des bactéries filamenteuses	28
9.1.	Production des antibiotiques	29
9.2.	Production d'enzymes	30

9.3.	Production des bioherbicides	30
9.4.	Contributions à l'épuration et à la dépollution des eaux	31
9.5.	Contributions éventuelles à la médecine	31
10.	Les problèmes liés aux bactéries filamenteuses	31
10.1.	Le Foisonnement	31
10.2.	Le moussage	32
10.3.	Croissance dispersée	32

Chapitre 2 : origine et identification

1.	Origine des bactéries filamenteuses	35
1.1.	Les actinomycètes de sol	35
1.2.	Les actinomycètes aquatiques	36
1.3.	Les actinomycètes de l'air	37
1.4.	Les actinomycètes du compost	37
1.5.	Les végétaux, les animaux et l'Homme	37
2.	Identification des bactéries filamenteuses	38
2.1.	L'examen macroscopique	38
2.1.1.	Aspect de colonies en surface sur milieu solide	38
2.1.2.	Aspect des colonies en profondeur	39
2.1.3.	Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire	40
2.1.4.	Exemple d'examen macroscopique	40
2.2.	L'examen microscopique	41
2.2.1.	Examen sans coloration	41
2.2.2.	Examen après coloration	42
2.3.	Les colorations pour examen microscopique	43
2.3.1.	La Coloration de Gram	43
2.3.2.	Colorations de Neisser	45
2.3.3.	Les colorations Noir de Soudan et bleu du Nil	46

2.3.4.	Coloration à chlorure de 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophényl-5-phényl tetrazolium « INT »	47
2.3.5.	Les limites de l'examen microscopique	48
2.4.	Identification physiologique et biochimique	49
2.4.1.	Mise en évidence du type respiratoire	49
2.4.2.	Recherche de la catalase	49
2.4.3.	Recherche de l'oxydase	50
2.4.4.	Recherche de la nitrate-réductase	50
2.4.5.	Etude de la voie d'attaque des glucides	51
2.4.6.	L'hydrolyse de l'amidon	52
2.4.7.	La dégradation de l'urée	52
2.4.8.	L'utilisation de citrate	52
2.4.9.	Les réactions Voges-Proskauer « VP » et Rouge de Méthyle « RM »	52
2.4.10.	Hydrolyse de la gélatine	53
2.4.11.	Recherche d'une Caséinase	53
2.4.12.	Recherche d'une lécithinase	53
2.5.	Méthodes d'identification moléculaires	54
2.5.1.	Le marqueur moléculaire ADNr 16S	54
2.5.2.	Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)	54
2.5.3.	Clonage de l'ARNr 16S	57
2.5.4.	Séquençage de gène de l'ARNr 16S	58
2.5.5.	Hybridation <i>in situ</i> de sondes fluorescente (FISH)	59
2.5.6.	Colorations immunofluorescentes	61
2.5.7.	Techniques d'empreinte moléculaires pour la caractérisation des communautés...61	
2.5.7.1.	Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant (DGGE)	62
2.5.7.2.	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE)	63
2.5.7.3.	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction(RFLP)/ Analyse par restrictions enzymatiques du polymorphisme de séquence d'ARNr amplifiées par PCR (ARDRA)	63

2.5.7.4.	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux (T-RFLP)	64
2.5.7.5.	Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins (SSCP)	64
2.5.7.6.	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) / Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)	65
2.5.7.7.	Avantages et inconvénients des techniques d'empreintes moléculaires	65
2.5.8.	Analyses par Microarray ou puce à ADN	65
Conclusion		68
Références bibliographiques		70

Introduction

Introduction

Lors de la division cellulaire, les cellules restent en contact, ce qui conduit à la formation de longs filaments pouvant atteindre jusqu'à 1 mm. Elles sont appelées les bactéries filamenteuses (**Lacroix, 2008**). Ces bactéries sont des micro- organismes très ubiquitaires dans différentes niches tels que le sol, l'air, l'eau douce et marines, les résidus végétaux, de compost, chez les animaux et l'homme (**Loucif, 2011**). Elles sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications dans divers domaines. Elles sont également une source prometteuse de large gamme d'enzymes important, Elles produisent aussi des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement de cancer (**Harrir, 2018**). En plus, elles contribuent à l'épuration et à la dépollution des eaux usées par le procédé de boues activées (**Lacroix, 2008**).

En fait, les bactéries filamenteuses constituent en moyenne 24 % des bactéries d'après une étude récente réalisée sur 24 installations à boues activées à très faibles charges (**Durban, 2015**). Elle intervient dans la formation des macrostructures des floccs, ce qui permet une meilleure épuration. Cependant, sous certaines conditions favorables à leur croissance (des excès de substrats préférentiels ou à les carences relatives en divers substrats au niveau du floc), elles se multiplient de façon excessive et dominant provoquant, ainsi, le phénomène de foisonnement filamenteux (**Amaral et al., 1999**). Ce type de dysfonctionnement touche près de 50 % des stations d'épuration à boues activées en France (**Canler, 2005**).

Jusqu'à présent, les moyens permettant de mettre fin à ce phénomène, après sa survenue restent limités à un traitement des boues par chloration. Cette méthode est efficace, mais très agressive pour l'ensemble des microorganismes présents au sein de l'écosystème. A l'heure actuelle il n'existe aucun moyen de lutte ciblant spécifiquement les bactéries filamenteuses. Ceci est en grande partie dû au fait que ces microorganismes particuliers soient encore mal connus (**Lacroix, 2008**).

Ainsi, Le principal objectif de cette étude bibliographique travail a donc avoir toute informations concernant ce type des bactéries et de préciser leurs origine et leurs méthodes d'identification, en utilisant des techniques de microbiologie classiques, de biochimie et de biologie moléculaire.

Le présent document comporte deux chapitres principaux résultant d'une synthèse bibliographique.

Le premier chapitre étudie les caractéristiques et l'importance des bactéries filamenteuses alors que le deuxième chapitre est consacré pour leur origine et les différentes méthodes qui permettent leur identification.

Introduction :

Les boues activées forment un écosystème très complexe où cohabitent différentes souches bactériennes et une microfaune représentée par les protozoaires et métazoaires, alors que les bactéries sont les actrices principales du traitement mais les autres formes biologiques gravitant autour d'elles sont indispensables au bon équilibre de l'écosystème (**Pujol et al., 1990**). Les bactéries et la microfaune sont spécifiques du type de traitement de l'installation (**Canler et al., 1999**).

1. La microfaune et la microflore des boues activées :

La faune et la flore bactérienne, appelées encore biomasse, représentent l'ensemble des êtres vivants, animaux et végétaux, présents dans le milieu considéré. Les bactéries sont les actrices principales du traitement mais les autres formes biologiques gravitant autour d'elles (protozoaires, métazoaires) sont indispensables au bon équilibre de l'écosystème (**Tableau n°1**) (**Canler et al., 1999**).

Les espèces varient suivant le type de station de traitement et sont caractéristiques du fonctionnement d'une station. Entre toutes ces espèces se créent alors des relations de compétition, certaines vont se développer plus facilement au détriment d'autres qui resteront minoritaires ou tendront à disparaître (**Canler et al., 1999**).

Tableau n° 1 : Populations des boues activées (Canler et al., 1999).

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

1.1. La microfaune :

Elle représente une quantité de cellules de l'ordre de 10^5 à 10^7 individus 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 (**Pandolfi, 2006**).

Selon l'organisation cellulaire des microorganismes, on distingue deux familles principales : les protozoaires et les métazoaires (**Pandolfi, 2006**).

1.1.1. 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 et de molécules organiques dissoutes. Le rôle principal des 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, produit toxiques. Il existe un grand nombre d'espèces de protozoaires fixés ou mobiles au niveau des flocs : *Zoothamnium pygmaeum*, Vorticelles à pédoncule long, *Litonotus*, *Aspidiscacostata*, *Arcella*, *Paramecium* (Damotta, 2001).

1.1.2. Les métazoaires :

Les métazoaires sont des organismes pluricellulaires dont la taille peut aller de 100 μm à 1mm. 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 et Les rotifères (Canler et al., 1999).

❖ Les nématodes :

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

❖ Les rotifères :

Ils représentent le plus grand groupe de métazoaires rencontrés dans les boues activées. Un âge de boue élevé est favorable au développement de rotifères. Leur présence stimule l'activité et la décomposition de la microflore. Assez sensibles aux composés toxiques, ils se développent dans des boues âgées et bien oxygénées (Pandolfi, 2006).

1.2. Les bactéries (la microflore) :

Elle correspond à l'ensemble des bactéries présentes dans la boue activée. Les concentrations en microflore sont très élevées, de l'ordre de 10^{11} à 10^{12} bactéries par litre de boues activées (Franck, 2002).

Malgré la diversité bactérienne susceptibles d'y être ensemencées, provenant des matières fécales mais aussi des eaux naturelles ou de l'aire, les boues activées se révèlent être un milieu très sélectif et seulement une dizaine de souche bactériennes sont présentes à un instant donné au niveau d'une installation des études ont montré que les bactéries intestinales se développent peu et survivent difficilement dans ce milieu (**Franck, 2002**).

Ces bactéries représentent le maillon essentiel du traitement car elles vont consommer les molécules organiques des eaux usées et permettre ainsi leur épuration. Grace à cette activité, elles se multiplient et sont le point de départ d'une chaîne trophique d'où le terme de microflore est car la flore est l'élément de départ des écosystèmes naturels (**Franck, 2002**). On distingue 3 types :

1.2.1. Les bactéries dispersées :

Ce sont des bactéries libres dans le liquide interstitiel. On les retrouve en général au démarrage d'une station, ou en présence d'une forte charge massique. Ces dernières peuvent rester à l'état dispersé ou former des colonies structurées par des exopolysaccharides (EPS) (**Lacroix, 2008**).

1.2.2. Les bactéries floculantes :

Bactéries floculées qui s'agrègent pour donner des floes qui décantent dans le clarificateur les bactéries floculées sont les plus intéressantes pour le procédé d'épuration car elles permettent une bonne séparation entre la biomasse épuratrice et l'eau épurée (**Franck, 2002**).

1.2.3. Les bactéries filamenteuses :

Lors de la division cellulaire, les cellules restent en contact, ce qui conduit à la formation de filaments pouvant atteindre jusqu'à 1 mm de long (**Lacroix, 2008**).

Les bactéries filamenteuses sont à l'origine de la plupart des dysfonctionnements d'ordre biologique des stations d'épuration à boues activées. Mais ces microorganismes, bien que constituant un risque potentiel pour la station, sont également des éléments essentiels de l'écosystème boues activées (**Lacroix, 2008**).

Il existe une grande variété de bactéries filamenteuses. Toutes ne sont pas identifiées et pour certaines il existe peu de données sur leur implication dans les dysfonctionnements biologiques. Trente morphologies différentes ont été observées dans les stations d'épuration

municipales, quarante autres dans les stations industrielles. Seulement dix de ces morphotypes sont à l'origine de 90 % des problèmes de foisonnement (**Durban, 2015**).

Les bactéries filamenteuses constituent en moyenne 24 % des bactéries d'après une étude récente réalisée sur 24 installations à boues activées très faibles charges. 35 % d'entre elles rencontraient des problèmes de décantation dont 15 % associés à une forte présence de bactéries filamenteuses (**Durban, 2015**).

2. Classification des bactéries filamenteuses :

2.1. Critères de classification des bactéries filamenteuses :

La classification des bactéries filamenteuses se fait selon des critères morphologiques sont définies par les critères suivants :

✓ La coloration de Gram :

Elle permet de classer les bactéries en 2 groupes. Basée sur la différence de structure de la paroi des 2 catégories de bactéries, elle donne lieu à 2 cellules : le violet pour les Gram positive (G+), le rose pour les Gram négative (G-). Toutefois certains filaments sont Gram variable (G+/-) (**Eikelboom, 2000**).

✓ La coloration de Neisser :

Certains protoplasmes fixent le bleu de méthylène contrairement à d'autres. *Nostocoida limicola* et *filament type 0092* sont des bactéries filamenteuses Neisser positif (**Eikelboom, 2000**).

✓ La forme du filament :

Le filament peut être droit (**Figure 1**) ou moins flexueux, bouclé (**Figure 2**), spiralé (**Figure 3**), plus ou moins long (50µm à 1 mm). Libre dans l'eau interstitielle ou saillant du floc (**Eikelboom, 2000**).



Figure 1: Forme de filament bouclé (Eikelboom, 2000).

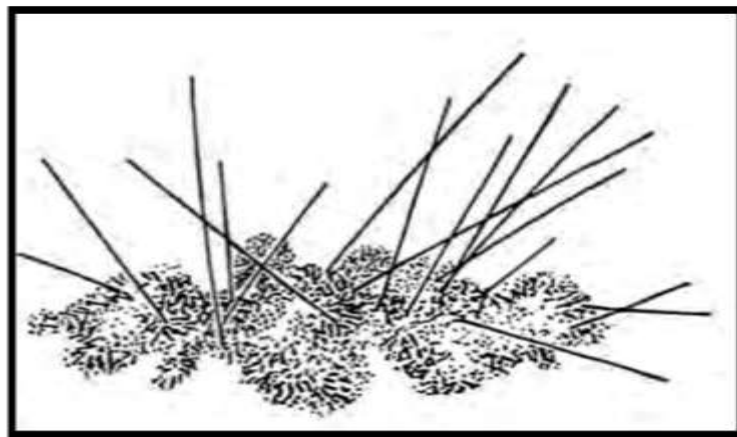


Figure 2: Forme de filament droit (Eikelboom, 2000).

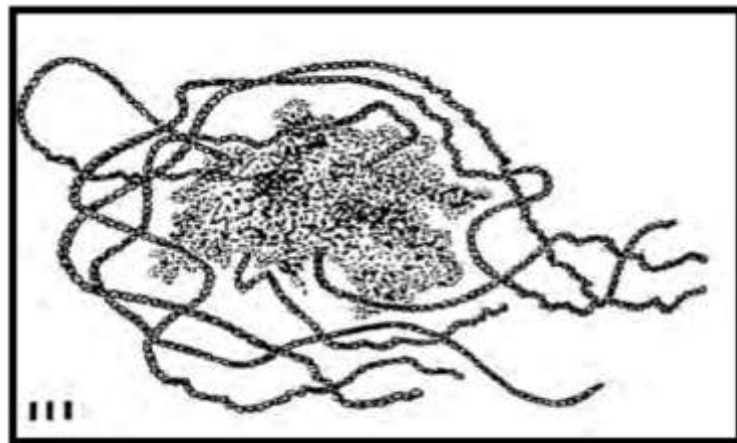


Figure 3: Forme de filament spiralé (Eikelboom, 2000).

✓ **Diamètre des filaments :**

Les microorganismes filamenteux sont divisés en trois groupes sur la base de leurs diamètres :

- Diamètre $< 1\text{ }\mu\text{m}$
- Diamètre $1\text{--}2.5\text{ }\mu\text{m}$
- Diamètre $> 2.5\text{ }\mu\text{m}$ (Eikelboom, 2000).

✓ **La forme des cellules :**

Les formes cellulaires suivantes peuvent être distinguées dans les cellules bactériennes (Figure 4) :

- Sphérique ou coccus(F1)
- Carré(F2)
- En forme de disque(F3)
- Rectangle(F4)
- En forme de tige (F5) (Eikelboom, 2000).

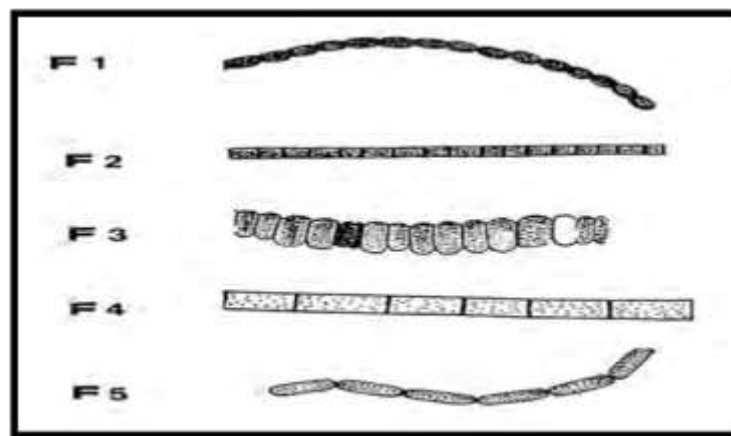


Figure 4: Forme des cellules (Eikelboom, 2000).

✓ **La présence de gaine autour de filament :**

Certains filaments possèdent une gaine composée d'un exopolymère qui enrobe les cellules bactériennes et leur confère des propriétés telle que l'assimilation des substrats, la croissance, la détoxification (Eikelboom, 2000)

✓ **La mobilité ou motilité :**

Certaines bactéries filamenteuses ont la faculté de se mouvoir (Eikelboom, 2000).

✓ **Les ramifications :**

Certains filaments présentent parfois une ou plusieurs ramifications (Eikelboom, 2000).

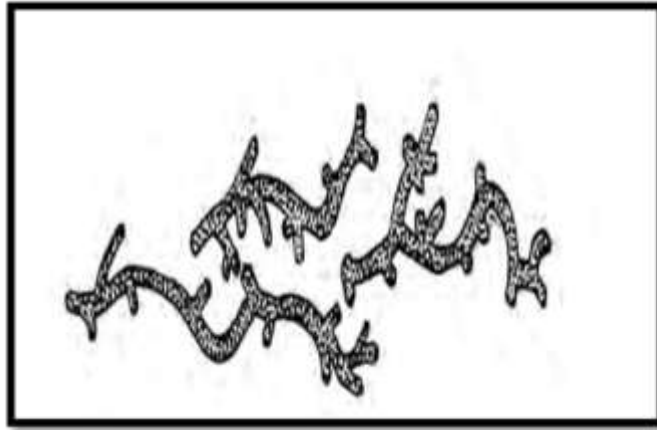


Figure 5: Forme de ramification (Eikelboom, 2000).

✓ **La présence des granules extracellulaire de soufre :**

Les cellules peuvent contenir de soufre sous forme de granules réfringents (jaune ou blanc) et parfois d'autres types d'inclusions (Eikelboom, 2000).

