

Popular Democratic Republic of Algeria  
Ministry Of High Education And Scientific Research  
Abebes Laghrour University ,Khenchela  
Faculty of Nature and Life Science  
Departement of ecology and environment



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة عباس لغرور خنشلة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم البيئة و المحيط

# Polycopié pédagogique

**Titre**

## **Microbiologie des Eaux**

Cours destiné aux étudiants de

Master I : Protection des écosystèmes

**Nom : HALASSI**

**Prénom : Ismahan**

**Grade : MCB**

Année : 2021

## *Avant-propos*

L'eau est le produit alimentaire le plus contrôlé avant d'être qualifiée comme étant propre à la consommation. Les micro-organismes sont toujours présents dans l'eau, en plus ou moins grande quantité. Dans ces milieux naturels, ils jouent souvent un rôle d'épurateur qui dégrade aussi bien les déchets organiques que les polluants qui s'y trouvent. Donc seul un petit pourcentage de ces microorganismes est nuisible pour la santé.

Le présent manuscrit, à caractère pédagogique et didactique, faisant l'objet de cours de Master I Protection des écosystèmes enseigné à la faculté des sciences de la nature et de la vie ; Université de Khenchela. En effet son objectif est de donner aux étudiants les bases de la microbiologie des eaux en se basant sur l'explication détaillée des différentes notions et l'utilisation des illustrations les plus claires.

## *Contenu de la matière*

**Semestre : 2**

**Intitulé de l'UEM:**

**Crédits : 9**

**Coefficients : 5**

**Intitulé de la matière : Microbiologie des eaux**

**Crédits : 5**

**Coefficients : 3**

### **Objectifs de l'enseignement**

Etudier la classification et la croissance microbienne, ainsi que les méthodes d'études des micro-organismes des écosystèmes aquatique.

### **Connaissances préalables recommandées**

De bonnes connaissances en écologie générale ainsi qu'en microbiologie et qualité des eaux

### **Contenu de la matière :**

1. Classification des microorganismes.
2. La croissance microbienne.
3. Les microorganismes et milieux.
4. Méthodes d'études des micro-organismes.
5. Les milieux de cultures.
6. Les écosystèmes aquatiques.
7. Les eaux d'alimentation.
8. Contrôle bactériologiques des eaux.

**Mode d'évaluation :** Examen final et contrôle continu.

## Sommaire

<i>Avant propos</i>	
<i>Contenu de la matière</i>	
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Chapitre I : Classification des microorganismes</i>	
<i>1. La Taxonomie des vivants</i>	<i>2</i>
<i>1.1. La classification dichotomique</i>	<i>2</i>
<i>1.2. Classification phénotypique</i>	<i>3</i>
<i>1. 2. 1. Les Tests métaboliques</i>	<i>4</i>
<i>1. 2.2. La méthode sérologique</i>	<i>4</i>
<i>1.2.3. Les tests d'inhibition</i>	<i>4</i>
<i>1.2.4. La chimiotaxonomie</i>	<i>4</i>
<i>1.2.5. La lysotypie</i>	<i>4</i>
<i>1.3. Taxonomie génétique ou phylogénique</i>	<i>4</i>
<i>1.3.1. La taille du génome</i>	<i>5</i>
<i>1.3.2. Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff)</i>	<i>4</i>
<i>1.3.3. Hybridation ADN/ADN</i>	<i>5</i>
<i>1.3.4. Le séquençage des ARN ribosomiaux (ARNr)</i>	<i>5</i>
<i>1.4. La Classification selon le manuel de Bergey</i>	<i>5</i>
<i>2. Les microorganismes et leurs propriétés</i>	<i>6</i>
<i>2.1. Les protistes inférieurs (procaryotes)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.1. Les bactéries (Les eubactéries)</i>	<i>7</i>
<i>2.1.2. Les archéobactéries</i>	<i>8</i>
<i>2.1.3. Les algues bleues (cyanobactéries)</i>	<i>8</i>
<i>2.2. Les protistes supérieurs (eucaryotes)</i>	<i>9</i>
<i>2.2.1. Les algues</i>	<i>9</i>
<i>2.2.2. Les protozoaires</i>	<i>9</i>
<i>2.2.3. Les champignons (moisissure et levure)</i>	<i>10</i>
<i>2.3. Les virus</i>	<i>11</i>
<i>Chapitre II : La croissance microbienne</i>	
<i>1. Les conditions physicochimiques de la croissance</i>	<i>13</i>
<i>1.1.Effet du pH</i>	<i>13</i>
<i>1.2.Effet de l'activité de l'eau</i>	<i>14</i>
<i>1.3.Effet de L'O2</i>	<i>14</i>
<i>1.4.Effet de la température</i>	<i>14</i>

