

50376
1975
126

Exemplaire

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DE LILLE

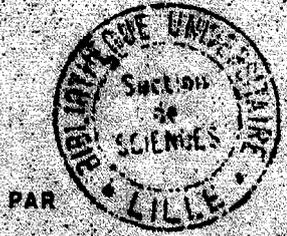
unique

50376
1975
126

THESE

pour l'obtention du grade de
Docteur . Ingénieur

Actinomycètes aérobies des eaux douces



CHEA Eak-Hour

Composition du Jury :

- J. GUILLAUME.....Président
- L. LACOSTE.....Rapporteur
- E. VIVIER.....Examineur
- H. LECLERC.....Examineur

N° d'ordre 167

Soutenu le 20 Février 1975



50376
1975
126

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

50376
1975
126

THESE

pour l'obtention du grade de
Docteur - Ingénieur

Actinomycètes aérobies des eaux douces



CHEA Eak-Hour

Composition du Jury :

- J. GUILLAUME.....Président
- L. LACOSTE.....Rapporteur
- E. VIVIER.....Examineur
- H. LECLERC.....Examineur

HOMMAGE

*à mes patriotes tombés
pour la juste cause du*

KAMPUCHEA

Les recherches que nous nous proposons de décrire ont été effectuées, sous la direction de Monsieur le Professeur Agrégé H. LECLERC, au Laboratoire d'Hydrobiologie de l'Institut Pasteur de Lille.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. GUILLAUME de nous avoir fait l'honneur de présider notre Jury. Nous avons pu bénéficier de ses conseils toujours judicieux qui nous ont beaucoup aidé. Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de toute notre reconnaissance.

Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur le Professeur L. LACOSTE qui nous a accueilli à Lille puis orienté vers le Laboratoire d'Hydrobiologie. En corrigeant notre travail sans ménager son temps, par ses précieuses critiques, il nous a aidé à améliorer la rédaction de notre mémoire. Qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur le Professeur E. VIVIER, dont l'intérêt pour les études écologiques est bien connu, de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury.

Nous tenons à exprimer, ici, toute notre gratitude à Monsieur le Professeur H. LECLERC qui nous a accueilli avec tant de chaleur et de sympathie dans son Laboratoire. Il nous fait découvrir le sens profond de la recherche et nous a toujours donné les moyens de la réaliser. Sa constante attention, ses précieux conseils et ses encouragements nous ont permis de résoudre toutes nos difficultés, morales ou matérielles, et de mener à bien ce travail. Nous garderons un agréable souvenir de lui lors de notre séjour en France et l'assurons de nos sentiments respectueux et dévoués.

Nous adressons également nos remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont aidé, moralement ou matériellement, à la réalisation de ce travail.

P L A N

-0-0-0-0-0

INTRODUCTION.....	1
Première partie : Revue bibliographique :	
o Chapitre I : Biologie.....	5
. Historique.....	6
. Répartition dans la nature.....	7
. Morphologie.....	9
. Systématique.....	20
. Physiologie.....	25
. Propriétés.....	32
o Chapitre II : Actinomycètes de l'eau.....	38
. Distribution.....	38
. Biologie.....	43
. Rôle.....	45
. Production des métabolites.....	46
Deuxième partie : Travaux de recherches :	
o Chapitre I : Etude du dénombrement.....	54
. Introduction.....	54
. Matériel et méthodes.....	56
- Origine et mode de prélèvement.....	56
- Traitements des échantillons d'eau.....	57
- Traitement des sédiments.....	58
- Homogénéisation des échantillons.....	58

.../...

- Ensemencement.....	59
- Essai d'antibiotiques.....	59
. Résultats et discussions.....	60
- Antibiotiques.....	61
- Traitement des échantillons.....	62
- Homogénéisation.....	65
- Milieux de culture.....	68
. Conclusion.....	71
o Chapitre II : Etude de l'identification.....	75
. Introduction.....	75
. Matériel et méthodes.....	76
- Etudes morphologiques.....	76
- Etudes biochimiques.....	80
. Résultats et discussions.....	83
- Identification morphologique prédominante.....	84
- Identification biochimique et morphologique....	85
. Proposition pour une clef d'identification.....	90
o Chapitre III : Etude des propriétés biochimiques.....	100
. Introduction.....	100
. Matériels et méthodes.....	100
- Souches d'actinomycètes.....	101
- Etude du pouvoir enzymatique.....	101
- Etude du pouvoir bactériolytique.....	105
- Etude du pouvoir antibiotique.....	106
. Résultats et interprétation.....	108
- Etude du pouvoir enzymatique.....	109
- Etude du pouvoir bactériolytique.....	111
- Etude du pouvoir antibiotique.....	114
. Conclusion.....	117

o Chapitre IV : Etude écologique.....	119
. Matériels et méthodes.....	119
- Terrains d'expérimentation.....	119
- Méthodes.....	121
. Résultats et discussions.....	123
- Présence et abondance des actinomycètes.....	124
- Evolution saisonnière.....	128
- Rôle dans les phénomènes d'auto-épuration.....	130
 CONCLUSION GENERALE.....	 137

Annexe

Bibliographie

INTRODUCTION

L'ampleur des nuisances qui empoisonnent le monde moderne, surtout dans des régions où se développe intensivement l'industrialisation, ne cesse de s'agrandir. Parmi les milieux les plus touchés, l'eau, élément essentiel des êtres vivants, n'a pu échapper à cet inquiétant phénomène. Chaque jour, les rejets industriels et domestiques déversent d'énormes quantités de matériaux minéraux et organiques, nuisibles ou non, dans des canaux, des rivières, des fleuves, des lacs, etc... Rares sont des réservoirs naturels dits "purs".

Devant le besoin accru en eau potable, la protection de nos eaux de surface, source pratiquement inépuisable, apparaît non seulement comme une préoccupation, mais un problème nécessaire et indispensable à résoudre. Dans l'immédiat, une des nécessités de la prévention des eaux de surface contre toutes formes de pollution, consiste à améliorer leur qualité tant au point de vue chimique que biologique.

En dehors des moyens artificiels mis en oeuvre pour cette revalorisation des eaux, de nombreuses observations montrent que

.../...

celles-ci sont capables de "s'auto-épurer". Ce phénomène d'épuration naturelle résulte de l'action combinée de divers facteurs : d'une part les facteurs physico-chimiques tels que la dilution, la sédimentation, le rayonnement solaire, etc..., et d'autre part des facteurs d'ordre biologiques auxquels participent intensément la microfaune et la microflore aquatique.

Pour mieux connaître cette capacité auto-épuratrice biologique, des connaissances approfondies sur chaque individu de cette communauté s'avèrent indispensables.

Parmi les microorganismes qui entrent en jeu, les actinomycètes constituent un grand groupe dont le rôle semble être non négligeable. D'innombrables travaux ont été consacrés à leur étude. Ils ont mis en évidence :

- . Leur rôle privilégié dans les grands cycles biologiques du sol : dégradation des matières organiques, en particulier la cellulose et la lignine.

- . Leur pouvoir de synthèse d'enzymes extrêmement utiles dans de nombreux domaines.

- . Leurs capacités exceptionnelles dans la synthèse de très nombreux antibiotiques.

- . La complexité et la diversité de leur structure et de leur physiologie et par conséquent la difficulté de leur classification.

Il apparaît pourtant que le rôle de ces microorganismes dans l'écologie des eaux est méconnu et que les travaux qui y ont été consacrés jusqu'à présent sont d'importance limitée sinon à peine ébauchés.

En raison de leurs importantes fonctions, nous nous sommes proposés de les rechercher dans les eaux pour en évaluer le rôle dans le domaine de l'écologie biochimique.

Ce présent travail a pour but de donner un aperçu général sur ces microorganismes, spécialement les cultures aérobies, dans la biocoenose aquatique. Il comportera deux grandes parties. La revue bibliographique qui constitue la première partie, traitera brièvement de leur biologie et de leurs particularités dans les eaux. La seconde partie sera consacrée aux travaux de recherche qui précéderont la conclusion générale.

Première partie

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
Biologie

Les actinomycètes groupent actuellement un grand nombre de genres très variés. Cette diversité morphologique et physiologique est telle qu'on ne peut trouver un caractère qui soit commun à tous les membres (LECHEVALIER, 1974).

Ethymologiquement, ce sont des microorganismes constitués par des filaments ramifiés, aspect qui les apparente aux champignons. Ces hyphes mycéliens, d'environ 1 μ de diamètre, quelquefois absents, quelquefois rudimentaires, sont de deux sortes :

- . mycélium inclus dans le substrat ou mycélium végétatif qui pénètre dans le milieu de culture, y puise des éléments nutritifs et parfois sporule,

- . mycélium aérien ou mycélium secondaire qui émerge du substrat, et assure la fructification.

On distingue cependant deux grands groupes :

- . les "Pro-actinomycètes" ou actinomycètes inférieurs qui englobent des genres anaérobies, microaérobies, ou anaérobies facultatifs. Appelés aussi "actinomycètes fermentatifs", ils sont potentiellement pathogènes,

. les "Eu-actinomycètes" ou actinomycètes supérieurs aérobies, d'origine tellurique, dits "actinomycètes oxydatifs".

I - HISTORIQUE

Les actinomycètes sont connus depuis environ un siècle. La première description fut celle de Ferdinand COHN qui les désigna sous le nom de "Streptothrix foersteri".

Depuis cette découverte, l'étude des actinomycètes a traversé 4 grandes périodes (WAKSMAN, 1959 ; BALDACCI, 1962).

1) Période dite "pathologique" (1875-1900) - L'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement à leur pouvoir pathogène.

2) Période dite "saprophytique" (1900-1919) - Parallèlement à la découverte des germes telluriques, les chercheurs tels que BEIJERINCK, essayèrent d'étudier leur physiologie et leur rôle dans la biologie du sol.

3) Période dite "biologique" (1919-1940) - Cette période fut marquée non seulement par l'étude écologique et morphologique,

mais surtout par celle de leurs propriétés physiologiques, (bactériolyse, dégradation des matières organiques, etc...).

4) Période dite "biochimique" - C'est la période de la grande découverte des antibiotiques et des vitamines produits par les actinomycètes. Grâce à leurs capacités exceptionnelles, l'étude des actinomycètes gagne chaque jour de l'intérêt et des laboratoires de plus en plus nombreux dans le monde entier s'y consacrent.

II - REPARTITION DANS LA NATURE

Ils sont très répandus dans la nature. D'après WAKSMAN :
"... They are found in virtually every natural substrates ; in the air we breathe, in the water we drink, in the foodstuffs we consume, and in the soil we talk on...".

Leur quantité et leur qualité sont étroitement liées aux milieux qu'ils habitent.

1) Dans le sol

On trouve les actinomycètes dans tous les types de sol.

Quantitativement, ils occupent une place intermédiaire entre les populations bactériennes et fongiques. Leur nombre peut atteindre facilement 10^6 et même 10^8 par gramme du poids sec de terre sur une population totale de 10^9 microorganismes. Cette quantité est très variable et dépend de plusieurs facteurs : climat, types du sol, profondeur, acidité, teneur en matières organiques, aération et teneur en eau du sol. Ils sont en nombre considérable dans le sol neutre ou légèrement alcalin, riche en matières organiques surtout en résidus végétaux. Ce nombre diminue au fur et à mesure qu'on descend en profondeur ou quand le sol est saturé d'eau.

Au point de vue qualitatif, le genre Streptomyces occupe une place prédominante. Il représente plus de 95 % des 5 000 souches isolées de 16 sols (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1964). Viennent ensuite les genres Nocardia et Micromonospora dont chacun représente environ 1 %. Les types de sol, par conséquent le pH, les rhizosphères et le degré de saturation du sol influent considérablement sur la répartition des genres.

2) Dans les fumiers et les composts

La température dans les composts normalement de 50 à 65° peut atteindre facilement 80°. On y trouve principalement des actinomycètes thermophiles : Thermoactinomyces, Thermomonospora, Streptomyces, etc... Leur nombre varie selon les différentes phases de la décomposition (LACEY, 1973).

3) Dans l'atmosphère

On trouve aussi les actinomycètes en abondance dans l'atmosphère. Ils peuvent s'y présenter sous deux formes, soit mycélienne, soit sporulée. Il suffit d'exposer les boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé, ouvertes pendant un certain temps, pour les récupérer. Ils peuvent être fixés sur les rochers, les plantes, les vêtements, les animaux et d'autres objets exposés à l'air libre. Tous ces supports et le vent jouent un rôle important dans la propagation des espèces.

III - MORPHOLOGIE

1) Aspect cultural

Les actinomycètes se développent sur milieux solides en formant des colonies qui proviennent de l'accumulation des hyphes mycéliens et non pas des cellules comme c'est le cas des bactéries. En général, ces colonies se distinguent facilement des autres germes. Elles présentent un aspect compact, sec, lisse ou rugueux, quelquefois poudreux à maturité, quelquefois en chou-fleur ; leur

.../...

contour est échancré ou arrondi. Elles sont le plus souvent pigmentées en jaune, jaune orangé, blanc crème, violet, rose, vert, gris, noir, etc... Elles diffèrent des colonies fongiques par leur taille beaucoup plus petite (1 à 5 mm de diamètre) et par leur développement non envahissant. L'examen à la loupe binoculaire (x 100) révèle la présence de filaments d'environ 1 μ de diamètre autour des colonies.

Quelquefois, à la surface du milieu solide, surgissent diverses formations : granules (BALDACCI et Coll., 1966), corémies (WAKSMAN, 1959), pycnides (KRASSILNIKOV, 1962), et sclérotés (LECHEVALIER et Coll., 1973 ; GANJU et IYENGAR, 1974).

On distingue deux types de colonies :

- colonies du type "Streptomyces", où le mycélium très développé pénètre intensivement dans le milieu. La colonie adhère fortement au substrat.

- colonies du type Nocardia où le mycélium est fragmenté et moins extensif. Dans ce cas, la colonie est facilement détachée du substrat.

En milieu liquide, ces filaments s'accumulent en donnant naissance à de petits granules dont certains ont l'aspect des grains de "Tapioca". Cette formation d'amas mycéliens ne trouble pas le milieu comme dans le cas des autres cultures bactériennes ; le liquide restant toujours clair.

2) Mycélium

A l'exception de la famille des Dermatophilaceae, où il se divise dans les sens transversaux et longitudinaux, le mycélium se développe toujours perpendiculairement à l'axe principal. De structure procaryote, il est constitué principalement des éléments suivants (WILLIAMS et Coll., 1973; WILDERMUTH, 1971) :

- . un appareil nucléaire composé de fines fibrilles disposées parallèlement dans la région centrale de la cellule,

- . des mésosomes ou corps périphériques, ou chondrioides ou membranes intracytoplasmiques, de formes variables (en tube ou en vésicule). Des particules ribosomales ont été retrouvées dans de nombreuses cellules. On y note aussi la présence de corps lipidiques et de granules de polyphosphate.

- . une membrane plasmique,

- . une paroi cellulaire analogue à celle des bactéries à Gram positif, constituée par le mucopeptide.

La plupart des actinomycètes prennent le Gram. Dans un seul genre, Mycoplana, les cellules sont à Gram négatif. Suivant leur composition en acides aminés, on distingue différents types de parois. Outre les acides aminés toujours présents (acide

glutamique, alanine, glucosamine, acide muramique), il existe des acides aminés caractéristiques de chaque genre, qui peuvent être présents, seuls, ou associés (2 ou 3) suivant les cas (Tableau 1).

Les 4 premiers types sont rencontrés principalement chez les Eu-actinomycètes. Les autres types sont propres aux actinomycètes inférieurs et les espèces voisines (LECHEVALIER, 1970).

Ces différentes caractéristiques pariétales constituent l'un des critères les plus importants dans l'actuelle taxonomie.

Le contenu mycélien varie selon les différents stades du développement : stade végétatif, stade aérien ou stade sporulé. WILDERMUTH en 1970 a signalé la présence de nombreuses vacuoles dans le mycélium aérien du Streptomyces et dans le mycélium en voie de lyse. BRADLEY et RITZI (1968) ont remarqué qu'en général, les protéines des spores et du mycélium végétatif ont les mêmes compositions en acides aminés. Seuls, les teneurs en arginine et en leucine sont moins élevées dans les spores que dans le mycélium végétatif. De même, le contenu cellulaire des spores en ADN est inférieur à celui du mycélium végétatif (BRADLEY et TEWFICK, en 1967).

L'analyse biochimique du contenu cellulaire chez les actinomycètes supérieurs révèle la présence de nombreux sucres (LECHEVALIER, 1968). Suivant la présence de certains sucres dits

Type de parois	DAB	Lysine	Ornithine	Acide aspartique	Glycine	meso-DAP	11-DAP	Ara- binose	Galac- tose	Gram
I					+		+			+
II					+	+				+
III						+				+
IV						+		+	+	+
V		+	+		*					+
VI		+		+	*					+
VII	+	+		+	*					+
VIII				+	*					+
IX						+				-

TABLEAU 1 : Différents types pariétaux des actinomycètes et de leurs rpoches (LECHEVALIER, 1970)

Toutes les parois contiennent en plus de ces acides aminés spécifiques, de l'acide glutamique, de l'alanine, du glucosamine et de l'acide muramique

* : variable ; DAB : Acide 2,4 - diaminobutyrique ; DAP : Acide 2,6 - diaminopimélique



"caractéristiques" dans la cellule, on distingue des groupes ou des séries désignées par les lettres A, B, C et D (Tableau 2).

Séries	Sucres caractéristiques
A	Galactose, Arabinose,
B	Madurose
C	Pas de sucres caractéristiques
D	Arabinose, Xylose.

TABLEAU 2 : Différentes séries de sucres caractéristiques présents dans la cellule (LECHEVALIER, 1970)

On constate que chaque série correspond à l'un des types de paroi décrits précédemment. Ainsi :

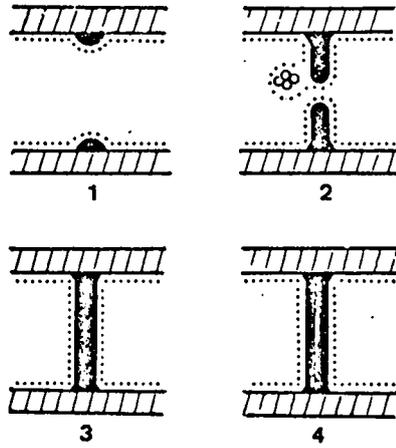
- la paroi du type II correspond à la série D,
- la paroi du type III correspond à la série B et C,
- la paroi du type IV correspond à la série A,
- la paroi du type I n'a pas de sucre caractéristique.

WAKSMAN en 1959 définissait les actinomycètes comme des microorganismes unicellulaires. L'étude de leur ultrastructure a révélé pourtant la présence des cloisonnements, non seulement entre les spores et le mycélium, mais aussi dans le mycélium végétatif (WILDERMUTH et HOPWOOD, 1970 ; WILLIAMS et Coll., 1973). Chez les actinomycètes, il y a 2 types de cloisonnements (Schéma 1)

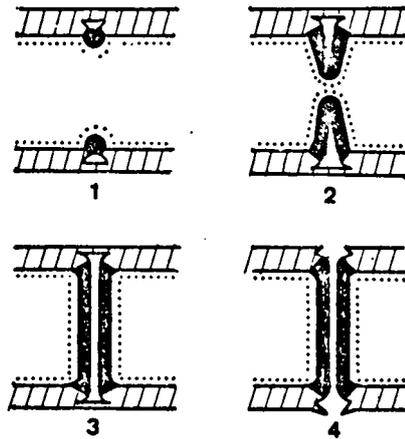
.../...

Schéma .1 Différents types de cloisonnements

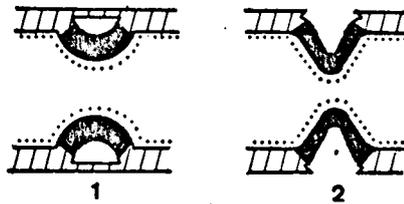
Type I



Type II
(a)



Type II
(b)



- Type I : il est observé dans le mycélium végétatif de S. griseus et quelquefois lors de la formation des spores. Il est aussi trouvé chez les bactéries à Gram +. Il est formé d'une ex-croissance de la membrane plasmique et de la paroi à l'intérieur de l'hyphe. Les mésosomes sont souvent associés au développement des cloisons. Le diamètre de cloison nouvellement formé est semblable à celui des hyphes-mères.

- Type II a : le second type est caractérisé par une double ex-croissance issue de la partie interne de la paroi, suivie ensuite de la séparation de l'hyphe en deux. On le trouve dans de nombreux actinomycètes, au cours de la formation des spores de Streptomyces, Nocardia et certains genres de la famille des Actinoplanaceae.

- Type II b : ce type est rencontré aussi lors de la formation des spores de S. coelicolor. Semblable au précédent, mais dans ce cas, il s'agit de la constriction de la paroi.

Mycélium végétatif

Les spores germent en donnant naissance à un ou plusieurs tubes germinatifs. Ces tubes germinatifs se ramifient et deviennent par la suite le mycélium végétatif qui pénètre plus ou moins profondément dans le substrat. De couleurs très variées, il mesure facilement de 50 μ à 600 μ avec un diamètre allant de 0,2 à 0,8 μ . Il est souvent irrégulier, en particulier chez les Pseudonocardia. Ce mycélium végétatif peut être absent ou fragmenté

en éléments bacillaires suivant les genres.

Mycélium aérien

Sur un milieu convenable, la plupart des espèces produisent des filaments émergeant à la surface du substrat. Ils constituent le mycélium aérien. Sa longueur est variable. Son diamètre est de 1 μ à 1,4 μ . Pigmenté en différentes couleurs, il se développe plus ou moins intensément suivant les genres. On le trouve en abondance chez le genre Streptomyces. Il est constitué généralement d'un filament principal, souvent stérile, qui donne ensuite des ramifications secondaires. A l'approche de la sporulation, ce mycélium aérien est recouvert, chez certains genres, d'une fine enveloppe.

Cette enveloppe, de nature hydrophobe et indépendante de la paroi, est constituée principalement d'éléments creux en forme de baguettes, de matériel amorphe et de fins éléments fibrillaires (WILDERMUTH, 1971 ; WILLIAMS, 1972). Elle servira d'ornementation sporale dans plusieurs genres, ou d'enveloppe du "sporange" des Actinoplanaceae.

Il convient, cependant, de remarquer que ce terme "sporange" trouvé dans la littérature sur les actinomycètes, principalement anglo-saxonne, est mal utilisé pour définir cette poche sporale. FELDMANN (1963) a distingué 2 types de vésicules :

- le sporocyste dont l'enveloppe est issue de la paroi hyphale,
- le sporange dont l'enveloppe est nouvellement formée par suite de la division à l'intérieur de la vésicule.

Dans le cas des Actinoplanaceae, l'enveloppe n'est que le prolongement de celle qui entoure le mycélium portant cet organe fructifiant (LECHEVALIER, 1967), ce qui montre que la poche sporale de la famille des Actinoplanaceae doit être considérée plutôt comme un sporocyste que comme un sporange. Nous utiliserons par la suite le terme "sporocyste" à la place du terme "sporange" trouvé fréquemment dans la littérature.

3) Spores

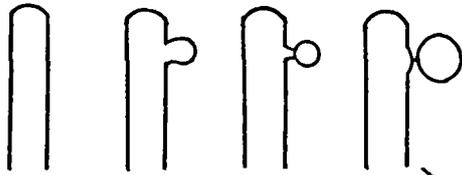
Le mycélium fructifie en formant des organes spéciaux de multiplication appelés couramment "spores". Sessiles ou montées sur de courtes sporophores, ces spores se développent de diverses manières : simultanées, basipétales ou acropétales (HENSSEN et SCHAFFER, 1971). Elles se forment par suite de la fragmentation des hyphes-mères ou par la réorganisation du cytoplasme et la formation d'une nouvelle paroi à l'intérieur des hyphes. On distingue 3 modes de formation de spores (Schéma 2) :

(a) Spores provenant des hyphes dépourvus d'enveloppe

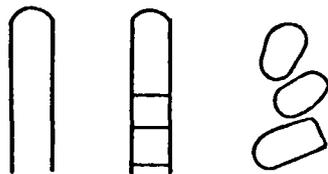
Ce mode de formation est rencontré chez les genres Micro-monospora, Nocardia, Micropolyspora, Actinomyces. Pour le premier, il y a formation, à un endroit donné, du mycélium, d'une boursouflure puis d'une cloison qui sépare la spore du mycélium. Le même

Schéma.2 Différents modes de formation des spores

Micromonospora

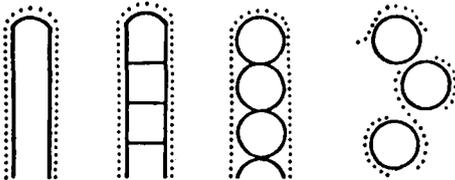


Nocardia



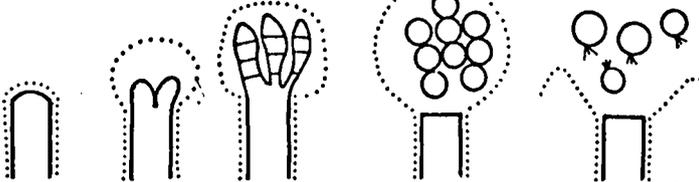
Formation des spores
par fragmentation des hyphes nus

Streptomyces

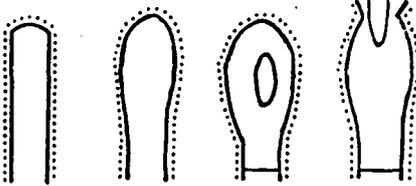


Formation des spores
par fragmentation des hyphes
contenus dans une enveloppe

Actinoplanes

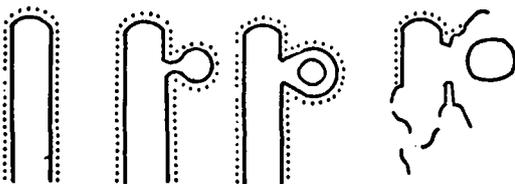


Planomonospora



Formation des endospores

Thermoactinomyces



processus de division est observé chez les Nocardia dont les hyphes se fragmentent en éléments bacillaires ou coccoïdes.

(b) Spores provenant des hyphes recouverts d'une enveloppe

On trouve ce type de formation chez les genres Streptomyces, Chainia, Microbispora, Microellobosporia, Dermatophilus, Thermomonospora et la famille des Actinoplanaceae. Dans ce cas, les spores proviennent de la division des hyphes à l'intérieur de l'enveloppe. L'enveloppe qui les entoure peut persister, ou disparaître.

(c) Spores formées à l'intérieur de l'hyphes

Dans ce 3ème cas, les spores sont formées à l'intérieur des hyphes-mères. Il y a synthèse d'une nouvelle paroi indépendante de la paroi hyphale. Ce sont de véritables endospores. On les observe dans le genre Thermoactinomyces.

Les spores ainsi formées mesurent de 0,2 à 1,3 μ de diamètre. Elles sont isolées ou en chaînes plus ou moins longues, ou globuleuses ou massuées dans des sporocystes.

Leurs chaînes peuvent contenir 2 - 4 et plus de 50 spores. Ce nombre joue un rôle important dans la détermination des genres. Chez les Streptomyces, les chaînes sont droites, ondulées, spirales ou verticillées. Selon les ornements, on distingue plusieurs types de spores : lisses, échinulées, velues ou verruqueuses.

Ces aspects jouent un rôle important dans la détermination des espèces (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

4) Sporocyste

Il est de taille et de forme très variable : globuleux (40 μ), sphérique ou allongé (2 μ x 9 μ). Le nombre des spores change considérablement d'un genre à un autre.

A l'intérieur, les spores se disposent :

- . en chaînes uniques (Planomonospora, Planobispora, Dactylosporangium, Microellobosporia, Microtetraspora),
- . en chaînes parallèles (Ampullariella),
- . en chaînes enroulées (Streptosporangium).

5) Flagelles

Chez certains genres, les spores sont mobiles grâce à la présence des flagelles. Ceux-ci sont en nombre très variable. Ils sont de 2 à 40 chez les Actinoplanes, 1 à 7 chez les Spirillospora (LECHEVALIER et HIGGINS, 1967). Leur disposition peut être polaire, ou pérित्रиче (WILLIAMS et Coll., 1973). Leur taille est inférieure

à celle des Eucaryotes. Ceux-ci présentent des flagelles composées de 11 fibrilles dont la taille de chaque fibrille correspond à celle d'une flagelle d'actinomycètes (LECHEVALIER, 1967).

IV - SYSTEMATIQUE

1) Position taxonomique

Pour les mycologistes, les actinomycètes sont des champignons.
Pour les bactériologistes, ce sont des bactéries.

Par rapport aux champignons, ils présentent un vrai mycélium ramifié, des spores en chaînes ou enveloppées dans des sporocystes. Certaines cultures produisent à la surface du milieu, des formations qui ressemblent à des corémies, des sclérotés, des pycnides, comme dans la flore fongique.

En dépit de ces aspects trompeurs, les actinomycètes sont des bactéries vraies :

. l'appareil nucléaire est dépourvu de membrane et de structure fibrillaire,

.../...

. la paroi est constituée par le mucopeptide ; elle est dépourvue de chitine et de cellulose,

. les flagelles sont de type bactérien,

. les études immunologiques montrent que les Nocardia, les mycobactéries et les corynébactéries ont une affinité certaine avec les actinomycètes.

. le diamètre des hyphes d'environ 1 μ est beaucoup plus petit que celui des champignons.

2) Classification

Si l'introduction des actinomycètes dans le grand embranchement des Schizomycètes semble être acceptée par de nombreux auteurs, leur classification demeure à présent encore fragile. Le tableau qui a été décrit dans le "Bergey's Manual" en 1957 et par WAKSMAN en 1959 mérite d'être totalement revu du fait de la découverte de nouveaux genres d'une part, et de la mise en application de nouvelles techniques, par conséquent de nouveaux critères, d'autre part. Plusieurs systèmes de classification ont été proposés. Ils diffèrent les uns des autres par les critères utilisés.

Actuellement, les données morphologiques et la nature des constituants pariétaux et cellulaires sont principalement retenues.

D'autres informations comme l'analyse des bases de l'ADN, l'étude des spectres d'infra-rouge, l'étude sérologique, la taxonomie numérique.... restent encore d'intérêt limité et souvent contradictoire (PRAUSER, 1970).

CROSS et GOODFELLOW (1973) pensent qu'une bonne classification doit être basée sur l'ensemble des données morphologiques, biochimiques, génétiques, etc... Ils ont proposé de regrouper les différents genres en 10 familles (Tableau 3), conformément au schéma suivant :

. Famille des Actinoplanaceae :

Ce sont des actinomycètes dont les spores, mobiles ou non, sont enveloppées dans des sporocystes de forme variable. La paroi cellulaire est du type II et III. Le mycélium aérien peut ou ne peut pas être présent.

. Famille des Dermatophilaceae :

Elle regroupe les cultures dont le mycélium se divise dans tous les sens (longitudinaux et transversaux). La paroi est du type III.

. Famille des Micromonosporaceae :

Représentée uniquement par le genre Micromonospora, elle est caractérisée par l'absence de mycélium aérien et par la formation de spores uniques isolées sur le mycélium végétatif. La paroi est du type II.