✓ **Le cloisonnement entre 2 cellules voisines :**

Une bactérie filamenteuse est composée de plusieurs cellules accolées. La zone de contact entre deux cellules, plus ou moins visibles, est appelé septum (Eikelboom, 2000).

2.1. La Classification :

Eikelboom 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°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 (g ranules de polyphosphates, de poly- β -hydroxybutyrate et de soufre (**Tableau n°3**) (Pandolfi, 2006).

Tableau n° 2 : Classification I des bactéries filamenteuses (Pandolfi, 2006).








CLASSIFICATION D'EIKELBOOM (1975)						
Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7
						
Gram - Gaine	Gram+ Gaine épiphytes	Cellules discoïdes	Cellules non visibles, filament Contourné	Filament droit ou peu contourné	Filament mobile	Divers
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Sphaerotilus Type 1701 Type 0321	Type 0041 Type 0675 Type 1851	Type 021 N Nostocoida Limicola Cyanophyobae	Microthrix Type 0581 Type 0192	Type 0803 Type 0092 Type 0961	Beggiatoa Type 0914	Type 1863 Nocardia Type 0411
Espèces caractéristiques du type						

Tableau n° 3 : Classification II des bactéries filamenteuses (Pandolfi, 2006).

Types de filaments	Gram	Neisser	PHB	Longueur filaments μm	Gaines	adhérences	ramifications	Forme de cellules
<i>Type 1701</i>	-	-	+	20-80	+	+	-	Discoïdes
<i>Type 0041</i>	+/-	+/-	-	100-600	+	++	-	Rectangulas
<i>Type 0675</i>	+/-	+/-	-	60-160	+	++	-	Rectangulas
<i>Type 021N</i>	-	+/-	+	60- >500	-	-	-	Ovoïdes
<i>Type 1851</i>	-	-	-	100->500	-	-	+	Rectangulas
<i>Type 0914</i>	+/-	+/-	+	50-200	-	+		Carrées
<i>Beggiatoa</i>	+/-	+/-	+	100->500	-	-	-	Cloisonnement
<i>Thiothrix I</i>	+/-	+/-	+	100- >500	+	-	-	Rectangulas
<i>ThiothrixII</i>	-	-	+	50-200	+	-	-	Rectangulas
<i>M. parvicella</i>	+	+	+	100-400	-	-	-	Formes souples
<i>N. LimicolaII</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

Une approche plus abordable a été mise au point par la suite : la classification de Wanner 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 (**Pandolfi, 2006**).

En effet, certaines bactéries comme *Microthrix parvicella* ou le filament type 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*, le filament Type021 ou *Leucothrix* sans les granules de sulfure reste très difficile (**Pandolfi, 2006**).

3. Principales bactéries filamenteuses :

Une quarantaine de micro-organismes filamenteux différents ont été recensés dans l'écosystème boues activées des stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines et industrielles. (**Lacroix, 2008**).

3.1. Les Actinomycètes :

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, ramifiées, à coloration de Gram positive (**Figure 6**). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable ; elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Ces bactéries sont aérobies, mésophiles, leur température optimale est de 25-30°C, leur pH optimal est de 6.5-8 (**Loucif, 2011**).



Figure 6: *Actinomycetes* (Eikelboom, 2000).

3.2. *Haliscomenobacter hydrossis* :

Cette espèce bactérienne se présente sous la forme d'un filament très rigide et très fin, d'une longueur comprise entre 10 et 100 μm et d'un diamètre de 0,5 μm (**Figure 7**). Les colorations de Gram et Neisser sont toutes les deux négatives pour cette bactérie. Ce filament peut se retrouver à l'intérieur du floc, mais il peut également se rencontrer libre en suspension. Elle se caractérise par la présence d'une gaine entourant le filament, absence de ramification (**Lacroix, 2008**).

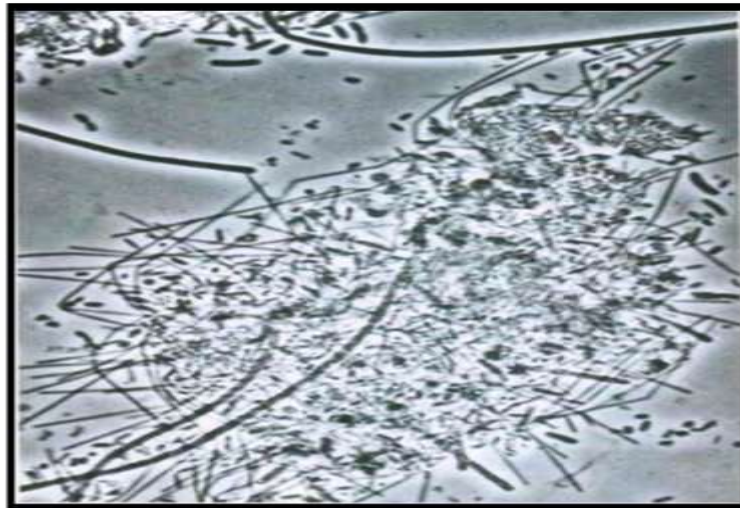


Figure 7: *H. hydrossis* (Eikelboom, 2000).

3.3. *Microthrix parvicella* :

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, avec une largeur de trichome (cellules très courtes qui constituent la bactérie filamenteuse). De 0,5 à 0,8 μm et sans adhérence (**Figure 8**). *Microthrix parvicella* est une bactérie Gram positive, Neisser positive et Noir de Soudan positive. On la trouve de manière importante lors des phénomènes de dysfonctionnement (bulking, moussage) des stations d'épuration (**Pandolfi, 2006**).

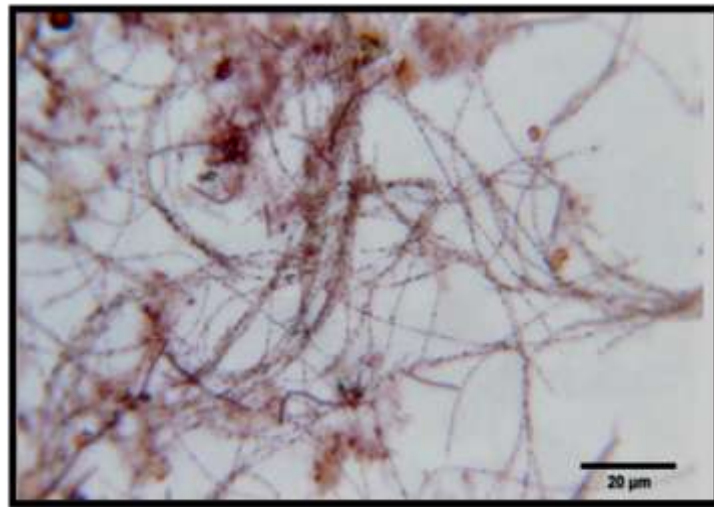


Figure 8: *M. parvicella* (Durban, 2015).

3.4. *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 (**Figure 9**). 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 $^{\circ}\text{C}$ sur des milieux comprenant une source de carbone, des extraits de levure, du glucose et du tryptophane. Ce microorganisme joue un rôle important dans la formation et la stabilisation du moussage biologique dans les procédés à boues activées (**Pandolfi, 2006**).

La croissance de *Nocardia spp* peut être facilitée par la présence de substrats hydrophobes (acides gras) par rapport aux substrats hydrophiles comme le glucose (**Pandolfi, 2006**).

La bactérie supporte des carences en azote et phosphore. Ces actinomycètes sont considérés comme des germes aérobies stricts et ne peuvent se développer sans oxygène (**Pandolfi, 2006**).



Figure 9: *Nocardia spp* (**Pandolfi, 2006**).

3.5. *Sphaerotilus natans* :

Cette bactérie est fréquemment rencontrée dans les phénomènes de bulking, mais essentiellement en Amérique du Nord et dans les stations traitant des effluents provenant d'industries agroalimentaires. Par contre on ne la rencontre que très rarement dans les stations à boues activées en France. C'est un filament long (jusqu'à 1 000 μm) et rigide (**Figure 10**). Les cellules sont rectangulaires aux extrémités arrondies et d'une taille de 1,5 à 2 μm de diamètre et 2 à 5 μm de longueur. Le trichome est entouré d'une gaine de polysaccharides. La principale caractéristique morphologique de ce filament est de posséder de fausses ramifications (filaments collés) et non de vrais embranchements. Les colorations de Gram et Neisser sont négatives. Les cellules contiennent parfois des granules de PHB quand elles se développent dans un milieu riche en glucose (**Lacroix, 2008**).

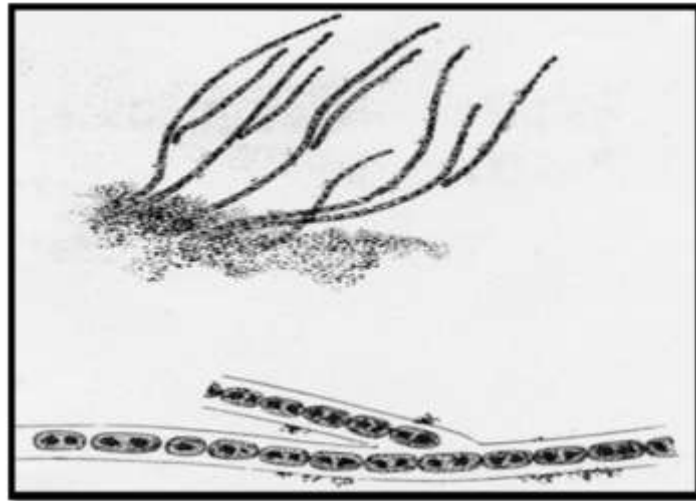


Figure 10: *S. natans* (Pandolfi, 2006).

3.6. *Thiothrix*, Type 1863, Type 021 :

Thiothrix et le filament de Type 021 sont fréquemment trouvés dans le foisonnement des boues. De manière générale, *Thiothrix*, le filament Type 021 et Type 1863 sont des bactéries Gram négative et possèdent des granules de sulfures (**Figure 11**). Ces sulfures peuvent provenir d'effluents industriels ou de la biodégradation de composés soufrés présents dans les stations d'eau urbaines (Lacroix, 2008).

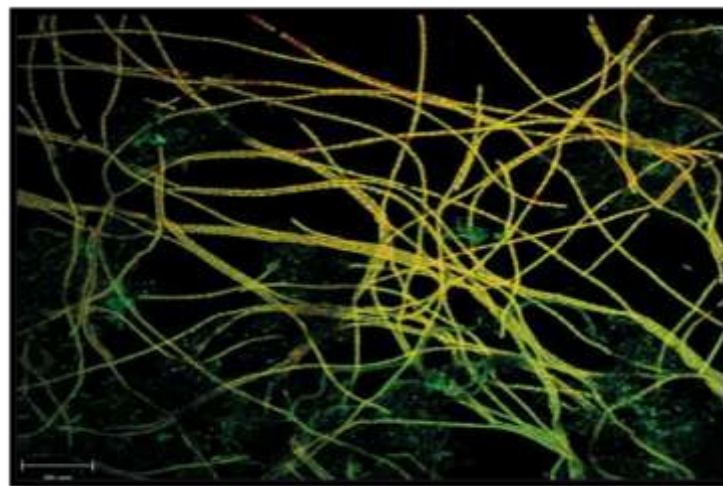


Figure 11: *Thiothrix* (Juzan et al., 2012).

3.6. *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:

- 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)

Les différences entre ces derniers se retrouvent essentiellement au niveau de la taille des cellules et du trichome inférieur à 200 μm (**Figure 12**). La croissance de *Nostocoida limicola* peut être stimulée dans des conditions anaérobies par des composés de type hydrates de carbone ou alcools (**Pandolfi, 2006**).

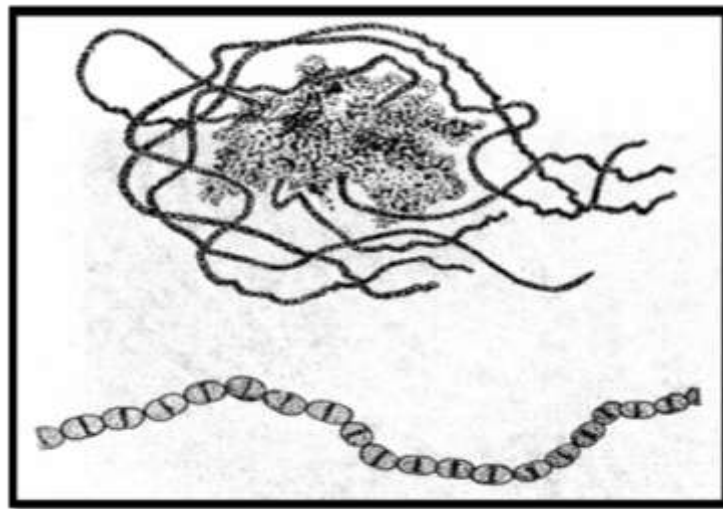


Figure 12: *N. limicola* (**Pandolfi, 2006**).

3.7. *Streptococcus* :

Les *streptococcus* sont des bactéries filamenteuses qui possèdent les caractéristiques suivantes : la longueur de filament < 200 μm , avec de fausses ramifications. Les cellules sont rondes et d'une taille de 0,7 μm , immobile, aucune gaine n'est observée autour du trichome (**Figure 13**). La coloration de Gram est positive, et celle de Neisser est négatives (**Eikelboom, 2000**).

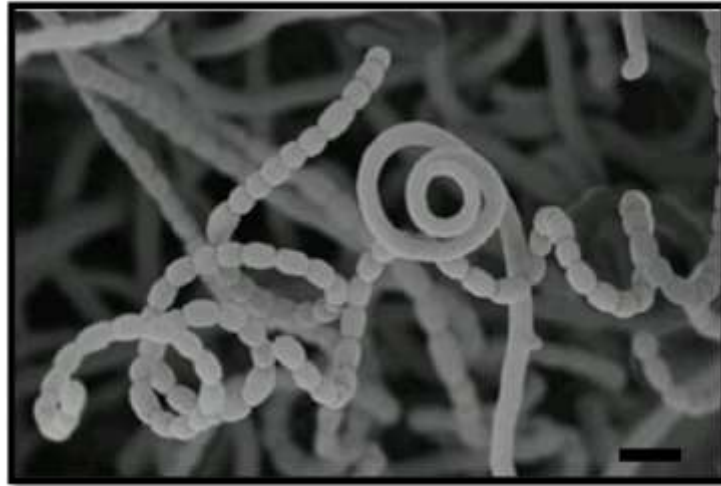


Figure 13: *Streptococcus* (Eikelboom, 2000).

3.8. Filament type 0041 et type 0675 :

Le type 0041 est un filament raide pouvant mesurer jusqu'à 500 μm et composé de cellules rectangulaires de 1,2 à 1,6 μm de large et 1,5 à 4 μm de long. Le trichome est recouvert d'une gaine. Il est important de noter que ses filaments sont la plupart du temps entourés de particules en raison d'un phénomène d'adhérence (**Figure 14**). La coloration de Gram de cette bactérie est assez variable (plutôt faiblement positive), alors que celle de Neisser est négative (**Lacroix, 2008**).

Le filament type 0675 possède les mêmes caractéristiques que le filament type 0041, mais ses filaments sont plus courts, de 50 à 150 μm . C'est pourquoi les deux filaments ont été regroupés sous la dénomination commune de le filament type 0041/0675 (**Lacroix, 2008**).

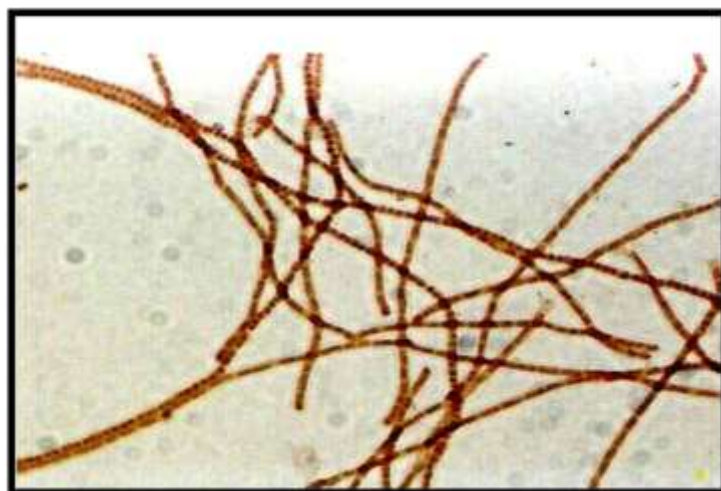


Figure 14: Filament type 0675 (Juzan et al., 2012).

3.9. Filament Type 0092 :

Ce filament est de forme assez variable (rigide ou courbe), plutôt court (de 10 à 80 μm de long) et souvent situé à l'intérieur du floc. Les cellules qui le constituent sont de forme rectangulaire (0,6 X 1,5 μm), mais sont très difficilement observables (**Figure 15**). Il n'y a pas de gaine autour du trichome. Le filament Type 0092 est fréquemment responsable des problèmes de bulking en boues activées (**Lacroix, 2008**).



Figure 15: Filament type 0092 (**Eikelboom, 2000**).

3.10. Eikelboom type 021N ou *Thiothrix eikelboomii* :

Ce genre bactérien est très fréquemment rencontré dans les boues activées. Il se présente sous la forme d'un long filament rigide pouvant atteindre jusqu'à 1 000 μm de long, composé de cellules d'un diamètre de 0,7 à 4 μm et d'une longueur de 0,5 à 5,5 μm . Les cellules qui le composent sont de forme irrégulière, le plus souvent carrée ou discoïde (**Figure 16**). Cette bactérie fait partie des gamma protéobactéries. Elle est Gram-négative et Neisser-négative, mais contient de fines granulations de PHB et des granules de soufre. Comme pour *Thiothrix*, on peut observer la formation de rosettes et de gonidies. Aucune gaine n'est observée autour du trichome. L'espèce *Eikelboom type 021N* est subdivisée en 3 groupes : I, II et III. Ils se différencient sur la base de leurs séquences d'ARNr 16S (**Lacroix, 2008**).

Thiothrix est le voisin le plus proche du type 021N. De plus, ces deux espèces présentent dans leur séquence de l'ARNr 16S une délétion caractéristique d'une structure en boucle située dans la région 455-477 (numérotation *E.coli*). Il a donc été proposé d'intégrer *Eikelboom type 021N* comme une espèce particulière du genre *Thiothrix* (**Lacroix, 2008**).

