

Démarrer une activité microscopie sur site

L'observation microscopique est un outil puissant qui permet d'anticiper un dysfonctionnement biologique et/ou d'en diagnostiquer les causes mais également d'orienter les stratégies d'exploitation et/ou les traitements curatifs.

La mise en place d'une activité microscopie sur site nécessite de s'équiper en conséquence. Un microscope, tout d'abord, mais aussi différents accessoires qui vont permettre de réaliser des observations dans de bonnes conditions. La présente fiche se veut un outil d'aide à la mise en place d'une telle activité, en abordant les aspects techniques, matériels et financiers d'une part, mais également les aspects pratiques.

1. Equipement nécessaire

1.1. Microscope

Pour réaliser l'observation microscopique des boues activées, il est indispensable d'utiliser un microscope à contraste de phase (fig. 1). Si l'on souhaite prendre des photos, il faut que le microscope soit trinoculaire, c'est-à-dire qu'il ait une sortie caméra/appareil photo. Le logiciel d'analyse d'images associé doit permettre de mesurer facilement la taille des micro-organismes observés car c'est un paramètre important dans l'identification de la microfaune et des bactéries filamenteuses.

Si l'on opte pour un microscope binoculaire, une réticulation dans l'un des deux oculaires doit permettre, grâce à une échelle de correspondance fonction de l'objectif utilisé, de déterminer la taille réelle de l'individu observé.

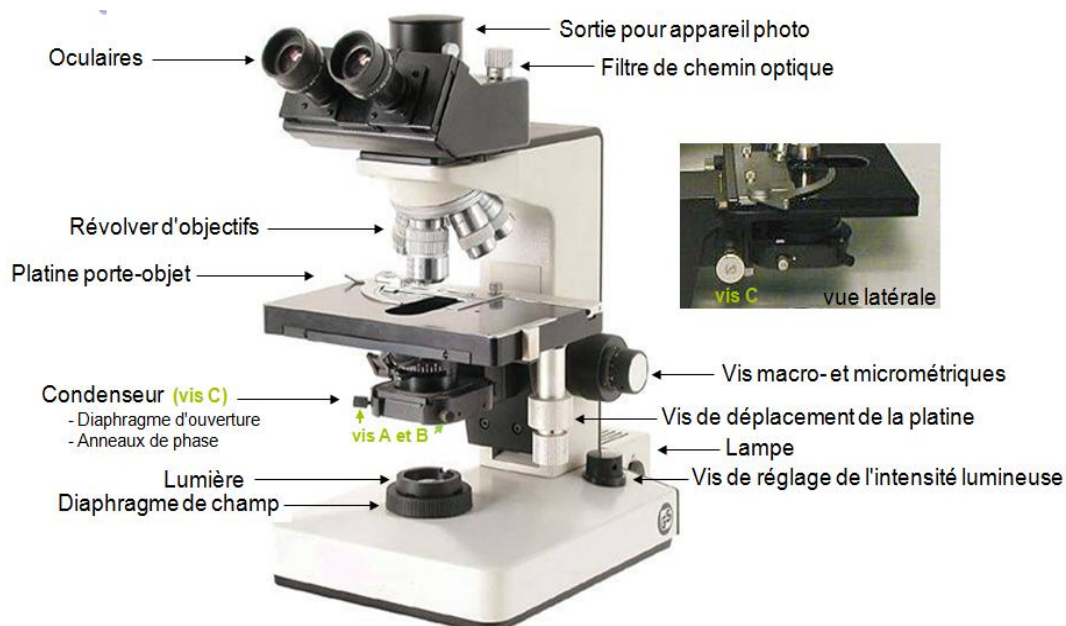


Figure 1 : Microscope trinoculaire à contraste de phase

Les objectifs indispensables sont les x10, x40 et x100, les autres objectifs peuvent tout à fait être acquis si besoin dans un deuxième temps. Ne pas oublier de prévoir dans le budget alloué au microscope une maintenance, dont la fréquence est fonction des conditions d'utilisation de l'appareil.

Les quatre principaux fournisseurs sont Zeiss, Leica, Olympus, et Nikon. Des microscopes sont également disponibles chez des fournisseurs de matériel de laboratoire tels que Fisher, VWR ou Dominique Dutscher. Dans tous les cas et quelque soit les besoins, ne pas hésiter pas à faire jouer la concurrence.