. Famille des Nocardiaceae :

Les genres de cette famille forment un mycélium végétatif qui se fragmente en éléments coccoïdes. Le mycélium aérien porte de courtes chaînes de spores. La paroi est du type IV.

. Famille des Streptomycetaceae :

Ce sont des actinomycètes à mycélium végétatif non fragmenté. Le mycélium aérien, souvent bien développé, porte des chaînes de spores plus ou moins longues suivant les genres. La paroi cellulaire est du type I. Les spores peuvent être immobiles ou mobiles. Dans ce dernier cas, elles sont en courtes chaînes enveloppées dans des sporocystes allongés ou en massue.

. Famille des Thermoactinomycetaceae :

Elle est représentée uniquement par le genre Thermoactinomyces dont les spores formées sur les deux mycélium sont de véritables endospores thermo-résistantes. La paroi cellulaire est du type III.

. Famille des Thermomonosporaceae :

Cette famille englobe des genres dont les deux mycélium peuvent porter des spores. Celles-ci peuvent être isolées, en paires ou en courtes chaînes. Le mycélium végétatif peut être fragmenté. La plupart ont des parois du type III. Le seul genre Saccharomonospora a une paroi de type IV. Il ressemble morphologiquement au genre Thermomonospora.

FAMILLES	GENRES
ACTINOMYCETACEAE	Actinomyces, Agromyces, Arachnia, Bacterionema, Bifidobacterium, Rothia
ACTINOPLANACEAE	Actinoplanes, Ampullariella, Dactylosporangium, Planobispora, Planomonospora, Spirillospora, Streptosporangium
DERMATOPHILACEAE	Dermatophilus, Geodermatophilus
FRANKIACEAE	Frankia
MICROMONOSPORACEAE	Micromonospora
MYCOBACTERIACEAE	Mycobacterium
NOCARDIACEAE	Nocardia, Micropolyspora, Mycobacterium rhodochrous, Gordona
STREPTOMYCETACEAE	Streptomyces, Chainia, Streptoverticillium, Elythrosporangium, Microellobosporia, Kitasatoa
THERMOACTINOMYCETACEAE	Thermoactinomyces
THERMOMONOSPORACEAE	Thermomonospora, Saccharomonospora, Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora

TABLEAU 3 : Différentes familles d'actinomycètes (CROSS et GOODFELLOW, 1973)

231
500

V - PHYSIOLOGIE

1) Conservation - Viabilité

Les actinomycètes sont doués d'une grande résistance. Cette propriété est due à la présence des spores. TRESNER & Coll. (1960), en conservant 300 souches de Streptomyces à -22°C pendant 3 ans, remarquent que 0,8 % seulement ont perdu leur vitalité. CROSS et JOHNSTON (1971) signalent que les endospores restent toujours fertiles dans les sédiments à la température de 5 à 6° durant une période supérieure à 100 ans. Mais, le temps de stockage diminue le taux de germination. En général, les spores supportent mieux la dessiccation que l'humidité. Les espèces résistantes dans ces conditions sont prédominantes dans le sol aride.

Au cours de la conservation sur milieu gélosé, apparaissent des mutations spontanées à la surface des colonies qui affectent leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. Certaines cultures perdent même leur capacité de produire du mycélium aérien par suite d'ensemencement excessif. La terre stérile représente le meilleur milieu de conservation. La fréquence des repiquages n'est pas recommandable. La lyophilisation est finalement la solution la plus adaptée.

2) Dormance et germination

Les spores des actinomycètes peuvent passer par une période de latence avant de germer. Cette dormance est constitutive dans le cas des endospores ou exogène dans le cas des spores de Streptomyces. Parmi les spores nouvellement formées, 5 à 30 % chez les Thermoactinomyces vulgaris, 1 à 10 % chez les T. alba, peuvent germer immédiatement (KALAKOUTSKII et AGRE, 1973 ; KALAKOUTSKII et POUZHARITSKAJA, 1973).

La levée de cette dormance est conditionnée principalement par la température. Il semble qu'une diminution de la température soit favorable. 90 % des spores de T. vulgaris germent après une préincubation de 48 h à 20°, leur température minimale de croissance végétative (ATTWELL et CROSS, 1973 ; KAKAKOUSKII et AGRE, 1973). La mise en suspension aqueuse des spores suivie d'une homogénéisation avec des billes de verre semble aussi efficace.

Dans des conditions convenables, les spores germent rapidement en donnant naissance à un ou plusieurs tubes germinatifs. Cette germination exige un milieu organique à base de peptone ou d'hydrolysate de caséine. D'autres facteurs tels que l'aération intensive, la présence d'un acide aminé, en particulier la L-valine à la dose de 0,5 %, stimulent la germination. Par contre, la forte teneur en CO₂ ou la présence de l'acide glutamique donnent des effets contraires.

Au premier stade de la germination, les spores perdent leur réfringence. Tous les constituants cellulaires deviennent visibles. Il semble que la séparation de l'appareil nucléaire précède l'émergence du tube germinatif.

Les différents événements se produisant au cours de la germination sont décrits dans le tableau 4.

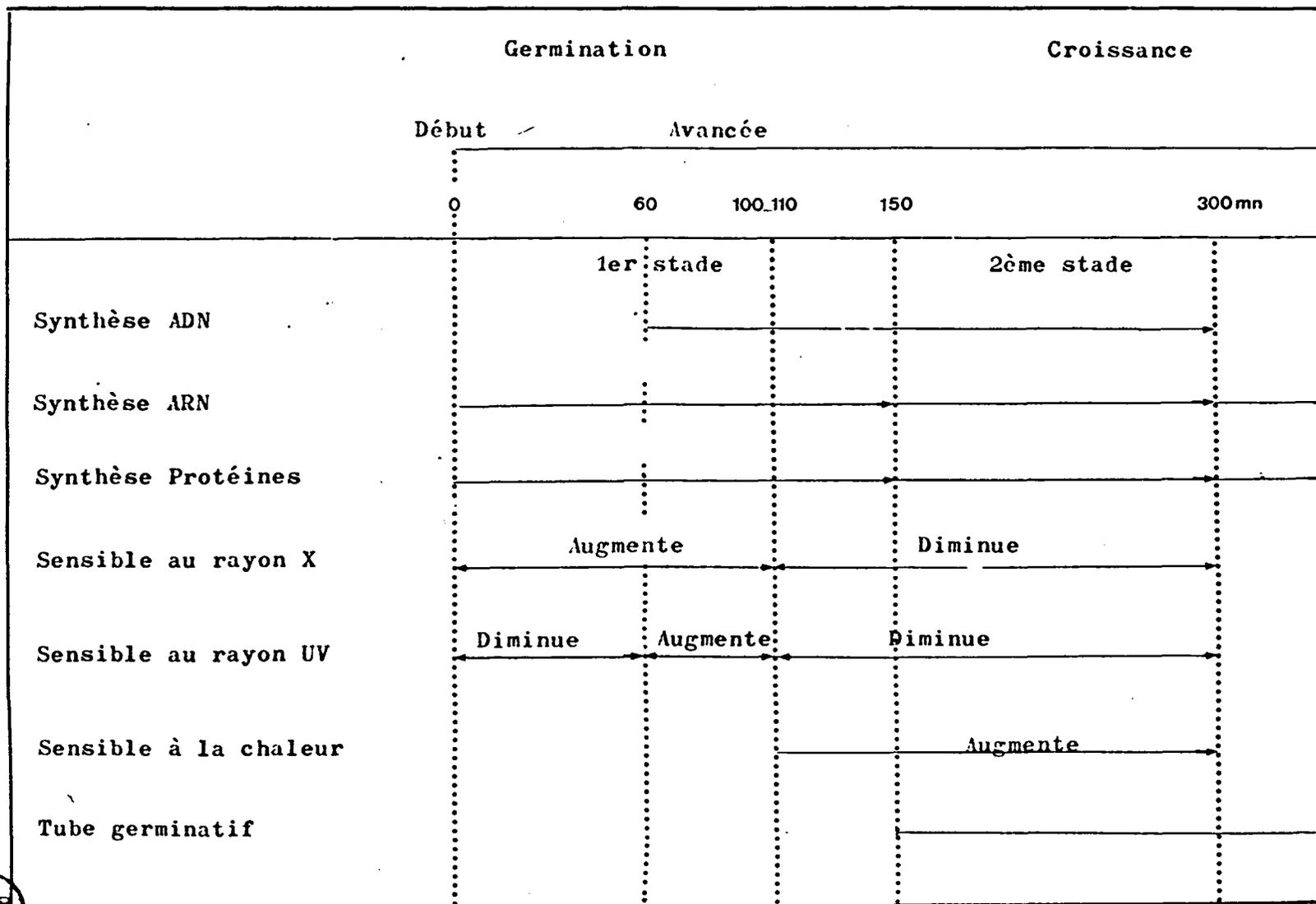
3) Croissance

On distingue 2 phases de croissance : la première est caractérisée par un taux de croissance rapide et une synthèse des protéines et des acides nucléiques. La seconde est marquée par un ralentissement du taux de croissance et par une baisse notable de la teneur en protéines et en ARN. Elle précède l'autolyse.

La vitesse de croissance est variable suivant les conditions de culture. Elle atteint le maximum aux environs de 10 jours pour les cultures non agitées et de 3 à 5 jours pour les cultures agitées. Chez Streptomyces griseus, la production de Streptomycine se fait au cours du 1er stade (WAKSMAN, 1959).

La phase autolytique est marquée par une diminution du poids du mycélium et une baisse de la demande en oxygène. Cette lyse affecte soit une partie de la colonie, soit la colonie toute entière. Certains filaments peuvent échapper à cet effet par suite de la

TABLEAU 4 : Germination du *S. cacaoi* (KALAKOUTSKII and POUZHARITSKAJA, 1973)



formation des chlamydospores. La lyse est plus rapide avec les cultures liquides agitées que dans les cultures stationnaires. Généralement, les substances antibiotiques sont en quantité maximale au début de la lyse, dans les cultures en milieu liquide. Les substances responsables de ce phénomène sont produites par les souches elles-mêmes et libérées lors de la décomposition de leur mycélium.

4) Nutrition

Les actinomycètes se développent sur des substrats très variés minéraux ou organiques. Cette capacité exceptionnelle reflète leur grand pouvoir d'assimilation et de synthèse.

• Nutrition carbonée

L'utilisation des glucides est sélective.

Les glucose, maltose, amidon, sont d'excellents substrats. Les saccharose, xylose, rhamnose, raffinose ne semblent pas appréciés par tous les actinomycètes. L'utilisation de la cellulose, de la chitine, de la lignine et des tanins est seulement propre à certaines cultures.

En général, les acides organiques tels que les acides acétique, lactique, citrique, propionique, pyruvique, succinique et malique, constituent d'excellentes sources de carbone. Par

contre, les acides formique, oxalique, tartrique, benzoïque et hippurique ne sont pas favorables.

La plupart des actinomycètes préfèrent le glycérol et le mannitol au dulcitol, à l'inositol et à l'éthanol.

La grande sélectivité dans l'utilisation de ces hydrates de carbone joue un rôle considérable dans la détermination des espèces (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

L'assimilation des glucides par les actinomycètes se fait par oxydation ou par fermentation. Des enzymes responsables de l'oxydation tels que les phénols oxydases, le phosphofructokinase... et les cytochromes a, b, c, d ont été isolés à partir des cultures.

LECHEVALIER et PINE (1973) distinguent 3 types de fermentation chez les actinomycètes inférieurs :

- Fermentation lactique : Actinomyces, Rothia,
- " hétérolactique : Bifidobacterium,
- " propionique : Arachnia, Bacterionoma,

• Nutrition azotée

La plupart des cultures d'actinomycètes sont protéolytiques. Les protéines, les peptones, certains acides aminés (asparagine, alanine, glycine...) constituent de bonnes sources d'azote pour ces microorganismes.

La réduction des nitrates est commune mais non universelle chez les actinomycètes.

A la limite, certaines souches peuvent fixer l'azote atmosphérique. METCALFE et Coll., en 1957, ont isolé 2 souches de Nocardia qui sont capables de fixer l'azote atmosphérique. D'autres sont nitrifiantes (S. nitrificans).

• Nutrition minérale

Outre le carbone et l'azote, les actinomycètes ont besoin d'éléments minéraux tels que le P, S, Fe, Mg, K et aussi d'oligo-éléments indispensables pour leur croissance et leur synthèse. La nécessité de ces oligo-éléments (Cu, Co, Mn, Zn...) est liée souvent à la synthèse des diverses substances antibiotiques, des pigments et des enzymes.

Certaines cultures peuvent croître dans des milieux contenant de fortes concentrations de sels. Quelques Streptomyces et Nocardia se développent en présence de 10 % de NaCl et de 20 % de Na₂SO₄ (WAKSHAN, 1959; COCHRANE, 1960).

Quelques souches sont autotrophes. S. autotrophicus peut oxyder l'hydrogène atmosphérique. D'autres ne peuvent proliférer en l'absence de CO₂. Elles nécessitent des traces de CO₂ pour se développer normalement.

.../...

VI - PROPRIETES

L'intérêt des actinomycètes s'exerce dans de nombreux domaines. Nous n'en citerons, dans ce paragraphe, que quelques aspects principaux :

1) Synthèse des enzymes

De nombreux enzymes endocellulaires et exocellulaires ont été mis en évidence. Certains d'entre eux ont été isolés et purifiés. En dehors de ceux rencontrés couramment comme l'amylase, la protéase, la chitinase et la lipase, les actinomycètes peuvent produire de la kératinase, de la cellulase, et des enzymes qui oxydent la pénicilline, la pénicillinase. Certaines de ces substances sont thermolabiles (pénicillinase), d'autres sont thermo-résistantes (amylase).

Les actinomycètes peuvent synthétiser des substances bactériolytiques. L'actinomycétine, enzyme thermolabile secrété par le S. griseus, est capable de lyser les cellules vivantes de certaines bactéries à Gram positif et négatif (WELSCH, 1942).

Cet équipement enzymatique permet à ces microorganismes de

.../...

jouer un rôle important dans la décomposition des résidus animaux et végétaux, en particulier dans la formation et la décomposition de l'humus (WAKSMAN, 1959).

2) Synthèse des acides aminés et vitamines

Les cultures d'actinomycètes peuvent synthétiser divers acides aminés. Parmi ceux-ci, la production d'acide glutamique occupe une place prépondérante : sa concentration est de l'ordre de 0,25 à 1,75 mg/l.

En présence de cobalt, certaines souches peuvent synthétiser des vitamines, en particulier la vitamine B 12.

Certains mutants (traitement UV ou X) sont capables de produire de la porphyrine en quantité appréciable : 20 à 40 µg/l. Dans ce cas, le taux de vitamines B 12 synthétisé, est inférieur à celui trouvé dans la cellule-mère.

3) Production des pigments

Dans des conditions convenables de culture, la plupart des actinomycètes peuvent être pigmentés de diverses couleurs : jaune, bleu, rose, violet, vert, rouge, brun, noir... La production de ces pigments varie considérablement selon les espèces, les milieux de

culture et l'âge des cultures. Ils sont de nature très diverse : certains sont hydrosolubles, d'autres sont solubles dans les différents solvants tels que l'éther, le chloroforme, etc... WAKSMAN, en 1959, a distingué 6 groupes de pigments :

. Anthocyanines : solubles dans l'eau et en solution alcoolique, insolubles dans l'alcool absolu, le chloroforme. Rouges en solution acide, ils sont bleus en solution alcaline.

. Pigments verts : certains sont solubles dans le glycérol et en solution alcaline.

. Hydroactinochromes : solubles dans l'eau, dans l'alcool à 95 % et dans le chloroforme. Ils sont violets à l'état naturel, deviennent oranges en solution acide et violet-foncé en solution alcaline.

. Lipoactinochromes : solubles dans l'alcool. Ils sont rouges, oranges ou jaunes à l'état naturel (ex : pigments caroténoïdes).

. Prodigiosines : ils sont jaunes en solution alcaline et rouges en solution acide.

. Pigments brun-noir (mélanine).

Ces pigments jouent un rôle non négligeable dans la nomenclature des actinomycètes. Un grand nombre d'espèces, surtout dans le genre *Streptomyces*, a été appelé par le nom de leur pigment. De nombreux auteurs utilisent la pigmentation comme critère pour la différenciation des espèces (KRASSILNIKOV, 1970 ; BLINOV et KHOKHLOV, 1970).

Un certain nombre d'actinomycètes produit des antibiotiques pigmentés (Actinomycines, Actinorhodines, Coelicolorines, etc...). BENEDICT, en 1953, a proposé un système de classification des antibiotiques en basant sur leurs couleurs.

4) Production des substances antibiotiques

La propriété la plus importante des actinomycètes est leur capacité exceptionnelle de synthétiser de nombreuses substances antibiotiques. Le mécanisme de cette synthèse est complexe. Dans certains cas, un seul organisme peut produire plusieurs substances différentes ; dans d'autres cas, une même substance antibiotique est secrétée par plusieurs organismes différents.

A présent, des centaines d'antibiotiques ont été trouvés. Certains ont pu être synthétisés *in vitro* (chloramphénicol). Leur nature est très diverse, allant d'un simple composé chimique à des protéines complexes. Leur production dépend étroitement des conditions de culture. Leur maximum de rendement exige un milieu de culture spécifique, synthétique ou organique, dans des conditions d'environnement spécifique (température, pH, aération). Exemple : la production maximale de Streptomycine de l'ordre de 100 à 200 µg par ml lors de sa découverte atteint aujourd'hui 5 à 10 mg par ml : cette augmentation considérable est due, d'une part à l'utilisation d'un milieu convenable et d'autre part à la mise au point des conditions optimales de production (pH, âge de culture...). Pour un

même organisme, le changement dans la nutrition entraîne le changement de la nature des substances produites.

Ces substances antibiotiques sont utiles dans de nombreux domaines. En dehors du domaine médical, elles sont utilisées dans la lutte contre certaines maladies des plantes cultivées dans la conservation des aliments, etc...

5) Agents de maladie

Les actinomycètes peuvent produire aussi des effets néfastes certains d'entre eux sont pathogènes chez l'homme, les animaux et les plantes cultivées.

. L'Actinomycose est une maladie causée par des espèces du genre Actinomyces. Elle affecte différents organes (yeux, bouches, oesophage, système nerveux...). L'actinomycose cervicofaciale est la plus connue. Deux espèces en sont responsables : A. israeli, parasite de l'homme, et A. bovis, parasite des animaux.

De nouvelles espèces d'Actinomyces ont été isolées de la cavité buccale, et on pense qu'elles font partie de la microflore buccale. A. odontolyticus est isolé de la flore de la carie dentaire. D'autres études montrent que la bouche est un habitat naturel pour A. propionicus et pour A. viscosus (BOWDEN et HARDIE, 1973)

.../...

. La Nocardiose est une maladie pulmonaire sévère due à N. asteroides. N. brasiliensis peut causer le mycétome. N. farcinia est l'agent du farcin de boeuf.

. Certains actinomycètes thermophiles, Thermoactinomyces vulgaris et Micropolyspora faeni provoquent chez l'homme une maladie connue sous le nom de "maladie pulmonaire du fermier" (Farmer's lung disease). La contamination se fait par voie respiratoire. Le malade souffre d'une allergie alvéolaire.

On trouve entre autre, d'autres espèces pathogènes tels que le Dermatophilus, agent des mycoses cutanées, les Mycobacterium, agent de la tuberculose, de la lèpre.

Peu d'espèces sont pathogènes pour les plantes. La maladie la plus connue est la gâle commune de la pomme de terre causée par S. scabies. Une autre espèce, S. ipomea est l'agent de la gâle de patate douce. Divers modes de traitements ont été préconisés. La sélection des variétés résistantes, les pratiques culturales (augmentation d'acidité du sol, l'irrigation, etc...) semblent avoir un effet appréciable.

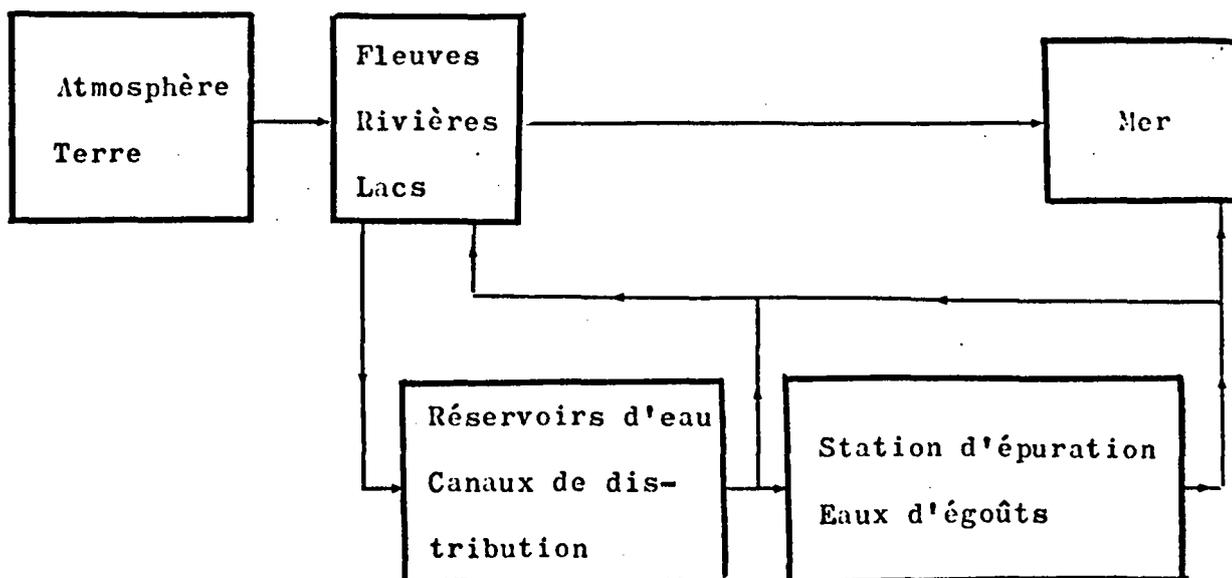
Chapitre II
Actinomycètes de l'eau

En général, les milieux aquatiques sont plus favorables au développement des bactéries à Gram négatifs qu'à celui des Gram +. Les actinomycètes, prenant le Gram, y vivent normalement moins nombreux que dans le sol, surtout dans les eaux profondes où la tendance vers l'anaérobiose s'accroît. De plus, les bactéries autochtones se développent plus vite que les actinomycètes et peuvent ainsi prendre une place dominante dans les eaux.

I - DISTRIBUTION

Dans la nature, les éléments de propagation des actinomycètes, disséminés par le vent ou entraînés par des apports terrigènes, contaminent les fleuves, les rivières, les lacs, etc... Puis, ils sont véhiculés par les eaux courantes et rejetés ensuite dans la mer. Ces trajets peuvent être représentés par le schéma suivant :

.../...



Dans l'eau, les actinomycètes existent sous deux formes : forme mycélienne et forme sporulée. Leur nombre varie considérablement d'une catégorie d'eau à une autre.

1) Rivières et lacs

Le genre Micromonospora apparaît comme un genre bien adapté au milieu aquatique. On le trouve à la surface et dans les sédiments. Il représente, dans l'échantillon d'eau d'un lac, 10 à 20 % de la microflore totale. Le nombre peut atteindre 100 000 par ml dans les sédiments (WAKSMAN, 1959).

Dans l'eau des fleuves qui ont reçu des apports terrigènes, on trouve plus de Streptomyces que de Micromonospora, comme dans

le sol. Ainsi, dans les eaux de la Tamise, BAYS et Coll. (1970) décèlent la présence de 5 000 à 20 000 Streptomyces et 1 000 à 2 000 Micromonospora par 100 ml. La prédominance du genre Streptomyces laisse penser que les cultures sont d'origine telluriques. Par contre, dans un cours d'eau, le nombre peut descendre jusqu'à 20 à 50 par 100 ml.

En dehors de ces deux genres, on signale la présence d'une autre famille, les Actinoplanaceae qui sont en abondance sur les débris végétaux en décomposition et dans les rivières au voisinage des fermes (WILLOUGHBY, 1969). Cet auteur a aussi trouvé des espèces de Nocardia, particulièrement bien adaptées à la vie aquatique.

2) Réservoirs et conduites de distribution

Dans les réservoirs d'eau où les conditions semblent peu propices pour leur développement, le nombre d'actinomycètes diminue considérablement par rapport à celui des rivières et des cours d'eau. On les trouve par contre, en grande quantité dans les dépôts au fond du réservoir.

A la surface du réservoir, BURMAN (1973) a constaté que le nombre de Micromonospora est d'environ 200 à 1 500 par 100 ml, nettement supérieur à celui des Streptomyces (10 à 500). Cette

prédominance des Micromonospora s'explique par la grande capacité d'adaptation de ce genre à la vie aquatique. Dans certains réservoirs, leur présence est presque négligeable, de 20 à 59/100 ml, comme dans les rivières et les cours d'eau.

Dans certaines stations, on préconise l'utilisation de système de filtration lente sur le lit de sable. Ce traitement réduit significativement le nombre d'actinomycètes. Cette réduction, de l'ordre de 42 % pour les Streptomyces, 90 % pour les Micromonospora, reste faible par rapport à celle observée chez les E. coli, où elle atteint environ 90 %. Le faible coefficient d'élimination est probablement dû au fait qu'une large proportion de ces microorganismes fait partie de la microflore du lit.

Après la filtration, l'eau est soumise ensuite à la stérilisation. BAYS et Coll., en 1970, ont remarqué que les souches d'actinomycètes sont plus résistantes à la chloration classique que les bactéries non sporulées trouvées dans l'eau. Elles peuvent survivre en nombre appréciable. Il semble que les Streptomyces soient plus sensibles à ce traitement que les Micromonospora.

Dans les conduites de distribution, on constate une légère augmentation du nombre des Streptomyces et une diminution du Micromonospora.

3) Eaux d'égoûts et boues activées

Les supports d'actinomycètes existant dans la nature (sol, eau, aliments, etc...) peuvent être entraînés, par différents facteurs, dans les eaux d'égoûts. En général, celles-ci les amènent ensuite dans les rivières, les lacs, la mer, etc... Dans certains cas, avant d'arriver dans ces réservoirs naturels, les eaux polluées subissent un traitement au cours duquel sont obtenues les boues activées. L'aération artificielle provoquée lors de l'épuration crée des conditions favorables pour la croissance des actinomycètes. LECHEVALIER, en 1974, y a isolé de nombreux actinomycètes, surtout des mycobactéries et des Nocardia.

4) Eaux marines

Les actinomycètes peuvent proliférer dans des milieux à forte teneur en sels. Leur existence dans ce milieu pourrait être due aux apports terrigènes qui sont véhiculés par les eaux courantes.

Ils vivent en surface, à l'état isolé, ou attachés à des particules solides en suspension dans l'eau. Ils appartiennent surtout aux genres Nocardia, Streptomyces, Micromonospora, Actinomyces et Mycobacterium. Les espèces du genre Mycoplana,

.../...

dont la place dans l'ordre des Actinomycétales reste encore incertaine, y vivent en quantité considérable.

On les trouve principalement dans des zones littorales, zones peu profondes, ou dans les sédiments côtiers. Il semble que les sédiments marins ne constituent pas un milieu propice pour leur végétation.

Il est possible que les actinomycètes puissent jouer un rôle dans la décomposition des substances cellulolytiques. FREITAS et BHAT (LECHEVALIER, 1974) ont signalé l'attaque de la cellulose des filets de pêche en décomposition par les Streptomyces. 15 souches de Streptomyces isolées du Golfe de Bengale à 30 mètres de profondeur, produisent des exocellulases capables d'attaquer la cellulose et la carboxyméthylcellulose (CHANDRAMOHAN et Coll., 1972).

II. - BIOLOGIE

La flore actinomycétique de l'eau est constituée principalement des espèces d'origine terrestre. Dans l'ensemble, leur morphologie est semblable à celle qu'on trouve dans les cellules isolées du sol.

ROACH et SILVEY (1958) et SILVEY (1964) ont signalé l'existence de cultures caractérisées par la présence simultanée ou alternative de deux formations de spores : spores latérales disposées en grappes et spores en chaînes. La première est rencontrée dans un environnement pauvre en nutriments.

Récemment, WILLOUGHY (1969 a) a décrit, dans son étude sur les actinomycètes vivant sur des feuilles en décomposition dans l'eau, deux cultures désignées sous le nom de "spore dome" et "spore head". Toutes les deux portent des spores terminales montées sur des phialides. La première, d'environ 1 à 2 mm de diamètre, présente un mycélium entièrement inclus dans la gélose et issu d'un centre de propagation situé à la surface du milieu. Les spores sont quiescentes in situ, et deviennent mobiles quand on les met dans l'eau. La seconde culture diffère de la première par l'absence du centre de propagation à la surface du milieu : c'est une colonie blanche de 1 à 2 mm de diamètre. Les phialides portent une ou plusieurs spores. Celles-ci, souvent groupées en amas, peuvent devenir mobiles au contact de l'eau.

La même année, le même auteur a signalé la présence de trois autres cultures désignées sous les noms : "Nocardia-type" (Nt), "Large spored pink irregular" (Lspi) et "Small spored pink irregular" (Sspi). Ces trois types sont caractérisés par l'absence de mycélium aérien et par les spores formées profondément dans la gélose.

.../...

Durant leur développement, le mycélium produit des spores en séries disposées en une file unique dans le cas du Nt et disposées en forme de "masse de corde" (rope like masses) dans les cas des "Lspi" et Sspi". Ceux-ci semblent avoir une affinité avec le genre Micromonospora par leur production d'innombrables petites spores non-mobiles.

III - ROLE

Les actinomycètes peuvent être à l'origine de certaines nuisances dans le milieu aquatique.

Dans les stations d'épuration des eaux usées, on observe quelquefois la formation à la surface des bassins de décantation secondaire, d'une écume épaisse constituée d'une masse mycélienne (Nocardia et Mycobacterium) et de bulles d'air. Cette écume pose des problèmes techniques dont la solution paraît coûteuse. De plus, l'aération violente des boues activées contenant des Nocardia et des Mycobactéries, dont certains sont pathogènes, produit des aérosols qui ne sont pas sans danger (LECHEVALIER, 1974).

Dans les bassins de pisciculture, SNIEZKO et Coll. (1964) ont trouvé une espèce de Nocardia asteroides qui cause des in-

fections chez les poissons. La truite "arc-en-ciel" affectée à un abdomen distendu contenant une masse compacte de Nocardia, et nage avec des mouvements très rapides de la queue, ou sur le côté et en cercle. Cette maladie, à basse mortalité, n'est pas contagieuse.

Certains genres d'actinomycètes peuvent attaquer le caoutchouc existant dans l'eau. LEEFLANG (1964) a observé que les anneaux en caoutchouc servant de liaison et d'étanchéité entre deux tuyaux en fibro-ciment ont été attaqués par deux espèces de Streptomyces.

IV - PRODUCTION DES METABOLITES A ODEUR DESAGREABLE

Une des particularités les plus frappantes du rôle biochimique des actinomycètes dans l'eau réside dans leur capacité de produire de nombreux métabolites dont certains affectent aussi bien la qualité des eaux de consommation que la valeur marchande des poissons.