<i>2. La Nutrition et les besoins élémentaires</i>	<i>15</i>
<i>2.1. L'eau</i>	<i>15</i>
<i>2.2. Source d'énergie</i>	<i>15</i>
<i>2.3. Source de carbone</i>	<i>16</i>
<i>2.4. La source d'azote</i>	<i>16</i>
<i>2.5. Les éléments minéraux</i>	<i>16</i>
<i>3. Les besoins spécifiques</i>	<i>16</i>
<i>3.1. Les facteurs de croissances</i>	<i>16</i>
<i>4. Croissance bactérienne</i>	<i>17</i>
<i>4.1. Courbe de croissance</i>	<i>18</i>

### *Chapitre III : Les microorganismes et milieux*

<i>1. Les Bactéries en milieux aquatiques</i>	<i>20</i>
<i>2. Les interrelations et intra-relations des microorganismes</i>	<i>21</i>
<i>2.1. Saprophytisme</i>	<i>21</i>
<i>2.2. Commensalisme</i>	<i>21</i>
<i>2.3. Symbiose ou mutualisme</i>	<i>21</i>
<i>2.4. Parasitisme</i>	<i>21</i>
<i>2.5. Prédation</i>	<i>21</i>
<i>2.6. Compétition</i>	<i>21</i>
<i>2.7. Pathogénicité</i>	<i>22</i>
<i>2.8. Le pouvoir pathogène des bactéries</i>	<i>22</i>
<i>2.9. Notions</i>	<i>23</i>

### *Chapitre IV: Méthodes d'études des micro-organismes*

<i>1. Mesure de la croissance</i>	<i>25</i>
<i>1.1. Mesures directes</i>	<i>25</i>
<i>1.1.1. Dénombrement des bactéries après culture (méthodes de dilutions)</i>	<i>25</i>
<i>1.1.1.1. Numération en milieu solide</i>	<i>25</i>
<i>1.1.1.2. Numération en milieu liquide</i>	<i>27</i>
<i>1.1.2. Mesure directe du nombre de cellules sous microscope</i>	<i>27</i>
<i>1.1.3. Compteur électrique (Compteur de particules)</i>	<i>30</i>
<i>1.1.4. Mesure par filtration sur membrane</i>	<i>31</i>
<i>1.1.5. La technique d'épifluorescence</i>	<i>32</i>
<i>1.2. Mesures indirectes</i>	<i>32</i>

<i>1.2.1. La mesure de la turbidimétrie</i>	32
<i>1.2.1.1. Spectrophotométrie</i>	32
<i>1.2.2. Mesure de la biomasse</i>	33
<i>1.2.2.1. Impédancemétrie</i>	33
<i>1.2.2.2. Spectrométrie de masse</i>	34
<i>1.2.2.3. Cytométrie de flux</i>	34

#### *Chapitre V : Les milieux de culture*

<i>1. Les milieux de culture</i>	35
<i>1.1. Les caractéristiques des milieux de culture</i>	35
<i>1.2. Les constituants fondamentaux</i>	35
<i>1.3. Classification des milieux de culture</i>	36
<i>1.3.1. Selon leur composition</i>	36
<i>1.3.2. Selon leur utilisation</i>	37

#### *Chapitre VI : Les écosystèmes aquatiques*

<i>1. Fonctionnement de l'écosystème aquatique</i>	39
<i>2. Les types d'écosystèmes aquatiques</i>	39
<i>2.1. Les systèmes aquatiques continentaux superficiels</i>	39
<i>2.2. Les écosystèmes aquatiques marins (Salinité : 33-34g/l)</i>	40
<i>2.3. Les écosystèmes de transition (les écotones)</i>	40
<i>3. Classification des eaux</i>	40
<i>4. L'eau potable</i>	42
<i>4.1. Les étapes de la production d'eau potable</i>	42
<i>5. Les eaux usées</i>	44
<i>5.1. Traitement des eaux usées</i>	44