1.2. Accessoires

Pour pouvoir observer à l'état frais un échantillon de boues au microscope, il faut déposer une goutte de boues sur une lame en verre transparente, puis la recouvrir d'une fine lamelle (fig. 2). Différentes tailles de lamelles sont disponibles, elles peuvent être carrées ou rectangulaires. Une lamelle de dimension 22x40 permet d'observer une surface suffisante d'échantillon.

Pour réaliser les colorations de Gram et de Neisser, nécessaires à l'identification des bactéries filamenteuses, les lames à 8 puits sont pratiques car elles permettent d'avoir sur une même lame les différentes colorations des boues et des mousses (fig. 2). Les lames colorées se conservent plusieurs mois à 4°C dans une boîte de rangement adaptée, on peut ainsi les observer à nouveau si nécessaire. Les lames et lamelles souillées doivent être stockées dans un container dédié avant élimination.

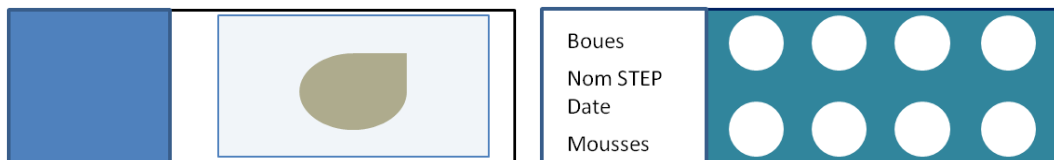


Figure 2 : Lames et lamelles pour l'observation microscopique

L'acquisition de petits flacons compte-gouttes simplifie grandement la réalisation des colorations, les solutions étant vendues dans des flacons de 250 à 500 ml. Les protocoles de coloration étant très rapides à réaliser, il est nécessaire d'avoir un minuteur avec secondes.

Les solvants utilisés dans les solutions de coloration sont plus ou moins toxiques selon les fournisseurs, il convient donc de lire avec attention la fiche de données de sécurité (FDS) associée à chaque réactif des kits de coloration, et de se protéger en conséquence (blouse, gants, lunettes de protection, signalisation des flacons par pictogrammes). Les conditions de stockage et d'évacuation particulières y sont également indiquées.

L'observation avec l'objectif x100 nécessite impérativement l'utilisation d'huile à immersion, qui permet d'augmenter la résolution de l'objectif.

Enfin, les objectifs doivent être nettoyés avec du papier optique exclusivement, afin d'éviter tout risque de rayure.

1.3. Entretien

Des conditions d'observation optimales impliquent une maintenance régulière du microscope avec notamment quelques réglages simples à vérifier, surtout si le microscope est amené à être déplacé.

- Centrage de l'éclairage (fig. 3.1)

- mettre au point une préparation avec l'objectif x10
- fermer le diaphragme de champ (fig. 1)
- centrer le point lumineux à l'aide des vis A et B (fig. 1)

- Réglage de Köhler (fig. 3.2)

- mettre au point une préparation avec l'objectif x10
- ouvrir au 1/3 - 1/2 le diaphragme de champ : obtention d'un polygone lumineux
- régler la netteté des bords du polygone en modifiant la hauteur du condenseur (vis C, fig. 1)
- ré-ouvrir le diaphragme de champ jusqu'au bord du champ visuel

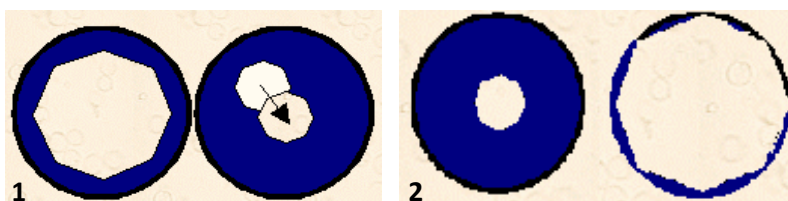


Figure 3 : Réglages à contrôler régulièrement : centrage de l'éclairage (1) et réglage de Köhler (2)
Source : www.agora.crosemont.qc.ca/urinesediments/docfr/doc_009.html

Le microscope est vendu avec une housse de protection, il est important de le protéger des poussières lorsqu'il n'est pas utilisé. Il faut également le placer sur une surface plane, sans autre appareil pouvant émettre des vibrations.

1.4. Coût

Le prix d'un microscope est très variable selon les besoins, le budget approximatif pour les accessoires est de 800 euros (tableau 1). En ce qui concerne la maintenance, le fournisseur du microscope dispose en général de différentes formules, ne pas hésiter là-aussi à faire jouer la concurrence, car il existe également des sociétés indépendantes qui peuvent réaliser ces prestations.