Tout comme *Thiothrix*, certaines souches d'*Eikelboom type 021N* possèdent dans leur cytoplasme des granules de sulfure. Il a donc été proposé de rebaptiser certaines de ces souches, notamment *Eikelboom type 021N AP3T*, sous le nom de *Thiothrix eikelboomii* (Lacroix, 2008).

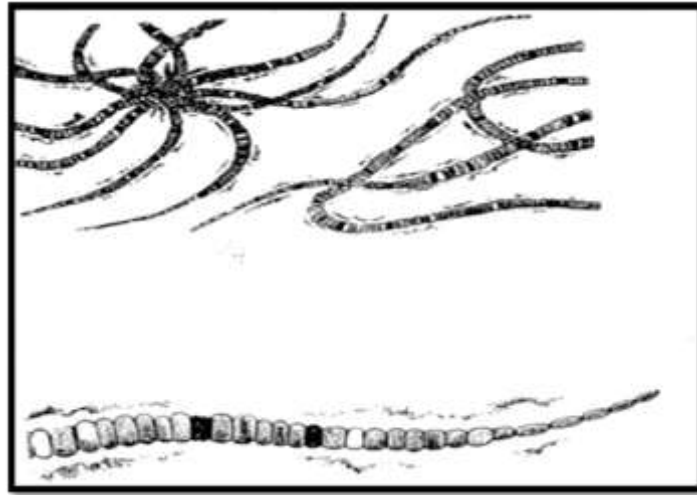


Figure 16: *Filament type 021 N* (Pandolfi, 2006).

3.11. *Filament Type 0581* :

Ce type bactérien est morphologiquement très proche de *Microthrix parvicella*, mais avec une coloration Gram-négative. Le filament est également moins long (100 à 200 μm) et plus fin (0,4 à 0,8 μm) (Figure 17). On ne retrouve pas non plus de gaine autour du filament. (Lacroix, 2008).

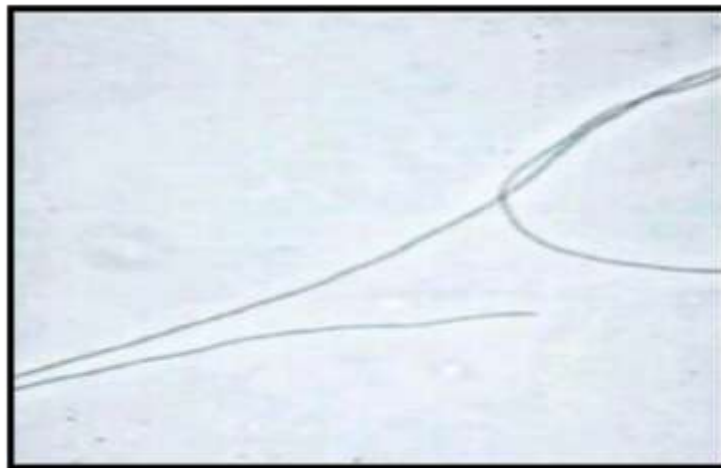


Figure 17: *Filament type 0581* (Eikelboom, 2000).

3.12. Filament Type 0961 :

Il est d'aspect rigide et long (de 200 à 500 μm). Les cellules qui le composent sont rectangulaires et allongées, de 1 à 1,4 μm de large sur 2 à 4 μm de long (**Figure 18**). Une caractéristique importante est que les cellules apparaissent comme translucides. Il n'y a pas de gaine entourant le filament, mais une matrice d'exopolysaccharides. Les colorations de Gram et de Neisser sont toutes les deux négatives (**Lacroix, 2008**).

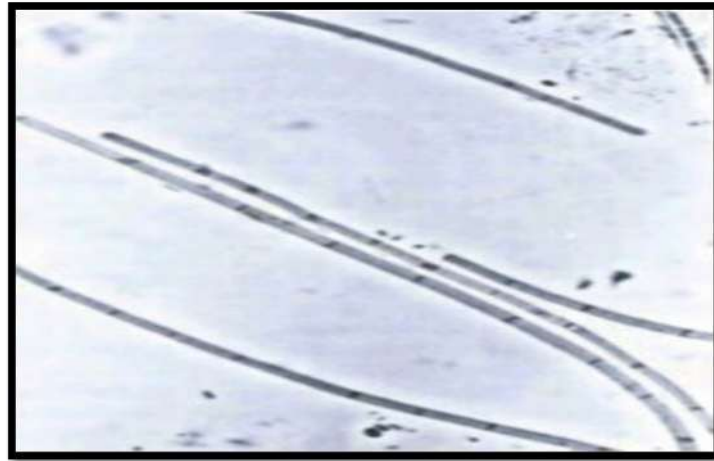


Figure 18: Filament type 0961(Eikelboom, 2000).

3.13. Leucothrix :

Leucothrix est un filament pouvant mesurer de plus de 200 μm et composé de cellules variables de long. Le trichome est recouvert d'une gaine (**Figure 19**). Il est important de noter que ses filaments sont immobiles. Les colorations de Gram et de Neisser de cette bactérie sont négatives (**Eikelboom, 2000**).

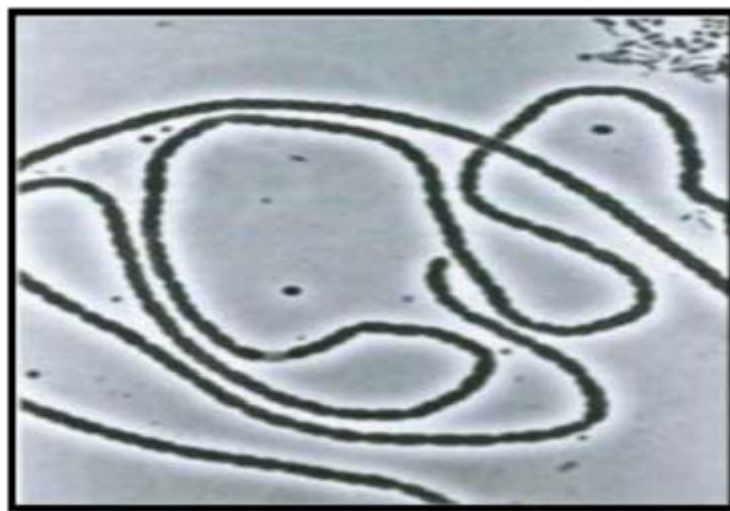


Figure 19: *Leucothrix* (Eikelboom, 2000).

3.14. Filament Type 0211 :

C'est un filament pouvant mesurer de moins de 200 μm . Le trichome est recouvert d'une gaine (**Figure 20**). Il est important de noter que ses filaments sont immobiles. Les colorations de Gram et de Neisser de cette bactérie sont négatives (**Eikelboom, 2000**).

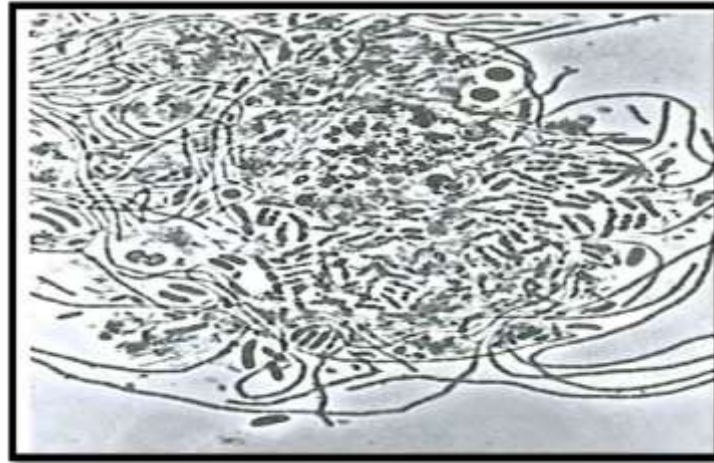


Figure 20: Filament type 0211 (**Eikelboom, 2000**).

4. Le rôle des bactéries filamenteuses dans les boues activées :

En dépit du risque qu'elles représentent, les bactéries filamenteuses sont une composante essentielle des boues activées. C'est en effet un élément indispensable à la structuration du floc (**Lacroix, 2008**).

Les flocs se composent de deux types de structures : la microstructure, formée par la simple agrégation des microorganismes, et la macrostructure, fournie par les bactéries filamenteuses internes au floc. La microstructure implique des flocs petits, sphériques et compacts, mais mécaniquement peu résistants. Lorsque des bactéries filamenteuses permettent le développement de la macrostructure, on obtient des flocs moins compacts, dans lesquels les différents microorganismes sont attachés au squelette filamenteux grâce à des polymères extracellulaires. Les flocs présentant une macrostructure permettent une meilleure épuration (**Duhamel, 1998**).

De plus, ils sont résistants au stress mécanique. La présence de bactéries filamenteuses internes est donc utile à la formation des flocs et à une bonne séparation dans le clarificateur (**Duhamel, 1998**).

5. Condition favorisant le développement de bactéries filamenteuses :

Les facteurs inducteurs de la filamentation ont fait l'objet de diverses études au cours des 30 dernières années. Ces facteurs sont multiples et spécifiques pour chacune des espèces de bactéries filamenteuses (**Lacroix, 2008**).

5.1. Le taux de croissance :

Les taux de croissance respectifs des bactéries filamenteuses et non filamenteuses, présentent des différences et varient en fonction de la concentration en substrat nutritif. Certaines études ont montré qu'une forte concentration en nourriture dans le liquide interstitiel, favorise le développement des bactéries zooglées au détriment des bactéries filamenteuses. A l'inverse, une faible concentration en nourriture permet le développement prépondérant de certaines espèces filamenteuses (*Sphaerotilus natans* notamment) (**Lacroix, 2008**).

5.2. L'équilibre en substrats nutritifs :

L'azote et le phosphore sont deux nutriments indispensables aux bactéries zooglées pour mener à bien l'élimination de la pollution carbonée (DBO5). L'équilibre idéal de DBO5, N et P doit respecter le rapport 100/5/1. Autrement dit, pour dégrader 100 unités de DBO5, il faut y associer 5 unités de N et 1 unités de P. Des études ont montré que tout déséquilibre lié à une carence en N ou P tend à induire des filamenteuses (**Site 1**).

Parallèlement, un substrat très riche en carbohydrates (sucres) favorise aussi le développement de certains filaments (comme *Sphaerotilus natans* ou le filament type 1701) (**Site1**).

Donne le développement des bactéries filamenteuses dépend de la concentration. On appelle substrat très riche, un substrat pour lequel la DBO5 est >500 mg/l et couplée à une carence en N et P. l'équilibre nutritif des eaux d'équits fécales n'est plus assuré et l'on est donc en présence d'eaux industrielle (**Site 1**).

5.3. La concentration en oxygène dissous :

De part sa forme allongé, une bactérie filamenteuse est dotée d'une grande surface d'échange. Cette particularité lui permet une exploitation toujours optimale de l'oxygène dissous, quelle que soit sa concentration et ceci au détriment des bactéries zooglées dont la surface est beaucoup plus faible. Une faible teneur en oxygène dissous est donc un des facteurs de sélection des filaments (comme *Beggiatoa*, par exemple), aux dépens des bactéries zooglées (**Site 1**).

5.4. La métabolisation du soufre :

Certaines espèces filamenteuses se développent dans les effluents septiques (pu ayant longtemps séjourné dans le réseau) contenant des concentrations non négligeables en soufre réduit (0.1 à 1.5 mg/l). Qu'elles utilisent en le métabolisant. C'est le cas *Théothrix* et *beggiatoa*, parfois majoritaires mais le plus souvent associés à *Sphaerotilus* (**Site 1**).

5.5. Le type d'écoulement :

On distingue deux types d'écoulement :

- ✓ **Mélange intégral** : dilution immédiate du substrat dès son introduction dans le bassin d'aération La concentration en substrat est faible et constante en tout point du bassin
- ✓ **Flux piston** : présente un gradient de concentration de substrat le long du bassin (**Site1**).

5.6. Le rôle de matières en suspension :

Le foisonnement filamenteux se produit le plus souvent dans les stations équipées de décanteurs primaires. En effet, les boues activées sont privées des matières en suspension, or celles-ci améliorent la structure et la cohésion du floc, donc son aptitude à décanter (**Site 1**).

6. Le métabolisme d'une bactérie filamenteuse (Exemple: *M. parvicella*) :

Les bactéries filamenteuses constituent en moyenne 24 % des bactéries d'après une étude récente réalisée sur 24 installations à boues activées. D'après cette même étude, les bactéries filamenteuses les plus abondantes sont *Microthrix* du phylum *Actinobacteria*, phylum *Chloroflexi* et phylum TM7. *Microthrix* représenterait entre 11 à 20 % des bactéries filamenteuses, le phylum *Chloroflexi* entre 30 à 60 % et en moyenne 10 % pour le phylum TM7 (**Durban, 2015**).

M. parvicella est une bactérie filamenteuse micro-aérophile chimio-organotrophe. Cette bactérie est non fermentative mais peut utiliser différents accepteurs d'électrons suivant les conditions d'aération. *M. parvicella* est considéré comme un organisme accumulant les lipides (lipid-accumulating organism : LAO) ; son métabolisme est schématisé dans la (**Figure 21**) (**Durban, 2015**).

D'après des études *in situ*, les substrats utilisés préférentiellement par *M. parvicella* sont les acides gras à longues chaînes (LCFA). La surface du filament de *M. parvicella* étant hydrophobe, les LCFA et d'autres molécules non polaires s'y fixeraient préférentiellement (**Durban, 2015**).

Le substrat est ensuite hydrolysé par des enzymes de surface, du type lipases et estérases, avant d'être assimilé par transport actif. En conditions anaérobies, *M. parvicella* accumule des lipides sous forme de triacylglycérides (TAG) avant de les réutiliser en conditions aérobies pour sa croissance (Durban, 2015).

Un certain nombre de questions persiste sur la source d'énergie nécessaire à ce stockage et sur le métabolisme impliqué. L'étude du génome de *M. parvicella* a montré qu'il pourrait s'agir de réserves de polyphosphate et/ou de tréhalose ou éventuellement une hydrolyse partielle des LCFA. Le métabolisme flexible de *M. parvicella* lui permet de s'adapter aux différentes conditions opératoires des systèmes à boues activées qui alternent les conditions anaérobies relativement riches en carbone et les conditions aérobies plus pauvres (Durban, 2015).

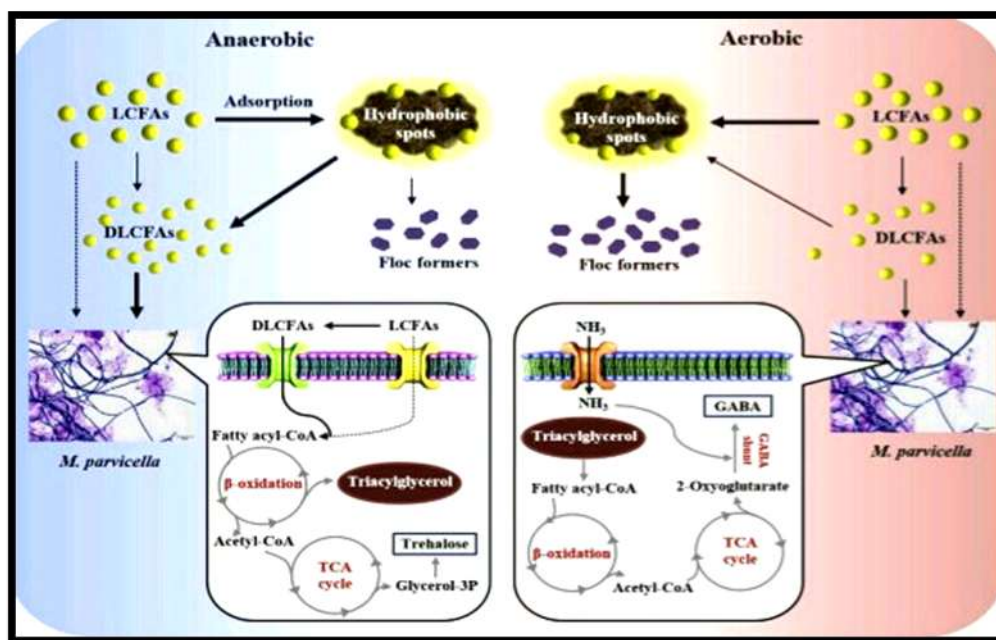


Figure 21: Résumé du métabolisme de *M. parvicella* (Durban, 2015).

7. Physiologie de développement d'une bactérie filamenteuse (exemple : *S. natans*) :

7.1. Sources de carbone et d'énergie :

S. natans est capable d'utiliser une large gamme de composés organiques comme source de carbone et d'énergie : glucose, galactose, sucrose, maltose, mannitol, sorbitol, succinate, fumarate, butanol, glycérol, lactate, pyruvate, acétate et éthanol. L'acétate et le butyrate peuvent également faire partie des sources de carbones. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, ils s'avèrent toxiques (Lacroix, 2008).

En ce qui concerne des composés tels que le lactose, Le xylose, l'arabinose, le benzoate, le propanol ou le méthanol, donne une très faible croissance, voire même aucune croissance (**Lacroix, 2008**).

7.2. Sources d'azote :

S. natans peut utiliser lors de sa croissance une grande variété de sources d'azote, comme par exemple des sels d'azote inorganique, des mélanges d'acides aminés ou bien encore des peptones ou des extraits de viandes (**Lacroix, 2008**).

7.3. Température :

En considérant un milieu favorable à la croissance de *S. natans* et contenant 0,1% de glucose et de peptone, ainsi que des sels minéraux, toutes les souches se développent, dans une gamme de température comprise entre 15 et 40°C. La température optimale de croissance est d'environ 30°C, et les croissances à 15 et 40°C sont lentes (**Lacroix, 2008**).

7.4. pH :

On obtient une croissance rapide et abondante si la culture est réalisée dans un milieu ayant un pH situé entre 6,4 et 8,1. En dessous de 5,5 aucune croissance n'est possible, mais elle peut être initiée au pH de 9 ou 10 (**Lacroix, 2008**).