#### *Chapitre VII: La microbiologie des eaux d'alimentation*

<i>1. Les indicateurs de contamination fécale (ICF)</i>	47
<i>1.1. Un bon indicateur de contamination fécale</i>	48
<i>1.2. Les ICF utilisés</i>	48
<i>1.2.1. Les coliformes totaux</i>	48
<i>1.2.2. Les coliformes thermotolérants (fécaux)</i>	49
<i>1.2.3. Les entérocoques</i>	49
<i>1.2.4. Clostridium perfringens</i>	50
<i>1.2.5. Les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) ou flore totale</i>	51

<i>aérobie mésophile (FTAM)</i>	
<b>2. Les normes de la qualité de l'eau</b>	<b>52</b>
2.1. Les valeurs guides	52
2.2. La valeur limite	53
2.3. Le classement de substances cancérogènes	54
<b>3. Le classement des maladies hydriques</b>	<b>54</b>
<b>4. L'importance des contaminations</b>	<b>55</b>
<b>5. Caractéristiques communes aux eaux souterraines et superficielles</b>	<b>56</b>
5.1. Caractéristiques particulières aux eaux souterraines	57
5.2. Caractéristiques particulières aux eaux superficielles	57
<b>Chapitre VIII : Contrôle bactériologique des eaux</b>	
<b>1. Méthodes de prélèvement</b>	<b>59</b>
<b>2. Méthodes générales de dénombrement</b>	<b>59</b>
2.1 Méthodes de dénombrement en milieu solide	59
2.2. Méthodes de dénombrement en milieu liquide	61
2.2.1 Méthode du nombre le plus probable	61
<b>3. Dénombrement des germes témoignant d'une pollution fécale</b>	<b>62</b>
3. 1 Dénombrement des micro-organismes revivifiables	62
3.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux	63
3.3. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et d'E. coli	64
3.4 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux ou Entérocoques	65
3.5 Recherche et dénombrement des spores de bactéries des anaérobies sulfitoréductrice et de clostridium sulfitoréducteurs	67
3.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures	67
<b>4.. recherche des germes pathogènes</b>	<b>68</b>
4.1 Recherche de salmonella	68
4.2 Recherche de Vibriion cholirérique	69
4.3 Recherche de Staphylocoques à coagulase positive	70
4. 4 Recherche de Pseudomonas aeruginosa	71
5. 5. isolement et identification des microorganismes pathogènes	72
<b>Conclusion</b>	<b>84</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>85</b>
<b>Annexes</b>	



Il existe tout un ensemble de microorganismes adaptés à la vie aquatique. Ils jouent un rôle primordial dans l'équilibre complexe qui régit les biotopes aquatiques.

La majorité de ces microorganismes sont inoffensifs et contribuent à réaliser un certain nombre de procédé bénéfique (producteurs primaires ou décomposeurs de la matière organique, agents de l'autoépuration dans le milieu naturel, acteurs de procédés biologiques dans les stations de traitement...). Mais, il y a aussi des microorganismes qui sont nocifs pour la santé humaine ou peuvent être responsables de graves maladies hydriques ; parmi eux, on trouve soit des pathogènes opportunistes, soit des parasites stricts pour lesquels l'eau n'est qu'un moyen de transport.

Les microorganismes rencontrés dans l'eau sont de trois types: des germes typiquement aquatiques, des germes telluriques et des germes de contamination animale ou humaine. Notre but est de comprendre le rôle et l'origine de ces microbes dans l'eau de manière simple, à travers ce support de cours qui s'articule en huit chapitres :

- Le premier chapitre présente des notions générales de microbiologie et de microorganisme notamment leur classification et leurs propriétés.
- Le second chapitre détaille dans sa première partie la croissance microbienne et les besoins nutritionnels et physicochimiques
- Un troisième chapitre dévoile les différents types d'interactions entre les microorganismes et leurs milieux et entre eux même.
- Dans le quatrième et le cinquième chapitre on aborde les différentes Méthodes d'études des micro-organismes ainsi que les différents milieux de cultures en microbiologie.
- Le chapitre six et sept classent les écosystèmes aquatiques et les eaux d'alimentations.
- Enfin un dernier chapitre consacré à l'étude de la qualité microbiologique des eaux, les normes internationales qui déterminent cette qualité ainsi que les méthodes utilisées pour le contrôle bactériologiques nécessaires.