L'eau peut avoir par moments une odeur de terre et de moisi plus ou moins prononcée, surtout en été. Ce phénomène déplaisant constitue une des difficultés majeures dans le traitement des eaux de consommation (ROSEN et Coll., 1970).

BERTHELOT et ANDRE (1891) signalent que l'odeur terreuse peut être due à une substance neutre existant dans le sol. THAYSEN et Coll. (1936) obtiennent, par extraction des filtrats des cultures d'actinomycètes, un composé organique légèrement soluble dans l'eau, soluble dans l'éther et partiellement soluble dans l'alcool. Dilué à l'eau, il donne une odeur terreuse typique. Les poissons peuvent absorber cette solution aqueuse soit par les branchies, soit par la bouche.

SYLVEY et Coll., en 1950, pensent que les substances produites par le genre Streptomyces sont des amines simples ou complexes, à des acides faibles saturés ou à des composés aromatiques non saturés.

En 1963, ROMANO et SAFFERMAN signalent qu'une culture en milieu liquide de S. griseoluteus donne une odeur à seuil compris entre 20 000 et 50 000. Ils obtiennent ensuite par distillation, puis par extraction à l'éther, 3,7 mg d'un composé jaune brun à partir de 1 000 ml de culture. Cet extrait concentré a un seuil de six billions. La même année, on a isolé d'une culture de Streptomyces de la rivière CEDAR dans l'état Iowa, une huile jaune pâle appelée "fraction neutre". Pour 40 à 50 litres de bouillons de cultures, on a obtenu entre 0,3 à 0,35 ml de fraction neutre. Cette huile est considérée comme responsable de l'odeur de moisi (MORRIS et Coll., 1963).

Bien que fortement discutée, la participation de la flore

actinomycétique dans de telles manifestations, est à présent reconnue de façon indiscutable à la suite des travaux de GERBER et LECHEVALIER (1965), de ROSEN et Coll. (1970) et de DOUGHERTY et MORRIS (1967). Ces auteurs ont extrait 3 produits des cultures d'actinomycètes reconnus comme responsables des odeurs de terre et de moisi dans l'eau : ce sont la géosmine, le mucidone et le 2 méthyl-isobornéol.

Récemment, KIKUCHI et MIMURA (1974) ont mis en évidence deux autres métabolites, le 1-phényl-2-propanone et le 2-phényl-éthanol, des cultures d'actinomycètes.

1) La géosmine

Cette substance, responsable des odeurs terreuses dans l'eau, a été isolée en 1965 par GERBER et LECHEVALIER des bouillons de culture de Streptomyces, en particulier S. griseus LP-16.

Les bouillons de culture sont distillés jusqu'à ce que 20 % de leur volume se transforment en distillat (on remarque que 90 % des substances odorantes sont dans les premiers 10 % du distillat). Ce distillat, saturé à moitié à l'aide d'une solution de ClNa (20 g/100 ml) est ensuite traité dans 10 à 20 % de chlorure méthylène, puis concentré.

A l'aide de la chromatographie en phase gazeuse, du spectrophotomètre à l'infra-rouge, de la RMN et du spectromètre de masse à haute résolution, la géosmine est identifiée. C'est une huile neutre qui bout à 270°C et qui a un pouvoir rotatoire spécifique de - 16,5. Il s'agit du trans-1,10-diméthyl-trans-9-décalol. Elle a une concentration du seuil d'odeur de 0,2 µg/l. Ce produit, qui peut être considéré comme un sesquiterpène dépourvu de groupement isopropyle, se transforme en milieu acide en trois oléfines sans odeur nommées argosmines, dont l'argosmine C a pour formule 1,10-diméthyl-1(9)-octaline (GERBER, 1968).

En 1968, ROSEN et Coll., en analysant l'extrait des cultures de S. griseoluteus préparé par ROMANO et SAFFERMAN en 1963, ont montré que cet extrait est identique à la géosmine.

On trouve aussi cette substance chez les genres Nocardia et Microbispora (GERBER, 1968), chez les algues : Simploca muscorum (SAFFERMAN et Coll., 1967), Oscillatoria tenuis (MEDSKER et Coll., 1968) et chez les zygomycètes, Basidiobolus ranarum (GERBER, résultats non publiés).

2) Mucidone

Cette substance a été mise en évidence par DOUGHERTY et MORRIS en 1967. Il s'agit d'une fraction neutre existant dans le

bouillon d'une culture de Streptomyces isolée de la rivière CEDAR (IOWA). Cette lactone neutre est reconnue comme responsable de l'odeur de moisi dans l'eau. Sa formule globale est $C_{12}H_{18}O_2$; son poids moléculaire est de 194. ~~.....~~
~~.....~~. LECHEVALIER (1974) a constaté que le mucidone synthétique a une faible odeur fruitée, et devait être contaminé, par une substance odorante, probablement la géosmine.

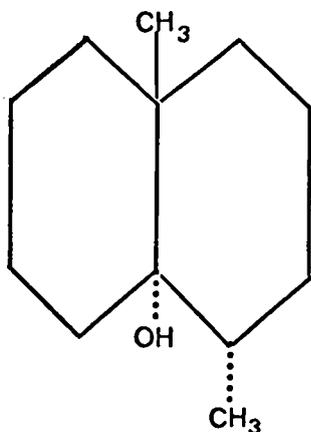
3) Le 2-méthyl-isobornéol

Ce produit a été isolé en 1970 par ROSEN et Coll. (1970) qui ont étudié l'eau du grand lac d'OHIO à l'époque où se manifestait intensément une odeur terreuse et simultanément par MEDSKER et Coll. (1969), GERBER (1969).

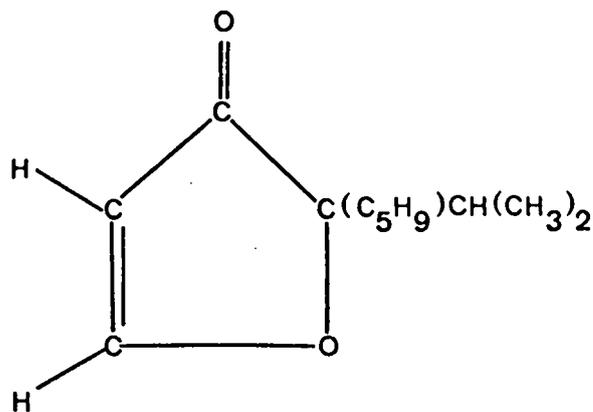
ROSEN et Coll. ont trouvé ce produit responsable d'odeur de terre et de moisi, dans un échantillon d'eau du lac, puis dans les cultures de Streptomyces isolées de ce lac et dans les souches de collection, en particulier S. lavendulae 3440-14.

Le 2-méthyl-isobornéol, dont le point d'ébullition est de l'ordre de 210°C, a un seuil de concentration de 0,1 µg/l. Il a pour formule $C_{11}H_{20}O$. C'est un alcool aliphatique dont la structure possède un groupement méthyl de moins que celle de la géosmine.

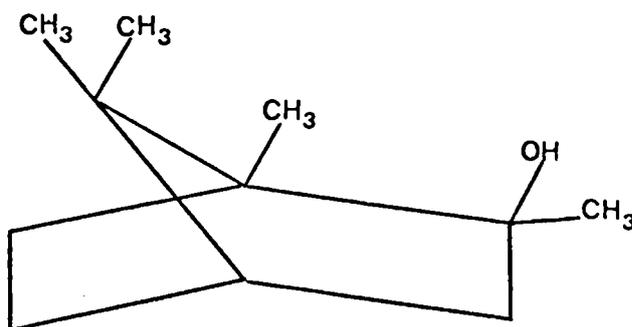
Formules :



Géosmine



Mucidone



2-méthylisobornéol

4) Le 1-phényl-2-propanone et le 2-phényl-éthanol

Ces deux métabolites ont été isolés et identifiés en 1974 par KIKUCHI et MIMURA, à partir de deux cultures d'actinomycètes dont l'une ressemble à S. platensis. A l'état pur, ces deux produits semblent inactifs, mais ils peuvent être partiellement responsables des odeurs désagréables dans l'eau de consommation en mélange avec la géosmine et le 2-méthyl-isobornéol.

D'autres métabolites volatiles secrétés par les actinomycètes ont été signalés. Il semble à présent que les deux principaux coupables sont la géosmine et le 2-méthyl-isobornéol.

5) Détection de géosmine et du 2-méthyl-isobornéol dans l'eau naturelle (ROSEN et Coll., 1970)

La méthode consiste à faire passer environ 3 000 litres d'eau à travers un filtre de carbone. Ce filtre est ensuite extrait avec du chloroforme. Le liquide obtenu est distillé, puis traité par l'éther. L'extrait étheré est finalement concentré à 1 ml puis analysé en chromatographie en phase gazeuse.

Par cette méthode, ROSEN et Coll. ont trouvé que les 5 échantillons d'eau du "Grand Lac" contiennent du 2-méthyl-isobornéol et que l'un contient en outre de la géosmine. Les mêmes auteurs ont ensuite étudié les échantillons à odeur terreuse du lac Indian (OHIO). Tous révèlent la présence de 2-méthyl-isobornéol.

6) Traitement

Afin de revaloriser la qualité de l'eau, plusieurs possibilités sont offertes :

. Les procédés classiques comme l'utilisation des agents oxydants (chloration au "break point") ne paraissent pas entièrement efficaces. On trouve encore des actinomycètes dans les réseaux de distribution après la stérilisation. L'emploi de KMnO_4 ou l'ozone, ne donne pas de résultats satisfaisants.

. Le seul remède actuel consiste à traiter à l'aide du charbon activé à 30 mg/l qui absorbe ces métabolites, (BAYS et Coll., 1970). Ce traitement élimine non seulement les odeurs, mais aussi certains composés inorganiques nocifs qui déprécient souvent la qualité des eaux.

Si le charbon activé paraît à nos yeux un moyen efficace, son champ d'application reste encore limité. Au point de vue économique, l'installation est onéreuse, et n'est rentable que dans de grandes installations, surtout à cause du caractère temporaire de ces odeurs de terre et de moisi.

. Les études récentes visent donc à rechercher d'autres méthodes plus pratiques et moins coûteuses. Une solution qui se révèle très intéressante, consiste à traiter le problème sur le plan biologique. Le principe est d'utiliser les microorganismes qui peuvent éliminer ces métabolites désagréables secrétés par les actinomycètes et les algues.

HOEN (1965) a signalé que l'emploi de Bacillus cereus est efficace dans l'élimination des odeurs terreuses.

. Les conditions nutritionnelles peuvent être envisagées. La privation d'éléments nutritifs (matières organiques) peut aussi éliminer indirectement la flore actinomycétique (SILVEY et Coll., 1972).

Deuxième partie

TRAVAUX de RECHERCHE

Chapitre I

Etude du dénombrement

I - INTRODUCTION

Quelles que soient les raisons que l'on ait de les étudier, le premier problème posé est de les isoler et de les dénombrer par des méthodes appropriées, efficaces et de préférence simples. Toutes les techniques décrites jusqu'à présent procèdent d'un même principe de sélection dû à la flore microbienne abondante et variée des échantillons étudiés. Dans l'étude du sol, certains auteurs introduisent dans leurs milieux de culture des antibiotiques pour empêcher la croissance des microflores antagonistes et par suite, faciliter celle des actinomycètes. Pour inhiber les champignons, CROOK et Coll. (1950) incorporent à leurs milieux le propionate de sodium à la concentration de 0,4 %. L'usage de l'actidione (ou cycloheximide) est souvent recommandé pour son pouvoir antifongique notable (DULANEY et Coll., 1955 ; CORKE et Coll., 1956 ; PORTER et Coll., 1960 ; WILLIAMS et DAVIES, 1965). Ces deux derniers auteurs signalent aussi l'efficacité du mélange nystatine-actidione (chacun à la concentration de 50 µg/ml). L'inhibition bactérienne se révèle plus difficile. DULANEY et Coll. recommandent une association complexe de cycloheximide, polymyxine, pénicilline et subtiline. PORTER et Coll., WILLIAMS et DAVIS constatent que cet effet s'exerce aussi

sur certaines souches d'actinomycètes : il serait donc préférable de les utiliser seulement pour l'isolement et non pour le dénombrement. OTTOW (1968) mentionne l'intérêt du rose de Bengal. TSAO et Coll. (1960), NAKKEEB et LECHEVALIER (1963) traitent les échantillons au carbonate de calcium avant la culture. Indépendamment des antibiotiques, il est possible de favoriser la sélection des actinomycètes grâce à des milieux chimiquement définis contenant des sources de carbone et d'azote convenables : glycérol - arginine (PORTER et Coll., 1960 ; NAKKEEB et LECHEVALIER, 1963), chitine (LINGAPPA et LOCKWOOD, 1961, 1962), amidon (ou glycérol) - caséine - nitrate (KUSTER et WILLIAMS, 1964), glycérol - caséinate de sodium (OLSON, 1968).

Dans l'eau, le dénombrement des actinomycètes rencontre des difficultés accrues par suite du rapport très élevé bactéries/actinomycètes, atteignant facilement 10^5 dans les eaux de surface. La sélection par des agents chimiques n'est le plus souvent pas suffisante et il est nécessaire de traiter au préalable les échantillons. Lorsque l'eau est relativement pure (eau de distribution) il devient indispensable de concentrer par filtration (W.R.A., 1968 ; BURMAN et Coll., 1969). Le chauffage à 44° pendant 1 h réduit considérablement la microflore aquatique (BAYS et Coll., 1970 ; BURMAN et Coll., 1969). La chloration ou même l'usage combiné de la chloration et du chauffage peut être nécessaire (BURMAN et Coll., 1969).

L'étude que nous présentons a pour but de rechercher, pour les échantillons d'eau de diverses natures, les méthodes de dénombrement les plus appropriées et les plus efficaces.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Origine et mode de prélèvement des échantillons

Les échantillons d'eau étudiés peuvent être classés en trois catégories suivant leur origine et leur qualité bactériologique globale.

. eau de rivière peu polluée contenant environ 10^3 germes par ml (dénombrement à 20°C).

. eau de rivière fortement polluée par des rejets domestiques et industriels et dont la charge microbienne est d'au moins 10^6 germes par ml.

. eau d'un bassin de lagunage destiné au traitement d'eaux de surface polluées. A l'entrée du bassin, le taux en bactéries est compris entre 10^5 - 10^6 par ml. A la sortie, il est de l'ordre de 10^3 - 10^4 .

Les échantillons d'eau ont été prélevés directement dans des flacons stériles. Les sédiments ont été prélevés à l'aide d'un appareil à ouverture commandée : les sédiments proviennent de la couche superficielle (10 premiers centimètres). Les analyses ont

été faites immédiatement après leur transport au laboratoire.

B - Traitements des échantillons d'eau

1) Décontamination

Pour des raisons évoquées plus haut, il est recommandé, surtout dans le cas des eaux polluées, de décontaminer l'échantillon. Cette méthode est décrite par BURMAN et Coll. (1969) : un volume de 200 ml d'eau est chauffé à 44° au bain-marie pendant 1 h ; on laisse refroidir à la température de la chambre. On traite par 0,4 ml de solution stérile de NH_4Cl à 0,38 % et par 2 ml d'une solution d'hypochlorite titrant 200 mg/l de chlore. On laisse reposer pendant 10 minutes, puis on ajoute 0,1 ml d'une solution stérile de thiosulfate de sodium à 3 % pour neutraliser le chlore.

2) Concentration par filtration

Il permet surtout pour les eaux limpides (eaux de distribution, eaux peu polluées) d'améliorer la sensibilité et la précision de la recherche. La technique est celle décrite dans un rapport de Water Research Association (1968) avec une légère modification. Un volume de 200 ml d'eau (traité ou non) est filtré sur membrane (0,45 μ). Les membranes sont placées ensuite dans des flacons de transfusion (150 ml) contenant 20 ml de solution de Ringer diluée

au 1/4 et 10 g de billes de verre de 2 mm de diamètre. Le tout est agité fortement au vortex pendant 5 minutes. L'échantillon est ensuite dilué jusqu'à 10^{-4} .

C - Traitement des sédiments

Dans un flacon de 150 ml, on dilue un poids défini de sédiment, compris entre 1 à 2 g, dans 20 ml de solution de Ringer au 1/4 et en présence de 10 g de billes de verre, comme précédemment. On agite fortement au vortex pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors prêts à êtreensemencés directement ou après homogénéisation.

D - Homogénéisation des échantillons

Les actinomycètes sont le plus souvent fixés dans l'eau à des matières solides : sédiments, végétaux, paroi des conduites et des réservoirs... Il apparaît donc souhaitable d'homogénéiser les échantillons. Ceux-ci, bruts ou traités sont distribués à raison de 5 ml dans des tubes à essais (16 x 160), puis placés ensuite dans une cuve à ultrason (Appareil KERRY : type KS 101, 45 KHz, Kerry Ultrasonics Ltd, Hitchin Hertz). La dilution et l'ensemencement se font immédiatement après homogénéisation.

E - Ensemencement

Les milieux de culture sont décrits en annexe. L'ensemencement se fait par inondation en surface de 1 ml d'échantillon d'eau, brut ou dilué (jusqu'à 10^{-4}). On utilise 3 boîtes par dilution. Les boîtes ouvertes sont mises à sécher à l'étuve à 44° pendant 30 - 45 minutes. Dans le cas de sédiments, il se fait par étalement en surface de 0,1 ml d'échantillon (10^{-1} à 10^{-5}) dans chaque boîte à raison de 3 boîtes par dilution. Tous les milieux sont incubés à 27°C . La lecture des résultats se fait après 3 semaines d'incubation. Les colonies d'actinomycètes sont faciles à distinguer de celles des bactéries ou des champignons, comme nous le verrons ultérieurement.

F - Essai d'antibiotiques

1) Préparation des solutions d'antibiotiques

Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées à l'aide de bougies Chamberland. Elles sont ensuite incorporées extemporanément dans le milieu de culture préalablement fondu et refroidi à 45°C . Les souches tests sont ensemencées en stries sur la surface de la gélose à raison de 4 souches par boîtes (chaque test est répété sur 3 boîtes). Les résultats sont comparés par rapport aux témoins

ensemencés sur le même milieu sans antibiotique, après 7 à 15 jours d'incubation à 27°C.

2) Milieu utilisé (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

. Extrait de levure.....	4 g
. Extrait de Malt.....	10 g
. Dextrose.....	4 g
. Agar.....	20 g
. Eau distillée.....	1000 ml

pH : 7,3

Stériliser 15 minutes à 120°C.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Pour apprécier la valeur des techniques, nous avons étudié d'une part le pouvoir d'inhibition des antibiotiques antifongiques et antibactériens sur des souches d'actinomycètes, d'autre part l'efficacité du traitement des échantillons dans l'élimination des contaminations bactériennes, enfin la sensibilité des milieux de culture décrits dans la littérature. Ces deux dernières séries

.../...

d'expériences ont porté sur des échantillons d'eaux de surface faiblement ou fortement polluées et sur les échantillons de sédiments correspondants. Les dénombrements ont été pratiqués en triple exemplaire pour les échantillons bruts et pour toutes les dilutions. Les résultats donnés correspondent à la moyenne de 3 échantillons (tableau 5), ou la moyenne de 9 échantillons (tableaux 6 et 7).

A - Antibiotiques

55 souches d'actinomycètes isolées de l'eau dont 45 de Streptomyces et 10 de Micromonospora ont été testées vis-à-vis de 4 antibiotiques : actidione, pénicilline, streptomycine, néomycine aux doses de 5 - 10 - 20 - 40 µg/ml.

1) Antibiotique antifongique

Aucune de nos souches n'a été sensible au cycloheximide à la dose de 40 µg/ml. Des résultats semblables ont été signalés par CORKE et CHASE (1956), PORTER et Coll. (1960), WILLIAMS et DAVIES (1965). L'emploi de cet antibiotique se révèle donc très utile ; il élimine une bonne partie des champignons qui, à cause de leur mycélium, gênent souvent la croissance des actinomycètes et empêchent leur dénombrement. Dans les conditions de notre

expérience, la dose de 40 µg/ml est suffisante pour inhiber la croissance des champignons : aucune de leurs colonies n'a été observée.

2) Antibiotique antibactérien

L'utilisation des antibiotiques antibactériens (pénicilline, streptomycine, néomycine) ne paraît pas recommandable. Toutes nos souches y sont plus ou moins sensibles à diverses concentrations. WILLIAMS et DAVIES (1965), en étudiant les germes du sol, ont signalé que 10 % des souches tests sont inhibées par la pénicilline à la dose de 1 µg/ml. Nous avons remarqué en plus que l'emploi de la pénicilline à la dose de 20 - 30 unités/ml, sans avoir d'effet notable sur la microflore bactérienne, inhibe une partie des souches d'actinomycètes.

L'emploi des antibiotiques antibactériens se révèle donc nocif, bien que certains auteurs (DULANEY et Coll., 1955 ; WILLIAMS et DAVIES, 1965) les aient recommandés pour l'isolement des actinomycètes du sol. De même, l'utilisation du rose de Bengale, proposée par OTTOW (1968), ne nous donne pas satisfaction, une partie de nos souches étant inhibée.

B - Traitement des échantillons

Nous avons recherché l'utilité des techniques de décontamination et de concentration des échantillons pour dénombrer les

actinomycètes dans des eaux de surface faiblement ou fortement polluées. Le milieu d'OLSON (1968) a été employé, additionné de 40 µg/ml de cycloheximide. 4 séries d'essais ont été effectuées. Les résultats sont rapportés dans le tableau 5.

La méthode normale de dénombrement par dilution, utilisée couramment en bactériologie, ne donne pas de résultats interprétables : cela est dû à la faible quantité d'actinomycètes présents dans l'eau d'une part, et d'autre part au pourcentage très élevé des contaminants bactériens. Par contre, la concentration par filtration suivant la méthode décrite plus haut donne des résultats très significatifs avec le milieu ci-dessus défini. Sur le plan technique, BURMAN et Coll. (1969) proposent l'application directe de la membrane à la surface du milieu à la chitine (face supportant les microorganismes au contact du milieu). Après incubation à 30° pendant 4 h, les membranes sont enlevées et les boîtes sont ensuite placées dans une enceinte à 27°. Nous avons réalisé des essais selon cette méthode, sur 8 échantillons d'eaux peu polluées, en filtrant des quantités de 10 - 50 - 100 - 200 ml. Ils se sont révélés totalement inefficaces par rapport à la méthode décrite précédemment.

La concentration des échantillons est utile, mais elle présente l'inconvénient de récolter en même temps les bactéries antagonistes : le nombre des bactéries retenues sur la membrane est souvent considérable. Le traitement des échantillons par

Echantillons	Traitements	Dilution directe sans filtration	Filtration	Décontamination et filtration
Rivière peu polluée :				
1		-	420	500
2		-	390	510
3		-	245	250
4		-	90	110
moyenne		-	286	342
Rivière polluée :				
1		-	230	640
2		-	390	690
3		-	345	640
4		-	240	550
moyenne		-	300	630
Bassin de lagunage : entrée				
1		-	260	510
2		-	245	520
3		-	390	580
4		-	370	590
moyenne		-	316	550
Bassin de lagunage : sortie				
1		-	20	50
2		-	25	60
3		-	25	70
4		-	50	80
moyenne		-	30	65

TABLEAU 5 : Etude des traitements de décontamination et de filtration sur la récupération des actinomycètes de l'eau. Les chiffres donnés correspondent au nombre d'actinomycètes dans 100 ml.

- : Présence irrégulière, non interprétable



chauffage et chloration avant la filtration a été expérimenté pour observer la réduction de ces bactéries contaminantes. Les résultats enregistrés sont tout à fait remarquables si on les compare aux précédents. Dans tous les cas, les taux d'actinomycètes sont significativement plus élevés qu'avec la technique de simple concentration. Cette amélioration est surtout remarquable avec les eaux polluées des rivières et du bassin de lagunage. Le nombre d'actinomycètes obtenu par ce procédé a presque doublé. Nous remarquons aussi que le nombre de bactéries baisse notablement d'environ 70 %. Des cultures pures de 55 souches d'actinomycètes isolées de l'eau ont été soumises à ce traitement sans aucune diminution de leur nombre.

C - Homogénéisation

L'étude a été menée comme précédemment sur des échantillons d'eau de deux rivières et d'un bassin de lagunage. Les échantillons d'eau sont traités, filtrés et redilués dans 20 ml de solution de Ringer 1/4. Les échantillons de sédiments (1 à 2 g) sont dilués dans 20 ml de solution de Ringer 1/4. Les uns et les autres sont agités fortement au vortex à l'aide des billes de verre pendant 5 minutes, puis traités aux ultrasons. Le milieu d'OLSON a été utilisé, additionné de 40 µg d'actidione/ml. Les résultats sont rapportés dans le tableau 6.

1) Eaux

PIKE et Coll. (1972) ont montré que le dénombrement des

Echantillons Temps d'homogénéisation	Actinomycètes par 100 ml d'eau				Actinomycètes par g de sédiments ($\times 10^3$)			
	Rivière peu polluée	Rivière polluée	Bassin de lagunage		Rivière peu polluée	Rivière polluée	Bassin de lagunage	
			Entrée	Sortie			Entrée	Sortie
Témoin non homogénéisé	95	220	300	60	39,2	6,7	6,0	10,4
15 mn	130	265	310	85	41,2	11,2	5,0	13,1
30 mn	135	245	355	95	43,5	10,9	6,9	14,0
60 mn	110	210	330	70	45,0	12,8	10,6	21,3

TABLEAU 6 : Etude de l'homogénéisation

(Les chiffres correspondent à des moyennes de résultats portant sur 9 échantillons)



bactéries dans les boues activées donne de meilleurs résultats en traitant les échantillons pendant 1 minute dans une cuve à ultrason. Le rapport entre le nombre des bactéries de l'échantillon homogénéisé et non homogénéisé s'accroît jusqu'à une minute pour diminuer ensuite notablement.

Des études préliminaires nous ont montré que le traitement aux ultrasons devait être prolongé durant un minimum de 15 minutes pour être décelable. Dans le tableau 6, on constate que le rendement est maximum entre 15 à 30 minutes. Après 60 minutes, il a tendance à décroître. La température de l'eau de la cuve augmente, atteignant plus de 44°C. En outre, la prédominance de colonies muqueuses sur les milieux peut gêner la croissance des actinomycètes. Il semble donc que l'homogénéisation par les ultrasons présente un intérêt relatif dans ce dénombrement.

2) Sédiments

Dans les sédiments, l'homogénéisation nous fournit des résultats très encourageants. Après un traitement de 60 minutes, le nombre d'actinomycètes est nettement supérieur au témoin. Cette constatation est surtout remarquable avec les sédiments des rivières polluées. Des essais réalisés dans les mêmes conditions sur des suspensions de culture pure de 25 souches d'actinomycètes isolées de l'eau, confirment cette amélioration. La température de l'eau dans la cuve à ultrasons continue pourtant à augmenter et il ne semble pas recommandable de prolonger un traitement

susceptible de nuire à la viabilité de ces microorganismes.

D - Milieux de culture

Nous avons recherché le milieu le plus spécifique et le plus sensible. Les 5 milieux décrits dans l'annexe ont été utilisés parallèlement. Tous ont reçu de l'actidione à raison de 40 µg/ml. Les échantillons d'eau ont été traités, filtrés et redilués dans 20 ml de solution de Ringer 1/4, puis passés au vortex pendant 5 minutes à l'aide des billes de verre. Les sédiments (1 - 2 g) ont été dilués dans 20 ml de solution de Ringer 1/4, agités au vortex pendant 5 minutes environ et traités ensuite aux ultrasons pendant 60 minutes. Les chiffres donnés dans le tableau 7 correspondent à la moyenne de 9 échantillons étudiés. Les résultats de nos essais font apparaître une supériorité d'ensemble de 3 milieux K.W., O., et L.L., c'est-à-dire de ceux qui contiennent de la caséine ou de la chitine. Cette sensibilité doit être discutée en fonction de l'origine et du degré de pollution des eaux soumises à l'analyse.

Dans le cas des eaux de surface de bonne qualité bactériologique, peu contaminées, le milieu L.L. se révèle nettement le meilleur de tous. Par contre, il donne des résultats illisibles, ininterprétables avec les eaux fortement polluées. En outre, sur le plan pratique, le repérage et la lecture des colonies sont rendus difficiles par l'opacité du milieu d'une part, et par la

.../...

Echantillons	Milieux	L.B.	N.L.	K.W.	O.	L.L.
I - Eaux (Actinomycètes/100 ml)						
	Rivière peu polluée	60	75	90	110	145
	Rivière polluée	400	450	500	650	i
	Bassin de lagunage : entrée	250	380	300	360	i
	Bassin de lagunage : sortie	30	40	50	90	i
II - Sédiments (Actinomycètes/g x 10³)						
	Rivière peu polluée	31.0	42.5	45.0	47.0	61.0
	Rivière polluée	3.5	8.2	8.5	8.4	i
	Bassin de lagunage : entrée	4.7	7.1	7.7	8.2	i
	Bassin de lagunage : sortie	6.3	10.5	15.5	16.2	i

TABLEAU 7 : Etude comparative des différents milieux :
 L.B. = milieu de Lindenbein modifié par Benedict
 N.L. = milieu de Nakeeb - Lechevalier
 K.W. = milieu de Kuster - Williams
 O. = milieu d'Olson
 L.L. = milieu de Lingappa - Lockwood



i = illisible

taille des colonies qui se distinguent assez mal de la population microbienne d'autre part. La même remarque a été formulée par WILLIAMS et DAVIES (1965).

Des résultats très favorables ont été obtenus avec le milieu d'OLSON à base de caséinate de sodium, aussi bien dans les eaux de toutes catégories que dans les sédiments. Les colonies sont faciles à dénombrer. Avec les eaux peu polluées, les taux relevés sont légèrement inférieurs à celui du milieu L.L. Par contre, dans le cas des eaux fortement contaminées, ce taux est toujours le plus grand. Le milieu K.W., également à base de caséine, fournit des résultats souvent comparables, surtout dans le cas des sédiments, un peu plus faible cependant dans les eaux. Les milieux L.B. et N.L. enfin, qui contiennent du glycérol comme source de carbone et de l'arginine comme source d'azote, sont, de tous, les moins sensibles, quels que soient les échantillons analysés.

Ainsi, le choix d'un substrat convenable pourrait se limiter entre le milieu d'OLSON favorable à l'analyse des échantillons faiblement ou fortement pollués et le milieu à la chitine (L.L.) utilisable uniquement dans le cas des milieux peu pollués.

.../...

IV - CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus met en lumière un certain nombre de notions intéressantes sur le plan pratique.

. L'emploi d'antibiotique antifongique (comme l'actidione) se révèle efficace dans l'inhibition des champignons qui gênent parfois la croissance des actinomycètes. Notre étude montre que leur pouvoir inhibiteur est nul vis-à-vis de ces derniers.

. Le traitement des échantillons d'eau est recommandable dans tous les cas. Avec les eaux peu polluées, la concentration par filtration paraît suffisante. Avec les eaux fortement polluées, les traitements de chauffage, de chloration suivis d'une filtration sont souhaitables.

. L'homogénéisation, peu utile dans le cas des échantillons d'eau, s'avère très favorable en ce qui concerne les sédiments.