Tableau 1 : Coût de la mise en place d'une activité microscopie

Equipements	Prix
Microscope	2 000 – 15 000 €
Huile à immersion	30 €
Lames	2 – 12 € / 50
Lamelles	40 € / 1000
Lames à puits	80 € / 100
Boîte de rangement	7 – 20 €
Papier optique	180 € / 625
Solution Gram	80 € / 500 mL
Solution Neisser	50 € / 100 mL
Flacons compte gouttes	25-45 € / 25
Minuteur	7 – 30 €
Micropipette	200 €
Cônes	30 € / 1000

2. Protocole à suivre

Quelques microlitres de boues suffisent pour réaliser une observation microscopique, il est donc essentiel qu'ils soient représentatifs des milliers de mètres cube de boues du bassin d'aération. Pour cela, plusieurs conditions sont à respecter.

2.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Le prélèvement de boues se fait au niveau du bassin d'aération, après 15 min au moins d'aération/brassage et au niveau d'une zone correctement mélangée, afin que la boue du bassin soit homogène et garantisse ainsi la représentativité de l'échantillon prélevé. S'il y a des mousses en surface du bassin, il est impératif de ne pas les prélever avec l'échantillon de boues, pour cela l'idéal est d'utiliser une bouteille de prélèvement à clapets. Le volume à prélever est d'1 L dans une bouteille de 2 L (ou de 500 mL dans 1 L), afin de laisser de l'air pour la microfaune. L'échantillon de mousse doit être prélevé à part dans un petit flacon, quelques millilitres suffisent.

Pour une boue faible charge/aération prolongée, l'échantillon peut se conserver trois à quatre jours au réfrigérateur, le mieux étant bien sûr d'observer la boue le plus rapidement possible. Au-delà, certains micro-organismes peuvent se développer, et d'autres disparaître, la représentativité de l'échantillon n'est alors plus assurée.

La fréquence d'échantillonnage est généralement d'un prélèvement par âge de boues. La composition en micro-organismes des boues ne change pas du jour au lendemain, il est donc inutile en temps normal de faire une observation tous les jours. En revanche, lors d'un traitement curatif, une chloration par exemple, l'observation quotidienne des boues peut se révéler très efficace pour ajuster le dosage. On peut en effet constater l'efficacité du traitement en observant si les filaments sont abîmés et vérifier le bon état physiologique de la microfaune.

2.2. Observation microscopique

L'observation microscopique se fait en plusieurs étapes :

- 1^{ère} étape : observation à l'état frais

Une goutte de boues est prélevée à l'aide d'une pipette dont l'extrémité du cône est découpée afin de l'élargir et ainsi ne pas sélectionner les éléments à observer selon leur taille. L'observation se fait en contraste de phase, les organites intracellulaires et les contours des individus sont ainsi plus visibles (fig. 4). Il est conseillé d'observer au moins deux lames, et de procéder toujours de la même manière pour la lecture d'une lame : commencer en haut à gauche puis arrivé à l'extrémité droite, descendre et lire de droite à gauche, et ainsi de suite jusqu'à arriver en bas de la lame, afin de balayer toute sa surface. Le grossissement global tient compte de celui des oculaires et de celui de l'objectif : le grossissement des oculaires étant en général de 10, lorsque l'on utilise l'objectif x10, le grossissement obtenu est donc de 100 (10x10).

La mise au point se fait à l'objectif x10, il est utile pour caractériser les floccs (structure, forme, taille), le liquide interstitiel (présence de bactéries libres, de bactéries filamenteuses, de spirochètes, de débris divers) et la microfaune (espèces présentes, quantité, état physiologique) (voir photothèque). Les objectifs x20 et x40 peuvent se révéler utiles pour identifier plus précisément les espèces présentes. Ensuite, une première identification des bactéries filamenteuses est réalisée avec l'objectif x100 (granules de soufre intracellulaires, forme des cellules, mobilité du filament).