Les microorganismes (« microbes », « germes ») constituent un groupe extrêmement diversifié d'organismes microscopiques généralement invisible à l'œil nu et ne peut être observé qu'à l'aide du microscope, capable d'effectuer des processus de vie basiques. Observés pour la première fois en 1674, mais ils ne sont identifiés réellement que 200ans plus tard (pasteur).

La science des règles de la classification s'appelle taxinomie. La taxinomie permet de nommer les organismes vivants (la nomenclature) et de les classer en unités (taxons), au sein desquels, ils partagent un grand nombre de caractéristiques communes.

En microbiologie, cela nous permet d'identifier (l'identification) les micro-organismes pour mieux les utiliser ou les exploiter (ceux qui sont bénéfiques) ou bien pour mieux s'en protéger et de les contrôler (ceux qui sont pathogènes).

Les principaux taxons par ordre décroissant (hiérarchie taxinomique) : Domaine, Règne, Phylum, Classe, Ordre, Famille, Genre (ensemble d'espèces), Espèce (ensemble de souches).

## **1. La Taxonomie des vivants**

### **1.1. La classification dichotomique.**

Avant, tous les êtres vivants étaient classés à l'intérieur du règne animal ou du règne végétal. Les organismes animaux tirent leur énergie de l'oxydation de matériaux organiques, accumulent des substances de réserve sous forme de graisses ou de glycogène, sont animés de mouvements actifs ils sont aussi dépourvus de parois cellulaires. Les végétaux, au contraire, sont photosynthétiques, utilisant la lumière comme source d'énergie ; ils synthétisent de l'amidon comme réserve nutritive, sont dépourvus de mouvement et possèdent une paroi cellulaire.

Puis l'invention du microscope par Van Leeuwenhoek en 1676 a introduit un nouveau élément de trouble de cette classification par sa conséquence immédiate, la découverte de microscope optique et donc la découverte des microorganismes (plus de 100 000 espèces connues actuellement),

Ensuite la théorie cellulaire qui oppose les microorganismes unicellulaires (bactéries, protistes) des organismes pluricellulaires (animaux et végétaux). Mais l'existence des groupes comme les algues et les champignons qui comprennent à la fois des uni et pluricellulaires ; des microorganismes et des macroorganismes mettant les limites de cette nouvelle classification.

Enfin la découverte du microscope électronique a permis pour la première fois au regard scientifique de pénétrer l'intimité de la cellule ; il apparaît alors que le monde vivant pouvait être divisé en deux selon une nouvelle ligne de partage selon le noyau donc on distingue les organismes composés de cellule avec noyau ou les eucaryotes (animaux, plantes, algues, champignons, protistes) et ceux composés de cellules sans noyau vrai ou les procaryotes (bactéries et archées) (Fig.1).