. Le milieu à base de caséinate de sodium paraît le plus sensible pour le dénombrement des actinomycètes dans les milieux pollués plus ou moins intensément. Le milieu à base de chitine fournit d'excellents résultats dans le cas des eaux faiblement polluées.

En tenant compte de ces observations, les techniques suivantes peuvent être recommandées :

1) Eaux peu polluées : Eaux de stockage, eaux de réservoirs, eaux de surface, eaux d'alimentation.

Filtrer sur membrane (0,45 μ) un volume d'eau de 200 à 500 ml (variable suivant le degré de la pollution de l'échantillon étudié). Placer la membrane dans un flacon contenant 10 g de billes de verre de 2 mm de diamètre et 10 ml de solution de Ringer diluée au 1/4. Agiter fortement au vortex pendant 5 minutes. Faire des dilutions de 10 en 10 jusqu'à 10^{-4} . Ensemencer 1 ml d'eau brute ou diluée à la surface de chaque milieu. Les boîtes, ouvertes, sont mises à l'étuve à 44° durant 30 à 45 minutes. Après séchage, elles sont incubées normalement à 27° pendant 3 semaines.

On peut utiliser indifféremment le milieu à la chitine de LINGAPPA et LOCKWOOD ou celui à la caséine d'OLSON après incorporation de 40 μ g d'actidione par ml. L'emploi des deux milieux parallèlement est la solution la meilleure.

2) Eaux polluées : Eaux de rivières

Chauffer un volume de 200 ml d'eau pendant 1 h au bain-marie à 44°C. Laisser refroidir à la température du laboratoire. Traiter par 0,4 ml d'une solution stérile de NH_4Cl à 0,38 % et par 2 ml d'une solution d'hypochlorite titrant 200 mg de chlore par litre. Laisser reposer pendant 10 minutes puis ajouter 0,1 ml d'une solution stérile de thiosulfate de sodium à 3 %.

Filtrer l'échantillon (si possible dans sa totalité soit

200 ml sinon 100 ml). Poursuivre ensuite, selon la description précédente.

Le milieu à base de caséinate de sodium d'OLSON est utilisé, additionné de 40 µg/ml d'actidione.

3) Sédiments

Un poids défini (1 - 2 g) de sédiments est dilué dans 20 ml de solution de Ringer dilué au 1/4 dans un flacon contenant 10 g de billes de verre. Agiter fortement le flacon au vortex pendant 5 minutes. Traiter le liquide obtenu aux ultrasons pendant 60 minutes. Diluer jusqu'à 10^{-5} et ensemercer par étalement en surface 0,1 ml de l'échantillon brut ou dilué sur chaque milieu. La lecture des résultats se fait après 3 semaines d'incubation à 27°C.

Le milieu d'OLSON additionné de 40 µg/ml d'actidione est recommandé.

Les colonies d'actinomycètes diffèrent de celles de champignons par leur taille beaucoup plus petite (1 - 4 mm de diamètre) et par leur développement non envahissant. Elles se distinguent de celles des bactéries par leur aspect compact, sec, quelquefois poudreux, quelquefois entourées d'un ou plusieurs liserés concentriques et adhérant fortement au milieu. Dans les cas douteux, l'examen à la loupe binoculaire (x 100) est nécessaire. Un réseau très dense de filaments tenus d'environ 1 µ de diamètre entoure ces colonies ; cet aspect les différencie des champignons dont les filaments sont beaucoup plus grands, d'une part, et des bactéries

dépourvues de mycélium, d'autre part.

Avec le milieu L.L., l'aspect n'est pas très typique. Les colonies, entourées d'un halo clair, sont petites ; leur développement est réduit. Les pigments sont quelquefois absents ou peu visibles. L'examen à la loupe est alors nécessaire. Avec le milieu d'OLSON, les colonies sont plus faciles à reconnaître par leur aspect morphologique : le mycélium aérien est particulièrement développé dans le cas des Streptomyces.

L'isolement pour étude complémentaire peut se faire en ensemençant directement, en stries, dans des tubes ou dans des boîtes : on prélève soit un peu de mycélium aérien dans le cas où celui-ci est bien développé, soit un morceau de gélose portant la culture dans le cas où celle-ci compacte, adhère fortement au milieu. Plusieurs milieux ont été conseillés. Les milieux de KUSTER - WILLIAMS et de SHIRLING - GOTTLIEB peuvent être utilisés avec satisfaction.

Les actinomycètes isolés de l'eau appartiennent le plus souvent aux genres Streptomyces, Micromonospora, Streptosporangium, Streptoverticillium, Nocardia. Les 2 premiers genres sont les plus représentatifs.

Chapitre II
Etude de l'identification

I - INTRODUCTION

Les importants progrès réalisés au cours de ces dernières années dans la classification des bactéries sont dus à la mise en évidence de constituants spécifiques ou de propriétés nouvelles et à des nouvelles méthodes d'utilisation des données.

Le monde des actinomycètes n'a pas échappé à cette évolution. Le tableau de la classification traditionnelle qui a été décrit dans le "BERGEY'S MANUAL" en 1957, mérite d'être totalement revu. Des propositions ont été formulées pour le modifier. Elles font appel à des critères très variés : la morphologie (WAKSMAN, 1961 ; BALDACCII et LOCCI, 1970), l'étude des bases de l'ADN (YAMAGUCHI, 1967 ; DE LEY, 1970 ; TSYGANOV et Coll., 1966), la sensibilité aux actinophages (BRADLEY et ANDERSON, 1958), la taxonomie numérique (GOODFELLOW, 1971 ; GOODFELLOW et Coll., 1972 ; SNEATH, 1970), l'étude des constituants pariétaux et cellulaires

.../...

(CUMMINS et HARRIS, 1958 ; LECHEVALIER H.A. et M.P., 1970 ; YAMAGUCHI, 1965 ; NONOMURA, 1974), etc... Deux de ces critères jouent un rôle majeur. L'un, la morphologie, a toujours été le point de départ de toute identification. Il a même constitué, dans le passé, l'unique caractère. L'autre, est l'étude des constituants cellulaires. Il a progressivement pris une place qui tend à devenir privilégiée (PRAUSER, 1970).

Au cours de notre étude sur le dénombrement (CHEA et LECLERC, 1973), nous avons isolé 172 souches d'actinomycètes à partir d'échantillons d'eau de surface. Ce travail a pour but de présenter les méthodes que nous avons développées pour aboutir à leur identification en nous basant sur les deux critères ci-dessus définis.

II - MATERIELS ET METHODES

A - Etudes morphologiques

Du fait de la complexité de leurs structures et de leurs modes de croissance, l'étude morphologique des actinomycètes exige plusieurs méthodes d'approche et des milieux de culture assez variés.

Les principaux éléments d'identification que nous avons retenus sont :

- . la présence ou l'absence des sporocystes et leur morphologie,
- . la fragmentation du mycélium végétatif,
- . la présence ou l'absence du mycélium aérien,
- . la présence des spores, leur morphologie ainsi que celle des sporophores.

1) Examen direct au microscope

Les cultures sont ensemencées en stries quadrillées à la surface d'un milieu solide approprié dans des boîtes de Pétri. Après un temps d'incubation variable selon les espèces, les boîtes sont mises directement sur la platine du microscope. L'examen des cultures s'effectue à l'aide d'un objectif à longue distance frontale (x 32). L'observation doit être poursuivie tous les 4 - 5 jours jusqu'à ce que la culture parvienne à maturité (3 - 4 semaines).

Cette technique (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966) offre l'avantage d'observer les cultures intactes. Elle permet de distinguer la forme du mycélium aérien (droit, ondulé, verticillé ou spiralé), les spores et les sporocystes. L'objectif (x 32) distingue cependant mal la fragmentation du mycélium végétatif. Aussi, est-il

nécessaire d'avoir recours à la méthode de culture sur lamelles.

2) Culture sur lamelles insérées dans le milieu

La méthode (WILLIAMS et Coll., 1968) consiste à insérer obliquement à 45° les lamelles stériles dans un milieu solide convenable, les souches étant ensemencées sur la ligne de contact externe de la lamelle avec la surface du milieu (3 lamelles par boîtes).

Pour examiner le mycélium à l'immersion dans les meilleures conditions, nous avons procédé comme suit : les lamelles avec leurs cultures adhérentes sont retirées du milieu, essuyées soigneusement sur leur surface interne exempte de croissance, puis déposées sur une lame : trois petits spots de colle judicieusement placés sur cette lame serviront de support à la lamelle et ménageront un espace dans lequel le mycélium restera prisonnier et parfaitement observable au microscope à l'immersion.

Par cette méthode, il est possible de distinguer nettement la fragmentation du mycélium végétatif et les chaînes de spores.

3) Culture en milieu liquide

La culture de Micromonospora exige des précautions particulières. La technique de LUEDEMANN (1969) que nous avons suivie,

consiste à ensemercer les souches en milieu liquide, soit dans des erlenmeyers, soit dans des tubes placés dans un bain-marie agité. Les examens se font à intervalles réguliers tous les 2 jours : on étale une petite goutte de culture sur une lamelle. Puis, à l'aide d'une soufflerie à air chaud, on évapore le liquide jusqu'à siccité. La lamelle est ensuite déposée sur une lame, au contact d'une goutte de colorant (érythrosine ou cristal violet). On observe en contraste de phase à l'objectif à immersion.

Par cette méthode, les spores uniques de Micromonospora sont parfaitement distinguées.

4) Milieus de culture

L'aspect morphologique des actinomycètes doit être observé dans les conditions les plus favorables. Parmi les nombreux milieux de culture utiles, nous avons retenu les milieux "YEG", "YE-ME", "GA", "PCA", "PGA" et "Th" dont les compositions figurent dans l'annexe. Le milieu "Th" est utilisé spécialement pour étudier les souches thermophiles.

La mise en évidence des sporocystes des Actinoplanaceae exige les milieux suivants :

- milieux solides : "Ch", "GA", "PCA" et "PGA".

Dans le cas des souches non fructifiantes, on préconise l'incorporation de l'acide humique à la concentration finale de 0,5 % dans le milieu de culture (WILLOUGHBY et Coll., 1968).

• milieu liquide :

On utilise des feuilles de graminées que l'on découpe en lamelles de 1 x 10 cm. Chaque lamelle est introduite dans des tubes de 16 x 160, contenant 10 ml d'eau distillée, puis stérilisée à l'autoclave à 110°C durant 20 mn.

Après ensemencement, les tubes sont incubés à 27 - 30°C pendant un temps allant de 3 à 5 semaines. On observe un feutrage mycélien qui émerge à la surface de l'eau et poursuit sa croissance sur la partie végétale non immergée.

Pour l'examen microscopique, on dépose la feuille sur une lame porte-objet : on l'observe avec l'objectif à longue distance frontale.

B - Etude biochimique

Les techniques que nous avons suivies ont été décrites par BECKER et Coll. (1964), LECHEVALIER (1968) et MORDASKA et Coll. (1972).

Les souches sont cultivées dans 100 ml de milieu liquide, principalement le milieu "YEG", en erlenmeyers (250 ml) placés dans un bain-marie agité (Modèle G 76 New Brunswick Scientific) à mouvement giratoire. Après un temps d'incubation variable suivant les souches, les cultures sont tuées par le formol (concentration finale 1%) durant 18 h à 37°C, puis lavées deux fois à l'eau

distillée et une fois à l'alcool éthylique à 95°. Après centrifugation, les culots sont recueillis dans des petits cristallisoirs et séchés au dessiccateur.

1) Mise en évidence des isomères de DAP (BECKER et Coll., 1964)

10 mg de cellules séchées sont additionnés à 1 ml de HCl 6N dans des tubes (10 x 160) scellés puis placés à l'étuve à 100° pendant 18 heures pour leur hydrolyse. Après refroidissement, la suspension est filtrée sous vide sur membrane Millipore de 0,45 μ , puis lavée à l'aide de quelques gouttes d'eau distillée. Le filtrat est placé dans un petit cristallisoir en porcelaine et évaporé jusqu'à siccité sur un bain de sable à la température de 85 - 90°, puis repris par 1 ml d'eau distillée (3 fois consécutives). Cette opération a pour but d'éliminer toute trace d'acide. Le résidu est dilué dans 0,3 ml d'eau distillée. Une chromatographie descendante est effectuée sur papier WATHMAN n° 1, à partir de 20 μ l de la dilution. Le témoin est constitué de 10 μ l d'une solution de 0,01 M d'acide DL - α , E - diaminopimélique (SIGMA) ; le solvant est un mélange méthanol : eau : HCl 10N : pyridine (80 : 17,5 : 2,5 : 10). On révèle à l'aide d'une solution acétonique de ninhydrine (0,1 %) en portant à l'étuve à 100° pendant 2 à 5 minutes. Le ll-DAP migré un peu plus vite que le meso-DAP.

2) Mise en évidence des sucres (LECHEVALIER, 1968)

On prépare 50 mg de cellules séchées que l'on soumet à une

hydrolyse sulfurique (1 ml de H_2SO_4N) durant 2 h à l'étuve à 100°C en tubes (10 x 160) scellés. Après refroidissement, le contenu acide est additionné d'une solution saturée d'hydroxyde de baryum jusqu'à pH compris entre 5 et 5,5. On filtre sur membrane Millipore de 0,45 μ . Le filtrat est additionné de 2 ml de chloroforme pour prévenir toute contamination au cours des opérations qui suivent. Il est ensuite séché à l'étuve à 40°C pendant 18 à 24 heures. Le résidu est repris dans 0,4 ml d'eau. On utilise 30 à 40 μ l de cette dilution pour chromatographie sur papier Wathman n°1. Le témoin est un mélange des sucres galactose, glucose, mannose, arabinose, xylose, à la concentration de 50 γ . La migration descendante s'effectue dans le solvant n - butanol : eau : pyridine - toluène (5 : 3 : 3 : 4) pendant 48 à 56 h. Pour la révélation, on pulvérise une solution de phtalate d'aniline (3,25 g d'acide phtalique dans 100 ml de butanol additionné de 2 ml d'aniline), puis on procède à un séchage à l'étuve à 110° pendant 5 minutes.

3) Mise en évidence du lipide caractéristique de Nocardia
"LCN-A" (MORDASKA et Coll., 1972)

On mélange 100 mg de cellules séchées dans un tube à hémolyse à 2 ml du mélange "éthanol - éther" (1/1). Les tubes sont bouchés hermétiquement, laissés à la température ambiante pendant 3 à 4 h, et agités par intermittence. Le liquide après filtration sur membrane est séché à 37°C. Le résidu est dilué à l'aide de

0,1 ml de mélange "chloroforme - méthanol" (5/1). On prélève 40 µl de liquide pour une chromatographie ascendante en couche mince. Les extraits d'une souche de Nocardia sp. et de celle de Mycobacterium smegmatis se servent de témoins. Le solvant utilisé est le mélange éther de pétrole (40 - 65°C) : éther éthylique : acide acétique (85 : 15 : 1). Lorsque le solvant est parvenu par migration jusqu'au sommet, le support de silice est retiré et séché pendant 3 à 4 heures sous hotte ventilée. On révèle sous vapeur d'iode. Pour isoler dans les meilleures conditions le LCN - A des autres lipides, on effectue une seconde chromatographie avec du méthanol pur, puis on révèle.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Pour la majorité des souches étudiées, les aspects morphologiques et culturaux ont constitué les critères essentiels d'identification. D'autres, par contre, ont nécessité l'étude des constituants cellulaires. Il apparaît finalement utile d'associer la double analyse morphologique et biochimique dans tous les cas.

.../...

A - Identification morphologique prédominante

1) Un ensemble de 98 souches appartient au genre Streptomyces sur la base des caractères morphologiques et cultureux. Elles produisent un mycélium végétatif non fragmenté, un mycélium aérien abondant et bien développé.

Les spores, en nombre supérieur à 20, sont disposées en chaînes. Leur surface est lisse ou échinulée. Les sporophores sont du type "recti-flexibilis" : RF, ou enroulés à l'extrémité (retinaculiaperti : RA), ou spiralés (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

Toutes les espèces sont mésophiles (27 - 30°C) et sont incapables de se développer à 44°C. Elles forment des colonies de 3 à 5 mm, parfois 7 mm de diamètre, à croissance concentrique. On n'observe jamais de sclérotés, ni de sporocystes. Les pigments et la couleur du mycélium sont très variés. La production de mélanine est rencontrée dans quelques souches.

L'appartenance au genre Streptomyces a été confirmée par l'étude des constituants de la paroi : les analyses biochimiques de 45 d'entre elles révèlent la présence de l'acide diaminopimélique sous forme II.

2) Un autre ensemble de 40 souches se différencie du précédent

.../...

par l'absence de mycélium aérien et de sporocyste ; elles présentent un mycélium végétatif ténu, non fragmenté. Contrairement aux précédentes, les spores sont uniques et rattachées sur le mycélium ou à son extrémité par de courts sporophores. Les colonies ont la grosseur d'une tête d'épingle, soit environ 1 mm de diamètre. Elles sont pigmentées en jaune, jaune orangé ou rouge, puis se teintent ultérieurement en noir ou en brun foncé. Elles sont sèches ou brillantes. La croissance est lente (2 à 3 semaines). Elle se manifeste dans les meilleures conditions à la température de 27 à 30°C (mésophile). Elles appartiennent au genre MICROMONOSPORA.

3) Cinq souches ont les caractères typiques suivants : mycélium végétatif fragmenté en éléments bacillaires ou coccoïdes, mycélium aérien très peu développé. Leur croissance varie de 4 à 15 jours. Toutes sont mésophiles et dépourvues de sporocyste. Ces 5 souches appartiennent au genre NOCARDIA.

B - Identification biochimique et morphologique

Les souches restantes, au nombre de 29, ne peuvent être identifiées sur l'observation des seuls caractères morphologiques. Elles peuvent être néanmoins groupées en 8 séries, en fonction de leurs aspects morphologiques et culturels comme cela apparaît dans le tableau 8.

Séries	Nombre de souches	Sporocyste	Mycélium végétatif	Mycélium aérien	Spore	Tp° de croissance	Genres possibles
A	8	-	?	variable ou p.	chaînes	27 - 37°	Streptomyces ou Nocardia
B	2	-	n. f.	a.	chaînes	45°	Streptomyces thermophiles
C	1	-	n. f.	p.	uniques	27°	Saccharomonospora
D	1	-	forme irrégulière	a.	chaînes	27°	Pseudonocardia
E	3	-	f.	t. p.	-	27°	Nocardia ou Mycobacterium
F	1	-	?	p.	Courtes chaînes	45°	Actinomadura
G	12	-	n. f.	-	uniques?	27 - 37°	Micromonospora
H	1	globuleux	n. f.	p.	- ?	27°	Streptosporangium

TABLEAU 8 : Observations morphologiques des 29 souches

p. = pauvre ; a. = abondant ; t.p. = très pauvre ; f. = fragmenté ; n.f. = non fragmenté ; ? = difficile à interpréter



L'étude des constituants cellulaires donne des résultats qui figurent dans le tableau 9.

Séries Constituants cellulaires	A	B	C	D	E	F	G	H
	11 - DAP	+	+	-	-	-	-	-
meso - DAP	-	-	+	+	+	+	+	+
Xylose			-	-	-	-	+	-
Madurose			-	-	-	+	-	+
Galactose			+	+	+	-	-	-
Arabinose			+	+	+	-	+	-

TABLEAU 9 : Constituants cellulaires des 29 souches

Les travaux de LECHEVALIER et Coll. (1964, 1965, 1968, 1968, 1970) ont montré que les euactinomycètes présentent 4 types de parois différentes sur la base des constituants chimiques essentiels.

Le premier type contient le 11-DAP, et n'a pas de sucres

caractéristiques ; les 3 autres types possèdent le meso-DAP et des sucres cellulaires dont la nature et la variété sont déterminantes du type. Le tableau 10 résume l'ensemble de ces données.

Types de parois	11-DAP +	meso - DAP +			Familles
		Xyl. + Ara. +	Madu- rose +	Ara. + Gal. +	
I	+	-	-	-	Streptomycetaceae
II	-	+	-	-	• Micromonosporaceae • Actinoplanaceae
III	-	-	+	-	• Actinoplanaceae • Thermoactinomycetaceae
IV	-	-	-	+	Nocardiaceae

TABLEAU 10 : Composition en sucres de la cellule

La comparaison des tableaux 8, 9, 10, en associant les données morphologiques et chimiques précédentes, conduit à l'identification, conformément à l'analyse suivante :

• Les souches des séries A et B ont une paroi de type I et appartiennent donc à la famille des Streptomycetaceae. Elles forment toutes des spores en chaînes et sont dépourvues de sporocystes.

Celles de la série A, bien que la production du mycélium aérien soit variable, font partie du genre Streptomyces. Celles de la série B, qui exigent une température élevée de croissance, sont des Streptomyces thermophiles.

. Les souches de la série C ont les mêmes propriétés que la souche témoin T 80 (NONOMURA et OHARA, 1971), à la seule différence près que cette dernière est thermophile, tandis que la notre est mésophile. La paroi de type IV et la production de spores uniques isolées sur le mycélium sont caractéristiques du genre Saccharomonospora.

. La seule souche de la série D a aussi une paroi de type IV. Par son mycélium de forme irrégulière, son développement acropétal et sa croissance en dents de scie, elle doit être classée dans le genre Pseudonocardia. Elle est mésophile et s'apparente à l'espèce "spinosa" (HENSSSEN et SCHAFFER, 1971).

. Les souches de la série F produisent de courtes chaînettes de spores et peuvent être classées dans les genres Micropolyspora ou Actinomadura. L'étude des constituants cellulaires permet de faire la distinction : elles sont du genre Actinomadura.

‡ Les cultures de la série G sont des Micromonospora : elles ont une paroi de type II et ne forment pas de sporocystes.

. Les souches de la série H sont du genre Streptosporangium : elles ont une paroi de type III ; leurs spores immobiles sont enfermées dans des sporocystes sphériques.

. Chez les souches de la série E, les filaments mycéliens primaires sont fragmentés et le mycélium aérien très peu développé. Leur paroi est du type IV. Ce sont, selon toute vraisemblance, des Nocardia.

Elles sont très proches des mycobactéries par leurs constituants pariétaux et par leurs aspects morphologiques. Elles possèdent pourtant un lipide caractéristique désigné sous le nom du "LCN - A" inexistant chez les mycobactéries (MORDASKA et Coll., 1972).

L'analyse par chromatographie en couche mince des extraits lipidiques des souches de la série E révèle la présence de ce lipide caractéristique absent chez les souches témoins de Mycobacterium smegmatis.

IV - PROPOSITION POUR UNE CLEF D'IDENTIFICATION

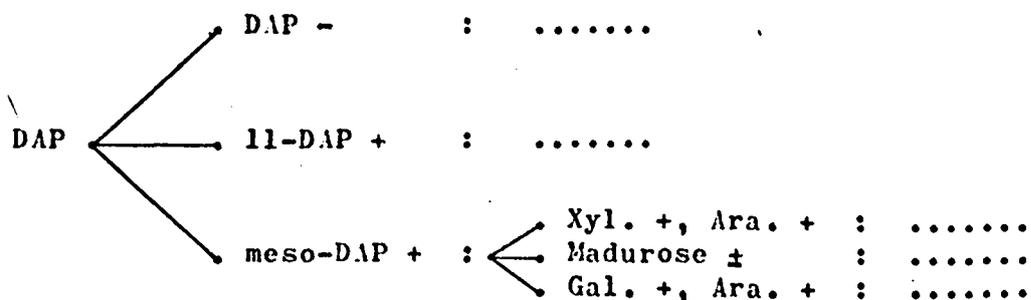
Les nombreux travaux consacrés à la taxonomie des actinomycètes, les contributions fondamentales de WAKSMAN, LECHEVALIER et plus récemment de CROSS et GOODFELLOW (1973), ont apporté à cette science des éléments d'information tout à fait exceptionnels. Ils ont donné en particulier une connaissance précise sur chaque famille.

.../...

Il apparaît pourtant que l'importance des actinomycètes dans de nombreux domaines de la recherche et de l'application exige pour leur identification des méthodes simples et rapides permettant de les reconnaître au moins au niveau des genres. C'est dans cette optique que nous proposons une clef d'identification en nous basant sur 2 critères principaux : les constituants cellulaires et la morphologie.

Constituants cellulaires

La mise en évidence de l'acide diaminopimélique et de ses isomères permet de différencier 3 grands groupes parmi les actinomycètes :



Les souches du 1er groupe n'ont pas de DAP dans leur paroi. On les qualifie souvent d'actinomycètes inférieurs. Ce sont des espèces microaérophiles appartenant aux genres Actinomyces, Rothia, Bifidobacterium, Agromyces. Les souches du 2ème groupe contiennent le 11-DAP, mais aucun sucre caractéristique. Celles du 3ème groupe possèdent le meso-DAP et des sucres caractéristiques. L'identification chromatographique de ces sucres, qui sont au nombre de 4,

(xylose, arabinose, madurose et galactose) permet de distinguer 3 sous-groupes.

• Morphologie

La détermination des genres dans chaque groupe exige de plus une étude morphologique.

- Groupe 11-DAP - (Clef d'identification 1)

Dans le groupe, certains représentants forment des sporocystes, d'autres non. Les seconds constituent 4 genres. Dans le genre Streptomyces, le mycélium végétatif est non fragmenté, le mycélium aérien est abondant et porte de longues chaînes de spores. Dans le genre Streptoverticillium, les caractères sont voisins, mais les sporophores sont verticillés. Dans le genre Chainia, on observe de longues chaînes de spores et surtout la présence de sclérotés. Enfin, les Sporichthya sont caractérisés par l'absence de mycélium végétatif.

Parmi les premiers, on peut distinguer les Kitasatoa, proches des Streptomyces, mais formant des sporocystes en massue ; les Elythrosporangium intermédiaires entre les Streptomyces et les Microellobosporia. Ces derniers ne forment pas de chaînes de conidies sur le mycélium.

- Groupe meso-DAP, Xyl. +, Ara. + (Clef d'identification 2)

Les 4 genres de ce groupe ne produisent pas de mycélium aérien. Le genre Micromonospora est le seul qui soit dépourvu de

sporocyste ; les spores sont uniques et isolées sur le mycélium.
La croissance est mésophile.

Chez les 3 autres genres, des sporocystés sont formés. Dans le genre Dactylosporangium, les sporocystes sont allongés en doigts de gants. Le genre Ampullariella se différencie des Actinoplanes par des sporocystes de formes variables et des spores allongées, disposées en chaînes parallèles.

- Groupe meso-DAP, madurose + ou - (Clef d'identification 3) et 4)

La famille Dermatophilaceae (ex : Dermatophilus et Geodermatophilus) est très caractéristique sur le plan morphologique : le mycélium se divise dans les sens longitudinaux et transversaux, alors que dans les autres genres du groupe, il se divise seulement perpendiculairement à l'axe.

Parmi ces derniers, on distingue 9 genres : 4 d'entre eux forment des sporocystes. Le nombre et la mobilité des spores permettent de les différencier facilement. Les 5 autres genres sont dépourvus de sporocystes. Les genres Actinomadura, Microbispora, et Microtetraspora se reconnaissent facilement grâce au nombre de spores. Par contre, la distinction entre Thermoactinomyces et Thermomonospora se révèle plus ardue : chez les premiers, les spores sont uniques et isolées sur les mycélium aérien et végétatif ; avec les seconds, seul le mycélium aérien porte des spores. Ces données classiques ont été récemment remises en cause à la suite de l'observation chez Thermomonospora de spores sur le mycélium végétatif. Mais, il s'agit d'endospores véritables dans le cas des Thermoactinomyces.

- Groupe meso-DAP, Gal. +, Ara. + (Clef d'identification 4)

Tous les représentants du groupe sont dépourvus de sporocystes. Pour ceux qui ne produisent pas de mycélium aérien, on distingue les mycobactéries et les Nocardia. L'analyse des extraits lipidiques montre que les Nocardia possèdent du "LCN - A". LECHEVALIER a signalé en plus qu'ils renferment de l'acide nocardomycolique différent de l'acide mycolique des mycobactéries (LECHEVALIER et Coll., 1971 ; KANETSUNA et BARTOLI, 1972).

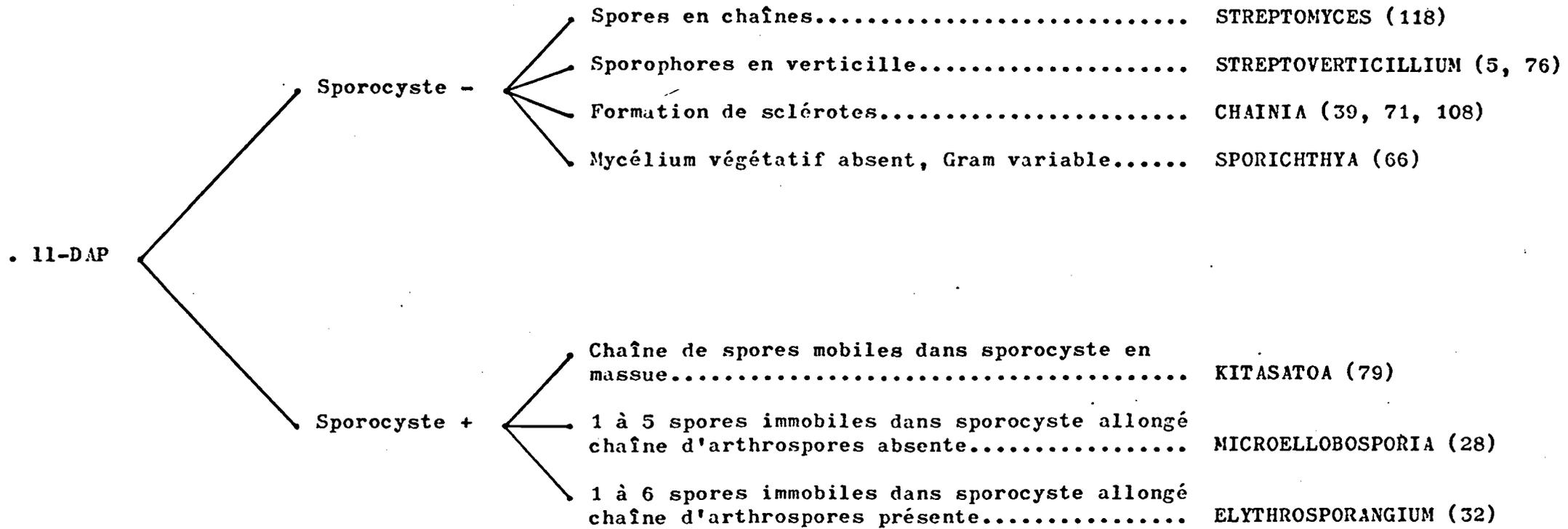
Un autre sous-groupe rassemble tous les genres pourvus de mycélium aérien. Les Saccharomonospora se reconnaissent par la formation de spores isolées le long du mycélium. Les Micropolyspora forment de courtes chaînes de spores. Les Pseudonocardia produisent un mycélium végétatif de forme irrégulière ; la croissance est acropétale et quelquefois en dents de scie. Les Nocardia enfin, ont un mycélium végétatif fragmenté ; le mycélium aérien, s'il existe, peut être porteur de chaînes de spores.