7.5. Besoins en oxygène :

S. natans est un microorganisme aérobic, il ne peut se développer en absence d'oxygène. Ceci est notamment mis en évidence par sa tendance à se développer à la surface des tubes ou flasques lorsqu'il est cultivé en milieu liquide. Il peut cependant croître en présence de très faibles quantités d'oxygène, mais il ne supporte pas les longues périodes d'anaérobiose (**Lacroix, 2008**).

8. Le cycle de développement d'une bactérie filamenteuses (exemple : *Streptomyces*) :

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développe un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la (**Figure 22**) (**Loucif, 2011**).

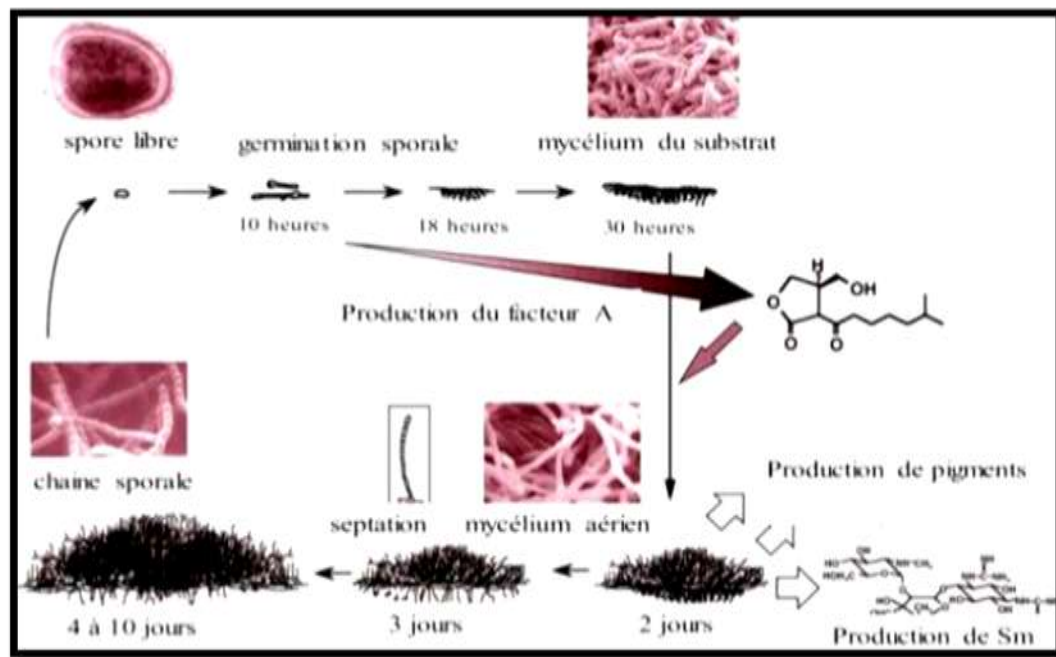


Figure 22: Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Bakdi et al., 2016).

9. Les applications des bactéries filamenteuses :

Les *actinobactéries* sont bien reconnues pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications dans divers domaines. Elles sont également une source prometteuse de large gamme d'enzymes important, qui sont produites à l'échelle industrielle. Une grande fraction d'antibiotiques sur le marché provient d'*actinobactéries*. Elles produisent aussi des inhibiteurs enzymatiques utiles pour le traitement de cancer et les immunomodifiants qui améliorent la réponse immunitaire. Elles effectuent des transformations de composés organiques. De nombreux genres d'*actinobactéries* peuvent être potentiellement utilisés dans la bioconversion des déchets agricoles et urbains sous-utilisés en produits chimiques de haute valeur. Elles sont également importantes dans le domaine de la biotechnologie végétale. La **Figure 23** ci-dessous présente une brève description des applications importantes des *actinobactéries* (Harrir, 2018).

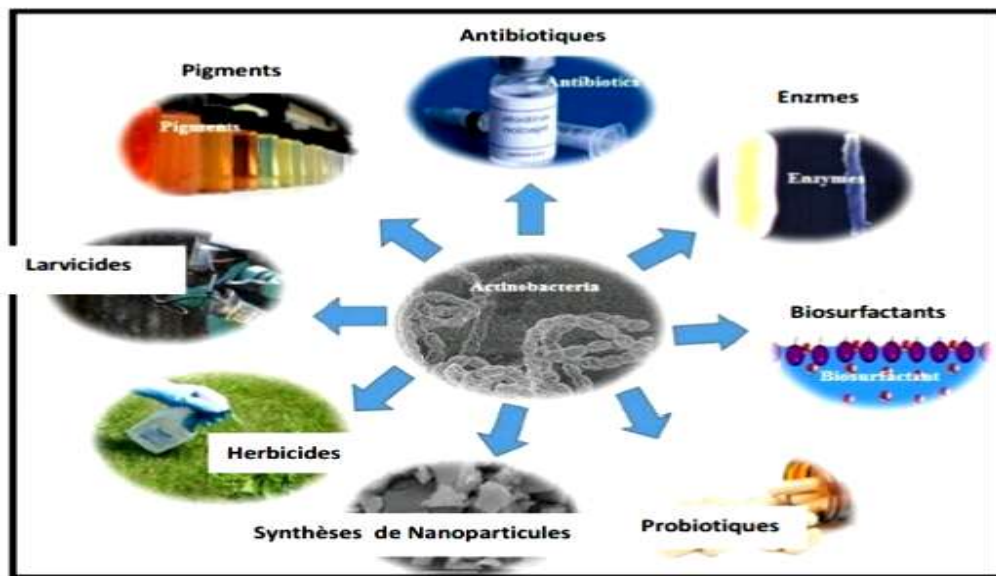


Figure 23: Applications biotechnologiques des *actinobactéries* (Harrir, 2018).

9.1. Production des antibiotiques :

Les *actinobactéries* jouent un rôle important dans la production des antibiotiques. Ces médicaments sont variés et extrêmement importants pour la santé. Ils sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelles et leurs dérivés. Or, les maladies dues à des bactéries pathogènes multirésistantes augmentent vigoureusement. Face à la perte d'efficacité de certains antibiotiques, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les efforts se concentrent sur la recherche de nouveaux antibiotiques avec des nouveaux mécanismes d'actions et qui ne comportent aucun effet toxique. La (Figure 24) montre que la majorité d'antibiotiques proviennent de micro-organismes, en particulier des espèces d'*actinobactéries* (Harrir, 2018).

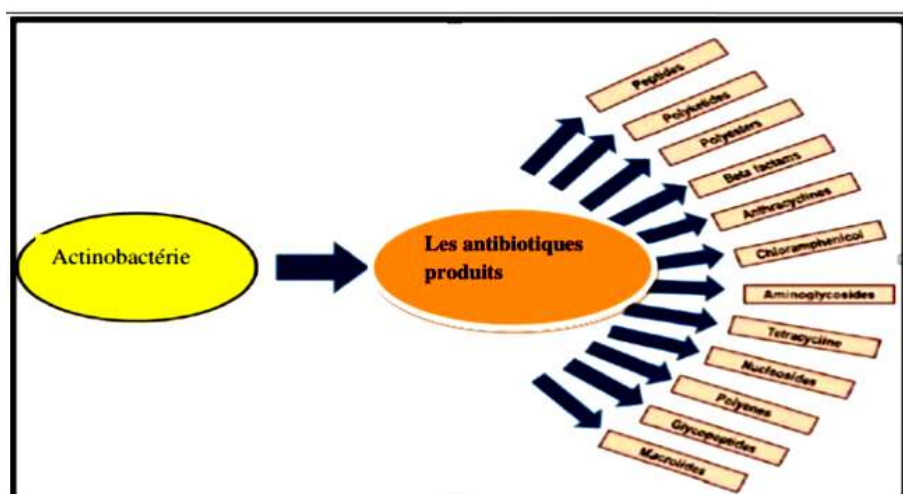


Figure 24: Antibiotiques produits par les *actinobactéries* (Harrir, 2018).

9.2. Production d'enzymes :

Une grande variété d'enzymes biologiquement actives sont produites à la fois par des *actinobactéries* marines et terrestres qui sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules, ce qui les aide à effectuer une digestion extracellulaire. Cette enzyme est très importante dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier en raison de leur capacité à dégrader l'amidon. Les *actinobactéries* produisent aussi les cellulases, qui constituent une collection d'enzymes hydrolytiques qui rompent les liaisons glucosidiques de la cellulose et des dérivés apparentés de cello-digosaccharide. La lipase est produite à partir de divers *actinobactéries*, bactéries et champignons et est utilisée dans les industries des détergents, des denrées alimentaires, mais aussi dans les industries pharmaceutiques (Harrir, 2018).

9.3. Production des bioherbicides :

Plusieurs métabolites secondaires sont synthétisés par des *Streptomyces* et utilisés comme herbicides contre les mauvaises herbes indésirables (Tableau n°4) (Saker, 2015).

Tableau n° 4 : Les herbicides produits par les *Streptomyces* (Saker, 2015).

Bio-herbicides	Utilisations	Souches
Anisomycine	Inhibiteur de la croissance des mauvaises herbes Graminées telles que la basse-cour et les mauvaises herbes à feuilles larges.	<i>Streptomyces sp.</i>
Bialaphos	Lutte contre les mauvaises herbes graminées et vivaces et les mauvaises herbes à feuilles larges	<i>S. viridochromogenes</i>
Coformycine et hydantocidine carbocycliques	Contrôle de plusieurs mauvaises herbes.	<i>S. hygroscopicus</i>
Herbicidines et herbimycines	Monocotylédone et dicotylédone	<i>S. saganonensis</i>
Phthoxazoline, hydantocidine et homoalanosine	Contrôle de plusieurs mauvaises herbes	<i>Streptomyce ssp.</i>

9.4. Contributions à l'épuration et à la dépollution des eaux :

La capacité à oxyder le fer est une des propriétés les plus caractéristiques de *S. natans*. Cette bactérie est capable de fixer les ions Fe (III) à l'intérieur ou à la surface de la gaine. À la différence de *Leptothrix*, et contrairement à ce qui a été décrit dans un premier temps, ce microorganisme n'est pas capable d'oxyder le Manganèse (Mn) (**Lacroix, 2008**).

S. natans est également capable d'adsorber de nombreux ions métalliques. Ce phénomène d'adsorption des polluants par la biomasse est appelé biosorption. Ce processus est utilisé dans le traitement des eaux résiduaires urbaines et surtout industrielles pour l'élimination des métaux lourds et d'autres polluants. Il est également utilisé pour la purification des métaux précieux comme l'or ou l'argent à partir de particules du sol. En ce qui concerne *S. natans*, ce microorganisme est capable d'adsorber les ions Cr (III), Pb, Cd, ainsi que les ions Cu, Zn, Ag. En plus des capacités épuratoires classiques des bactéries des boues activées, *S. natans* montre une aptitude tout à fait originale et intéressante pour l'élimination de polluants difficiles à traiter comme le sont les métaux lourds (**Lacroix, 2008**).

De nombreuses études ont été et sont encore menées sur la façon dont pourrait être utilisée cette capacité dans le traitement des eaux usées, et en particulier pour les effluents de types industriels (**Lacroix, 2008**).

Cependant l'utilisation d'un tel microorganisme pour la biosorption des métaux lourds en station d'épuration semble compliquée en raison des problèmes de foisonnement filamenteux qui pourraient en résulter (**Lacroix, 2008**).

9.5. Contributions éventuelles à la médecine :

Au cours des années 80, des études ont mis en évidence une aptitude plus surprenante de *S. natans*. En effet, il a été démontré que ce microorganisme aurait une activité anti-tumorale. Par la suite, il a également été mis en évidence que *S. natans* et surtout les exopolysaccharides que sécrète cette bactérie, pourraient avoir une activité immuno-stimulatrice. Cette activité agirait notamment en stimulant les macrophages (**Lacroix, 2008**).

10. Les problèmes liés aux bactéries filamenteuses :

10.1. Le Foisonnement :

Le foisonnement (bulking en anglais) est caractérisé par un indice de boue supérieur ou égal à 200 ml/g. Au-delà de 150 ml/g, des difficultés de décantation apparaissent (**Canler, 2005**).

On rappelle qu'une boue décantant correctement à un indice de boue de l'ordre de 100 mg/g. Un développement filamenteux important limite fortement les capacités hydrauliques du clarificateur et peut entraîner des départs de boue dans le milieu naturel (**Canler, 2005**).

Dans la station, le foisonnement est souvent associé à :

- Une détérioration de la qualité du rejet en cas de perte de boue épisodique ou chronique.
- Un floc légèrement floconneux avec un volume décanté important lors du test de décantation, qui rend impératif la dilution des échantillons de boue. L'indice de boue est alors supérieur à 200 ml/g. Lors de l'observation microscopique, on observe une densité importante de microorganismes filamenteux.

L'indice de boue moyen observé sur le parc français des stations d'épuration, en aération prolongée est de 150 ml/g hors stations soumises à des crises aiguës de foisonnement (**Canler, 2005**).

10.2. Le moussage :

Ce type de dysfonctionnement se caractérise par la présence d'une couche de mousses stables et denses en surface des bassins ainsi que par la présence de flottants au niveau du clarificateur. Il résulte de la stabilisation entre trois éléments : l'air, l'eau et les cellules bactériennes. Le moussage peut être causé par la production excessive d'EPS (lipides, protéines ou carbohydrates), par la présence de composés tensio-actifs dans les eaux usées ou par la prolifération excessive de bactéries filamenteuses dont les parois sont très hydrophobes. Les bactéries hydrophobes, et éventuellement les agrégats auxquels elles sont liées, ont tendance à être entraînées à la surface des bassins sous l'action de l'aération. De par leur caractère hydrophobe, *M. parvicella* et *Mycolata* sont les bactéries filamenteuses le plus souvent à l'origine de ce type de dysfonctionnement. L'accumulation de biomasse dans les mousses entraîne des difficultés à maintenir stable la concentration en matières en suspension (MES) dans l'installation et à contrôler l'âge de boues (**Durban, 2015**).

10.3. Croissance dispersée :

Si les bactéries filamenteuses sont incapables de fournir la macrostructure des floccs, on voit apparaître des microflocs trop légers, qui décantent mal. L'effluent surnageant dans le clarificateur est alors mal purifié, et contient beaucoup de matières en suspension (MES) (**Figure 25**) (**Duhamel, 1998**).

Le volume de boues en bas de clarificateur est très faible (indice de Mohlman $50 \text{ cm}^3/\text{g}$). Ceci se produit lorsqu'il y a trop peu de bactéries filamenteuses, ou qu'elles présentent trop peu de polymères extracellulaires nécessaires à la fixation des bactéries sur l'exosquelette. Ce phénomène reste néanmoins relativement rare, et serait dû la plupart du temps à des apports de toxiques par l'influent à traiter. La conséquence est donc une dégradation importante de la qualité de l'effluent rejeté, qui contient un grand nombre de microorganisme (**Duhamel, 1998**).

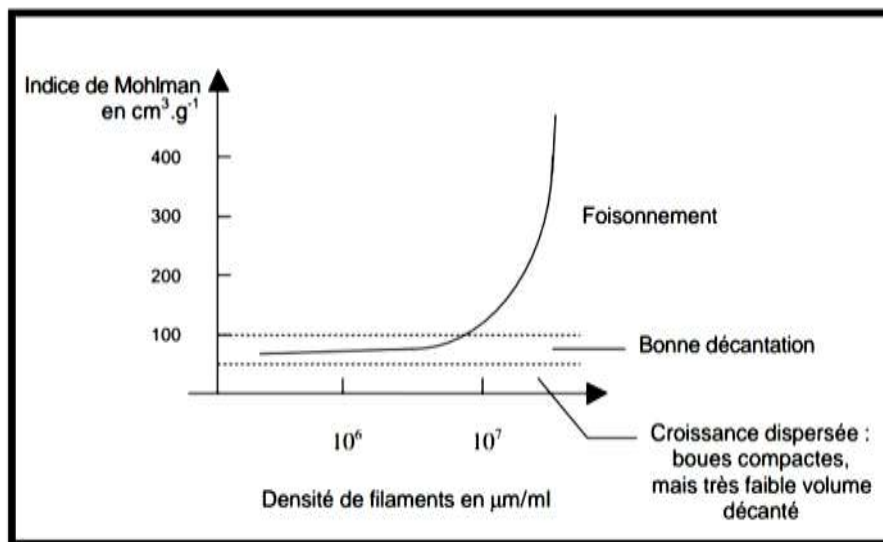


Figure 25: Influence de la densité des filaments sur l'indice de Mohlman (**Duhamel, 1998**).

1. Origine des bactéries filamenteuses :

Les actinomycètes sont des micro- organismes très ubiquitaires dans différentes niches tels que le sol, l'air, l'eau douce et marines, les résidus de végétaux de composts chez les animaux et l'homme (Loucif, 2011).

Tableau n° 5 : Habitats de certains actinomycètes (Saker, 2015).

Actinobactéries	Habitats
<i>Actinoplanes spp.</i>	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia spp.</i>	Nodules racinaires des non-légumineuses, sol.
<i>Micromonospora spp.</i>	Eau douce, sédiments, sols (humides ou non).
<i>Nocardia amarae</i>	Boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Foin moisi, sol.
<i>Streptomyces spp.</i>	Sol, litière végétale, eau.
<i>Saccharomonospora</i>	Compost, sol.

1.1. Les actinomycètes de sol :

Les *actinobactéries* sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (**Tableau n°5**). Dans le sol, de nombreuses *actinobactéries* sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les *actinobactéries* du sol sont surtout présents en surface, mais on peut les retrouver aussi à plus de 2 m de profondeur. Elles produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2- méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur caractéristique des sols. Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50%. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'*actinomycètes* isolées à partir de 16 types de sols (**Tableau n°6**) (Belyagoubi, 2014).

Tableau n° 6 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol (Belyagoubi, 2014).

Genre	Pourcentage
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,4
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

1.1. Actinomycètes dans les sols de rhizosphères de plantes :

Elles jouent également un rôle majeur au sein de la communauté microbienne de la rhizosphère. Les *actinobactéries* appartenant au genre *Frankia* sont importantes pour de nombreux types de plantes. Cette bactérie est capable de fixer l'azote en formant des nodules au niveau des racines de certaines angiospermes, ce qui confère donc un avantage à la plante pour croître dans un sol pauvre en azote. Cette relation « plante- *actinobactérie* » est appelée association actinorhizienne. Peu d'espèces sont phytopathogènes, l'exemple le plus étudié étant *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Saker, 2015).