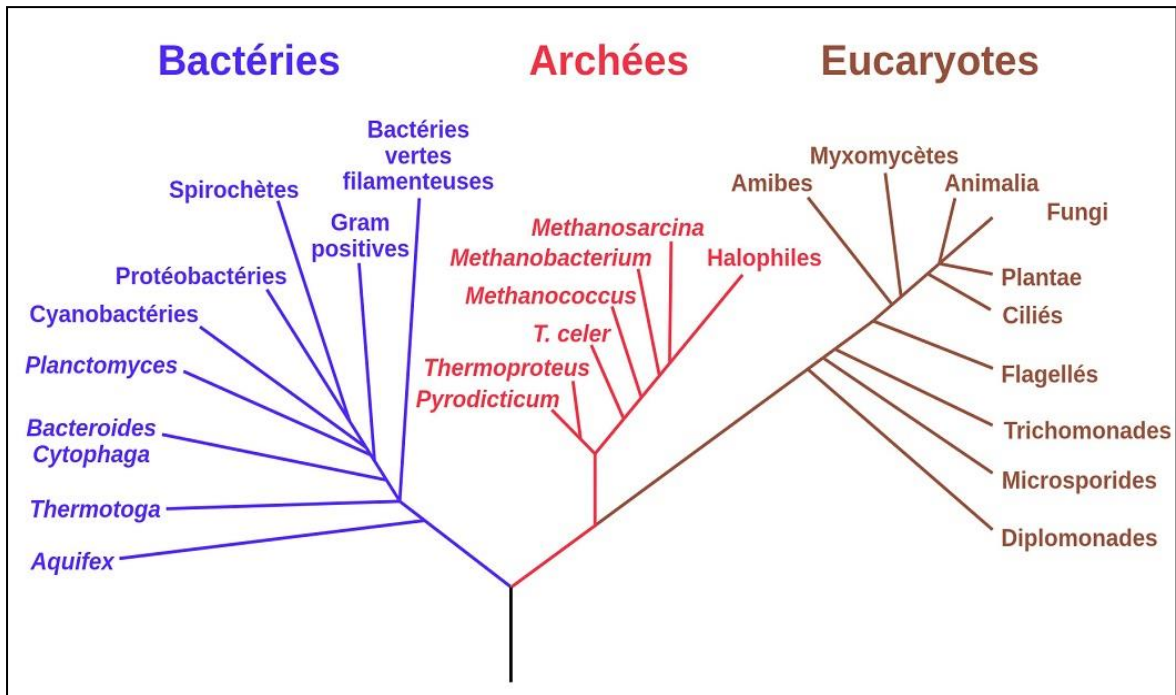


Figure 1. Les trois grands domaines des organismes vivants.

### 1.2. Classification phénotypique :

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années soixante, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénotypique.

La classification phénotypique (ou phénétique) utilise un nombre de caractères considérés comme importants :

- Observations macroscopiques, microscopiques:
- Descriptions des colonies (forme, taille, couleur, odeur)
- la morphologie des cellules (bacille, coque) .
- leurs arrangements.
- Les colorations (Gram, bleu méthylène, acido-alcool-résistante).
- Observation de la mobilité à l'état frais.

- On peut également rechercher la présence d'endospores, la croissance aérobie, anaérobie.

Les caractères morphologiques sont utiles pour l'identification, mais ne peuvent pas démontrer à eux seuls les relations phylogénétiques.

### ***1.2.1. Les Tests métaboliques :***

Très importants, ils peuvent distinguer des bactéries très apparentées. On recherche la présence d'enzymes (oxydase, catalase), la dégradation de l'urée, de l'esculine. La transformation du lactose et la production de gaz, l'utilisation de différents sucres comme source de carbone, l'utilisation du citrate, la production d'acétoïne.

Ces techniques ont été miniaturisées dans des galeries spécialisées (API), on peut faire 20 tests sur une même galerie spécifique des entérobactéries.

### ***1.2.2. La méthode sérologique:***

Le sérodiagnostic et le stéréotypage est basé sur la réaction spécifique antigène – anticorps. Cette méthode permet de différencier des espèces et même des souches au sein d'une même espèce. Les antigènes ciblés sont les Ag O chez les Gram négatives, les Ag H flagellaires et les Ag K capsulaires.

***1.2.3. Les tests d'inhibition :*** On évalue la croissance des micro-organismes sur des milieux sélectifs, en présence d'antibiotiques (antibiogramme).

***1.2.4. La chimiotaxonomie:*** On détermine le profil des acides gras des parois. Le Profil des protéines totales par électrophorèse (séparation selon le pHi et le poids moléculaire).

***1.2.5. La lysotypie :*** Infection par des bactériophages et formation de plages de lyses. On définit le lysovar ou le lysotype.

### ***1.3. Taxonomie génétique ou phylogénique :***

Les critères sont recherchés sont:

1. La taille du génome.
2. La composition des bases d'ADN sous la forme de pourcentage de G+C (GC%).
3. Le taux d'hybridation ADN/ADN.
4. La séquence de l'ADN qui code pour l'ARN ribosomal 16 S.

### **1.3.1. La taille du génome**

Selon les espèces la taille du génome est variable. Par exemple les bactéries paratrophes le génome est très réduit.

### **1.3.2. Composition en base d'ADN (Coefficient de Chargaff) :**

Quel que soit l'espèce d'origine, l'ADN contient toujours autant de purine que de pyrimidine soit :  $(A + G) = (C + T)$  ou  $(A+G) / (C+T) = 1$

De plus, il y a autant de thymine que d'adénine  $A/T = 1$ , autant de guanine que de cytosine  $G/C = 1$

Par contre, le rapport  $(A+T)/(C+G)$  varie beaucoup : il est caractéristique de l'espèce.