Cette clef d'identification ne prétend pas couvrir l'ensemble des actinomycètes. Un certain nombre de genres dont la nomenclature reste encore incertaine, n'y a pas été inclus. Il s'agit en particulier des genres :

- Pilimelia (KANE, 1966)
- Actinomonospora (CASTELLANI, DE BRINTO et PINTO, 1958)
- Intrasporangium (KALAKOUTSKII, KIRILLOVA, KRASSILNIKOV, 1967)
- Actinobifida (KRASSILNIKOV and AGU, 1964)

.../...

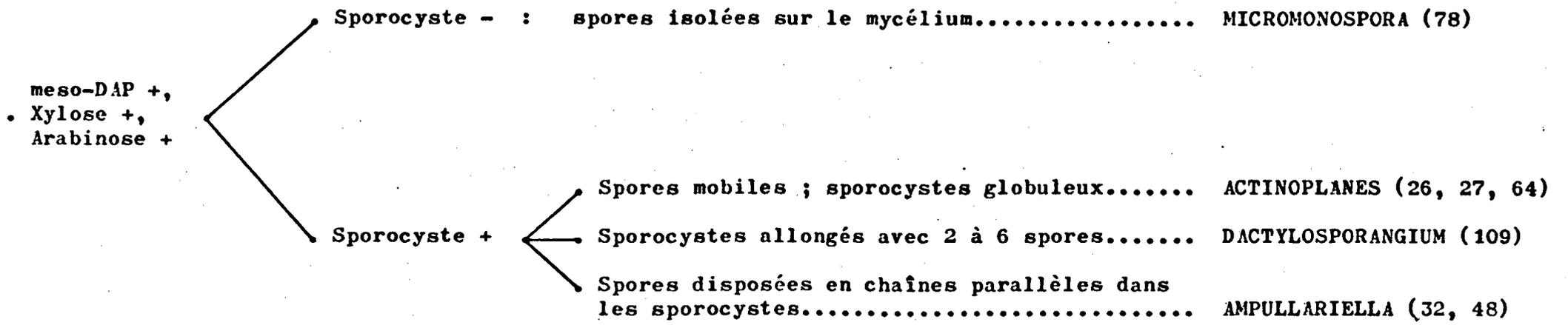
- Actinopycnidium (KRASSILNIKOV, 1962)
- Thermopolyspora (HENSSEN, 1957)
- Microechinospora (KONEY, TSYGANOV, MIUBAEY and MOROSOV, 1905)
- Actinosporangium (KRASSILNIKOV and TSI-CHEN, 1961).



CLEF D'IDENTIFICATION 1 : Groupe 11-DAP

Les chiffres indiquent les références des travaux les plus notoires correspondant à chaque genre.

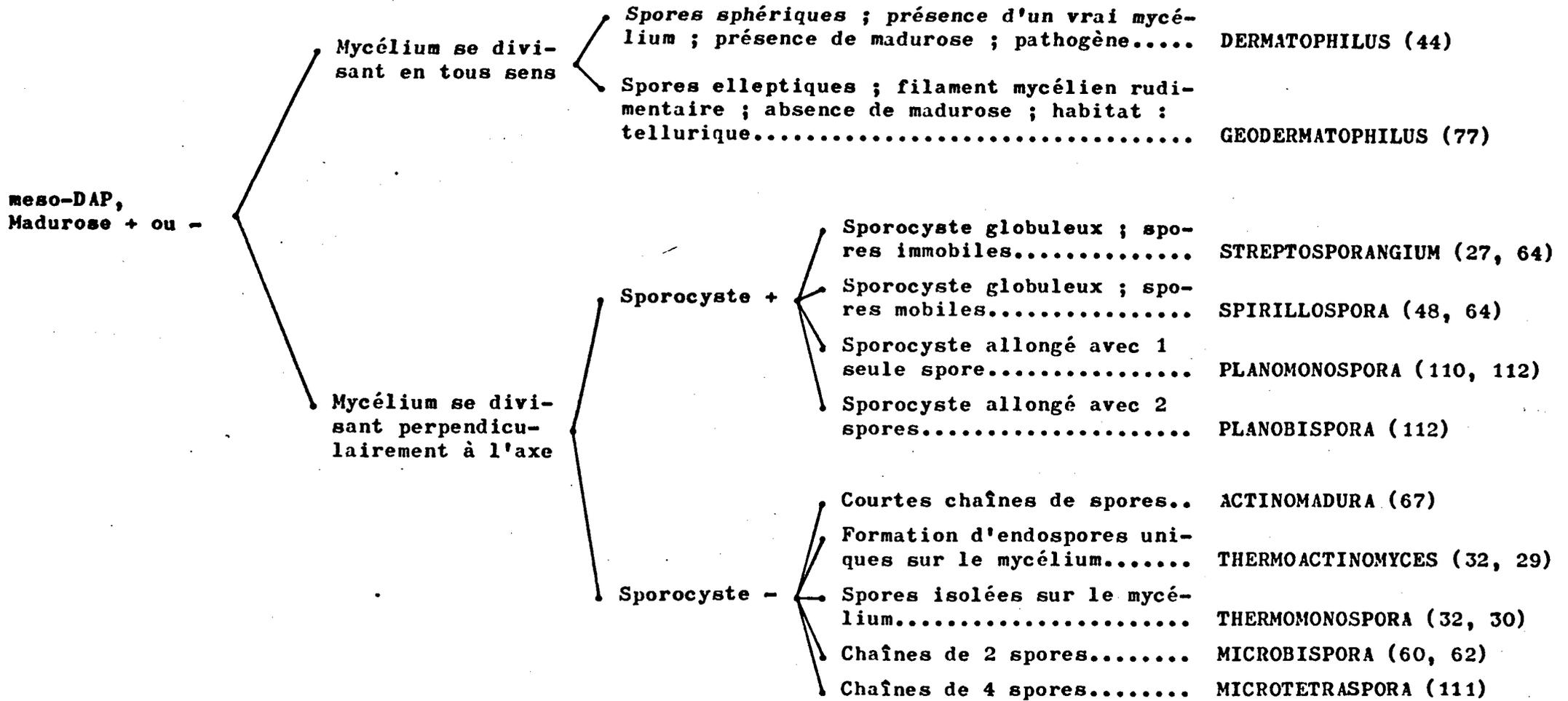




CLEF D'IDENTIFICATION 2 : Groupe meso-DAP, Xylose +, Arabinose +.

Les chiffres indiquent les références des travaux les plus notoires correspondant à chaque genre.

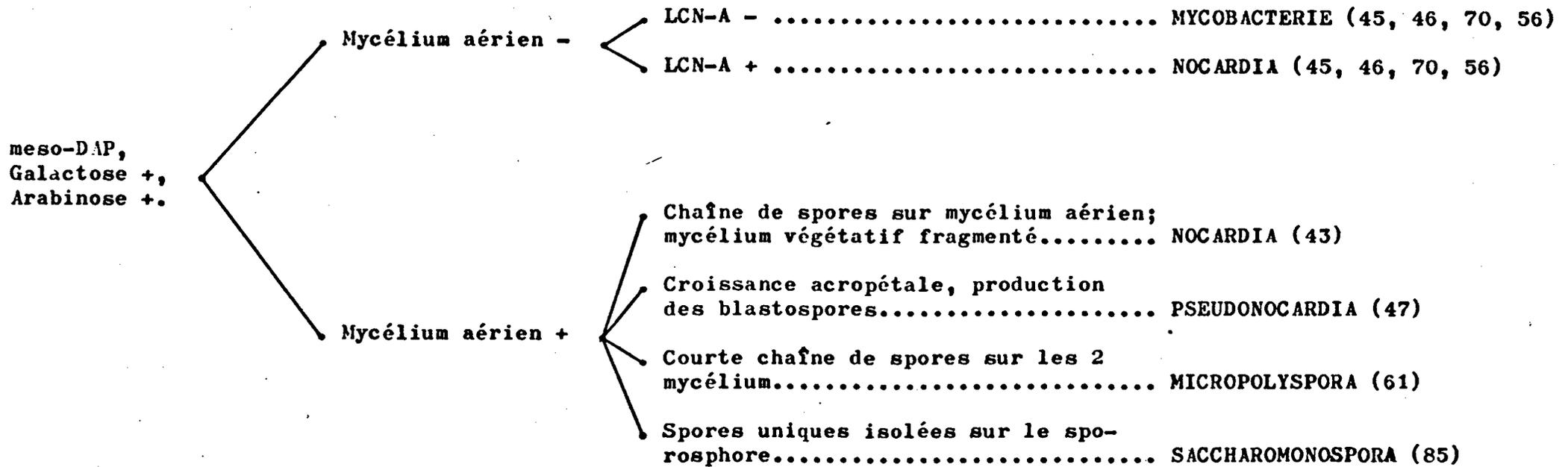




CLEF D'IDENTIFICATION 3 : Groupe meso-DAP, Madurose + ou -.

Les chiffres indiquent les références des travaux les plus notoires correspondant à chaque genre.





CLEF D'IDENTIFICATION 4 : GROUPE meso-DAP, Galactose +, Arabinose +.

Les chiffres indiquent les références des travaux les plus notoires correspondant à chaque genre.



Chapitre III

Etude des propriétés biochimiques

I - INTRODUCTION

Après avoir mis au point les techniques préliminaires (le dénombrement et l'identification) au cours des deux précédents chapitres, nous avons isolé et identifié un certain nombre de souches. Afin de mieux juger leur importance dans l'éco-système des eaux douces, il s'avère indispensable de connaître leurs différentes propriétés *in vitro*.

Les diverses fonctions des actinomycètes telluriques sont bien connues et déjà décrites dans la première partie de notre travail. Par contre, celles des actinomycètes aquatiques sont peu étudiées. Dans ce chapitre, nous avons cherché à étendre nos connaissances par l'étude de leur capacité de dégradation des différents substrats d'une part, et de leur activité d'antagonisme vis-à-vis de l'ensemble de la microflore d'autre part.

II - MATERIELS ET METHODES

A - Souches d'actinomycètes

178 souches, dont 134 Streptomyces, 36 Micromonospora et 8 Nocardia, sont soumises aux différentes études décrites ci-dessous. Toutes ces cultures sont ensemencées préalablement sur le milieu solide "YEG", placé dans des tubes (16 x 160). Après une durée d'incubation de 1 à 2 semaines à 30°C, elles sont ensuite utilisées comme inoculum sur les différents substrats testés.

B - Etude du pouvoir enzymatique

7 substrats sont étudiés :

1) Caséine (BUTTIAUX et Coll., 1969)

On dilue 10 g de lait écrémé dans 100 ml d'eau distillée. Après stérilisation à 110° pendant 20 mn, on incorpore 10 ml de cette solution dans 100 ml du milieu "gélose nutritive ordinaire" (Institut Pasteur de Lille) préalablement fondu au bain-marie et refroidi à 45°C. Après homogénéisation, on le répartit dans 5 boîtes de Pétri, et on laisse refroidir. On dépose ensuite les inoculums d'actinomycètes en petits points sur la surface du milieu, à raison de 5 inoculums par boîtes. On incube les boîtes ensemencées à 30°. On note les résultats au bout de 2, 4 et 7 jours d'incubation.

La digestion de la caséine se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des points d'inoculum.

2) Gélatine

On dilue 10 g de gélatine en feuillets dans 100 ml d'eau distillée. On chauffe légèrement pour dissoudre la gélatine et on stérilise à 110° pendant 20 minutes. Ensuite, on suit le même procédé que celui de la caséine.

La lecture des résultats se fait en recouvrant la surface du milieu avec 1 ml de la solution suivante :

. HgCl ₂	15 g
. HCl concentré.....	20 ml
. Eau distillée.....	100 ml

Le milieu devient opaque, sauf là où la gélatine a été hydrolysée. Dans ce cas, on voit apparaître une zone claire autour de l'inoculum.

3) Amidon

On prépare une solution à 10 % d'amidon soluble et on stérilise à 110° pendant 20 minutes. Ensuite, on suit le même procédé décrit précédemment.

Au moment de la lecture des résultats, on inonde la surface du milieu avec 1 ml de lugol. Le milieu devient brun-noir, sauf la

zone où l'amidon a été hydrolysée ; dans ce cas, la gélose est claire autour de l'inoculum.

4) Lipide (SIERRA, 1957)

Comme précédemment, on incorpore d'une manière aseptique 1 ml de "Tween 80" et 1 ml de solution aqueuse à 1 % de CaCl_2 dans 100 ml de milieu "gélose nutritive ordinaire". Cette technique révèle la présence des estérases et plus particulièrement des Tween-estérases.

Le lipidolyse se manifeste par l'apparition de la zone de précipitation de sels de calcium autour de l'inoculum.

5) Chitine

La préparation et la composition du milieu (milieu "Ch" : à base de chitine) sont décrites dans l'annexe. L'ensemencement se fait en déposant les inoculums en petits points à la surface du milieu, à raison de 5 points par boîtes.

Après une durée d'incubation à 30° de 7 à 14 jours, on voit apparaître une zone claire autour de l'inoculum dans le cas où celui-ci est chitinolytique.

6) Pectine

Le milieu utilisé est celui proposé par EDWARDS et EWING et modifié par LECLERC en 1964. La préparation et la composition de ce milieu (à base de polypectate de sodium) sont figurées dans l'annexe.

L'ensemencement se fait par piqûre centrale. Après incubation à 30 minutes pendant 2 à 4 semaines, la réaction positive est marquée par la liquéfaction du milieu par suite de la production des polygalacturonidases par les actinomycètes ensemencés.

7) Cellulose

Nous utilisons la technique de WINOGRADSKY. Elle consiste à découper des bandelettes de papier filtre "Durieux sans cendre" (1 x 10 cm), et à les mettre dans des tubes à essais (16 x 160) qui contiennent 10 ml de solution minérale. La composition de cette solution est décrite dans l'annexe.

On ensemence en déposant une gse de l'inoculum dans la solution et on agite légèrement le tube afin de mieux homogénéiser la suspension. On l'incube à 30°C.

On examine les tubes une fois tous les 7 jours jusqu'à la 7^{ème} semaine.

Les souches cellulolytiques découpent la bande de papier au niveau où le papier émerge du milieu. Dans le cas des souches non cellulolytiques, la bande de papier reste intacte.

C - Etude du pouvoir bactériolytique

1) Préparation des suspensions des bactéries-tests

8 bactéries dont Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Bacillus subtilis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter anitratus et Vibrio EV5, sont choisies pour mettre en évidence le pouvoir bactériolytique de nos souches.

10 ml de suspension bactérienne (de 48 heures pour les S. faecalis et C. diphtheriae, et de 24 heures pour les autres), sontensemencés dans des boîtes de Roux contenant 100 ml de gélose nutritive ordinaire. Après un temps de contact de 15 à 25 minutes, on aspire le liquide en excès et on incube la boîte à 37°C.

Après 24 ou 48 h d'étuvage, suivant les cas, on récupère les bactéries en inondant la boîte à l'aide de 20 ml d'eau distillée stérile. Les bactéries ainsi récupérées sont lavées 3 fois et suspendues finalement dans l'eau distillée à la densité optique de 0,8 à 650 μ . Cette suspension bactérienne est utilisée telle quelle dans le cas des germes viables, ou subit un traitement au bain-marie bouillant pendant 5 mn (sauf pour les Bacillus où la durée de chauffage est de 10 mn), dans le cas des germes tués.

2) Préparation du milieu

La technique consiste à couler les milieux dans les boîtes de Pétri en double couche :

- Cas des cellules tuées :

On répartit 15 ml de gélose à 2 % qui sert de couche de fond dans des boîtes. Après solidification, on ajoute 7 ml du mélange (vol/vol) de "suspension bactérienne et de gélose à 2 %".

- Cas des cellules viables :

On utilise le même procédé que le précédent, mais dans ce cas, on emploie le milieu à la "gélose nutritive" au lieu de la "gélose à 2 %".

3) Souches actinomycètes

Elles sont préparées, ensemencées comme dans le cas d'étude enzymatique.

La lecture des résultats se fait au bout de 24 h, 48 h, et 4 jours d'incubation à 30°. La zone de lyse se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de l'inoculum.

D - Etude du pouvoir antibiotique (WAKSMAN et LECHEVALIER, 1962)

Le "screening" des antibiotiques s'effectue en 2 temps.

Dans un premier temps, on sélectionne les souches qui montrent un pouvoir antagoniste vis-à-vis des bactéries tests. Puis, dans le second temps, avec les souches actives lors du 1er test, on recherche leur propriété antibiotique proprement dite.

1) Recherche d'une activité antibiotique

La méthode employée est la méthode des "stries croisées". On ensemence les souches d'actinomycètes à la surface du milieu "YEG", en une seule strie de 5 à 6 mm de largeur. On incube à 30°C pendant une semaine pour le Streptomyces et le Nocardia, et pendant 10 à 14 jours pour le Micromonospora.

Après incubation, on ensemence des stries perpendiculaires de suspensions (culture de 24 h) de bactéries tests. On étudie 4 espèces par boîte.

Après 24 h de réincubation à 37°C, les bactéries résistantes se développent perpendiculairement à la culture d'actinomycètes.

Dans le cas des bactéries sensibles, on observe une zone d'inhibition plus ou moins grande.

2) Etude de l'antibiose

Les souches actives lors du 1er test sont cultivées ensuite en erlenmeyer, dans 100 ml de milieu "YEG" liquide, (bain-marie

agité à 20°). Après un temps d'incubation variable, suivant les souches (4 à 10 j), on centrifuge à 3 000 t/mn, et on récupère le surnageant. On filtre ce surnageant plusieurs fois sur des membranes de porosité de plus en plus petites (2 μ à 0,45 μ). Puis, on stérilise le filtrat clair à l'aide d'une bougie "Chamberland". Le liquide ainsi obtenu est utilisé pour le test d'antibiose.

La technique des cupules, décrite par BUTTIAUX et Coll., consiste à découper avec un emporte-pièce de 1 cm de diamètre dans le milieu "Muller-Hinton" coulé en boîte de Pétri et ensemencé avec les suspensions bactériennes, 5 cylindres pour obtenir des cupules également espacées les uns des autres. On dépose une goutte de gélose à 2 % dans le fond de chaque trou afin d'éviter la diffusion du filtrat, sous les couches d'agar.

On verse ensuite 3 à 4 gouttes du filtrat stérile dans chaque cupule et on incube les boîtes à 37° pendant 24 h.

Une zone d'inhibition plus ou moins grande autour de chaque cupule indique que le filtrat est actif.

III - RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats des études des pouvoirs enzymatiques,

bactériolytiques et antagonistes sont rapportés respectivement dans les tableaux 11, 12 et 13.

A - Etude du pouvoir enzymatique

Les résultats (tableau 11) nous montrent que :

• Le genre Streptomyces est muni d'un équipement enzymatique très puissant. Sur 134 souches étudiées, plus de 95 % sont capables de dégrader la caséine du lait, la gélatine, l'amidon, les lipides et la chitine. Environ 30 et 40 % utilisent respectivement la cellulose et la pectine.

• Le genre Micromonospora semble être très actif sur ces différents substrats. Les 36 souches étudiées sont toutes protéolytiques. Plus de 96 % dégradent la chitine, et environ 85 % sont capables d'attaquer la pectine et la cellulose. La dégradation de celle-ci est particulièrement rapide : 55,5 % découpent les bandes de papier au bout de 2 à 3 semaines. Par contre, le pouvoir enzymatique des Micromonospora reste encore faible dans le cas des substrats amidonnés et lipidiques.

• Dans le cas du genre Nocardia, le faible nombre de souches étudiées ne nous permet pas de donner une interprétation adéquate. Néanmoins, nous remarquons que dans l'ensemble des 8 souches étudiées, leur pouvoir enzymatique est faible, voire négligeable, par rapport aux précédentes, sauf dans le cas des substrats lipidiques où la moitié d'entre elles donnent des résultats positifs.

Actinomycètes Substrats	Streptomyces			Micromonospora			Nocardia		
	++	+	-	++	+	-	++	+	-
Caséine	86,5	9,8	3,7	77,8	22,2	-	-	12,5	87,5
Gélatine	86,5	10,6	2,9	77,8	22,2	-	-	25,0	75,0
Amidon	82,9	13,4	3,7	22,2	30,5	47,3	-	12,5	87,5
Lipides	77,6	17,2	5,2	47,3	16,7	36,0	-	50,0	50,0
Chitine	22,5	73,8	3,7	44,6	52,7	2,7	-	12,5	87,5
Cellulose	1,6	29,8	68,6	55,5	33,4	11,9	-	-	100
Pectine	12,6	29,8	57,6	27,8	55,5	16,7	-	-	100

TABLEAU 11 : Etude du pouvoir enzymatique

Les chiffres donnés indiquent le pourcentage du nombre des souches actives sur le nombre total de souches étudiées de chaque genre

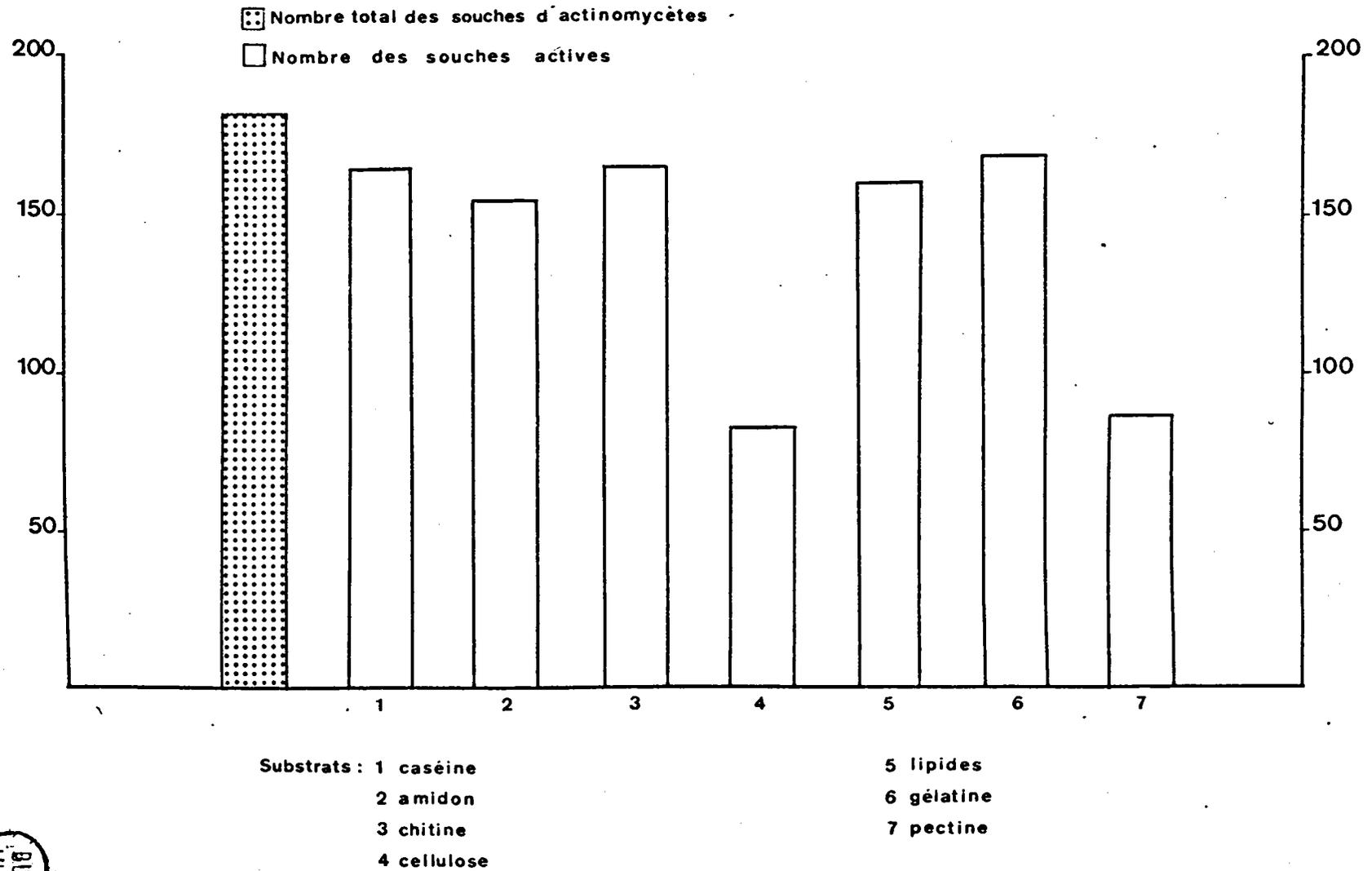
Légende : - = Réponses négatives

+ = Réponses positives : . en 4 jours pour la caséine, la gélatine et les lipides,
. en 1 semaine pour l'amidon et la chitine,
. en 6 semaines pour la cellulose et la pectine.

++ = Réponses positives : . en 48 h pour la caséine, la gélatine et les lipides,
. en 4 jours pour l'amidon et la chitine,
. en 2 semaines pour la cellulose et la pectine.



Fig.1 Etude du pouvoir enzymatique



Dans l'ensemble des 178 souches d'actinomycètes isolées des eaux et des sédiments (Figure 1), nous remarquerons qu'elles montrent une capacité enzymatique très puissante. Environ 90 % dégradent la caséine, la gélatine, l'amidon, la chitine et les lipides. La dégradation de la pectine et la cellulose, bien que le pourcentage ne soit pas très élevé, s'avère très intéressant par rapport à d'autres microflores aquatiques.

B - Etude du pouvoir bactériolytique

Les résultats figurent dans le tableau 12.

Les signes "++" et "+" représentent l'intensité de la lyse au bout de 4 jours :

- . ++ : diamètre de la zone de lyse \geq 15 mm.
- . + : diamètre de la zone de lyse $<$ 15 mm.
- . - : pas de zone de lyse.

Ces résultats nous montrent que :

1) Cas des cellules viables

Aucune souche d'actinomycète étudiée n'est capable de lyser les cellules des Gram -. Par contre, chez les bactéries à Gram

Bactéries tests	S. aureus		S. faecalis		B. subtilis		C. diph- teriae		E. coli		P. aeru- ginosa		A. ani- tratum		Vibrio EV ₅		
	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	V	T	
Actinomycètes	++	6,7	42,5	2,2	14,9	0,7	27,6	2,3	6,7	-	23,9	-	28,4	-	30,6	-	33,5
	+	28,4	43,3	34,8	67,1	4,6	58,9	47,0	69,5	-	64,2	-	47,7	-	61,2	-	60,6
	-	64,9	14,2	63,0	18,0	94,7	13,5	50,7	23,8	100	11,9	100	23,9	100	8,2	100	5,9
Streptomyces	++	2,7	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	44,6	66,8	41,7	59,5	5,5	72,2	19,5	55,5	-	75,0	-	66,7	-	69,5	-	77,8
	-	52,7	30,5	58,3	44,5	94,5	27,8	80,5	44,5	100	25,0	100	33,3	100	30,5	100	22,2
Micromonospora	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Nocardia	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TABLEAU 12 : Etude du pouvoir bactériolytique

Les chiffres donnés indiquent le pourcentage du nombre de souches actives sur le nombre total des souches étudiées de chaque genre

V = Viable
T = Tuée



positif, 45 % de Streptomyces peuvent attaquer les cellules des C. diphteriae, S. aureus et S. faecalis. Seulement 5 % lyse les cellules de B. subtilis. La même remarque s'observe aussi avec le genre Micromonospora. Les souches de Nocardia ne semblent pas avoir un effet bactériolytique.

2) Cas des cellules tuées

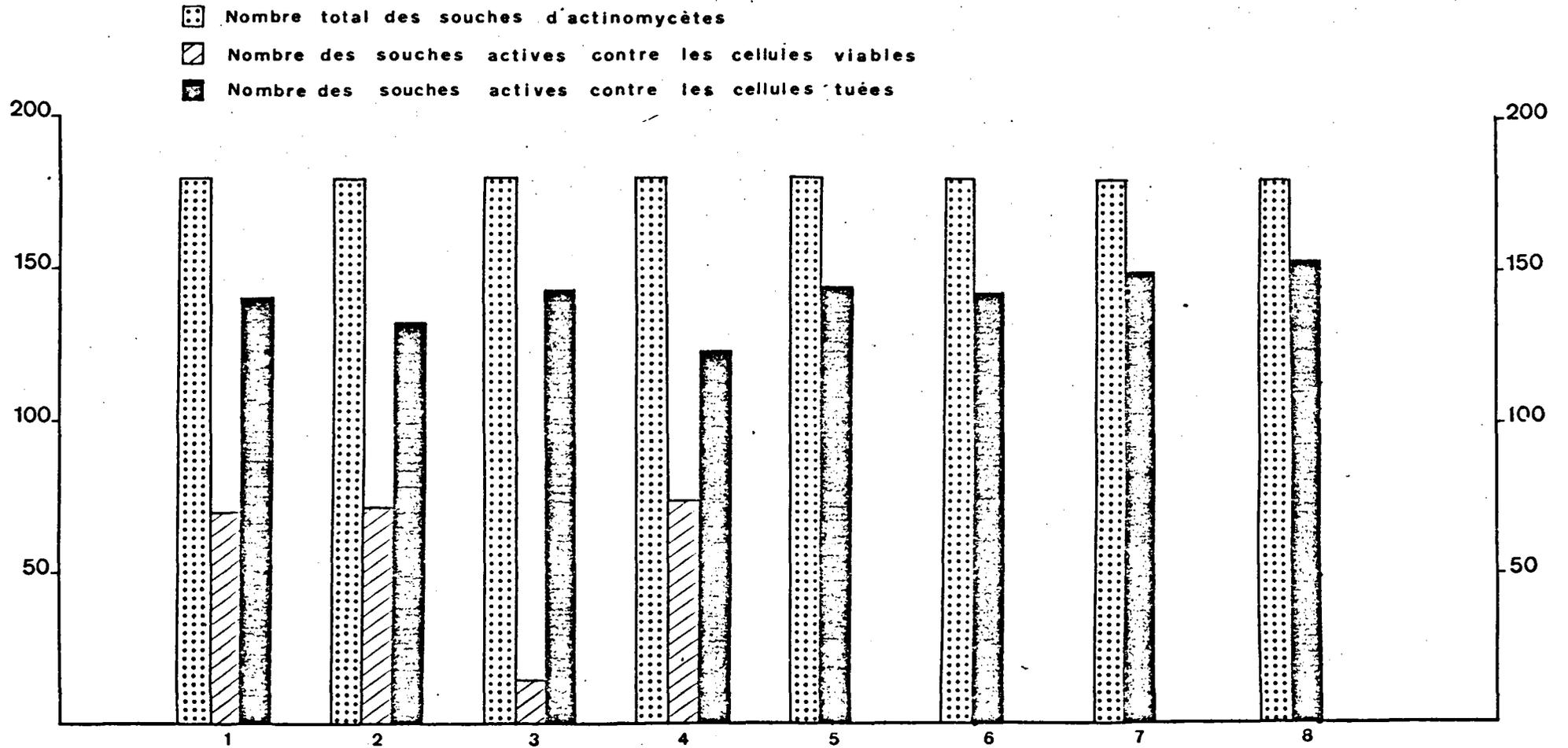
Le genre Streptomyces lyse aussi bien les cellules de Gram + que celles de Gram -. Plus de 80 % sont capables de digérer ces cellules. Il est important de remarquer que le pourcentage de lyse des cellules de Gram -, à l'exception de celle des P. aeruginosa, est légèrement supérieur à celui observé chez les Gram positifs.