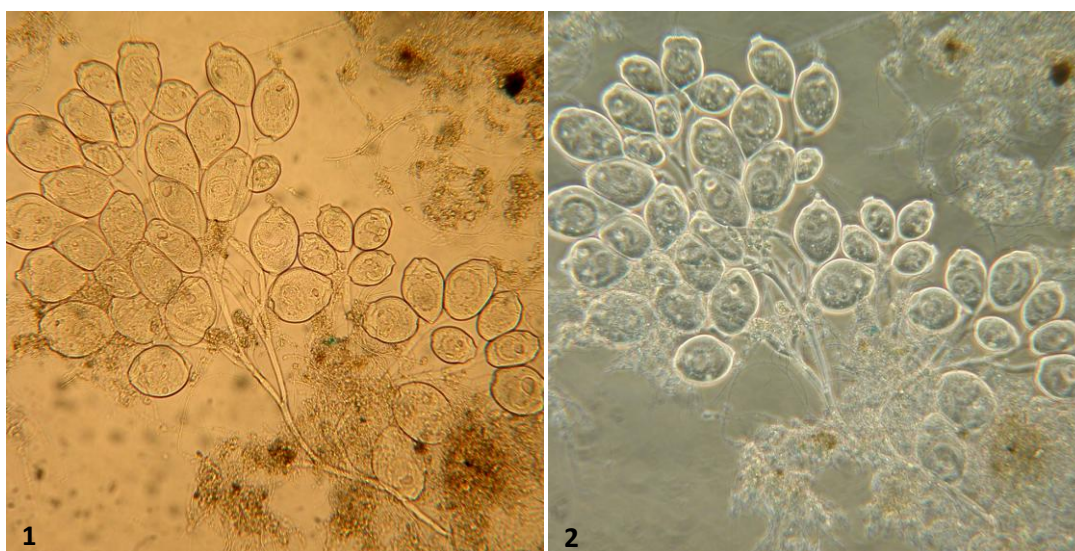


Figure 4 : Différents modes d'observation : lumière directe (1) et contraste de phase (2) (objectif x10)

- 2^{ème} étape : observation des colorations de Gram et Neisser

L'idéal est de déposer toujours le même volume d'échantillon (10 µl environ) sur chaque puits, afin de pouvoir comparer les colorations entre elles. Après séchage à température ambiante, les colorations de Gram et de Neisser sont réalisées en suivant le protocole du fournisseur choisi. L'observation se fait en lumière directe, avec l'objectif x100 (fig. 5).

L'identification des bactéries filamenteuses présentes se fait par l'observation de leurs réponses aux colorations et l'étude de leur morphologie, *via* l'utilisation de clés d'identification (cf. FNDAE N°33).

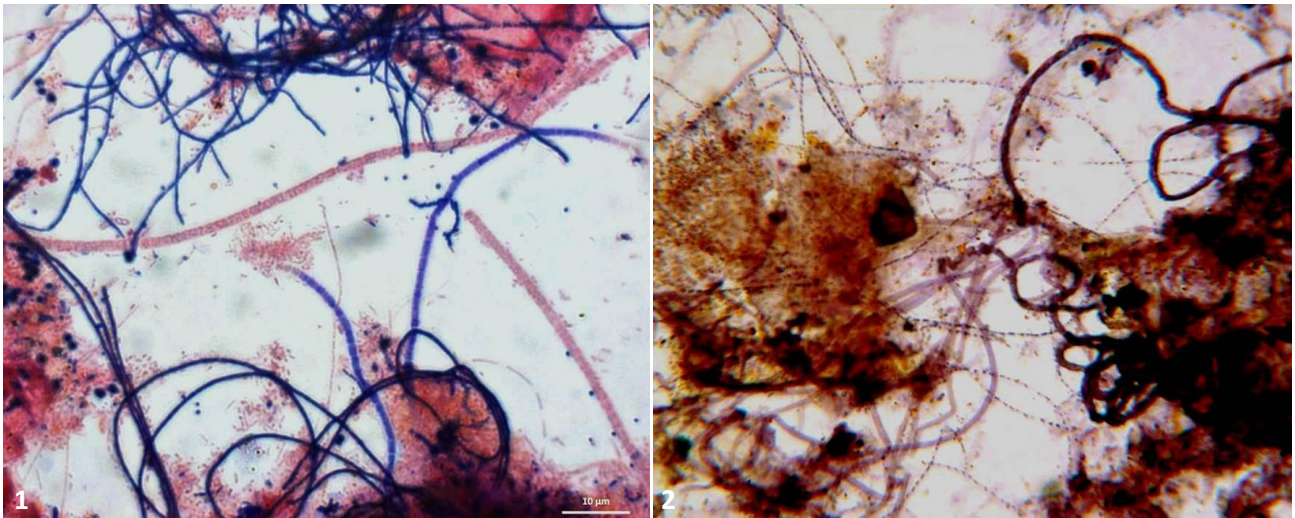


Figure 5 : Colorations de Gram (1) et de Neisser (2) de boues activées (objectif x100)