Ce coefficient est appelé coefficient de Chargaff. Il peut être calculer suite à un séquençage par la formule suivante  $((G+C)/(A+T+G+C)) \times 100$ .

Ou bien par une méthode de spectrométrie ultra-violet.

### **1.3.3. Hybridation ADN/ADN**

Les températures clés et leurs définitions :

**T<sub>m</sub>** : Point de fusion (Thermal elutionmidpoint) : Température de dénaturation de 50% de l'hybride

**T<sub>or</sub>** : Température optimale de renaturation : 25° à 30°C < Température de dénaturation

**T<sub>rr</sub>** : Température restrictive de renaturation: 10 à 15 °C < Température de dénaturation

### **1.3.4. Le séquençage des ARN ribosomaux (ARNr) :**

Selon Woese, les ARNr sont les meilleurs chronomètres moléculaires par :

- \* La constance de leur fonction
- \* Leur répartition dans tous les organismes
- \* Leur grande taille

Les taxonomistes utilisent un maximum de caractères écologiques, morphologiques, métaboliques comme des propriétés moléculaires, afin d'obtenir les résultats les plus fiables et les plus réalistes.

### **1.4. La Classification selon le manuel de Bergey :**

Cette classification est la plus acceptée par tous les microbiologistes. Dans ces premières éditions, en 1936, elle se basait sur l'étude :

**\*De leur morphologie microscopique** (bactérie de type coque, bacille, vibrion ; isolés, par deux, en chaînettes...).

**\*De leur morphologie macroscopique** (taille, forme, couleur... des colonies sur milieux de culture gélosés)

**\*De leur mobilité** (mobilité ou immobilité à une température donnée)

**\*De la présence de spores** (à l'état frais ou après coloration)

**\*Du résultat de la coloration de Gram** (coloration de Gram positive ou négative)

**\*De la température de croissance** (4° C, 20° C, 30° C, 37° C...).

**\*Du type respiratoire** (aérobie, anaérobie strict, aéro-anaérobie facultatif, microaérophile..).

**\*Des besoins nutritionnels** (nécessité de substances particulière pour le développement).

**\*De la capacité à utiliser certaines sources de carbone ou d'azote** (on parlera de biotypes ou biovars).

A cette période, les procaryotes étaient répartis en 4 divisions reconnues sur la base de l'existence ou non de la paroi. : **Les *Gracilicutes*, les *Firmicutes*, les *Tenericutes*, les *Mendosicutes*.**

\*La division des "*Gracilicutes*". Regroupant les bactéries à Gram négatif.

\*La division des "*Firmicutes*". Regroupant les bactéries à Gram positif.

\*La division des "*Tenericutes*". Bactéries dépourvues de paroi, Gram négatif.

\*La division des "*Mendosicutes*". Archaeobactéries.

## **2. Les microorganismes et leurs propriétés :**

Les microorganismes ne font partie ni de règne animale ni de règne végétale donc on les appelle protistes, répartis dans les trois domaines du vivant (bactérie, archées et eucaryote). Ils se distinguent les uns des autres par leur mode de vie ainsi que leur forme, et leur taille respectives sont présentées dans le tableau (1).

**Tableau 01: les différents types de microbes, leurs tailles et leurs natures cellulaires**

Microbe	Taille approximative	Nature des cellules
Virus	0,01-0,25 $\mu\text{m}$	Acellulaire
Bactérie	0,1-10 $\mu\text{m}$	Procaryote
Mycètes	2 $\mu\text{m}$ - 1 $\mu\text{m}$	Eucaryote
Protozoaires	2-1000 $\mu\text{m}$	Eucaryote
Algues	1 $\mu\text{m}$ – plusieurs mètres	Eucaryote

On les rencontre partout dans le sol, l'eau, l'air et même la peau et on les classe en deux catégories :

**2.1. Les protistes inférieurs (procaryotes) :**

**2.1.1. Les bactéries (Les eubactéries) :**

- Ce sont les bactéries les plus connues, elles sont douées de métabolisme et capables de croître et de se diviser au dépend de substances nutritives.
- Elles se développent à l'état aérobie ou anaérobie et présentent dans l'eau, le sol et l'air et la peau.
- Ce sont les êtres les plus nombreux sur terre (15fois>a tous les animaux)
- Elles se divisent par simple division cellulaire (reproduction asexuée) ou par reproduction sexuée par l'échange de l'information situé sur l'ADN circulaire.
- La majorité des bactéries intervient dans de nombreux phénomènes biologiques (fermentation, fixation d'azote atmosphérique) mais seule la minorité est pathogènes (3%).
- Les bactéries ont une structure simple protégée par une paroi qui leur confère une forme sphérique, bâtonnet ou spirale, et de taille qui ne dépasse pas 2  $\mu\text{m}$  généralement (Fig.2).