Dans le cas des Micromonospora, la lyse vis-à-vis des Gram - oscille entre 66% à 77 %. Vis-à-vis des Gram +, elle varie entre 55 % à 72 %.

De cette étude, nous remarquons (figure 2) que :

. les actinomycètes lysent aussi bien les cellules des Gram + que celles des Gram -, quand la paroi bactérienne est altérée. Par contre, quand celle-ci est intacte, ils dégradent seulement les cellules des Gram + ; tandis que celles des Gram - restent indemmes. Cette constatation a été observée par plusieurs auteurs, en particulier WELSCH en 1942 et WAKSMAN en 1959. La bactériolyse résulte

Fig.2 Etude du pouvoir bactériolytique



Bactéries-tests 1 Staphylocoque aureus
 2 Streptocoque faecalis
 3 Bacillus subtilis
 4 Corynebacterie diptheriae

5 Escherichia coli
 6 Pseudomonas aeruginosa
 7 Acinetobacter (B₅W)
 8 Vibrio EV₅



de l'action des complexes enzymatiques. Il semble que la lyse des cellules vivantes soit conditionnée par 2 facteurs : un facteur bactéricide et un facteur bactériolytique. La substance bactéricide agit seulement sur les cellules des Gram +. Le système bactériolytique est constitué de deux sortes d'enzymes : peptidase et protéinase. Celle-ci dégrade les protéines à haut poids moléculaire (WELSCH, 1942).

C - Etude du pouvoir d'antibiose

Les tests des "stries croisées" montrent (tableau 13) que :

• le genre Streptomyces exerce un effet antagoniste sur un certain nombre de bactéries testées. Il est plus actif chez les bactéries à Gram positif que chez celles à Gram négatif. C. diptheriae est le plus sensible. Les sensibilités des Bacilli, des Staphilococci sont à peu près identiques, de l'ordre de 40 %. Chez les Gram négatifs, le Vibrio EV₅ est le plus touché. Par contre, l'Acinetobacter et le Pseudomonas s'avèrent très résistants.

• le genre Micromonospora a un pouvoir antagoniste non négligeable. Un certain nombre de souches inhibe la croissance des bactéries testées. Comme précédemment, leur effet est particulièrement actif chez les Gram positifs. Tandis que chez les Gram négatifs, cet effet d'antagonisme semble être négligeable.

.../...

Actinomycètes Bactéries tests	Streptomyces			Micromonospora			Nocardia		
	++	+	-	++	+	-	++	+	-
S. aureus	9,7	23,8	66,5	5,5	16,7	77,8	-	12,5	87,5
S. faecalis	7,9	22,6	70,9	-	19,5	80,5	-	12,5	87,5
B. subtilis	11,9	29,2	58,9	2,7	25,0	72,3	-	12,5	87,5
C. diphtheriae	12,6	48,6	38,8	33,4	16,7	49,9	-	-	100
E. coli	1,6	16,4	82,0	-	-	100	-	-	100
P. aeruginosa	1,6	2,9	95,5	-	2,7	97,3	-	-	100
A. anitratus	-	0,8	99,2	2,7	2,7	94,6	-	-	100
Vibrio EV ₅	8,2	15,6	76,2	-	-	100	-	-	100

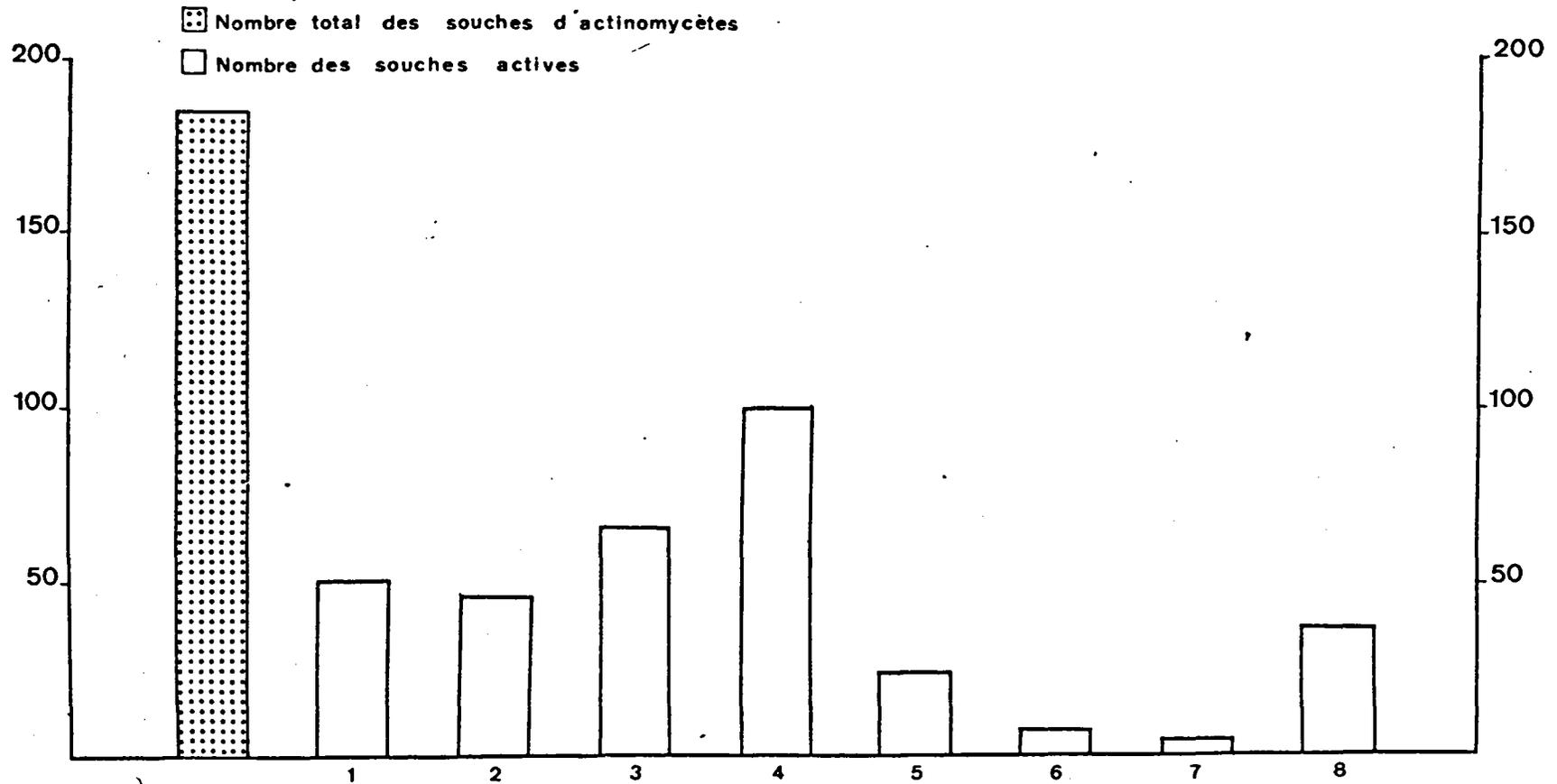
TABLEAU 13 : Etude du pouvoir antagoniste

Les chiffres indiquent le pourcentage du nombre des souches actives sur le nombre total des souches étudiées de chaque genre

- ++ : zone d'inhibition \geq 15 mm
- + : zone d'inhibition $<$ 15 mm
- : pas de zone d'inhibition



Fig.3 Etude du pouvoir antibiotique



Bactéries-tests: 1 Staphylocoque aureus
2 Streptocoque fæcalis
3 Bacillus subtilis
4 Corynebactérie diphteriæ

5 Escherichia coli
6 Pseudomonas aeruginosa
7 Acinetobacter (B₅W)
8 Vibrio EV₅



. dans le cas de Nocardia, il semble que son action soit très faible chez les Gram + et nulle dans le cas des Gram -.

Dans l'ensemble des 178 souches d'actinomycètes étudiées, (figure 3), il apparaît que le nombre des souches actives soit faible et leur action ne s'exerce que vis-à-vis des bactéries à Gram +, parmi lesquels C. diphtheriae se montre le plus sensible.

La recherche du pouvoir antibiotique par le filtrat de culture montre que dans les conditions de notre travail, sur les 50 souches ayant une activité positive dans des tests d'antagonistes, 8 s'avèrent exercer un effet antibiotique sur des bactéries à Gram + et 4 seulement dans le cas des Gram négatifs.

L'absence d'effets d'antibiose des autres filtrats peut être due à plusieurs facteurs. Un des facteurs principaux est la condition culturale. Pour une souche donnée, la production maximale des substances antibiotiques dépend de la nature du milieu, du temps de culture, de la température, du pH, de l'aération, etc... Dans le cas de notre travail, nous n'avons pas envisagé l'étude de la recherche des conditions optimales de la production de chaque souche. Cette absence peut être aussi due au fait qu'en milieu solide, les actinomycètes pourraient sécréter l'ammoniac en quantité considérable, qui inhibe la croissance des germes testés.

D'après nos résultats, il est difficile de dire que les actinomycètes jouent un rôle très important dans la sécrétion des substances antibiotiques dans l'eau, car celles-ci dépendent de beaucoup de facteurs.

Cependant, les substances antibiotiques dans l'eau, s'il y en a, ne touchent, en général, que les bactéries à Gram + qui y sont peu abondantes par rapport à celles des Gram négatifs.

IV - CONCLUSION

De ces études, nous remarquons que :

- Nos souches sont équipées d'un système enzymatique très puissant. Elles peuvent dégrader tous les substrats étudiés. Ces propriétés sont comparables à celles qu'on trouve chez les actinomycètes telluriques, ce qui nous laisse penser que nos cultures isolées de l'eau sont probablement celles du sol qui contaminent les rivières et bassins étudiés.

- Vis-à-vis de la microflore bactérienne, il semble que les bactéries à Gram + soient plus sensibles aux diverses actions

.../...

(bactériolyse, antagonisme) des actinomycètes, que celles des Gram -. Celles-ci sont abondantes dans le milieu aquatique. Dans ce cas, les actinomycètes joueraient-ils un rôle dans l'épuration biologique, malgré leur équipement enzymatique exceptionnel ? Nous en discuterons dans le prochain chapitre qui traite de leur place dans l'écologie aquatique.

Chapitre IV

Etude écologique

La majorité des recherches effectuées à ce jour concernant les actinomycètes ont, le plus souvent, été orientées dans un sens physiologique et taxonomique. Par contre, l'aspect écologique a été peu étudié. Les connaissances actuelles sur leur rôle dans les écosystèmes aquatiques sont dues principalement aux travaux de SILVEY et Coll., et de WILLOUGHBY. Les premiers se sont intéressés plus spécialement à leur présence dans les réservoirs d'eau. Le second a étudié principalement les Actinoplanaceae des lacs et des rivières. Ces espèces sont en effet fréquentes sur les feuilles en décomposition dans l'eau.

Dans le présent chapitre, nous étudions les actinomycètes dans les eaux de surface : leur présence, leur abondance par rapport aux autres populations microbiennes, leur évolution au cours des saisons, leur rôle dans les phénomènes d'auto-épuration.

I - MATERIEL ET METHODES

1) Terrains d'expérimentations

.../...

Trois terrains d'expérimentation ont été choisis. Ils sont caractérisés par des niveaux différents de pollution bactérienne et chimique. La pollution bactérienne correspond au nombre total de bactéries par ml d'eau (dénombrement à 20°C). La pollution chimique est déterminée par la "demande biochimique d'oxygène en 5 jours" (DBO_5) : ce test permet de mesurer la quantité des matières organiques aisément oxydables par les microorganismes. La quantité d'oxygène qu'ils consomment représente la demande biochimique d'oxygène (D.B.O.), grandeur directement proportionnelle à la charge organique.

. Rivière peu polluée :

- Bactéries totales : 10^3 à 10^4 par ml
- DBO_5 < 5 mg par litre
- largeur : 3 m
- profondeur : 2 à 3 m

Cette eau possède les qualités requises pour la production d'eau destinée à l'alimentation humaine après traitement normal physique, chimique, et stérilisation (coagulation, floculation, décantation, filtration et stérilisation) si l'on s'en réfère à l'ensemble des paramètres physiques, chimiques et biologiques.

. Rivière canalisée fortement polluée par les rejets industriels et domestiques:

- Bactéries totales : 10^6 par ml
- DBO_5 > 10 mg par litre

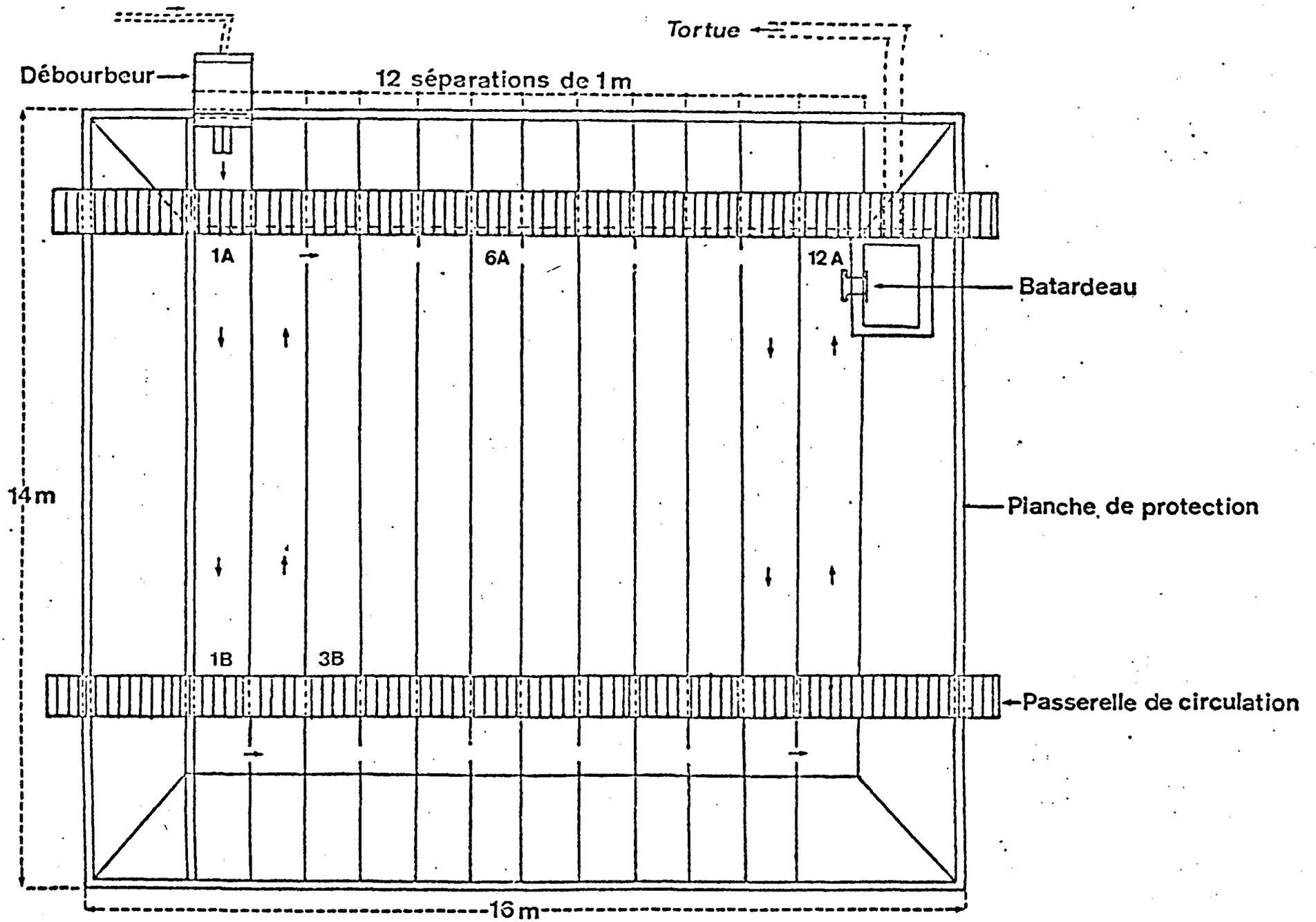


Fig.4 : Plan du bassin pilote

- largeur \approx 15 m
- profondeur \approx 3 m

Cette eau, de par l'ensemble de ses caractères, n'est pas directement utilisable pour la production d'eau potable.

. Bassin de lagunage qui sert au traitement des eaux de la rivière polluée. Il rentre dans la catégorie des bassins dits de "maturation" qui sont destinés à affiner la qualité des effluents secondaires des stations d'épuration. Ce bassin est constitué par une cuvette de 14 m x 16 m pour une hauteur de 1,65 m. Il est divisé en 12 compartiments transversaux dans lesquels l'eau circule alternativement (Figure 4). Le débit est de 6,8 litres par mn.

- à l'entrée (point 1A) :

- .. Bactéries totales : 10^5 à 10^6 /ml
- .. DBO_5 $>$ 10 mg/l

- à la sortie (point 12A) :

- .. Bactéries totales : 10^4 /ml
- .. DBO_5 : 3 - 4 mg/l

2) Méthodes

Lieux de prélèvements

Dans le cas des rivières, les prélèvements ont été effectués en des points fixes (approximativement au centre du flux et à

.../...

environ 0,50 m de profondeur). Trois échantillons sont pris successivement à 15 mm d'intervalles aux fins d'analyses.

Dans le cas du bassin, les prélèvements ont été effectués en 5 points caractéristiques (1A, 1B, 3B, 6A et 12A), représentatifs de l'évolution du traitement.

. Modes de prélèvements

Les échantillons ont été recueillis stérilement dans des flacons stériles. Dans le cas des sédiments, nous avons utilisé deux systèmes qui dépendent de l'état de chaque terrain étudié. Pour les sédiments de la rivière, nous avons employé un appareil simplifié constitué d'une boîte métallique à ouverture commandée.

Avec les sédiments du bassin, pour éviter de perforer la feuille de plastique qui isole l'eau du bassin, nous avons dû concevoir un autre dispositif qui est composé d'une fiole pour filtration sous vide de 1 000 ml qui sert à recueillir les sédiments : l'ouverture latérale de cette fiole est reliée à une pompe péristaltique électrique. Le bouchon en caoutchouc de la fiole est traversé d'une tige en verre de 1 cm de diamètre connectée par un intermédiaire en plastique à un tuyau métallique de même diamètre, muni à son extrémité d'un entonnoir en plastique. Au moment du prélèvement, on plonge le tuyau (côté d'entonnoir) jusqu'au fond du bassin. Par aspiration, on recueille les sédiments dans la fiole.

Les sédiments de la rivière polluée n'ont pas été étudiés en raison de leur remise en suspension permanente par le mouvement incessant des péniches.

• Analyses

Les analyses ont été faites immédiatement après le transport des échantillons au laboratoire.

* **Dénombrement des bactéries** : le dénombrement global à 20°C est réalisé suivant la méthode classique de dilution et incorporation (3 boîtes par dilution) dans un milieu gélosé solide coulé en boîte de Pétri, selon BUTTIAUX (1958).

- **Dénombrement des actinomycètes** : le dénombrement est réalisé suivant les techniques décrites dans le chapitre "Dénombrement" (CHEA et LECLERC, 1973). Dans le cas des sédiments, avant l'analyse, on élimine l'eau par centrifugation à 3 000 tours pendant 15 minutes. Le culot obtenu est divisé en 2 parties : l'une est réservée à l'analyse proprement dite, et l'autre sert à la détermination du poids sec.

II - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats présentés ci-dessous correspondent à une série

d'études effectuées entre janvier 1973 et avril 1974. Pendant cette période, 16 séries de prélèvements mensuels ont été réalisées.

1) Présence et abondance des actinomycètes dans les eaux

Les résultats des analyses qui figurent dans le tableau 14 sont, on ne peut plus significatifs.

Dans les eaux de la rivière peu polluée, le nombre d'actinomycètes s'échelonne de 110 à 7 500 par 100 ml. Ces chiffres sont très faibles comparativement à la flore bactérienne totale de l'eau. Si l'on considère le chiffre le plus bas (110), les bactéries totales sont en nombre de 30 000/ml soit 30 000 fois plus nombreuses. Si l'on utilise le chiffre le plus haut (7 500), les bactéries totales du même échantillon sont au nombre de 47 000 soit 600 fois plus nombreuses.

Dans les eaux de la rivière fortement polluée, le nombre d'actinomycètes est plus bas que dans le cas précédent et comme les taux des bactéries totales sont ici environ 100 fois plus élevés, les différences sont en conséquence beaucoup plus tranchées. Les bactéries totales sont environ 10 000 à 1 000 000 de fois plus élevées que les actinomycètes.

On peut considérer que la présence des actinomycètes en suspension dans l'eau est faible, le plus souvent négligeable par

	Rivière peu polluée						Rivière polluée		
	Eaux			Sédiments			Bac-	Acti	%
	Bact /ml	Acti/ 100 ml	% A/B	Bact/ g(10 ⁴)	Acti/ g(10 ⁴)	% A/B	téries: par ml 10 ⁶	par 100 ml	A/B
Janvier	27 000	4 500	0,2	500	16	3,2	3,5	800	*
Février	4 500	1 100	0,2	400	12	3,0	3,1	500	*
Mars	5 000	585	0,1	400	12	3,0	3,6	300	*
Avril	9 000	575	0,05	580	11	1,9	3,0	300	*
Mai	3 000	800	0,2	440	8,6	1,9	2,1	200	*
Juin	10 000	130	0,01	600	40	6,6	1,1	100	*
Juillet	30 000	110	0,003	650	31	4,9	1,0	500	*
Août	45 000	900	0,02	900	80	8,8	0,2	2 000	0,01
Septembre	10 500	1 100	0,1	700	80	11,3	0,2	3 000	0,01
Octobre	8 700	900	0,1	600	85	14,1	1,6	1 100	*
Novembre	13 700	4 500	0,3	800	200	25,0	5,6	700	*
Décembre	12 000	4 250	0,3	850	66	7,7	8,0	2 500	*
Janvier	47 000	7 500	0,1	960	70	19,4	7,0	550	*
Février	27 000	5 250	0,2	300	13	4,3	1,3	800	*
Mars	29 000	1 250	0,04	310	14	4,6	2,6	600	*
Avril	8 600	300	0,03	400	7	1,7	3,0	600	*

TABLEAU 14 : Présence et abondance des actinomycètes
dans les eaux et les sédiments des rivières



* : négligeable

rapport à la flore microbienne totale. Elle résulterait essentiellement de leur transit au cours de la sédimentation ou de leur remise en suspension sous l'effet du passage très fréquent des péniches.

Dans l'ensemble, qu'elle soit polluée ou non, l'eau apparaît comme un milieu peu favorable aux actinomycètes. Leur nombre absolu est à peu près semblable dans les deux cas ; celui-ci est relativement beaucoup plus faible, dans l'eau polluée, du fait du développement privilégié de la flore bactérienne autochtone constituée par des bacilles à Gram négatifs. Ces derniers croissent très rapidement aux dépens des substrats organiques facilement biodégradables, et tendent à occuper une place dominante dans les eaux au détriment de la flore actinomycétique.

Dans les sédiments, par contre, les nombres d'actinomycètes sont significativement élevés puisqu'ils représentent dans les plus mauvaises conditions le 1/50^è, en général le 1/10^è et quelquefois le 1/4 de la microflore totale. Il semble donc que les actinomycètes trouvent un environnement favorable physique et chimique au niveau des sédiments. Leur présence en nombre important dans les dépôts des rivières, des lacs... est signalée par plusieurs auteurs. Les sédiments sont constitués principalement par des matériaux d'origine terrestre. Les déchets solides animaux ou le plus souvent végétaux décantent facilement. Leurs constituants principaux celluloses, pectiques, ligneux, etc... représentent des substrats

.../...

favorables pour le développement des actinomycètes qui disposent d'enzymes adaptatifs variés et puissants. Du point de vue physiologique, les sédiments hydriques diffèrent des sédiments terrigènes par deux aspects principaux : manque de lumière et absence d'oxygène. Dans l'ensemble, les actinomycètes se développent normalement en l'absence de la lumière (WAKSMAN, 1959). On signale en plus qu'au premier stade de leur croissance, ils peuvent se développer dans des conditions d'anaérobiose. A partir de certaines profondeurs (eaux profondes, fond de l'océan), cette condition d'anaérobiose peut affecter le développement de ces microorganismes (LECHEVALIER, 1974).

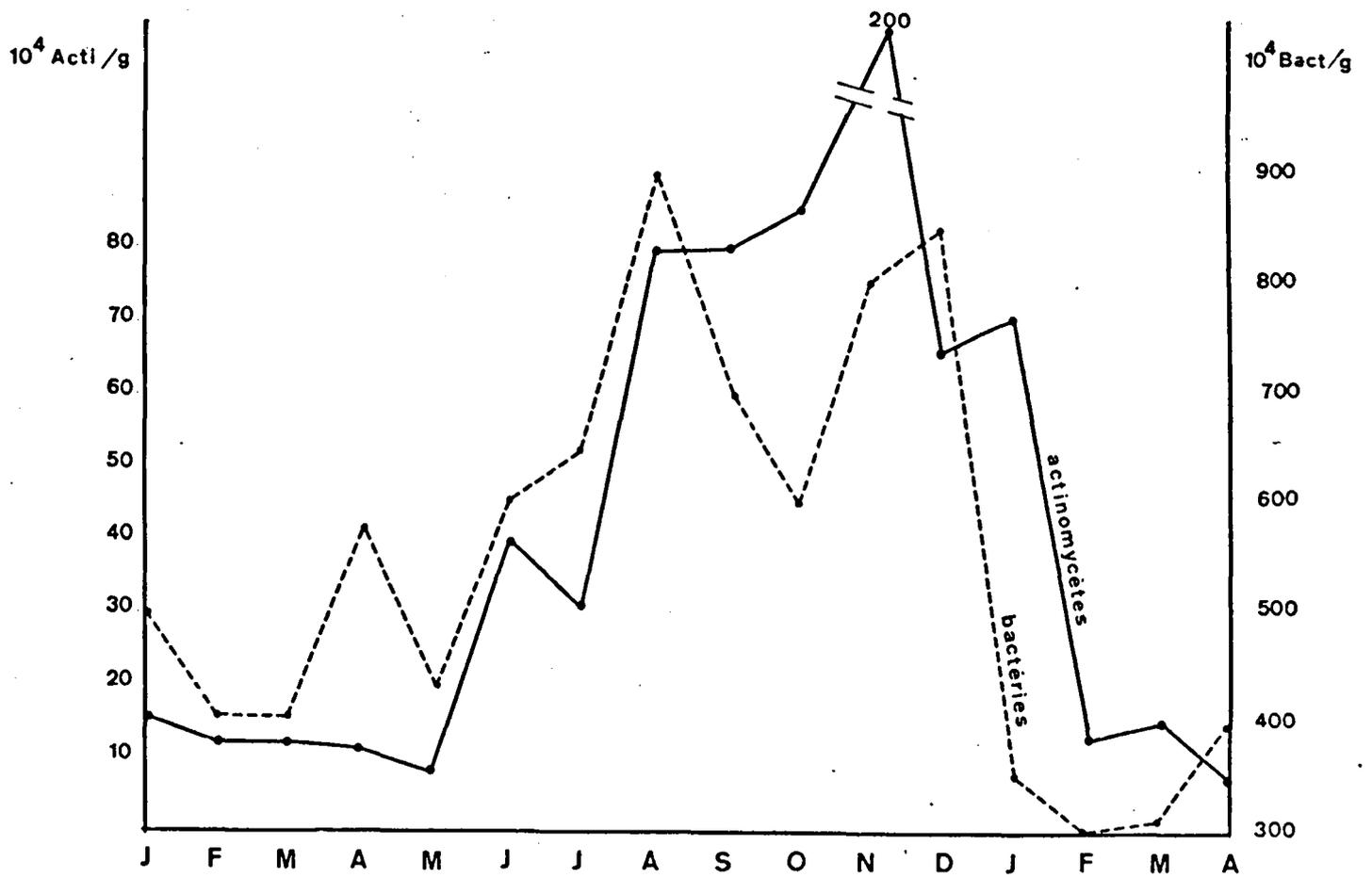
Au point de vue qualitatif, l'analyse des échantillons d'eau et des sédiments révèle l'existence d'espèces très variées (CHEA et LECLERC, 1974a). Deux genres y sont prédominants : les Streptomyces et les Micromonospora. Le premier occupe environ 85 % de la population actinomycétique dans les sédiments. La prédominance des Streptomyces, comme dans le cas des sols, laisse penser que ces germes sont d'origine terrestre. La présence unique des Streptomyces dans les eaux très polluées qui reçoivent en abondance les déchets industriels et domestiques pourrait être expliquée par leur résistance dans des conditions hostiles. Le genre Micromonospora, signalé par certains auteurs par sa capacité adaptatrice au milieu aquatique, est en nombre limité dans les sédiments. Par contre, son nombre est supérieur à celui des Streptomyces, dans les eaux auto-épurées (point 12A du bassin) où les conditions de nutrition sont appauvries.