1.2. Les actinomycètes aquatiques :

Les *actinobactéries* sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches *Microspora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents ou ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa flaveur. Alors qu'ils sont absents dans les eaux minières très acides (pH<1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Harrir, 2018).

1.3. Les actinomycètes de l'air :

L'air constitue pour les *actinomycètes*, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores d'*actinomycètes* thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (Kitouni, 2007).

1.4. Les actinomycètes du compost :

Les microbes mésophiles y compris les *actinomycètes* effectuent la décomposition des substrats riches en nutriments et créent une température plus élevée qui fournissent des conditions idéales pour la croissance rapide des *actinomycètes* thermophiles. *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* et *Streptomyces* sp, *Thermomonospora* ont été isolés à partir de tels substrats auto-chauffée. Les espèces de *Thermomonospora* se développent particulièrement bien pendant la deuxième phase de préparation d'engrais pour la culture de champignon tandis que les *Streptomyces diastaticus* et *Thermoactinomyces vulgaris* prédominent dans le compost cuit à la vapeur et sa poussière (Harrir, 2018).

1.5. Les végétaux, les animaux et l'Homme :

Dans la distribution naturelle des *actinomycètes*, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'Homme pour lesquels certaines espèces sont pathogènes. Peu de maladies des plantes sont provoquées par les *actinomycètes*. Notons une gale de pomme de terre causée par *Streptomyces scabiei*. Certaines *Mycobactéries* sont la cause de pathologies animales, végétales et surtout humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la Tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) (Loucif, 2011).

2. Identification des bactéries filamenteuses :

La prolifération excessive des microorganismes au sein des boues activées reflète un problème de fonctionnement de la station d'épuration. Une identification précise des bactéries incriminées peut permettre de fournir aux exploitants des pistes quant à la nature du dysfonctionnement. Les principaux caractères utilisés pour différencier les familles et les genres sont surtout d'ordre morphologique et chimique (**Lacroix, 2008**).

Les principaux critères morphologiques sont :

- La présence ou non de gaine ou d'une matrice d'exopolysaccharides autour du filament ;
- La motilité des cellules ;
- La présence de ramifications, vraies ou fausses ;
- La taille et la forme des filaments ;
- Le résultat de la coloration de Gram et de Neisser ;
- La morphologie, le diamètre et la longueur des cellules du trichome ;
- La présence ou l'absence ainsi que la nature des inclusions intracellulaires (PHB, sulfures) (**Lacroix, 2008**).

Il est possible d'observer les bactéries soit lorsqu'ils sont regroupés en colonies sur boîte visible à l'œil, il s'agit alors d'une observation macroscopique ; soit à l'état de cellule, il s'agit d'une observation microscopique (**Bouزيد, 2019**).

2.1. L'examen macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Il permet d'observer la taille, la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies. Ceci nous permet de prélever et de sélectionner seulement les colonies possédant les caractéristiques culturelles des bactéries souhaitées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies (**Paris, 1999**).

2.1.1. Aspect de colonies en surface sur milieu solide :

✓ La taille :

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires (**Bouزيد, 2019**).

✓ **La forme** : est caractérisé par :

- L'Allure de contours : elle peut être : lisse, dentelé, déchiqueté ou irrégulière.
- Le Relief : la colonie peut être : bombée, demi-bombée ou plate.
- Centre : parfois surélevé, parfois ombiliquée (en creux) (**Bouزيد, 2019**).

✓ **L'aspect de la surface** :

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, renvoyé la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé (**Bouزيد, 2019**).

✓ **L'opacité** :

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière)
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli).
- Transparentes (laissent passer la lumière et permet de voir les formes au travers, comme le verre, on parle de gouttes de rosée" (**Bouزيد, 2019**).

✓ **La consistance** :

Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes) (**Bouزيد, 2019**).

✓ **La couleur et/ou pigment**

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu (**Bouزيد, 2019**).

2.1.2. Aspect des colonies en profondeur :

Elles peuvent être :

- Colonies régulières en formes de lentilles ;
- Colonies irrégulières de formes diffuses et floues (**Bouزيد, 2019**).

2.1.3. Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire :

Elles peuvent être :

- Filiformes ;
- Légèrement envahissantes avec bords ondulés ;
- Légèrement envahissantes avec bord érodé ;
- Envahissante (**Bouزيد, 2019**).

Procédure :

1. Milieu solide :

Repiquer différents aspects et formes de colonies sur des tubes de gélose linéaire. On incube à 37°C pendant 24 h et observer les différents aspects (**Bouزيد, 2019**).

2. Milieu liquide :

Repiquer à l'aide d'une anse de platine des colonies différentes dans des tubes de bouillon nutritifs et flamber l'anse après chaque repiquage. On incube à 37 °C pendant 24 à 48h et Observer les différents aspects de pousse en milieu liquide (**Bouزيد, 2019**).

2.1.4. Exemple d'examen macroscopique :

La **Figure n°26** et le **tableau n°7** représente un exemple d'examen macroscopique des colonies de *Nocardia sp.*

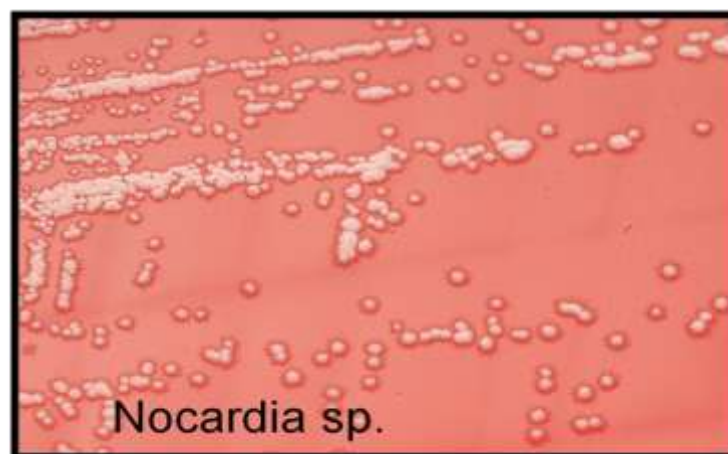


Figure 26: Aspect macroscopique des colonies de *Nocardia sp* (site 1).

Tableau n° 7 : Résultat de l'examen macroscopique d'une culture de *Nocardia* (Laurent et al., 2008).

taille	forme	Aspect de surface	consistance	Couleur	Aspect de colonie
petite	Surélève en dôme	Plissé (cérébriforme)	Ferme mais friable	Pigmenté : beige/ jaune/blanc/rouge	Crayeux/ poudreux

2.2. L'examen microscopique :

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne. Son but est recherché la forme des bactéries et leur mode de groupement. Ces renseignements peuvent être fournis par une simple préparation à l'état frais entre lame et lamelle, les bactéries étant alors observées vivantes, ou par l'observation d'un frottis coloré (Canler, 2005).

2.2.1.Examen sans coloration :

✓ Examen à l'état sec :

Cette préparation appelée « état sec » parce que les microorganismes sont fixés sur une lame, sous l'effet de la chaleur. Permet de déterminer différents paramètres morphologiques des bactéries filamenteuses et des flocs : nombre moyen et longueur des filaments, surface moyenne et « rugosité » des flocs (**Figure 27**) (Damotta et al., 2001).

Procédure :

Un volume de boues est étalé sur une lame et fixé à chaleur douce. L'Observation est réalisée avec un grossissement 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 (Pandolfi, 2006).

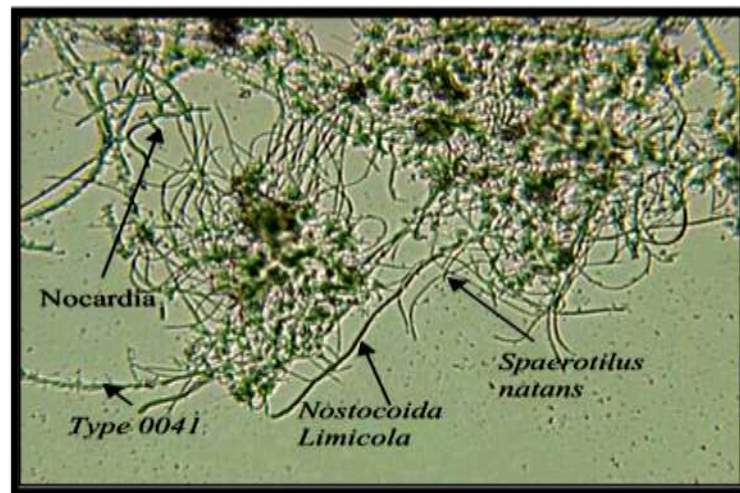


Figure 27: Vue microscopique des bactéries filamenteuses à l'état sec (Pandolfi, 2006).

✓ **Examen à l'état frais :**

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie. (Sidi Baba et al., 2007)

Procédure : Il existe deux cas suivant la nature de milieu de culture :

1. A partir d'une culture en milieu liquide :

Déposer sur une lame propre le contenu soit d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle (Sidi Baba et al., 2007).

2. A partir d'une culture sur milieu solide :

Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide (Sidi Baba et al., 2007).

2.2.2. Examen après coloration :

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis sèches et fixes, sont classées en :

- Coloration simple (un seul colorant).
- Coloration différentielle type Gram.
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spore) (Sidi Baba et al., 2007).

Procédure :

Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

1. Etalement sur lame de verre :

- La référence de l'échantillon doit être noté sur une lame parfaitement propre et Dégraissée.
- Une goutte de culture bactérienne est prélevée stérilement à l'aide d'une anse de platine, puis étalé sous forme d'un filme mince (**Sidi Baba et al., 2007**).

2. Séchage :

Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat (**Sidi Baba et al., 2007**).

3. Fixation du frottis sec :

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par la chaleur : la lame, tenue par une pince est passée 3 ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration (**Sidi Baba et al., 2007**).

2.3. Les colorations pour examen microscopique :**2.3.1. La Coloration de Gram :**

Tandis que l'observation microscopique des bactéries à l'état frais est réalisée pour voir leur mobilité tandis que La taille, la forme et le type de regroupement des cellules bactériennes sont appréciés après coloration de Gram (**Figure 28**). Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne car les bactéries qui seront dites « Gram négatif » ont une paroi pauvre en peptidoglycane donc plus fine qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de Gentiane (**Paris, 1999**).

Procédure :

La colonie bactérienne suspecte est délacérée dans une goutte d'eau physiologique sur la lame porte-objet. Ensuite, le frottis est préparé à la flamme du bec Bunsen . Puis, émergé avec du violet de Gentiane pendant 60 secondes. le Lugol est ajouté et laissé agir encore 30 secondes (**Djaballah, 2009**).

La lame est lavé à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente. On effectue un Lavage rapide à l'eau et on recouvre la lame de fuschine pendant 10 secondes. Ensuite ; l'observation microscopique des frottis est réalisée après un lavage à l'eau et un séchage au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

Les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100). Les bactéries colorées en rose sont dites Gram négatif, alors que celles colorées en violet sont Gram positif (**Figures 28,29 et 30**) (**Djaballah, 2009**).

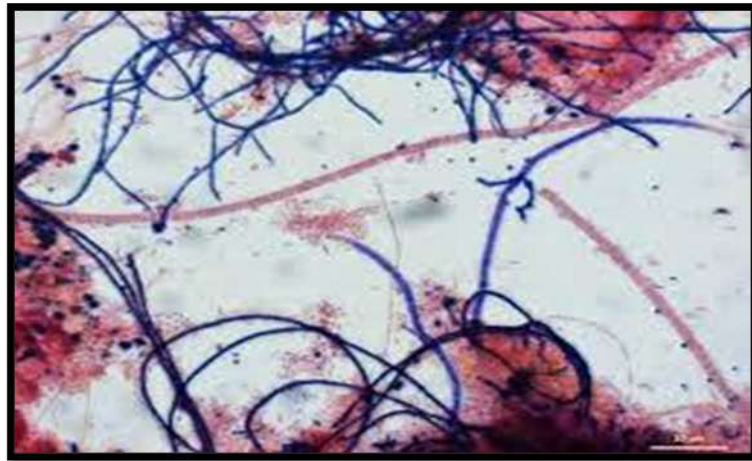


Figure 28: Bactérie Gram (+) (**Pandolfi, 2006**).

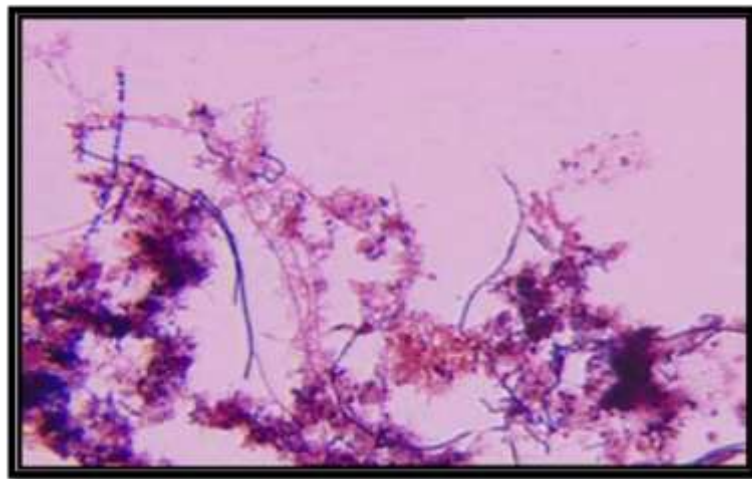


Figure 29: Bactérie gram (-) (**Pandolfi, 2006**).

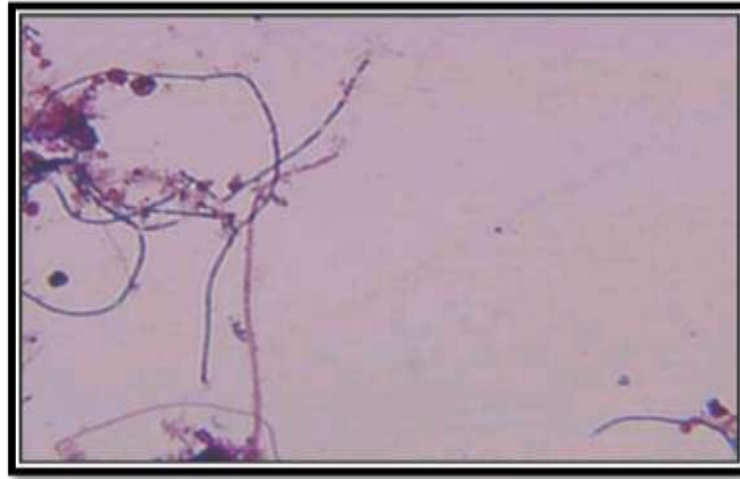


Figure 30: Bactéries gram (+) et gram (-) (Pandolfi, 2006).

2.3.2. Colorations de Neisser :

C'est une méthode utilisée pour détecter les granules de polyphosphates chez les bactéries filamenteuses de boues activées. Dans la coloration de Neisser, 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 (bleu noir) (Pandolfi, 2006).

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 (**Figure 31**), alors que les filaments colorés en jaune brun sont Neisser négatif (**Figure 32**) (Pandolfi, 2006).

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 (Pandolfi, 2006).

Procédure :

Un volume de boue est fixé sur une lame à chaleur douce. Sur laquelle la solution de bleu acétique est appliquée pendant 10 minutes environ. La lame est rincée à l'eau déminéralisée puis recouverte 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 (Pandolfi, 2006).



Figure 31: Coloration de Neisser (-) (Pandolfi, 2006)



Figure 32: Coloration de Neisser (+) (Pandolfi, 2006).

2.3.3. Les colorations Noir de Soudan et bleu du Nil :

Les composés du type PHA, PHB peuvent être mis en évidence par les colorations classiques au Noir de Soudan et Bleu du Nil. 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. C'est un composé très soluble dans les lipides et contre colorée par la safranine. Les filaments contenant du matériel lipidique (PHB) sont colorés en bleu (**Figure 33**) et ceux qui n'en possèdent pas en rouge (**Figure 34**) (Pandolfi, 2006).

Procédure : Cette coloration nécessite l'utilisation de deux solutions :

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

Solution n°2 : safranine 0 à 0,5 %.

Un volume de boue est fixé sur une lame par une chaleur douce. Ensuite, la lame est recouverte avec la solution n°1 pendant 10 minutes et rincée à l'eau distillée. Puis, la solution n°2 est appliquée pendant 1 minute. Après rinçage à l'eau distillée et séchage à l'air ambiante, les lames sont observées en microscopie optique en contraste de phase avec de l'huile à immersion au grossissement $\gamma : 250X$ (Pandolfi, 2006).



Figure 33: Coloration Noir de Soudan PHB(+) (Pandolfi, 2006).

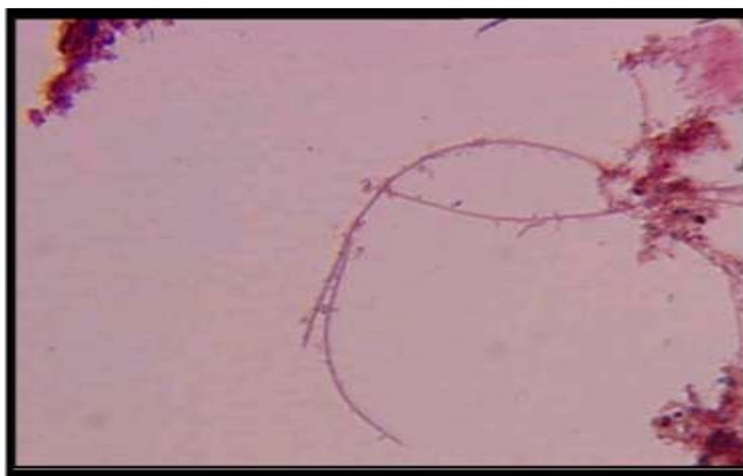


Figure 34: Coloration noir de soudan PHB (-) (Pandolfi, 2006).

2.3.4. Coloration à chlorure de 2-p-iodophényl-3-p-nitrophényl-5-phényl tétrazolium « INT » :

L'activité respiratoire chez les microorganismes filamenteux peut être mise en évidence par la coloration à l'INT.