- 3^{ème} étape : réalisation de colorations complémentaires si nécessaire

- sulfite de sodium : mise en évidence des granules de soufre intracellulaires

Elle permet de mettre en évidence les granules de soufre intracellulaires de certaines bactéries filamenteuses, pas toujours visibles à l'état frais. Pour cela, il suffit de réaliser une solution à 1 g/L de sulfite de sodium et de la mélanger dans un tube avec de la boue (volume à volume, 0.5 mL suffisent), de laisser agir 15 minutes au noir puis d'observer (objectif x100, contraste de phase) (fig. 6.1).

- encre de Chine : mise en évidence de la production de mucilage (EPS : exopolysaccharides)

Elle permet de mettre en évidence une surproduction de mucilage par les bactéries du floc. L'encre de Chine va colorer le liquide interstitiel mais toutes les substances hydrophobes (donc les EPS) ne prendront pas la coloration et resteront blanches (objectif x10, lumière directe) (fig. 6.2).

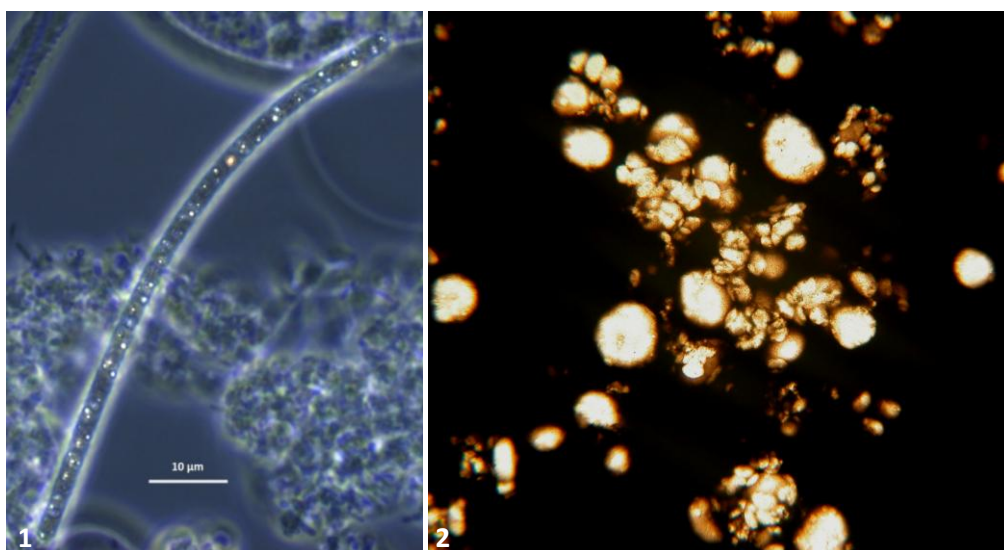


Figure 6 : Colorations complémentaires : sulfite de sodium (1) et encre de Chine (2)

[Pour aller plus loin](#)

A l'achat

- [En français](#)

- Canler, J-P. *et al.* (1999) Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées, Cemagref éditions.
- Vedry, B. (1996) Les biomasses épuratrices, AESN
- Drakides, C., (1994) μ -F Diagnostic, Creufop

- [En anglais](#)

- Eikelboom, D. H. (2000) Process control of activated sludge plants by microscopic investigation, IWA publishing.
- Jenkins, D., *et al.* (2004) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems, 3rd edition, CRC Press.
- Seviour, R. and Nielsen, P. H. (2010) Microbial ecology of activated sludge, IWA publishing

[Téléchargeable gratuitement \(http://gisbiostep.irstea.fr/\)](http://gisbiostep.irstea.fr/)

- GIS BioSTEP. (2004) Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration: origines et solutions, FNDAE N°33.
- Duchène, P., Pujol, R. (1993) Guide de lutte contre les mousses biologiques stables dans les stations d'épuration à boues activées, FNDAE hors série.
- Pujol, R. (1990) Guide technique sur le foisonnement des boues activées, FNDAE N°8.

Formations et Newsletter

<http://www.oieau.org/cnfme/catalogues/EAU-2014/>

<http://www.environmentallevantage.com/>

<http://www.irsa.cnr.it/Docs/Archivio/25SludgeCourse.pdf>