2) Evolution saisonnière

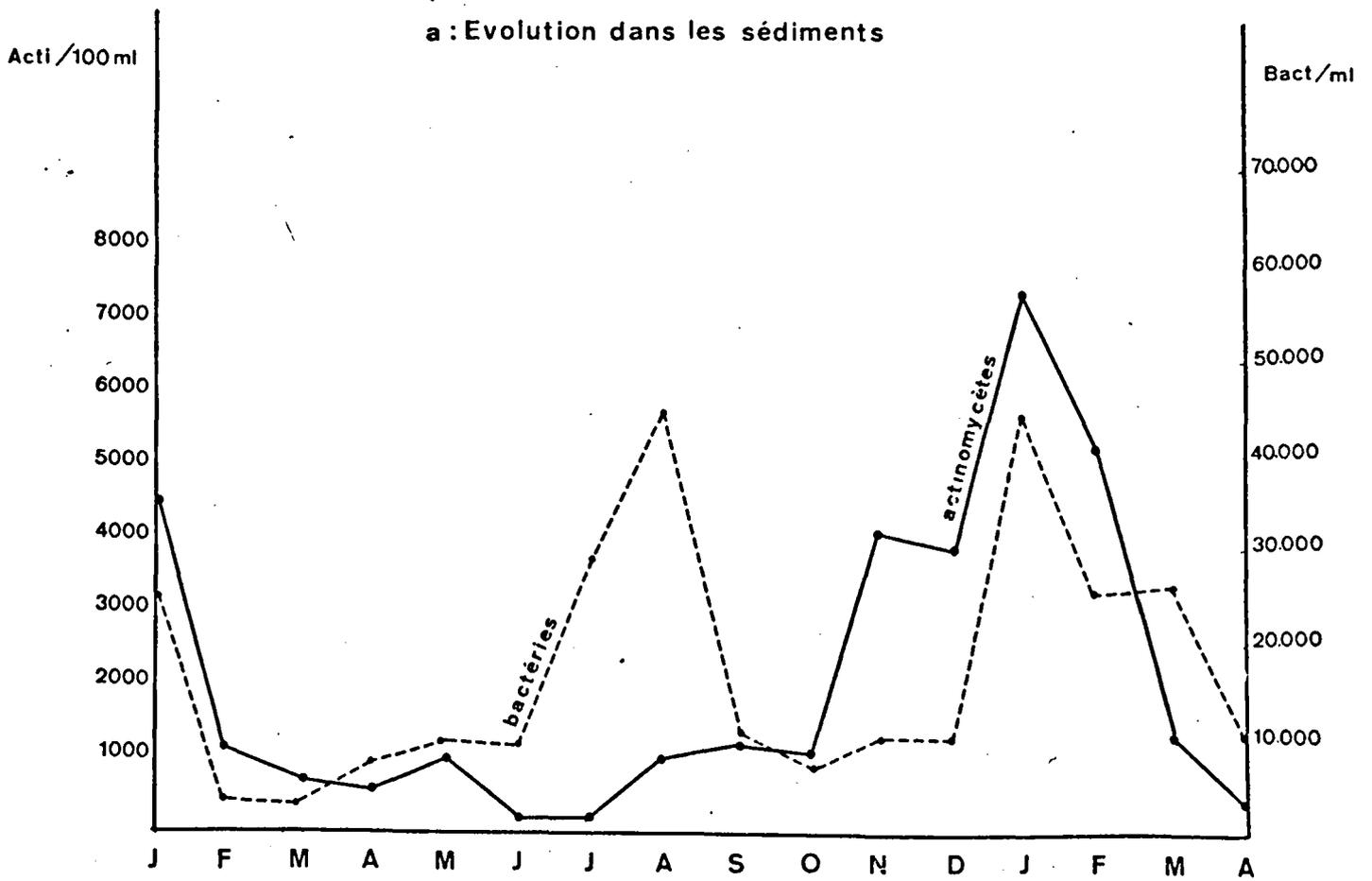
Comme nous venons de le constater, le nombre d'actinomycètes dans les eaux est faible et négligeable ; il n'est que le pâle reflet de ce qui se passe sur le lit de la rivière. Dans ces conditions, il apparaît illusoire et inutile d'en apprécier l'évolution saisonnière.

C'est au niveau des sédiments que les phénomènes essentiels se déroulent. C'est donc là qu'il est nécessaire d'en suivre l'évolution.

Durant la période qui s'écoule de janvier à mai (Figure 5a) le nombre d'actinomycètes reste à peu près stable avec une légère tendance à la diminution. C'est à partir de juin que les taux s'élèvent de façon significative (4 fois plus) pour atteindre un maximum en octobre - novembre (20 fois plus) ; comme précédemment, de décembre jusqu'en avril, le nombre baisse de nouveau. L'augmentation observée pendant l'été et l'automne peut être due simplement à l'élévation de température plus favorable à leur croissance. Cette explication est la plus simple à avancer. Elle a été formulée par SILVEY et WYATT (1973) et KENNETH qui ont étudié ce phénomène dans des réservoirs d'eau. Ils ont signalé que la première phase de croissance se fait souvent dans des conditions d'anaérobiose, dans le fond des réservoirs. A ce stade, ils sont capables de décomposer les matières organiques sans produire de métabolites



a: Evolution dans les sédiments



b: Evolution dans l'eau



Fig.5: Evolution des germes dans l'eau peu polluée

pas étudiée, suivie de la phase actinomycétique qui, selon nos résultats, se situe entre octobre et novembre. L'apparition des bactéries à Gram positif se situerait ensuite.

D'autres faits fragmentaires paraissent corroborer ce schéma. C'est ainsi que la dégénérescence des algues s'opère plus rapidement en présence d'actinomycètes qu'en leur absence. La symbiose entre les actinomycètes et les bactéries à Gram positif peut expliquer la disparition de l'odeur terreuse d'origine actinomycétique en présence de Bacillus cereus. On en ignore l'interprétation. Les Bacillus sont-ils capables de lyser les hyphes d'actinomycètes ? Utilisent-ils les métabolites produits ? On a simplement remarqué que l'autolyse des actinomycètes s'effectue plus rapidement en présence des Bacillus.

3) Rôle des actinomycètes dans les phénomènes d'auto-épuration

La grande efficacité de la technique de lagunage dans l'épuration chimique et microbienne des eaux polluées a été maintes fois signalée (en particulier WALKER et LECLERC, 1974). Dans le cas de bassin de maturation étudié ici, le rôle des actinomycètes peut-être analysé à la lumière de certains résultats généraux :

- . Sur l'évolution chimique et biochimique (Figure 6)

Les aspects observés les plus positifs sont la forte diminution de la DBO_5 et de la teneur en ammoniacque (75 % de réduction).

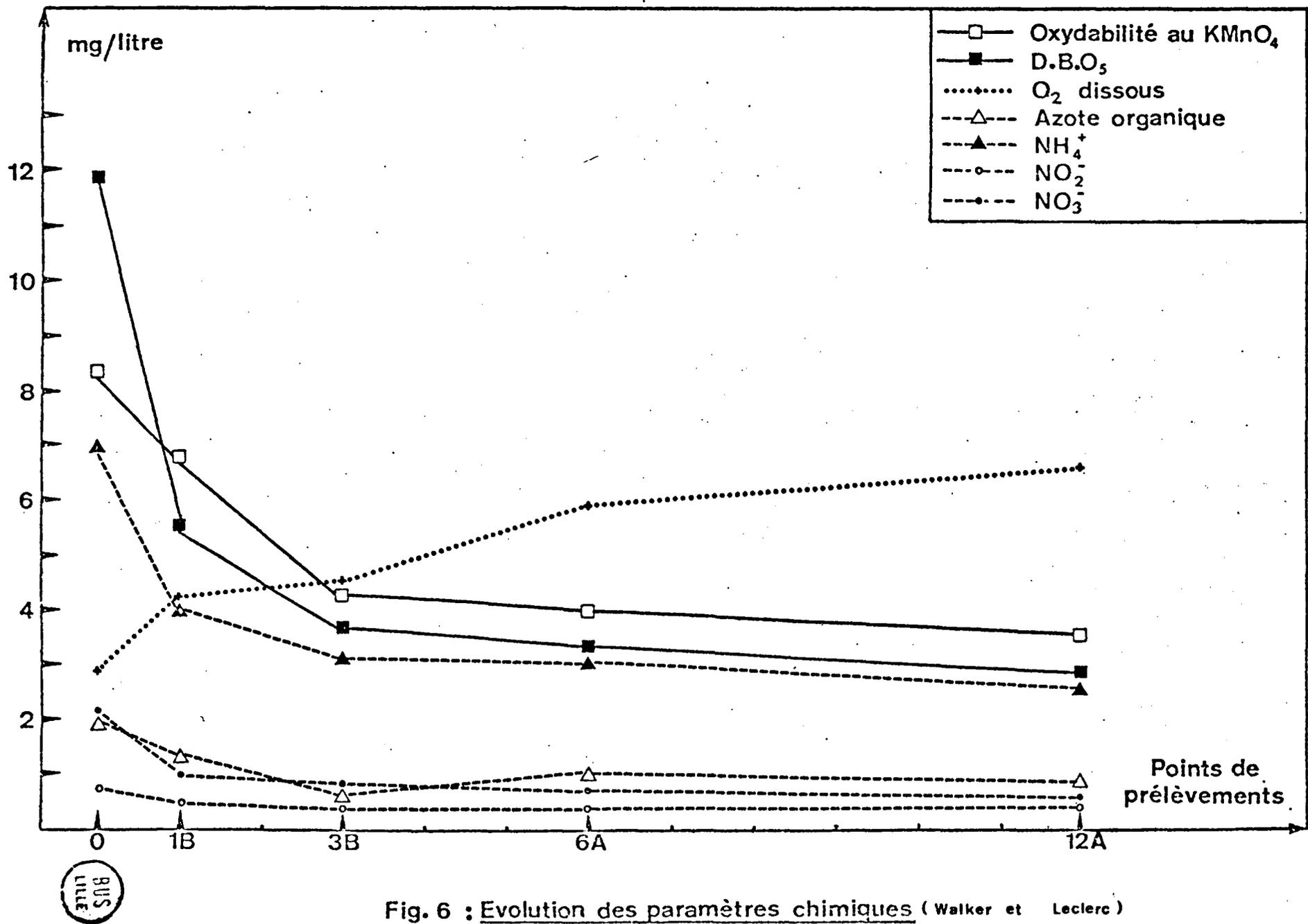


Fig. 6 : Evolution des paramètres chimiques (Walker et Leclerc)
(moyennes sur 4 campagnes)

Les teneurs en nitrites et en nitrates, faibles à l'entrée du bassin, vont également en décroissant (respectivement 37 à 43 % de réduction). Cette absence de nitrification associée à une diminution importante de l'azote ammoniacal a déjà été rapportée par plusieurs auteurs. L'assimilation de ces sources d'azote par les microorganismes est l'hypothèse la plus fréquemment avancée pour expliquer l'ensemble de ces phénomènes. Il est aussi possible qu'après une première phase de nitrification, les nitrates soient réduits pour disparaître sous forme d'azote. Cette dénitrification est pourtant peu vraisemblable étant donné le taux d'oxygène dissous dans les eaux du bassin. Il faudrait admettre qu'elle se situe au niveau des sédiments et que les actinomycètes, dont les propriétés de réduction des nitrates sont très connues, y jouent un rôle actif.

. Sur l'évolution microbienne

- Germes indicateurs de contamination fécale

Sur le plan écologique, ces populations bactériennes d'origine intestinale sont totalement étrangères au milieu et doivent être considérées comme faisant intégralement partie de la charge polluante. Elles subissent en conséquence une élimination rapide conduisant à des taux de réduction très importants identiques à ceux généralement rapportés dans la littérature (Figure 7).

De nombreux mécanismes, les uns d'ordre physico-chimique (rayonnements solaires, température, pH, rH, sédimentation, raréfaction des substrats assimilables), les autres d'ordre biologique (activité des germes bactériolytiques ou de prédateurs, pouvoir

.../...

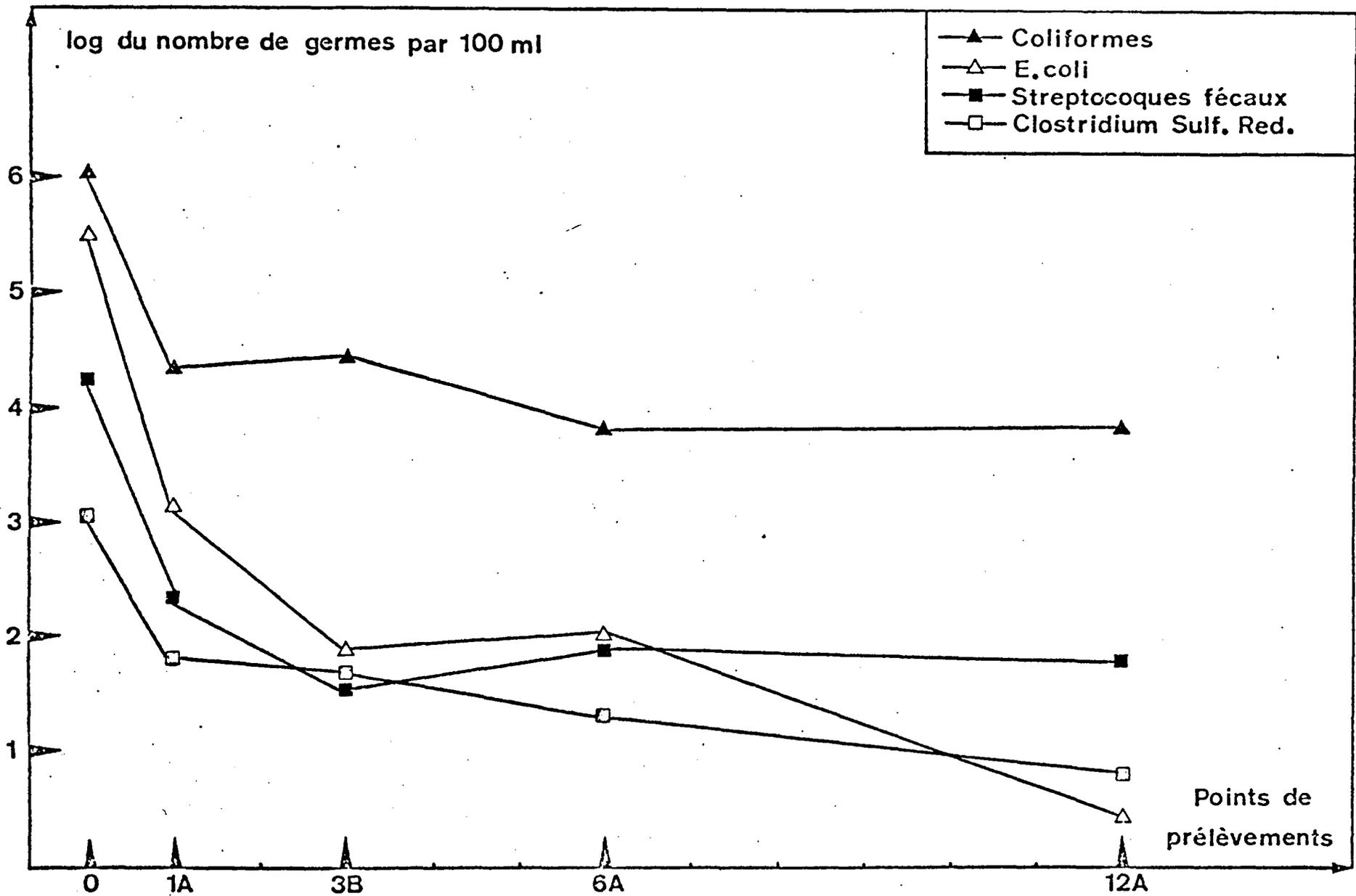


Fig 7: Evolution des germes fécaux dans les eaux (Walker et Leclerc)
(moyennes sur 8 campagnes)



antibiotique de la masse algale) permettent d'expliquer cette remarquable élimination. Tous sont en effet susceptibles d'intervenir à des degrés divers.

D'un point de vue sanitaire, ce pouvoir d'élimination de la population bactérienne constitue l'un des aspects les plus positifs de ce type de traitement. En effet, de tels taux de réduction (> à 99,5 % pour les différents germes indicateurs) ne sont jamais atteints par les traitements aérobies classiques de lits filtrants ou de boues activées dont le pouvoir dans ce domaine est plus faible et généralement de l'ordre de 90 %. Le procédé peut donc particulièrement bien convenir en tant que traitement tertiaire (bassin de maturation) pour limiter la contamination microbienne des milieux récepteurs par les affluents de stations d'épuration.

- Bactéries totales

Ces germes "autochtones", mieux adaptés au milieu, s'éliminent beaucoup plus lentement que les populations d'origine fécale.

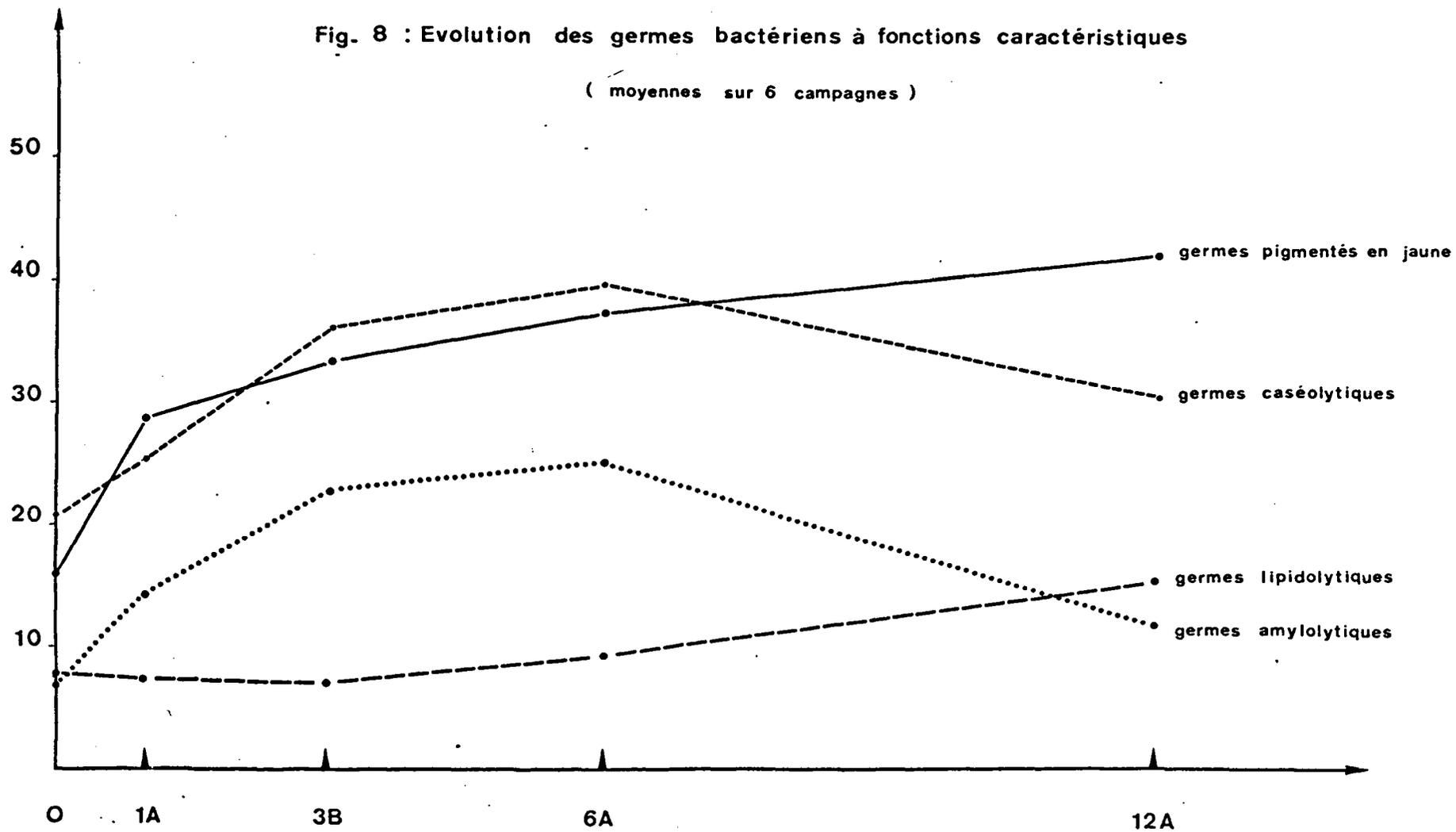
On peut noter (Figure 8), l'augmentation du pourcentage de germes protéolytiques entre les points 0 et 6A, puis sa diminution en fin de traitement. Cette flore protéolytique est d'ailleurs en pourcentage, la plus importante, et son activité peut être mise en rapport avec la diminution de la teneur des protéines totales. Le pourcentage des germes amylolytiques suit la même évolution, tandis que la concentration en glucides totaux augmente d'amont en aval du bassin. Le pourcentage des germes lipidolytiques augmente dans la dernière phase du traitement, cette variation va dans le même sens que celle de la teneur en matières grasses.

.../...

% de germes

Fig. 8 : Evolution des germes bactériens à fonctions caractéristiques

(moyennes sur 6 campagnes)



	Caséolyse	Amylolyse	Lipidolyse
Nombre de souches identifiées	119	77	205
Bacilles ou cocci Gram + (%)	18,4	9,0	6,3
Bacilles Gram - pigmentées en jaune (%) *	59,0	66,2	24,3
Pseudomonas (%)	10,0	9,0	28,2
Achromobacter (%)	0,8	1,2	32,0
Divers Gram - (%)	11,8	14,6	9,2

TABLEAU 15 : Activités biochimiques des principaux groupes bactériens (WALKER et LECLERC, 1974)

* : ne fermentant pas ou très tardivement le glucose et produisant un pigment jaune non diffusible de nature caroténoïde.



L'identification des espèces bactériennes constituant chacun de ces groupes figure dans le tableau 15.

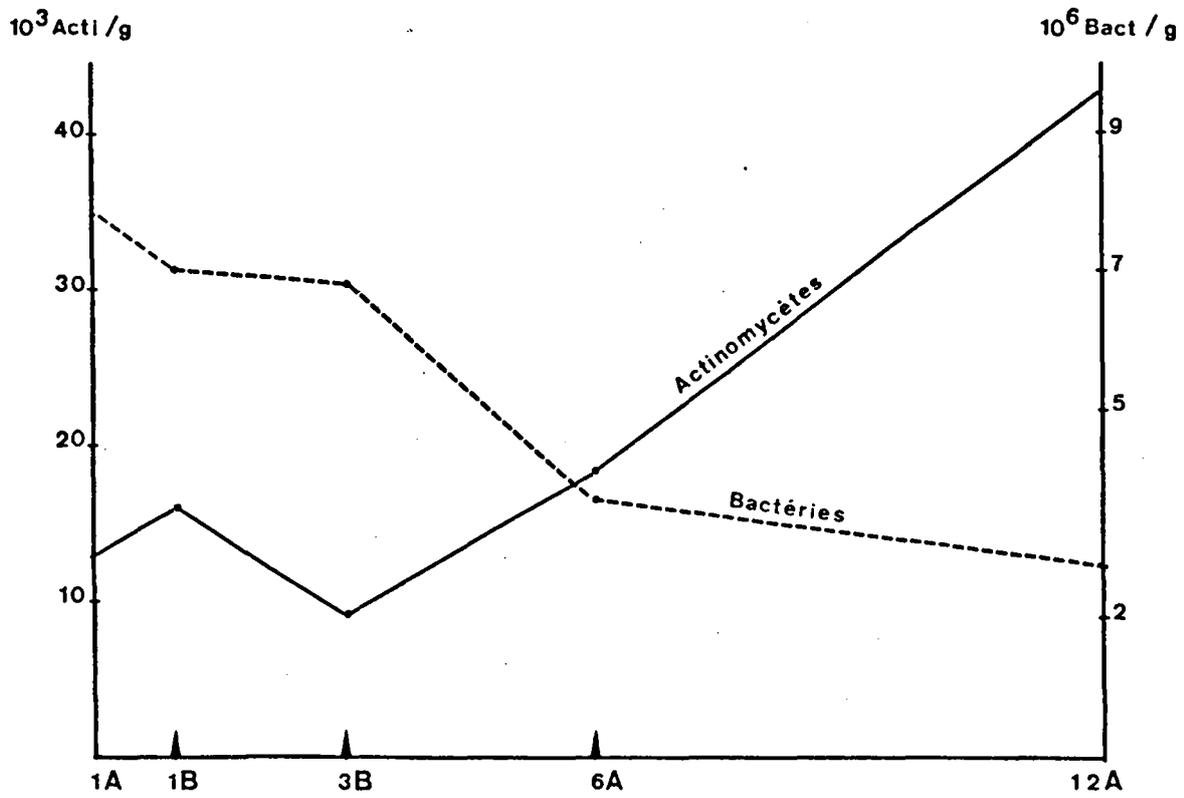
On remarque (tableau 15) que la fonction lipidolytique est à peu près également répartie entre les 3 groupes bactériens prédominants (Pseudomonas, Achromobacter, bacilles à Gram - pigmentés en jaune). Toutefois, il faut préciser que cette propriété constitue un caractère constant pour toutes les souches du genre Achromobacter isolées du bassin. La flore caséolytique est, quant à elle, en majeure partie (60 %) constituée par des bacilles à Gram - pigmentés en jaune. Les germes Gram + (bacilles ou cocci) constituent le second groupe important de la flore caséolytique (20 % des souches).

Les bacilles Gram - pigmentés en jaune forment également la majeure partie (73 %) des germes amylolytiques isolés. Ces 2 fonctions de caséolyse et d'amylolyse apparaissent donc, dans le cas présent, étroitement reliées entre elles au sein d'un même groupe de germes pigmentés. Ceci explique en conséquence la similitude constatée entre l'évolution du pourcentage de germes caséolytiques et celle du pourcentage de germes amylolytiques.

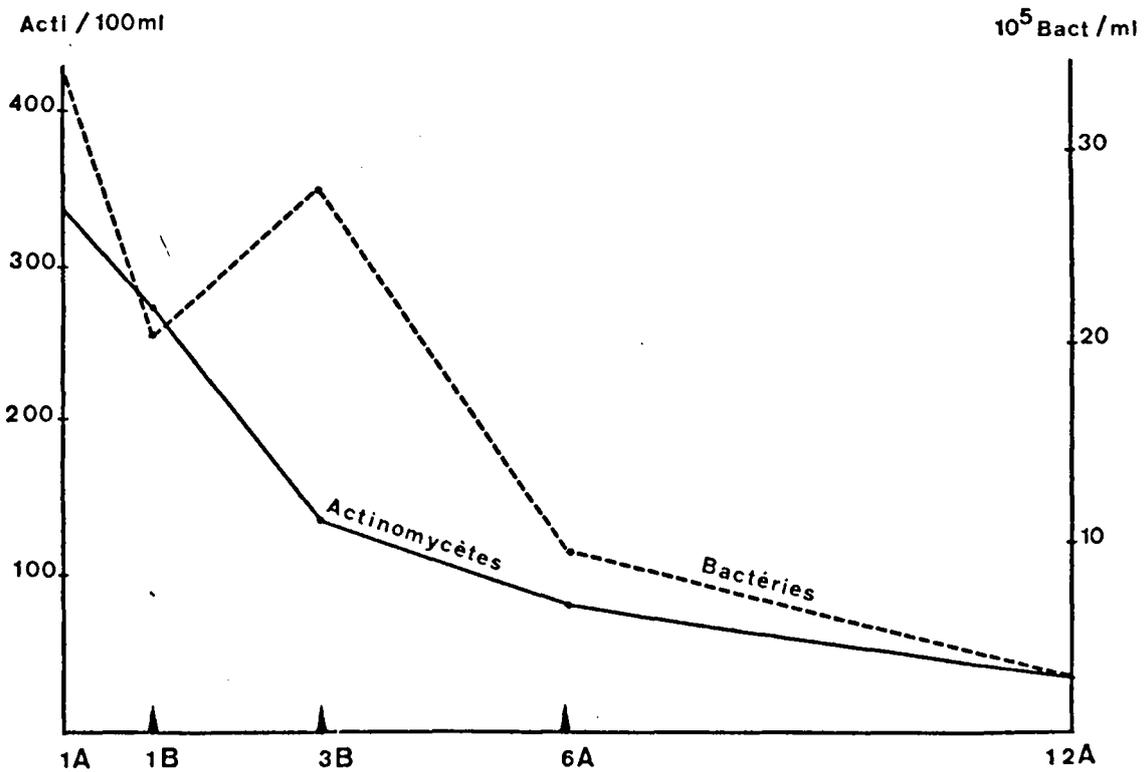
- Actinomycètes (Figure 9)

Dans les sédiments, ils augmentent considérablement d'amont en aval. Leur courbe d'évolution peut être comparée à celle des bactéries pigmentées en jaune dont on vient de constater également l'importante augmentation relative. Les pourcentages d'élévation sont approximativement du même ordre (4 fois plus dans les 2 cas).

.../...



Evolution dans les sédiments



Evolution dans les eaux



Fig. 9 : Evolution des actinomycètes dans le bassin

(chaque point correspond à la valeur moyenne des 16 campagnes)

Interprétation

. Sur l'évolution bactérienne

L'étude de l'évolution spécifique des diverses populations met en évidence des phénomènes de sélection pouvant s'expliquer par les activités métaboliques différentes des principaux groupes bactériens. On assiste tout d'abord à une prédominance primaire des germes à tendance glucidolytique (Pseudomonas surtout) dont l'activité conduit à la neutralisation d'une certaine fraction de la charge organique, notamment des sucres simples et des composés facilement biodégradables. Dans le même temps, les populations "allochtones" s'éliminent très rapidement. La prédominance secondaire d'une flore protéolytique (germes pigmentés en jaune, actinomycètes) et lipidolytiques (*Achromobacter*, Actinomycètes) se fait ensuite aux dépens de composés plus résistants tels que protéine, polysaccharide complexe (cellulose, pectine), lipides.

. Sur l'importance écologique des actinomycètes

Dans le cadre du traitement étudié, parallèlement à la prédominance des germes pigmentés en jaune dans les eaux, les actinomycètes se maintiennent mieux dans les sédiments et y constituent une population dominante secondaire. La charge organique à traiter, déjà partiellement stabilisée, se caractérise par des teneurs relativement plus fortes en composés de nature protéique pouvant parfaitement servir de substrat aux activités métaboliques de ces

germes. En effet, l'étude de leurs caractères biochimiques a révélé leur grand pouvoir glucidique, lipidique et protéique (Chapitre III de la deuxième partie). Ces propriétés leur confèrent la possibilité de participer aux dernières phases des processus d'auto-épuration par élimination des protéines et des polysaccharides complexes. En outre, leur pouvoir bactériolytique, antibiotique (principalement sur des Gram +) et leur aptitude à se développer aux dépens de cadavres bactériens (Gram + et Gram -) permettent également d'expliquer leur maintien dans ce milieu.

CONCLUSION GENERALE

Au terme de cette étude, nous pouvons dégager un certain nombre de points essentiels suivants :

. En général, les actinomycètes présents dans l'eau sont en quantité très faible. Le rapport actinomycètes/bactéries est presque négligeable, et par conséquent, leur dénombrement et leur isolement rencontrent de sérieuses difficultés. Il apparaît que le traitement des échantillons d'eau par concentration, par chloration et l'emploi des milieux de culture sélectifs, en particulier ceux à base de caséine ou de chitine, donnent des résultats très encourageant dans la recherche de ces germes dans l'eau.

. Bien que le milieu aquatique soit peu propice à leur multiplication, on les trouve par contre en nombre important dans les sédiments. Dans certains cas, lors de la période de pleine prolifération, ils peuvent représenter une proportion notable par rapport à d'autres microflores (25 % de la flore bactérienne totale dans les sédiments de la rivière peu polluée).

. Au point de vue qualitatif, deux genres sont prédominants : le Micromonospora et le Streptomyces. Le premier ensemble particulièrement adapté à la vie aquatique : on le trouve plus souvent dans l'eau, surtout quand celle-ci est appauvrie en éléments

nutritifs minéraux ou organiques. Le second est par contre, abondant dans les sédiments, et en plus dans l'eau enrichie en apport terrien.

. Dans l'ensemble, les espèces rencontrées diffèrent très peu de celles trouvées dans le sol. Elles sont plus variées dans la rivière peu polluée que dans celle fortement polluée. L'association systématique des études biochimiques des constituants cellulaires et des études morphologiques s'avère être un moyen simple et pratique pour leur identification.

. En général, ils sont équipés d'un système enzymatique très puissant. Grâce à cette capacité exceptionnelle et à leur présence en quantité relativement abondante dans les sédiments, ils peuvent jouer un rôle très important dans la dégradation des matières organiques rejetées dans l'eau.

A N N E X E

1 - Milieu de Lindenbein : modifié par Bénédicte (L.B.)

(PORTER et Coll., 1960)

• Glycérol.....	20 g
• L. arginine.....	2,5 g
• NaCl.....	1 g
• CaCO ₃	0,1 g
• FeSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,1 g
• MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,1 g
• Agar.....	20 g
• Eau.....	1000 ml

pH 7,0 - Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

2 - Milieu de Nakeeb et Lechevalier (N.L.)