On utilise ce colorant couplé au DAPI pour quantifier l'activité respiratoire des bactéries filamenteuses présentes dans un échantillon (Pandolfi, 2006).

Procédure :

Un volume de boues est misé en suspension dans un volume de solution d'INT à 0,02g/100ml de tampon pH 7. On fait deux lavages successifs à l'eau distillée par centrifugation pendant 2 à 3 minutes à 5000 tours par minute. Le culot est repris et étaler sur une lame, laissé sécher à chaleur douce. Ensuite, La contre coloration est réalisée avec du bleu de méthylène (0,1 %) pendant 1 minute.

On observe en microscopie en contraste de phase au grossissement γ de 250X. Les granules d'INT sont colorées en noir dans les filaments (**Figure 35**) (**Pandolfi, 2006**).

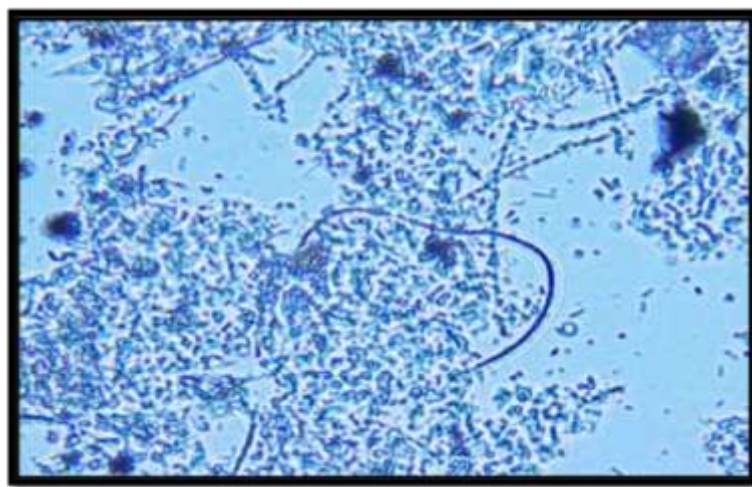


Figure 35: Coloration à l'INT (**Pandolfi, 2006**).

2.3.5. Les limites de l'examen microscopique :

La caractérisation morphologique présente de nombreuses limites. En effet, les colorations, et en particulier la coloration de Gram, donne des réponses variables pour certains filaments en fonction de leur état physiologique. Dans certains cas, des variations de la composition des eaux usées peuvent entraîner un changement dans la morphologie des filaments. Il faut également noter que certaines espèces ayant d'ordinaire une gaine entourant leur filament peuvent ne plus en avoir. En effet, les gènes permettant à la bactérie de la synthétiser sont parfois portés par des plasmides. Et en cas de perte de ces derniers, la bactérie perd sa faculté à synthétiser une gaine. Certaines espèces ont des caractéristiques morphologiques très proches et sont donc très difficiles à différencier. Certaines espèces peuvent exister sous forme de bactéries dispersées en plus de la forme filamenteuse. C'est le cas pour *Sphaerotilus natans*, *Microthrix parvicella* et *Thiothrix nivea* notamment (**Lacroix, 2008**).

2.4. Identification physiologique et biochimique :

Une série de tests physiologiques et biochimique sont utilisés par les taxonomistes sont retenues pour l'identification et la différenciation entre les différentes espèces des bactéries.

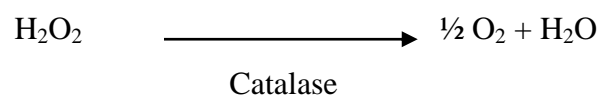
2.4.1. Mise en évidence du type respiratoire :

La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie consiste en la détermination du rapport de cette bactérie avec l'oxygène. Les bactéries ont des besoins respiratoires spécifiques, elles sont soit :

- Des bactéries aérobies strictes : Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration.
- Des bactéries anaérobies strictes : La présence de l'oxygène est toxique pour ces bactéries.
- Des bactéries aéro-anaérobies facultatives : La présence de l'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène.
- Des bactéries micro-aérophiles : Bactéries se développent sous une faible pression d'oxygène.
- Des bactéries anaérobies aéro-tolérantes : Bactéries se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu (**Meziani, 2012**).

2.4.2. Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé comme sous- produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



- L'apparition de bulles et un dégagement gazeux de dioxygène, ce qui indique que la bactérie possède une catalase (+). A l'inverse, l'absence des bulles et le dégagement gazeux indique que la bactérie ne possède pas une catalase (-) (**Figure 36**) (**Meziani, 2012**).

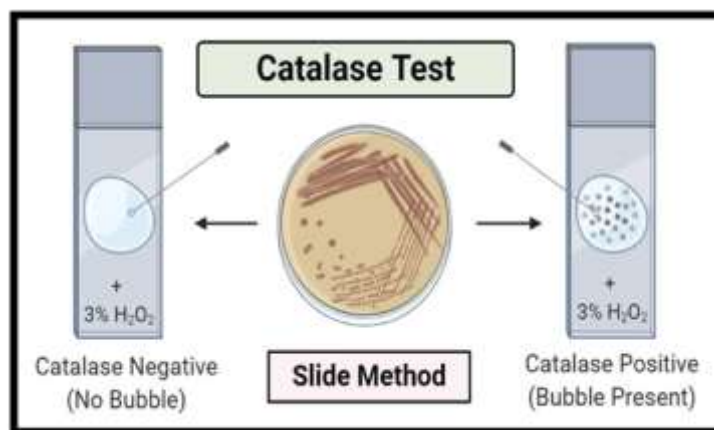


Figure 36: Principe de teste de catalase (site 2).

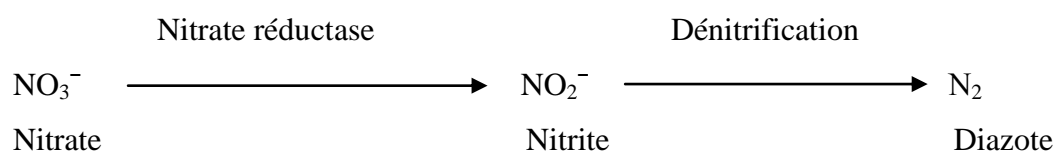
2.4.3. Recherche de l'oxydase :

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H_2O ou en eau oxygénée H_2O_2 .

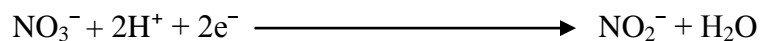
Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N, N, N, N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche de la cytochrome-oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés (Meziani, 2012).

2.4.4. Recherche de la nitrate-réductase :

La nitrate-réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon la réaction suivante :

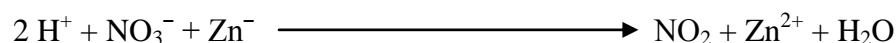


La nitrate-réductase réduit les nitrates jusqu'au stade nitrites selon :



Le réactif de Griess, prend une teinte rouge-orangé en présence d'ions nitrites, ce qui indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites. L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrates-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote N_2 et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tous les nitrates du milieu (**Meziani, 2012**).

Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites :



L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc ça signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase. A l'inverse, l'absence de coloration rouge indique qu'il n'y a plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc, donc la bactérie possède une nitrate-réductase très active qui a consommé tout les ions nitrates (**Meziani, 2012**).

2.4.5. Etude de la voie d'attaque des glucides :

Les bactéries utilisent les glucides suivant deux voies métaboliques :

- Une voie oxydative : en présence d'oxygène.
- Une voie fermentative : en absence d'oxygène, ou en faible tension d'oxygène.

Pour déterminer la voie d'attaque des glucides (glucose en particulier) par les bactéries à Gram négatif, (cas des entérobactéries) on utilise le milieu de Hugh et Leifson ou le milieu MEVAG. (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) (**Meziani, 2012**).

Ce milieu est additionné le plus souvent de glucose pour la détermination de la voie d'attaque de cet ose. Mais il peut aussi être préparé avec d'autres glucides (lactose, saccharose) pour étudier leur métabolisme par ces bactéries. Ce milieu contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose) qui libère des acides et éventuellement des gaz (**Meziani, 2012**).

Il vire au jaune en milieu acide, sinon il conserve la couleur verte du milieu où il vire au bleu en cas d'alcalinisation. Donc à la fin de l'incubation, on observe le changement de couleur du milieu pour déterminer le type oxydatif ou fermentatif (**Meziani, 2012**).

2.4.6. L'hydrolyse de l'amidon :

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble. Après 10 jours d'incubation à 30°C, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'absence de la coloration autour des colonies. A l'inverse, les autres zones du milieu qui contiennent l'amidon, elles se colorent en brun (**Kitouni, 2007**).

2.4.7. La dégradation de l'urée :

Ce test est basé sur l'ensemencement de suspension d'actinobactérie dans le milieu contenant le rouge de phénol et l'incubation pendant 7 à 10 jours à 30°C. Ces milieux prennent une teinte rouge si l'urée est dégradée cela signifie que les souches possèdent des enzymes uréases (**Guiraud, 1998**).

2.4.8. L'utilisation de citrate :

Ce test détermine la capacité d'un microorganisme à utiliser le citrate comme la seule source de carbone. Des cultures des différents isolats sur milieu citrate de Simmons sont incubées à 30°C et observées quotidiennement pendant 14 jours. La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage du bleu de bromothymol à sa teinte basique (**Guiraud, 1998**).

2.4.9. Les réactions Voges-Proskauer « VP » et Rouge de Méthyle « RM » :

Les différentes colonies des isolats ont été ensemencées à part dans des tubes contenant un milieu liquide Clark et Lubs, puis incubées à 30°C durant 7 à 10 jours. Après incubation, deux réactions de colorations doivent être faites pour mettre en évidence la voie de fermentation du glucose (la voie du butane diol et la voie acides mixtes) (**Guiraud, 1998**).

➤ Réaction au RM :

On ajoute 1 à 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 0,5% préparée dans l'alcool 60° à 2 ml du milieu. L'obtention d'une coloration rouge du milieu, correspondant à la fermentation acide mixte par acidification (un pH inférieur à 4,2) d'un milieu glucosé après fermentation du glucose, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative (**Guiraud, 1998**).

➤ **Réaction de VP :**

On Ajoute 0,5 ml d'une solution d' α -naphtol alcoolique à 6% et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16% à 1 ml du milieu de culture tube. On agite fortement et attende 15 minutes. L'apparition d'une coloration rouge, indiquant la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone), est considérée comme positive (**Guiraud, 1998**).

2.4.10. Hydrolyse de la gélatine :

Les bactéries sontensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% de gélatine, ensuite, incubées à 30°C. L'observation des zones claires autour des colonies correspondent à l'hydrolyse de la gélatine (**Chaphalkar et al., 1996**).

2.4.11. Recherche d'une Caséinase :

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur un milieu gélosé riche en lait écrémé. L'ensemencement des isolats à tester est réalisé par des stries et incubé à 30°C. Après 7 jours, l'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine (**Roy et al., 2014**).

2.4.12. Recherche d'une lécithinase :

Un milieu gélose à base de lécithines est utilisé pour tester les différents isolats afin de mettre en évidence leurs capacités à dégrader cette substance par la lécithinase produites par les souches. L'ensemencement des isolats à tester est établi par des stries, puis incubée à 30° C (**Raval et al., 2012**).

Le jaune d'œuf utilisé dans le milieu de culture est un substrat composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine. Il permet donc de rechercher trois enzymes en même temps :

➤ **La lécithinase** : se traduit par l'apparition d'un halo opaque, blanc perlé jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à sa limite.

➤ **La lipase** : est indiquée par l'apparition d'un halo blanc perlé huileux et brillant.

La lipoprotéinase : se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (**Raval et al., 2012**).

2.5. Méthodes d'identification moléculaires :

Face aux difficultés et aux erreurs pouvant être induites par la méthode d'identification classique, les chercheurs ont développé à partir des années 90 des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire. Ces techniques s'appuient sur l'analyse de l'ADN et/ou de l'ARN des bactéries. La cible qui est choisie afin de caractériser au mieux la complexité de la communauté bactérienne, est l'ARNr 16S (**Lacroix, 2008**).

2.5.1. Le marqueur moléculaire ADNr 16S :

Parmi différents marqueurs génétiques possibles, l'ADNr codant pour l'ARN ribosomique s'est avéré comme la cible moléculaire de choix pour les études écologiques. Ces séquences existent dans tous les organismes, avec une fonction conservée de part leur rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule : le codage de l'ARNr qui compose les ribosomes, structure responsable de la synthèse des protéines (**Martins, 2012**).

Parmi ces gènes, l'ADNr 16 S est le plus utilisé. Cette molécule possède le double avantage d'être très abondante et conservée. Mais elle possède également dans sa séquence des régions variables, caractéristiques de chaque espèce ou genre bactérien. Elle permet donc de pouvoir comparer des espèces dans un même domaine, mais aussi de pouvoir différencier les différentes souches d'une même espèce (**Martins, 2012**).

2.5.2. Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) :

La PCR 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 (**Podglajen, 2007**).

- **Le principe :**

Cette technique utilise *in vitro* la capacité de répllication de l'ADN que possède l'enzyme ADN polymérase, afin de produire des milliards de copies d'un fragment d'ADN cible afin de mettre en évidence sa présence ou son absence dans l'échantillon d'ADN, et ce même s'il n'est présent qu'en infime quantité. L'ADN polymérase a pour rôle de dupliquer le matériel génétique de la cellule lors de la division cellulaire (**Lacroix, 2008**).

In vivo, cette enzyme est associée à de nombreuses autres enzymes qui permettent notamment d'ouvrir le double brin d'ADN et de le stabiliser. *In vitro*, il serait délicat de recréer cette coopération moléculaire, et la séparation des deux brins de la molécule d'ADN est provoquée par chauffage à une température proche de 95°C (**Figure 37**). La nécessité de travailler à de telles températures a conduit à sélectionner un type particulier d'ADN polymérase (**Lacroix, 2008**).

La plus connue a été purifiée à partir d'une espèce bactérienne thermophile nommée *Thermus aquaticus* et dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C. Cette enzyme, souvent désignée sous le terme de Taq polymérase, peut donc supporter des températures identiques à celles utilisées pour dénaturer la structure secondaire de l'ADN sans que cela n'altère pour autant son activité. D'autres ADN polymérases capables de travailler à haute température ont été découvertes. De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes et ont largement été modifiées afin de les rendre plus efficaces et d'augmenter leur fidélité, c'est-à-dire diminuer les erreurs commises lors de la synthèse du brin d'ADN complémentaire (**Lacroix, 2008**).

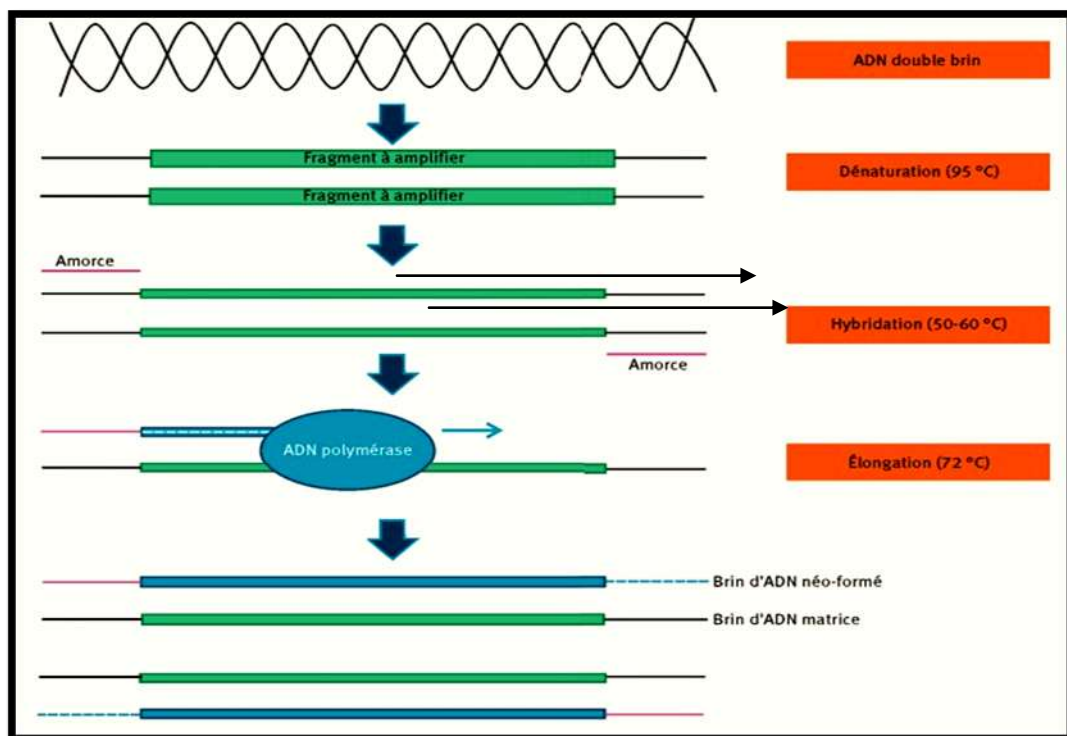


Figure 37: Le principe de la PCR (**Juzan et al., 2012**).

➤ **Conditions de la PCR :**

Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN en utilisant des amorces spécifiques (**Tableau n°9**) et une enzyme de polymérisation la «Taq polymérase» en présence de dNTP et de MgCl₂ dans un tampon PCR. La PCR peut être faite dans un thermocycleur selon le programme indiqué dans le **Tableau n°8**. La température d'hybridation et le nombre de cycles sont ajustés selon la longueur de l'amplifiat le T_m (melting temperature) et la nature des amorces utilisées (**Heddadji, 2015**).

Tableau n° 8 : Programme PCR utilisé pour l'amplification de fragments d'ADN.
(**Heddadji, 2015**).

Étape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale de l'ADN	94°C	5 min	1 cycle
Dénaturation d'ADN	94°C	30 s	
Hybridation des amorces sur le brin d'ADN (°C)	55°C -60°C	30 s	40 cycles
Elongation	72°C	30 s	
Elongation finale	72°C	10min	1 cycle

Tableau n° 9 : Amorces de PCR utilisées pour bactéries filamenteuses (**Lacroix, 2008**).

Dénomination.	Cible	Séquence (5'-3')	Long	T _m °C
16S sna 1 FP	S natans	AACGAAGAACGCGTGAAGTT	20	59,9
16S sna 1 RP	S natans	ATGCAGCACCTGTGTTCTGA	20	60,5
16S sna 2 FP	S natans	CCGCAAGTGAAACTCAAAGGAATTG	25	59.6
16S sna 2 RP ADNr 16S	S natans	GCACCTGTGTTCTGATTCTCTTTCG	25	60.4

➤ **Les étapes de la PCR :**

Pour avoir une répllication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

- **La dénaturation :** cette étape s'effectue à 95°C et consiste à ouvrir la double hélice d'ADN et à n'obtenir que des simples brins.

- **L'hybridation** : cette phase permet l'hybridation des amorces d'ADN. Ce sont de courtes séquences d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Et comme leur nom l'indique elles vont permettre à l'ADN polymérase d'amorcer sa réaction de synthèse de l'ADN.

Pour permettre cette hybridation, la température est ramenée à une valeur comprise entre 55 et 65°C, et dépend de la valeur de la température de fusion de l'amorce. La température d'hybridation choisie y est généralement inférieure d'environ 5°C (**Lacroix, 2008**).

- **L'élongation** : c'est durant cette phase que l'ADN polymérase va procéder à la synthèse des nouveaux brins d'ADN. L'enzyme va se fixer à l'extrémité 3' de l'amorce et créer le brin complémentaire au simple brin d'ADN. La température optimale de fonctionnement d'une Taq polymérase est généralement de 72°C. La durée de cette étape dépend de la longueur du brin d'ADN à synthétiser (**Lacroix, 2008**).

Après PCR, les amplifiés obtenus sont visualisés sur gel d'agarose par l'électrophorèse. Cette dernière a pour but de séparer les fragments d'ADN, de vérifier leur qualité et de déterminer leur taille (**Harrir, 2018**).

2.5.3. Clonage de l'ARNr 16S :

Cette méthode implique une extraction d'ADN à partir de boues, suivie d'une amplification à l'aide d'amorces universelles puis d'un clonage des gènes codant pour l'ARNr 16S des différentes souches bactériennes, la création de banques d'ARNr 16S et enfin un séquençage des produits de clonage. L'identification des microorganismes est ensuite réalisée en comparant les séquences ainsi obtenues à des bases de données. Actuellement, environ 700000 séquences d'ADNr 16S sont disponibles sur la base de données du NCBI (septembre 2007). Les séquences des différentes bactéries filamenteuses étant maintenant connues, elles sont facilement détectables et identifiables par cette méthode (**Lacroix, 2008**).

Cependant, cette technique nécessite beaucoup de temps, en particulier l'étape de clonage indispensable lorsque l'on travaille dans une matrice complexe telle que des boues activées. Cette technique est donc peu adaptée à l'analyse d'échantillons en grand nombre (**Lacroix, 2008**).

2.5.4. Séquençage de gène de l'ARNr 16S :

Le séquençage de l'ADN est une technique d'analyse de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Actuellement la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de Sanger (**Faugier, 2010**).

Cette méthode est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN complémentaire (arrêt d'élongation). L'ADN génomique est fragmenté, puis cloné dans un vecteur plasmidique et transformé dans *E. coli*. Pour chaque réaction de séquence une colonie bactérienne est utilisée et son ADN plasmidique isolé. Chaque cycle de séquençage a lieu à l'intérieur de micro-volume, générant plusieurs tailles de séquence d'ADN terminées par un ddNTP, qui sont séparées par électrophorèse à haute résolution à l'aide d'un séquenceur de 96 ou 384 capillaires. Les fragments de différentes tailles marqués par fluorescence passent devant un détecteur, les 4 canaux des spectres d'émissions sont utilisés pour obtenir les traces du séquençage (**Figure 38**). L'électrophorèse simultanée dans 96 ou 384 capillaires indépendants permet l'analyse simultanée de peu d'échantillons. Après beaucoup d'améliorations la technique de Sanger peut être appliquée pour déchiffrer des séquences jusqu'à environ 1 000 pb avec une précision par base de 99.999 % (**Faugier, 2010**).

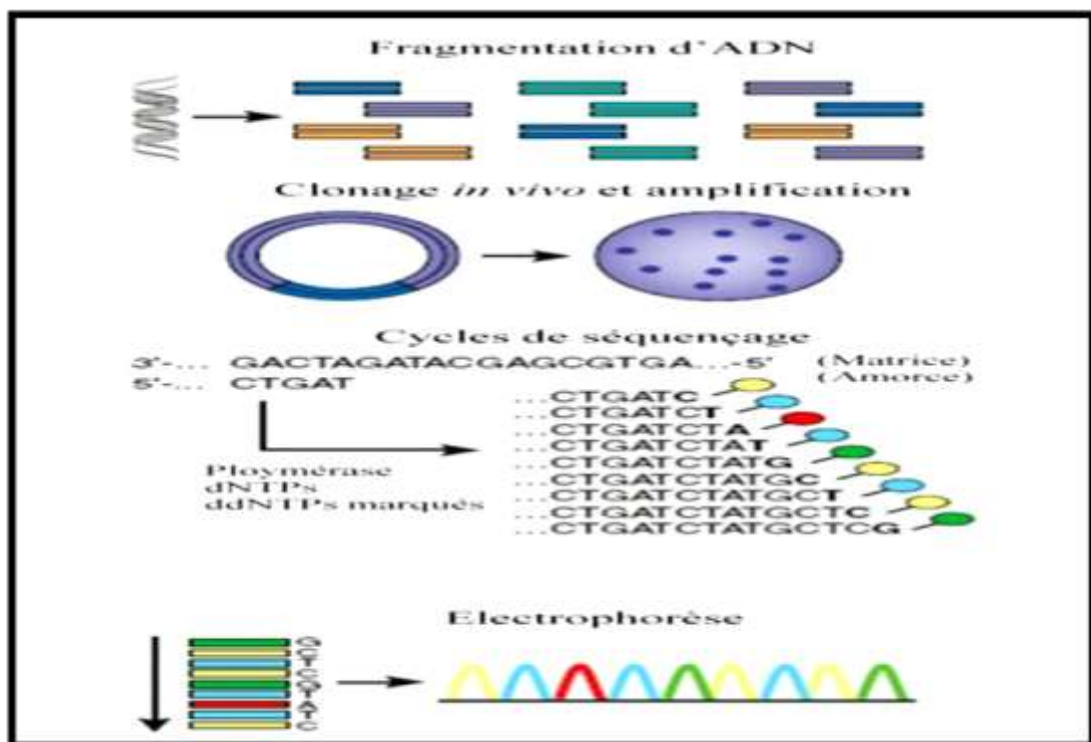


Figure 38: Le principe de séquençage (**Faugier, 2010**).

2.5.5. Hybridation *in situ* de sondes fluorescente (FISH) :

Une des caractéristiques intéressantes inhérente à cette technique est qu'elle permet d'intervenir sur une communauté microbienne sans en modifier la structure, ceci permettant d'obtenir des informations sur l'organisation générale du système.

Cette technique permet également de quantifier des bactéries directement dans leur environnement sans les avoir préalablement cultivées (**Lamriri, 2000**).

Le principe est le suivant, sur un support (biofilm) les cellules entières sont traitées par du paraformaldehyde. Ces cellules ainsi fixées et perméabilisées sont exposées à une sonde, souvent un oligonucleotide, qui a été marquée par un agent fluorescent tel que la fluorescéine (**Tableau n°10**). La sonde ADN se lie à la séquence ADN ou ARN qui lui est complémentaire à l'intérieur de la cellule. Ainsi grâce à cette méthode, il est possible de détecter via l'utilisation d'un microscope à épifluorescence les bactéries qui contiennent la séquence complémentaire qui s'est hybridée à la sonde (**Figure 39**) (**Lamriri, 2000**).

La méthode FISH peut donc permettre de marquer, détecter, et quantifier des bactéries dans de nombreux environnements, et ceci sans avoir à les cultiver. L'intensité de marquage est plus importante si les sondes ciblent des ARNr. Quelques réserves toutefois, car les résultats obtenus avec cette technique sont souvent inférieurs à ceux obtenus avec des techniques classiques de culture en plaque, car l'intensité de marquage des bactéries cibles dépend de la perméabilité de celles-ci à la sonde, et également de son activité si les sondes ciblent des ARNr (**Lamriri, 2000**).

Tableau n° 10 : Sondes oligonucléotidiques pour les bactéries filamenteuses (**Pandolfi, 2006**).

sondes	Séquences (5'-3')	Bactéries
LDI	CTCTGCCGCACTCCAGCT	<i>Leptothrix</i>
MPA60	GGATGGCCGCGTTCGACT	<i>Microthrix parvicella</i>
TNI	CTCCTCTCCCACATTCTA	<i>Thiothrix</i>
SNA	CATCCCCCTCTACCGTAC	<i>Sphaerotilus natans</i>
21N	TCCCTCTCCCAAATTCTA	<i>Eikelboom type 021N</i>
MNP1	TTAGACCCAGTTTCCCAGGCT	<i>Nocardiaforme</i>
HHY	GCC TAC CTC AAC CTG ATT	<i>H. hydrossis</i>
ACA652	ATC CTC TCC CAT ACT CTA	<i>Type 1863</i>
NLIMI 91	CGC CAC TAT CTT CTC AGT	<i>N. limicola I</i>

Procédure :

Cette technique nécessite :

- Tampon d'hybridation ;
- Tampon de lavage ;
- Solution de PBS ;

1) Fixation de l'échantillon :

- Mélanger un volume de boues avec 1 volume d'éthanol à 97 % et laisser 16 heures à 4°C. **(Figure 39)**. On Centrifuge à 5000g et enlève le surnageant. Le culot est lavé avec un volume de PBS et le remet dans un volume de PBS. On Ajoute un volume d'éthanol froid à 97% et mélanger et bien homogénéiser et prend 5 µl de solution et étaler sur une lame de microscope. Ensuite, Faire le Séchage de la lame avec une source de chaleur douce et Déshydrater la lame dans de l'éthanol à 50, 70, 90% pendant 3 minutes. Enfin, Attendre que la lame soit sèche.

2) La Perméabilisation :

Elle peut être réalisée de plusieurs manières :

- Soit avec de l'acide chlorhydrique : Récupérer la lame et ajouter 20 µl HCL à 1 mol/L, incubé à 48 °C pendant 50 minutes.
- Soit avec la mutanolysine (5000 U 20 µL 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.

3) L'Hybridation :

- Mettre 1 µL de sonde et 8 µL de tampon d'hybridation sur la lame et la recouvrir. L'introduire dans une boîte de Pétri fermée et incubé 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 grossissement γ de 100X (**Pandolfi, 2006**).

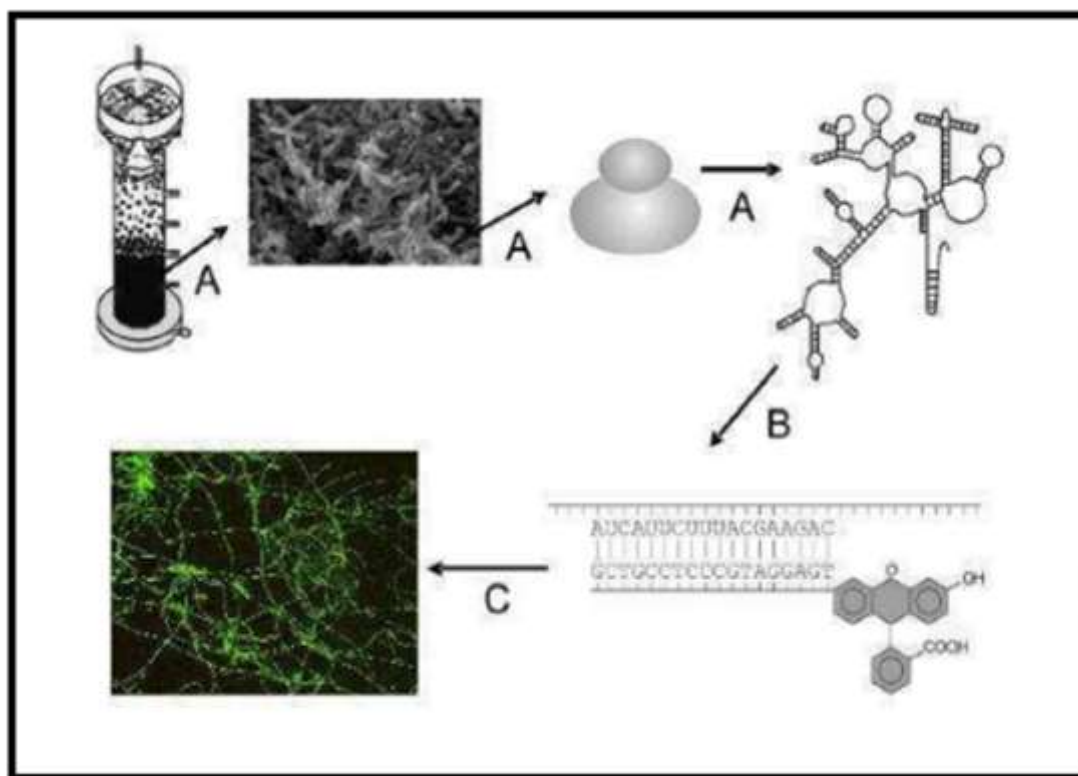


Figure 39: Schéma général du principe de la technique FISH (Lacroix, 2008).

2.5.6. Colorations immunofluorescentes :

Les techniques d'immunofluorescence utilisées sur 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 (Pandolfi, 2006).

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. 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 (Pandolfi, 2006).

2.5.7. Techniques d'empreinte moléculaires pour la caractérisation des communautés :

Les techniques d'empreinte moléculaire sont des méthodes couramment utilisées en écologie microbienne, visant la caractérisation de communautés microbiennes. Son principe repose sur l'analyse des profils obtenus, eux-mêmes fonction de l'information génétique spécifique à un échantillon (Martins, 2012).

Ces méthodes impliquent l'amplification d'un gène ou marqueur moléculaire cible, qui doit être ubiquitaire à la communauté à étudier, mais qui doit porter une variabilité taxonomique permettant la différenciation des espèces. Les amplifiats sont ensuite traités de façon à pouvoir être distingués, illustrant ainsi la diversité sous forme d'un profil. La comparaison de ces profils permet d'évaluer des changements structuraux et de diversité d'une communauté donnée (Martins, 2012).

Les différentes techniques développées se différencient par les principes de séparation de l'ADN, qui peut être basés soit sur la taille des fragments amplifiés, soit sur leur constitution ou conformation secondaire. On peut citer par exemple : DGGE/TGGE (Denaturing or Temperature Gradient Gel Electrophoresis), la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), la SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), l'ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) et la l'ARISA (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis) (Martins, 2012).

2.5.7.1. Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant (DGGE) :

La technique de DGGE est très certainement la plus répandue en ce qui concerne l'étude des populations microbiennes. Son principe relativement simple est basé sur la mobilité différentielle de fragment d'ADN de même taille, mais de séquences nucléotidiques différentes. L'ADN de l'échantillon est extrait puis une portion du gène de l'ARNr 16S est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces universelles. Les molécules d'acides nucléiques ainsi obtenues migrent sur un gel de polyacrylamide où elles rencontrent des concentrations croissantes d'agents dénaturants (Urée + Formamide). La dissociation transforme le fragment d'ADN en une structure partiellement ouverte et crée une diminution brutale de sa mobilité, qui conduit l'ADN à se concentrer en un point du gel. La migration des molécules est de ce fait très dépendante de la séquence et en particulier de sa composition en AT et GC (Figure 40) (Lacroix, 2008).

Le nombre de bandes ainsi obtenu sur le gel correspond aux espèces bactériennes dans l'échantillon. En association avec le séquençage des bandes ainsi obtenues et une analyse phylogénétique, cette méthode donne un très bon aperçu de la diversité de la communauté microbienne. En créant un référentiel à l'aide de souches pures, il est possible par la suite d'identifier et de suivre l'évolution de certaines espèces dans des environnements complexes (Lacroix, 2008).

Cependant cette technique n'est pas exhaustive et est plutôt destinée à mettre en évidence les membres dominants de la population bactérienne considérée. Elle est également tout à fait adaptée au suivi de l'évolution dynamique d'une population, comme par exemple les bactéries filamenteuses (Lacroix, 2008).

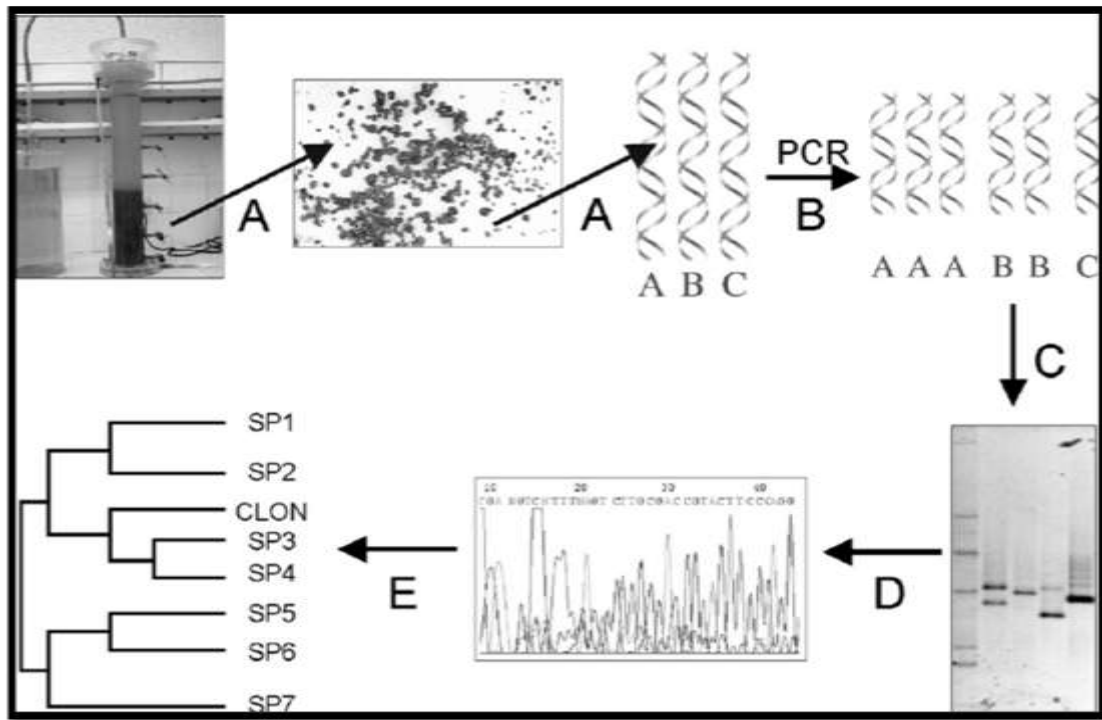


Figure 40: Le principe de la DGGE (Lacroix, 2008)

2.5.7.2. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) :

Le principe de l'analyse d'une population par TTGE est le même que celui de la DGGE. Le gel ne présente plus de gradient de dénaturant, mais un gradient de température au cours de la migration des molécules (Lacroix, 2008).