• Glycérol.....	12,5 g
• Arginine monochlorhydrate.....	1 g
• K ₂ HPO ₄	1 g
• MgSO ₄	0,5 g
• Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,1 g

• ZnSO ₄	0,001 g
• MnSO ₄	0,001 g
• CuSO ₄	0,001 g
• NaCl.....	1 g
• Agar.....	15 g
• Eau distillée.....	1000 ml

pH 6,9 - 7,1 ; Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

3 - Milieu de Kuster et Williams (K.W.)

• Caséine.....	0,3 g
• Glycérol.....	10 g
• KNO ₃	2 g
• K ₂ HPO ₄	2 g
• MgSO ₄	0,05 g
• FeSO ₄	0,01 g
• CaCO ₃	0,02 g
• NaCl.....	2 g
• Agar.....	18 g
• Eau distillée.....	1000 ml

pH 7,0 - 7,2 ; Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

4 - Milieu d'Olson : commercialisé par Difco (0)

• Caséinate de sodium.....	2 g
----------------------------	-----

- . Asparagine..... 0,1 g
- . Propionate de sodium..... 4 g
- . K_2HPO_4 0,5 g
- . $MgSO_4$ 0,1 g
- . $FeSO_4$ 0,001 g
- . Agar..... 15 g

Réhydrater 22 g de ce mélange dans 1 000 ml d'eau distillée. Chauffer. Puis ajouter 5 g de glycérol. Stériliser pendant 15 minutes à 121°C. pH final : 8,1.

5 - Milieu à base de chitine de Lingappa et Lockwood (L.L.)

- . Chitine..... 2,5 g
- . $MgSO_4, 7 H_2O$ 0,5 g
- . $FeSO_4, 7 H_2O$ 0,01 g
- . $ZnSO_4, 7 H_2O$ 0,001 g
- . Eau distillée..... 1000 ml
- . Agar..... 20 g

Stériliser à 115°C pendant 15 minutes. pH final : 7,0.

La chitine (B.D.H.) est solubilisée à froid par l'acide chlorhydrique concentré. Après filtration sur de la laine de verre, le filtrat est précipité par addition d'eau en excès, Le précipité est lavé jusqu'à neutralité.

Ce milieu est coulé en double couche : les boîtes de Pétri reçoivent tout d'abord 10 ml d'eau gélosée, (2 %), puis après refroidissement, 10 ml du milieu de culture.

6 - Milieu "YEG" (Extrait de levure - glucose) : solide ou liquide
(WAKSMAN, 1961)

. Glucose.....	10 g
. Extrait de levure.....	10 g
. Agar.....	15 g
. Eau.....	1000 ml

pH : 6,8.

7 - Milieu "YE-ME" (Extrait de levure - Extrait de malt) : solide
ou liquide (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

. Extrait de levure (Difco).....	4 g
. Extrait de malt (Difco).....	10 g
. Dextrose.....	4 g
. Agar.....	20 g
. Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster à pH : 7,3. Stériliser à 100°C pendant 15 à 20 minutes.

8 - Milieu "GA" (Glycérol - Asparagine) (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

. L-asparagine.....	1 g
. Glycérol.....	10 g
. K_2HPO_4	1 g
. Eau distillée.....	1000 ml

- . Solution de sels A * 1 ml
- . Agar..... 20 g

Ajuster le pH à 7,0 - 7,4. Stériliser à 100°C pendant 15 à 20 minutes.

* Solution de sels A :

- $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- $\text{ZnSO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Eau distillée..... 100 ml

9 - Milieu "PGA" (Pomme de terre - Glucose) (WAKSMAN, 1961)

On met 200 g de pommes de terre découpées en petits morceaux dans 1000 ml d'eau bouillante pendant 30 mn. Puis, on filtre sur de la laine de verre. Dans le filtrat, on ajoute :

- . Glucose..... 20 g
- . CaCO_3 0,2 g
- . $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- . Agar..... 15 g
- . Eau distillée, q. s.p..... 1000 ml

pH : 6,8 - 7,2.

10 - Milieu "Th" (Extrait de viande - Extrait de levure - Peptone)

(CROSS et LACEY, 1970)

- . Extrait de viande..... 0,5 g
- . Extrait de levure..... 1 g
- . Peptone..... 2,5 g
- . Agar..... 15 g
- . Eau distillée..... 1000 ml

pH final : 7,0 - 7,2.

11 - Milieu "PCA" (Pomme de terre - Carotte) (CROSS et Coll., 1963)

- . Pomme de terre..... 150 g
- . Carotte..... 80 g

Les pommes de terre et les carottes sont découpées en petits morceaux et mises dans 1000 ml d'eau à 100°C pendant 30 mn. Après la cuisson, le mélange est filtré sur de la laine de verre. Le filtrat obtenu est ajusté à 1000 ml avec de l'eau distillée et additionné de 20 g d'agar. Le pH final est de 6,5.

12 - Milieu pour la cellulose aérobie (POCHON et TARDIEUX, 1962)

- . Solution saline standard (a).. 50 ml
- . Nitrate d'ammonium..... 1 g
- . Extrait de sédiments (b)..... 20 ml
- . Solution d'oligo-éléments (c). 1 ml
- . Eau distillée q.s.p..... 1000 ml

Stériliser à 110°C pendant 20 minutes.

(a) Solution saline standard (de WINOGRADSKY)

- $\text{PO}_4 \text{HK}_2$	5 g
- $\text{SO}_4 \text{Mg}$	2,5 g
- NaCl	2,5 g
- $(\text{SO}_4)_3 \text{Fe}_2$	0,05 g
- $\text{SO}_4 \text{Mn}$	0,05 g
- Eau.....	1000 ml

(b) Extrait de sédiments

Mélanger à poids égal sédiments et eau du bassin, autoclaver 1 h à 130°C ; au sortir de l'autoclave, filtrer sur filtres papier, à chaud, plusieurs fois, jusqu'à l'obtention d'un liquide clair. Vérifier le pH, qui doit être voisin de la neutralité.

Stériliser à 115°C pendant 30 minutes. L'extrait doit être limpide, de teinte ambrée.

(c) Solution d'oligo-éléments

- Molybdate de potassium....	0,05 g
- Borate de sodium.....	0,05 g
- Perchlorure de fer.....	1 goutte
- Nitrate de cobalt.....	0,05 g
- Sulfate de cadmium.....	0,05 g
- Sulfate de cuivre.....	0,05 g
- Sulfate de zinc.....	0,05 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g
- Eau distillée.....	1000 ml

13 - Milieu à la pectine (LECLERC, 1963)

• Extrait de levure.....	0,5 g
• CaCl ₂ , 2 H ₂ O (10 %).....	0,6 ml
• Bleu de bromothymol (0,2 %)...	1,25 ml
• Polypectate de sodium.....	1 g
• Eau distillée.....	100 ml

pH final : 7,3. Stériliser à 120°C pendant 15 minutes.

BIBLIOGRAPHIE

-°°-°°-

- 1 - ATWELL R.W. & T. CROSS - Germination of actinomycetes spores, in "The Actinomycetales" (G. SYKES and F.A. SKINNER) - Acad. Press London, 1973, 197-207.
- 2 - BAYS L.R., N.P. BURMAN & W.M. LEWIS • Taste and odour in water supplies in Great Britain : A survey of the present position and problems for the future. - Wat. Treat. Exam., 1970, 19, 2, 136-160.
- 3 - BALDACCI E. - Tendances actuelles de la classification des actinomycète Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1962, 4, 633-646.
- 4 - BALDACCI E., G. FARINA & R. LOCCI - Emendation of the genus Streptoverticillium Baldacci (1958) and revision of some species. - Giorn. Microbiol., 1966, 14, 153-171.
- 5 - BALDACCI E., R. LOCCI & J.R. LOCCI - Production of granules by actinomycetales. - Giorn. Microbiol., 1966, 14, 173-184.
- 6 - BALDACCI E. & R. LOCCI - Micromorphology of actinomycetales and their genera arrangement, in "The Actinomycetales" (The Jena international symposium on taxonomy, 1968), 419-424. Veb Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 7 - BECKER B., M.P. LECHEVALIER, R.E. GORDON & H.A. LECHEVALIER - Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. - Appl. Microbiol., 1964, 12, 421-423.
- 8 - BECKER B., M.P. LECHEVALIER & H.A. LECHEVALIER - Chemical composition of cell wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. - Appl. Microbiol., 1965, 13, 236-243.

- 9 - BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 7è ed. Williams et Wilkins, Baltimore, 1957.
- 10 - BERTHELOT M. & G. ANDRE - Sur l'odeur propre de la terre. - C.R. Acad. Sci. Paris, 1891, 112, 598-599.
- 11 - BOWDEN G.H. & J.M. HARDIE - Commensal and Pathogenic Actinomycetes Species in man, in "The Actinomycetales" (SYKES G. and F.A. SKINNER). - Acad. Press London, 1973, 277-299.
- 12 - BLYTH W. - Farmer's lung disease, in "The Actinomycetales" (SYKES G. and F.A. SKINNER). - Acad. Press London, 1973, 261-276.
- 13 - BENEDICT R.G. - Antibiotics produced by actinomycetes. - Botan. Rev. 1953, 19, 229-320.
- 14 - BRADLEY S.G. & D.L. ANDERSON - Taxonomic implication of actinophages host-range. - Science, 1958, 128, 413-414.
- 15 - BRADLEY S.G. & D. RITZI - Composition and ultrastructure of Streptomyces venezuelae. - J. Bact., 1968, 95, 2358 - 2364.
- 16 - BUTTIAUX R. - Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique de l'eau. - Rev. Hyg. Med. Soc., 1958, 6, 170-192
- 17 - BUTTIAUX R., H. BEERENS & A. TACQUET - Manuel de techniques bactériologiques. - Ed. Med. FLAMMARION, 3ème Ed., Paris 1969.
- 18 - BURMAN N.P., C.W. OLIVER & Janet K. STEVENS - Isolation of Actinomycetes, in "Isolation methods for Microbiologists" (D.A. SHAPTON and G.W. GOULD), Tech. Ser. 3, 131-133. Acad. Press, London and New York, 1969.
- 19 - BURMAN N.P. - The occurrence and significance of Actinomycetes, in "The Actinomycetales : Characteristics and practical importance" (G. SYKES and F.A. SKINNER), 219-230. - Acad. Press, London and New York, 1973.
- 20 - CHANDRAMOHAN D., S. RAMU & R. NATARAJAN - Cellulocytic activity of marine streptomycetes. - Curr. Sci., 1972, 41, 245-246.

- 21 - CHEA E. Hour & H. LECLERC - Dénombrement des actinomycètes aérobies de l'eau. - Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1973, 124 B, 533-546.
- 22 - CHEA E. Hour & H. LECLERC - Identification des actinomycètes aérobies de l'eau. - Can. J. Microbiol. (sous presse).
- 23 - CHEA E. Hour & H. LECLERC - Propriétés biochimiques des actinomycètes aérobies de l'eau. - Microbia, Nancy (sous presse).
- 24 - CORKE C. T. & F. E. CHASE - The selective enumeration of actinomycetes in the presence of large numbers of fungi. - Can. J. Microbiol., 1956, 2, 12-16.
- 25 - COCHRANE V. W. - Physiology of actinomycetes. - Ann. rev. Microbiol., 1960, 15, 1-26.
- 26 - COUCH J. N. - Actinoplanes, a new genus of the Actinomycetales. - J. Elisha Mitchell. scient. Soc., 1950, 66, 87-92.
- 27 - COUCH J. N. - A new genus and family of the Actinomycetales with a revision of the genus Actinoplanes. - J. Elisha Mitchell. scient. Soc., 1955, 71, 148-155.
- 28 - CROSS T., M. P. LECHEVALIER & H. A. LECHEVALIER - A new genus of the Actinomycetales : Microellobosporia gen. nov. - J. gen. Microbiol., 1963, 31, 421-429.
- 29 - CROSS T., P. W. WALKER & G. W. GOULD - Thermophilic actinomycetes producing resistant endospores. - Nature, London, 1968, 220, 352-354.
- 30 - CROSS T. & J. LACEY - Studies on the genus Thermomonospora, in "The Actinomycetales" (The Jena International symposium on taxonomy, 1968), 211-219, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 31 - CROSS T. & D. W. JOHNSTON - Thermoactinomyces vulgaris. Distribution in natural habitat, in spore research, 1971, Barker A. N. Gould G. W. & J. WOLF (315-330) - Acad. Press, London, 1972.
- 32 - CROSS T. & M. GOODFELLOW - Taxonomy and classification of the Actinomycetes, in "The Actinomycetales : characteristics and practical importance" (G. SYKES & F. A. SKINNER), 11-112. - Academic Press, London - New York, 1973.

- 33 - CROOK P., C.C. CARPENTIER & P.S. KLENS - The use of sodium propionate in isolating actinomycetes from soils. - Science, 1950, 112, 656.
- 34 - CUMMINS C.S. & H. HARRIS - Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. - J. gen. Microbiol., 1958, 18, 173-189.
- 35 - DE LEY J. - Molecular techniques and applications in bacterial taxonomy, in "The Actinomycetales" (The Jena international symposium on taxonomy, 1968), 317-327, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 36 - DOUGHERTY J.D. & R.L. MORRIS - Studies on the removal of Actinomycetes musty tastes and odors in water supplies. - J. Am. Wat. Wks. Ass., 1967, 59, 1320-1326.
- 37 - DULANEY E.L., A.H. LARSEN & E.O. STAPLEY - A note on the isolation of microorganism from natural sources. Mycologia, 1955, 47, 420-422.
- 38 - FELDMAN J. - Les Algues, in "Botanique" (Collection Précis des Sciences biologiques, GRASSE P.P.) Ed. Masson et Cie, Paris 1963, . 1039pages.
- 39 - GANJU P.L. & M.R.S. IYENGAR - Micromorphology of some sclerotica actinomycetes and development of their sclerotia. - J. gen. Microbiol., 1974, 82, 35-48.
- 40 - GERBER N.N. - A volatile metabolite of actinomycetes, 2-methylisoborneol. - J. Antibiot. (Tokyo), 1969, 22, 508-509.
- 41 - GERBER N.N. - Geosmin from microorganisms, is trans-1, 10-dimethyltrans-9-decalol. - Tetrahedron Letters, 1968, 25, 2971-2974.
- 42 - GERBER N.N. & H.A. LECHEVALIER - Gosmin an earthy smelling substance isolated from Actinomycetes. - Appl. Microbiol., 1965, 13, 935-938.
- 43 - GORDON R.E. & J.M. MIHM - The type species of the genus Nocardia. J. gen. Microbiol., 1962, 27, 1-10.

- 44 - GORDON M.A. - The genus Dermatophilus. - J. Bact., 1964, 88, 509-522.
- 45 - GOODFELLOW M. - Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. - J. gen. Microbiol., 1971, 69, 33-80.
- 46 - GOODFELLOW M., A. FLEMING & M.J. SACKIN - Numerical classification of "Mycobacterium rhodochrous and Runyon's group. IV Mycobacteria. - Int. J. Syst. Bacteriol., 1972, 22, 81-98.
- 47 - HENSSEN A. & D. SCHAFER - Emended description of the genus Pseudonocardia Henssen and description of a new species Pseudonocardia spinosa Schäfer. - Int. J. Syst. Bacteriol., 1971, 21, 29-34.
- 48 - HIGGINS M.L., M.P. LECHEVALIER & H.A. LECHEVALIER - Flagellated actinomycetes. - J. Bact., 1967, 93, 1446-1451.
- 49 - HOEHN R.C. - Biological methods for the control of tastes and odors. - Southwest Wat. Wks. J. (U.S.A.), June 1965, 26-28.
- 50 - KALAKOUTSKII L.V. & L.M. POZHARITSKAJA - The Streptomyces spore : Its distinct features and Germinal behaviour, in "The actinomycetales" (G. SYKES & F.A. SKINNER), 155-178. - Acad. Press London, New York, 1973.
- 51 - KALAKOUTSKII L.V. & N.S. AGRE - Endospores of actinomycetes : dormancy and germination, in "The actinomycetales" (G. SYKES & F.A. SKINNER), 179-195. - Acad. Press, London -New-York, 1973.
- 52 - KENNETH L.D. - Actinomycetes and water quality. - J. Am. Wat. Wks Ass., 1968, 60, 379-381.
- 53 - KUSTER E. & S.T. WILLIAMS - Selection of media for isolation of Streptomyces. - Nature, London, 1964, 202, 928-929.
- 54 - KRASSILNIKOV N.A. - A new actinomyces genus Actinopycnidium. - N. Gen. of the Actinomycetaceae family - Mikrobiologia, 1962, 31, 250-253.

- 55 - KIKUCHI T. & T. MIMURA - Odorous metabolites of aquatic actinomycetes. Identification of 1-phenyl-2 propanous and 2-phenyl ethanol. - Chem. Phram. Bull., 1974, 22, 7, 1681-1684.
- 56 - KANETSUNA F. & A. BARTOLI - A simple chemical method to differentiate Mycobacterium from Nocardia. - J. gen. Microbiol., 1972, 70, 209-212.
- 57 - LACEY J. - Actinomycetes in soils, composts and fodders, in "The actinomycetales " (G. SYKES & F.A. SKINNER), 231-251. - Acad. Press London, 1973.
- 58 - LECLERC H. - Etude des Bacilles à gram négatif isolés des eaux présentant une activité galactosidasique. - Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, Lille, 1963, 14, 49-110.
- 59 - LEEFLANG K.W.H. - Microbiologie degradation of rubber. - J. Amer. Water works Assoc., 1963, 55, 1523-1535.
- 60 - LECHEVALIER M.P. & H.A. LECHEVALIER - A new genus of Actinomycetales : Waksmania. - J. gen. Microbiol., 1957, 17, 104-111.
- 61 - LECHEVALIER H.A., M. SOLOTOROVSKY & C.I. Mc DIRMONT - A New genus of Actinomycetales : Micropolyspora. - J. gen. Micro-biol., 1961, 26, 11-18.
- 62 - LECHEVALIER H.A. - Priority of the generic name Microbispora over Waksmania and Thermopolyspora. - Int. Bull. Bact. Nom. Tax., 1965, 15, 139-142.
- 63 - LECHEVALIER H.A. - The Actinomycetes, in "Principles and applications in aquatic microbiology " 230-253 (Ed. Heukelekian and Norman C. Dondero), John Wiley and Sons, Inc. New York - London - Sidney, 1964.
- 64 - LECHEVALIER H.A., M.P. LECHEVALIER & P.E. HOLBERT - Electron microscopic observation of the sporangial structures of strains of Actinoplanaceae. - J. Bact., 1966, 92, 1228-1235.
- 65 - LECHEVALIER H.A. & M.P. LECHEVALIER - Biology of actinomycetes. - Ann. Rev. Microbiol., 1967, 21, 71-100.

- 66 - LECHEVALIER M.P., H.A. LECHEVALIER & P.E. HOLBERT - Sporichthya, un nouveau genre de Streptomycetaceae. - Ann. Inst. Pasteur, 1968, 114, 277-286.
- 67 - LECHEVALIER H.A. & M.P. LECHEVALIER - A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes, in "The Actinomycetales" (The Jena international symposium on taxonomy, 1968), 393-405, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 68 - LECHEVALIER M.P. - Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. - J. Lab. Clin. Med., 1968, 71, 6, 934-944.
- 69 - LECHEVALIER M.P. & H.A. LECHEVALIER - Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. - Int. J. Syst. Bact., 1970, 20, 4, 435-443.
- 70 - LECHEVALIER M.P., A.C. HORAN & H.A. LECHEVALIER - Lipid composition in the classification of Nocardiae and Mycobacteria. - J. Bact., 1971, 105, 1, 313-318.
- 71 - LECHEVALIER M.P., H.A. LECHEVALIER & C.E. HEINTZ - Morphological and chemical nature of the sclerotia of Chainia olivacea Thirumalachar and Sukapure of the order Actinomycetales. - Int. J. Syst. Bact., 1973, 23, 157-170.
- 72 - LECHEVALIER H.A. & L. PINE - The actinomycetales, in Laskin, A. et Lechevalier H.A. (Eds.) Handbook of Microbiology, vol. 203-220. Organismic Microbiology, C R C Press, Cleveland 1973.
- 73 - LECHEVALIER H.A. - Distribution et rôle des actinomycètes dans les eaux. - Bull. Inst. Pasteur, Paris, 1974, 72, 159-175.
- 74 - LINGAPPA Y. & J.L. LOCKWOOD - A chitin medium for isolation growth and maintenance of Actinomycetes. - Nature, London, 1969, 189, 158-159.
- 75 - LINGAPPA Y. & J.L. LOCKWOOD - Chitin media for selective isolation and culture of Actinomycetes. - Phytopathology, 1962, 52, 317-323.
- 76 - LOCCI R., E. BALDACCINI & B. PETROLINI BALDAN - The genus Streptoverticillium, a taxonomic study. - Giorn. Microbiol. 1969, 17, 1-60.

- 77 - LUEDEMANN G. M. - Geodermatophilus, a new genus of the Dermaphilaceae (Actinomycetales). - J. Bact., 1968, 96, 1848-1858.
- 78 - LUEDEMANN G. M. - Micromonospora taxonomy. - Adv. Appl. Microbiol., 1969, 11, 101-133.
- 79 - MATSUMAE A., M. OHTANI, H. TAKESHIMA & T. HARA - A new genus of Actinomycetales : Kotasatoa gen. nov. J. Antibiot., 1969, 21, 616-625.
- 80 - MEDSKER L. L., D. JENSKINS & J. F. THOMAS - An earthy-smelling compound associated with blue-green algae and actinomycetes. - Environ. Sci. Technol., 1968, 2, 461-464.
- 81 - METCALFE G. & M. E. BROWN - Nitrogen fixation by new species of Nocardia. - J. gen. Microbiol., 1957, 17, 567-572.
- 82 - MORDASKA H., M. MORDASKI & M. GOODFELLOW - Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. - J. gen. Microbiol., 1972, 71, 77-86.
- 83 - MORRIS R. L., J. D. DOUGHERTY & G. W. RONALD - Chemical aspects of actinomycetes metabolites as contributors of taste and odor. - J. Wks. Ass., 1963, 55, 1380-1390.
- 84 - NAKEEB M. A. & H. A. LECHEVALIER - Selective isolation of aerobic Actinomycetes. - Appl. Microbiol., 1963, 11, 75-77.
- 85 - NONOMURA H. & Y. OHARA - Distribution of Actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes. - J. Ferment. Technol., 1971, 49, 11, 895-903.
- 86 - NONOMURA H. - Key for classification and identification of species of rare actinomycetes isolated from soils in Japan. - J. Ferment. Technol., 1974, 52, 71-77.
- 87 - OLSON E. H. - Actinomycetes isolation agar in "Difco" : supplementary literature" Difco lab., Detroit, Michigan 48, 201, U.S.A., 1968.
- 88 - OTTOW J. C. G. - Rose bengal - Malt extract : a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and Actinomycetes from soils. - Appl. Microbiol., 1968, 16, 1, 170-171.

- 89 - PIKE E. B., E. G. CARRINGTON & P. A. ASHBURNER - An evaluation of procedures for enumeration bacteria in activated sludge. *J. Appl. Bact.*, 1972, 35, 309-321.
- 90 - POCHON J. & P. TARDIEUX - Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Collection Technique de Base, Ed. Tourelle, St Mandé (Seine), 1962, 111 pages.
- 91 - PORTER J. N., J. J. WILHEM & H. D. TRESNER - Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. - *Appl. Microbiol.*, 1960, 8, 174-178.
- 92 - PRAUSER H. - Characters and genera arrangement in the Actinomycetales, in "The Actinomycetales" (The Jena international symposium on taxonomy, 1968), 407-418, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 93 - ROMANO A. H. & R. S. SAFFERMAN - Studies on Actinomycetes and their odors. - *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 1963, 55, 169-17
- 94 - ROSEN A. A., R. S. SAFFERMAN, C. I. MASHNI & A. H. ROMANO - Identity of odorous substance produced by *Streptomyces griseoluteus*. - *Appl. Microbiol.*, 1968, 16, 178-179.
- 95 - ROSEN A. A., C. I. MASHNI & R. S. SAFFERMAN - Recent developments in the chemistry of odour in water : the cause of earthy musty odour. - *Wat. Treat. Exam.*, 1970, 19, 2, 106-119.
- 96 - ROACH A. W. & J. K. G. SILVEY - The morphology and life cycle of freshwater actinomycetes. - *Trans. Am. Microscop. Soc.*, 1958, 77, 36-47.
- 97 - SAFFERMAN R. S., A. A. ROSEN, C. I. MASHNI & M. E. MORRIS - Earthy-smelling substances from a blue-green algae. - *Env. Science and Tech.*, 1967, 1, 429-430.
- 98 - SILVEY J. K. G., J. C. RUSSEL, D. R. REDDEN & W. C. McCORMICK - Actinomycetes and Common tastes and odors. - *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 1950, 42, 1018-1026.
- 99 - SILVEY J. K. G. - The role of aquatic actinomycetes in self-purification of fresh water streams, in "Advances in water pollution research" (B. A. Southgate Ed.), vol. 1, 227-243, Pergamon Press, London 1964.

- 100 - SILVEY J.K.G., D.E. HENLEY & J.T. WYATT - Planktonic blue - green algae : growth and odor production studies. - J. Am. water Wks. Ass., 1972, 64, 35-38.
- 101 - SILVEY J.K.G. & J.T. WYATT - The interrelationship between fresh bacteria, algae, and actinomycetes in southwestern reservoirs, in "The structure and function of fresh water microbial communities", 249-285, (Ed. J. CAIRNS), American Microscopical Society Symposium, 1974.
- 102 - SHIRLING E.B. & D. GOTTLIEB - Methods for characterization of Streptomyces species. - Int. J. Syst. Bact., 1966, 13, 313-340.
- 103 - SNEATH P.H.A. - Application of numerical taxonomy to Actinomycetales : Problems and prospects, in "The Actinomycetales", 'The Jena international symposium on taxonomy, 1968) 371-377, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 104 - SNIEZKO S.F., G.L. BULLOCK, C.E. DUNBAR & L.L. PETTIJOHN - Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). - J. Bact., 1964, 88, 1809-1810.
- 105 - SIERRA G. - A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and Patty substrates. - Anton. Van Leeuwenhock, 1957, 23, 15-22.
- 106 - THAYSEN A.C. & F.T.K.A. PENTELOW - The effect on fish of the taint produced by on odoriferous species of Actinomycetes. Ann. Appl. Biol., 1936, 23, 105-109.
- 107 - TRESNER H., F. DANGA & J. PORER - Long-term maintenance of Streptomyces in deep freeze. - Appl. Microbiol., 1960, 8, 339-341.
- 108 - THIRUMALACHAR M.I. - Chainia, a new genus of the Actinomycetales. - Nature, London, 1955, 176, 934-935.
- 109 - THIEMANN J.E., H. PAGANI & G. BERETTA - A new genus of the Actinoplanaceae : Dactylosporangium gen. nov. - Arch. Mikrobiol., 1967, 58, 42-52.

- 110 - THIEMANN J.E., H. PAGANI & G. BERETTA - A new genus of the Actinoplanaceae : Planomonospora gen. nov. - Giorn. Microbiol., 1967, 15, 27-38.
- 111 - THIEMANN J.E., H. PAGANI & G. BERETTA - A new genus of the Actinomycetales : Microtetraspora gen. nov. - J. gen. Microbiol., 1968, 50, 293-303.
- 112 - THIEMANN J.E. - Study of some new genera and species of the Actinoplanaceae, in "The Actinomycetales" (The Jena international symposium on taxonomy, 1968), p. 245-257, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- 113 - TSYGANOV V.A., V.P. NAMESTNIKOVA & N.V. KRASSIKOVA - DNA composition in various genera of the Actinomycetales. Mikrobiologiya, 1966, 35, 92-95.
- 114 - TSAO P.H., C. LEBEN & G.W. KEITT - An enrichment method for isolating Actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. - Phytopathology, 1960, 50, 88-89.
- 115 - Water Research Association (report n° 150), Recommended methods for the enumeration of actinomycetes and fungi in waters. Wat. Treat. Exam., 1968, 17, 1, 67-70.
- 116 - WALKER J. & H. LECLERC - Traitement experimental d'épuration d'une eau de surface par lagunage : aspects écologiques et biochimiques. - Wat. Res. 1974 (sous presse).
- 117 - WAKSMAN S.A. - "The actinomycetes", vol. I, the Williams & Wilkins company, Baltimore, 1959. 327 pages.
- 118 - WAKSMAN S.A. - "The actinomycetes", vol. II, The Williams & Wilkins company, Baltimore, 1961. 363 pages.
- 119 - WAKSMAN S.A. & H.A. LECHEVALIER - "The actinomycetes", vol. I The Williams & Wilkins company, Baltimore, 1962. 430 p
- 120 - WELSCH M. - Bacteriostatic and bacteriolytic properties of actinomycetes. - J. Bacteriol., 1942, 44, 571-588.
- 121 - WILLIAMS S.T. & F.L. DAVIES - Use antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soils. - J. gen. Microbiol., 1965, 38, 251-261.

- 122 - WILLIAMS S. T., F. L. DAVIES & T. CROSS - Identification of genera of the Actinomycetales, in "Identification methods for microbiologists" (GIBBS B. M. & A. SHAPTON) (Techser 2, 111-124), Academic Press, London and New York, 1968.
- 123 - WILLIAMS S. T., R. M. BRADSHAW, J. W. COSTERTON & A. FORGHESON - Fine structure of the spore sheath of some Streptomyces species. - J. gen. Microbiol., 1972, 72, 249-258.
- 124 - WILLIAMS S. T., G. P. SHARPLES & R. M. BRADSHAW - The fine structure of Actinomycetales, in "The Actinomycetales" (SYKES G. & F. A. SKINNER) 113-130 - Acad. Press, London, 1973.
- 125 - WILDERMUTH H. - The fine structure of mesosomes and plasma membrane in Streptomyces coelicolor. - J. gen. Microbiol., 1971, 68, 53-63.
- 126 - WILDERMUTH H. - Surface structure of Streptomyces spores as revealed by negative staining and freeze etching. - J. Bact., 1970, 101, 318-322.
- 127 - WILDERMUTH H. & B. A. HOPWOOD - Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor. - J. gen. Microbiol., 1970, 60, 51-59.
- 128 - WILLOUGHBY L. G., C. D. BAKER & S. E. FOSTER - Sporangium formation in the Actinoplanaceae induced by humic acids. - Experientia, 1968, 24, 730-731.
- 129 - WILLOUGHBY L. G. - A study on aquatic actinomycetes. The allochthonous leaf component. - Nova Hedwigia, 1969, 12, 45-111.
- 130 - WILLOUGHBY L. G. - A study of the aquatic actinomycetes of Blelham Tarn, 1969, 34, 465-483.
- 131 - YAMAGUCHI T. - Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. - J. Bact., 1965, 89, 444-453.
- 132 - YAMAGUCHI T. - Similarity in DNA of various morphologically distinct actinomycetes. - J. gen. appl. Microbiol., 1967, 13, 63-71.