2.5.7.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction(RFLP)/ Analyse par restrictions enzymatiques du polymorphisme de séquence d'ARNr amplifiées par PCR (ARDRA) :

La RFLP aussi connue sous le nom d'ARDRA est une autre méthode reposant sur le polymorphisme de fragments d'ADN utilisée pour l'étude des structures des communautés microbiennes. La région d'intérêt est amplifiée à l'aide d'amorces à partir de l'ADN extrait d'un échantillon, les fragments obtenus sont digérés par une enzyme de restriction appropriée (Faugier, 2010).

On obtient alors des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les individus. Cette différence de taille est due à une différence du nombre de sites de restriction qui varie selon les individus, l'ADN à analyser étant alors fractionné en fragments de taille plus ou moins importante révélant alors le polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par une électrophorèse en gel d'agarose. Une espèce peut ainsi être caractérisée par 4 à 6 fragments de restriction dans la zone ciblée (Faugier, 2010).

2.5.7.4. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux (T-RFLP) :

Cette technique est basée sur le même principe que la RFLP, mis à part le fait que l'une des amorces est marquée avec un colorant fluorescent. Ceci permet seulement la détection des fragments de restriction terminaux marqués, simplifiant le profil des bandes. Cette méthode permet l'analyse de communautés complexes en fournissant des informations sur la diversité puisqu'une bande représente une seule OTU (Lacroix, 2008).

2.5.7.5. Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins (SSCP) :

Dans cette technique, la région d'intérêt du gène 16S ADN_r est amplifiée à partir d'une solution 'ADN extraite d'échantillons environnementaux à l'aide d'amorces marquées radioactivement. Les produits PCR sont ensuite soumis à une dénaturation. Les ADN en conformation simple brin présentent une certaine mobilité dans un gel de polyacrylamide non dénaturant. Cette mobilité spécifique est due à la conformation spatiale de l'ADN simple brin qui résulte de la formation de liaisons hydrogènes et électrostatiques essentiellement au sein des structures primaires qui aboutissent à la formation des structures secondaires-tertiaires de l'ADN (Martins, 2012).

Comme dans la technique précédente des profils de bandes d'ADN sont générés et permettent de se rendre compte de la diversité des gènes ribosomiques donc des bactéries présentes dans l'échantillon étudié. Ici encore des biais peuvent survenir liés au fait qu'un ADN simple brin peut avoir plus d'une conformation stable. De ce fait une même séquence d'ADN peut être représentée sur le gel d'agarose par plus d'une bande (Martins, 2012).

2.5.7.6. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) / Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) :

Cette technique est basée sur l'amplification par PCR de la région IGS (intergenic spacer) située entre les sous unités ribosomales 16SrDNA et 23SrDNA, région d'ADN présentant une variabilité de taille et de séquences entre individus supérieure à celle des gènes, pouvant alors différencier des espèces très proches. Les produits générés, de différentes tailles sont alors séparés sur gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes (**Harrir, 2018**).

2.5.7.7. Avantages et inconvénients des techniques d'empreintes moléculaires :

Ces techniques d'empreintes moléculaires se sont révélées efficaces pour l'analyse comparative des structures des communautés microbiennes. Elles présentent plusieurs avantages, étant indépendantes de la culture *in vitro*, hautement reproductibles, robustes et permettent d'étudier rapidement la structure des communautés bactériennes (**Harrir, 2018**).

Mais elles comportent également des biais, ces méthodes basées sur une étape d'amplification, sous-estiment la diversité, car seules les espèces numériquement dominantes sont détectées. Un problème majeur est donc le manque de sensibilité de ces techniques qui ne couvrent que les 100 à 200 bactéries les plus représentées. Ces techniques ne répondent pas généralement directement aux questions concernant la richesse ou l'abondance relative des OTU (unité taxonomique opérationnelle) à moins que les bandes ne soient extraites du gel et l'ADN séquencé. Ces méthodes d'empreintes moléculaires sont donc généralement inefficaces pour fournir l'identité taxonomique des bactéries impliquées. La T-RFLP est celle parmi les méthodes d'empreintes moléculaires qui offre la meilleure résolution taxonomique, potentiellement capable de l'identification de classes. Comme déjà mentionné, l'association à la nomenclature taxonomique de chaque groupe peut être effectuée par séquençage, après une étape d'extraction et de purification de chaque bande, et n'est donc pas très adaptée pour des grandes études comparatives telles que le suivi environnemental (**Harrir, 2018**).

2.5.8. Analyses par Microarray ou puce à ADN :

Le concept des puces à ADN, aussi désigné sous le terme de biopuce ou Microarray, est né dans les années 90. Il repose sur une technologie pluridisciplinaire intégrant la micro-électronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image et la bioinformatique (**Lacroix, 2008**).

Le principe des Microarrays est basé sur l'hybridation des acides nucléiques (**Figure 41**) d'une part des oligonucléotides spécifiques des espèces cibles sont fixés sur un support solide (matrice) et forment des spots. D'autre part des ADN de ces mêmes souches cibles sont digérés par des enzymes de restriction et marqués à l'aide d'un fluorochrome. Les ADN extraits de l'échantillon à analyser sont digérés de la même façon et marqués à l'aide d'un autre fluorochrome émettant à une longueur d'onde différente. Les ADN de référence et de l'échantillon sont ensuite mis en contact avec les oligonucléotides fixés sur la puce. La présence des bactéries d'intérêt dans l'échantillon est révélée en analysant l'intensité de fluorescence correspondant à chacun des fluorophores pour chaque spot (**Lacroix, 2008**).

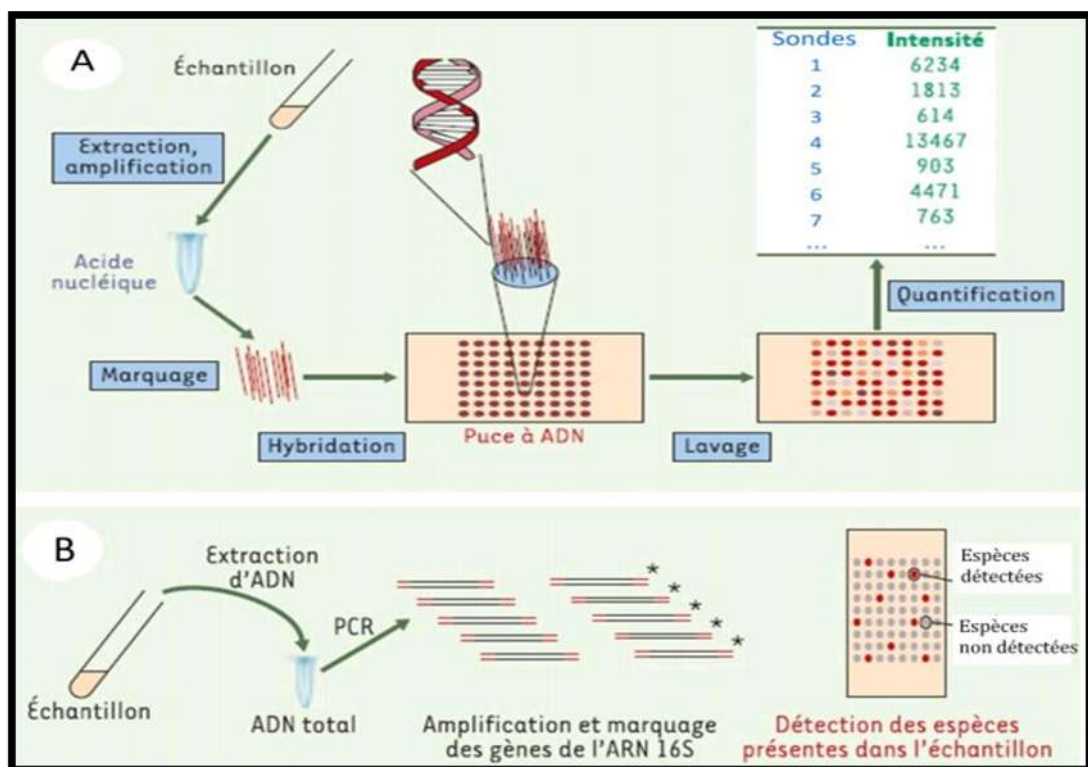


Figure 41: Principe de la puce à ADN ou Microarray (**Faugier, 2010**).

Conclusion

Les bactéries filamenteuses sont des micro- organismes très ubiquitaires dans différentes niches. Elles sont les responsables de la plupart des dysfonctionnements d'ordre biologique des stations d'épuration à boues activées tel que le foisonnement filamenteux, le moussage et la croissance dispersé. Ils peuvent avoir de graves répercussions sur la qualité des effluents rejetés dans les milieux aquatiques et sur la gestion économique des stations. Il existe une grande variété de bactéries filamenteuses, les plus abondantes sont les *actinomycètes* tels que *Microthrix. parvicella* et *Sphartilus. natans*.

Il existe des méthodes d'identification classiques tels que : Les examens macroscopiques et microscopiques et les tests biochimiques. Mais, face aux difficultés et aux erreurs pouvant être induites par ces méthode, les chercheurs ont développé des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire. Ces dernières s'appuient sur l'analyse de l'ADN et/ou de l'ARN des bactéries est ce qui suit : PCR, Clonage de l'ARNr 16S, Séquençage de gène de l'ARNr 16S, FISH, Colorations immunofluorescences et les techniques d'empreintes moléculaires comme : DGGE, TTGE, RFLP, ARDRA, T-RFLP, SSCP, RISA, ARISA, Analyses par microarray ou puce à ADN.

Références bibliographiques

Bakdi K. et Lounis A., 2016. Evaluation de l'activité antimicrobienne et de la capacité de production enzymatique des Actinomycètes. Mémoire de Master en Biotechnologie Microbienne. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 104 p.

Belyagoubi L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd de Tlemcen. 146 p.

Sidi Baba A. et Bent-Mohamed A., 2007. Manuel de travaux pratiques de microbiologie. Département de biologie. Université de Nouakchott, 18 p.

Bouزيد D., 2019. Cour de microbiologie générale. Université Ferhat Abbas de Sétif, 46 p.

Canler J.P., 2005. Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines et solutions. Document technique FNDAE, n° 33. France, 107 p.

Canler J.P., Perret J.M., Duchéne P. et Cotteux E., 1999. Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées. QUAE édition, France, 155 p.

Chaphalkar S.R. et Dey S., (1996). Computer assisted identification of Streptomyces species with high extracellular protease activity. Actinomycete. 7(2): 47-54.

Damotta M., 2001. Applications de l'analyse d'image à la caractérisation de la microfaune de stations d'épuration des eaux usées. Thèse Doctorat en génie des procédés de l'institut national polytechnique de lorraine.

Djaballah CH., 2010. Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha d'Ain- Mlila. Mémoire de Magister en écologie microbienne. Université Mentouri de Constantine, 72 p.

Duhamel B., 1998. Les bactéries filamenteuses dans le traitement par boues activées. Document technique ENGREF. 11 p.

Durban N., 2015. Traitement du foisonnement filamentaire induit par *Microthrix parvicella* par ajout de sels métalliques : impact sur les boues activées. Thèse de Doctorat en Sciences de l'eau. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), 158p.

Eikalboom DH., 2000. Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. English Edition Publishing by I.W.A, 155p.

- Faugier A., 2010.** Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires « the rare biosphère ». Thèse de Doctorat. Ecole Centrale de Lyon-France, 157 p.
- Franck R., 2002.** Analyse des eaux, Aspects réglementaires et techniques. Edition Scérén CRDP AQUITAINE, Bordeaux, p165-260.
- Haddadji M., Kihal M., et Henni J., 2015.** Les méthodes moléculaires utilisées dans l'identification des microorganismes. Manuel de laboratoire. Université Oran 1, 205 p.
- Harrir M., 2018.** Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des soles arides et semi arides d'Algérie. Thèse de Doctorat en intérêt des microorganismes en agriculture et en agroalimentaire. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 174 p.
- Juzan L., Pernelle J.J. et Dabert P., 2012.** Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. Sciences Eaux & Territoires, INRAE, p76 -81.
- Kitouni M., 2007.** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes : identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse Doctorat en microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, 171 p.
- Lacroix S., 2008.** Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation de *Sphaerotilus natans*, bactérie modèle du foisonnement invasif en boues activées. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Parasitologie. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), 275p.
- Lamriri N., 2000.** Quantification bactérienne par technique de biologie moléculaire. Rapport de recherche bibliographique. CEMAGREF - UR QHAN, 23 p.
- Laurent F., Rodriguez-Nava V., Zoopoguy A., Blaha D., Couble A., Mouniée D. et Boiron P., 2008.** La nocardiose : une maladie en expansion. Antibiotiques 10 :115-127.
- Loucif K., 2011.** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes : caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne. Université Mentouri de Constantine, 115 p.
- Martins G., 2012.** Communautés microbiennes de la baie de raisin. Thèse de Doctorat en Ecologie. Université Bordeaux 2, 251 p.

Meziani M., 2012. Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Mémoire de Magister en Biochimie. Université Mentouri de Constantine, 68 p.

Pandolfi D., 2006. Caractérisation morphologique et physiologique de la biomasse des boues activées par analyse d'images. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés et des Produits. Institut National Polytechnique de Lorraine, 133 p.

Paris D., 1999. Etude microbiologique des boues activées d'un site papetier et biodégradabilité des résidus organiques des eaux épurées. Thèse de Doctorat en génie enzymatique, bioconversion, microbiologie. Université de Lille 1, 125 p.

Podglajen I. et Mainardi J., 2007. Apport des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic des endocardites infectieuses. Réanimation 16 :193–199.

Pujol R., Vachon A. et Martin G., 1990. Guide technique sur le foisonnement des boues activées. Document technique FNDAG, 8 p.

Raval (2012), Biotransformation of a single amino acid L-tyrosine into bioactive molecular L-DOPA. Int JSci; 2:2250-3153

Roy S, Das I, Munjal M, Karthinkl, Kumar G, Kumar S, and Rao RVB ., (2014). Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine anterobactéria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. Front. Biol.9(4): 306-316.

Saker R., 2015. Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Ferhat Abbas de Sétif 1. 174 p.

Sites Web :

1. <https://tte.afpa.free.fr/dossierstechniques/04%2520Microfaune%2520boues%2520activ%25E9es%2520des%2520pages%25202%2520%25E0%2520fin.pdf>
2. <https://www.google.com/search?q=principe+de+teste+catalase>.

Thème : *Les bactéries filamenteuses de la boue activée : origine et identification*

Résumé

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à l'étude des bactéries filamenteuses, en particulier dans les boues activées, concernant leurs origines et leurs identifications. Selon notre recherche, il s'avère que : les bactéries filamenteuses sont à l'origine de la plupart des dysfonctionnements d'ordre biologique des stations d'épuration à boues activées malgré leurs avantages. Il existe une grande variété de bactéries filamenteuses, les plus abondantes sont les actinomycètes tels que *Microthrix. parvicella* et *Sphartilus. natans*. Ces bactéries sont des micro- organismes très ubiquitaires dans différentes niches tels que le sol, l'air, l'eau douce et marines. Il existe des méthodes d'identification classiques. Mais, face aux difficultés et aux erreurs pouvant être induites par la méthode d'identification classique, les chercheurs ont développé des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire, qui est l'ARNr 16S comme une cible afin de caractériser au mieux la complexité de la communauté bactérienne filamenteuse.

Mots clés : bactéries filamenteuses, boues activées, origine, identification, biologie moléculaire.

Summary

In our work, we have been interested in the study of filamentous bacteria, especially in activated sludge, regarding their origins and identifications. According to our research, it turns out that: filamentous bacteria are at the origin of most of the biological malfunctions of activated sludge treatment plants despite their advantages. There is a wide variety of filamentous bacteria, the most abundant are *actinomycetes* such as *Microthrix. parvicella* and *Sphartilus. natans*. These bacteria are very ubiquitous microorganisms in different niches such as soil, air, freshwater and marine. There are classic methods of identification. But, faced with the difficulties and errors that can be induced by the classical identification method, the researchers have developed identification methods based on molecular biology, which is the 16S rRNA as a target in order to best characterize the complexity of the filamentous bacterial community.

Keywords: filamentous bacteria, activated sludge, origin, identification, molecular biology.

ملخص

في عملنا، كنا مهتمين بدراسة البكتيريا الخيطية، وخاصة في الحمأة المنشطة، فيما يتعلق بأصولها وتحديد هويتها. وفقا لبحثنا، اتضح أن: البكتيريا الخيطية هي في أصل معظم الأعطال البيولوجية لمصانع معالجة الحمأة المنشطة على الرغم من مزاياها. هناك مجموعة واسعة من البكتيريا الخيطية، والأكثر وفرة هي *actinomycetes* مثل ميكروثيريكس. بارفيسيللا و سبراتيلوس الناتان. هذه البكتيريا هي كائنات دقيقة في كل مكان جدا في منافذ مختلفة مثل التربة والهواء والمياه العذبة والبحرية. هناك طرق كلاسيكية لتحديد الهوية. ولكن، في مواجهة الصعوبات والأخطاء التي يمكن أن تسببها طريقة تحديد الهوية الكلاسيكية، طور الباحثون أساليب تحديد الهوية على أساس البيولوجيا الجزيئية، وهو rRNA 16S كهدف من أجل توصيف أفضل تعقيد المجتمع البكتيري الخيطي .

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الخيطية، الحمأة المنشطة، المنشأ، تحديد الهوية، البيولوجيا الجزيئية.