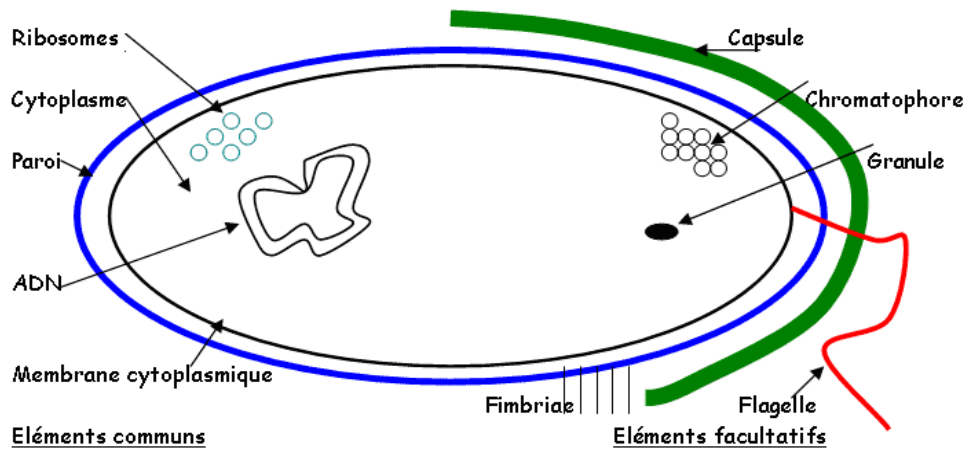


Figure 2. Schéma d'une cellule bactérienne.

### 2.1.2. Les archéobactéries :

C'est un groupe particulier de micro-organismes qui vit dans les conditions extrêmes de température, de pH et de salinité (milieu hostile), il comprend essentiellement que des espèces anaérobies.

Les archées utilisent une plus grande variété de sources d'énergie que les eucaryotes : composé organique comme les sucres, l'ammoniac, les ions métalliques et même l'hydrogène gazeux comme nutriments.

- Les bactéries méthanogènes
- Les bactéries halophiles
- Les bactéries thermoacidophiles

### 2.1.3. Les algues bleues (cyanobactéries) :

Sont des microorganismes photosynthétiques qui jouent un très grand rôle dans la production de l'oxygène atmosphérique. Ils ont une forme unicellulaire sphérique ou pluricellulaire en filament non ramifié.

- Ils entrent en symbiose avec les champignons et forment les lichens
- Ils ont une coloration variable : bleu vert, vert olivier et teignent les eaux en vert ou forme des couches vert turquoise.
- Très abondant en été (eau chaude) et forme des masse macroscopique appelée : fleur d'eau. Ils préfèrent les eaux peu profondes, tièdes, calmes et immobiles.

- Les cyanobactéries produisent des cyanotoxines nuisibles à la santé des usagers (irritations de peau, problèmes de foie et des systèmes nerveux) exp : les Microcystine libérée par *Microcystisaerogenosa*.

## **2.2. Les protistes supérieurs (eucaryotes) :**

### **2.2.1. Les algues :**

Ce sont des végétaux aquatiques primitifs, la majorité n'ont pas de corps, ils sont microscopiques mais devenu macroscopique en formant une masse visible en présence de nourriture. Ils sont photosynthétiques.

- Ils se divisent en deux groupes le phytoplancton qui vit en suspension et flotte et forme une nourriture pour la faune aquatique (1er maillon de la chaîne alimentaire) et le périphyton qui se fixe à des substrats solides (roches, plantes) et forme de nourriture pour le benthos.
- Ils ne sont pas toxiques en eux même (rare), mais ils ont une activité bactéricide et bactériostatique.
- Ils ont une paroi cellulosique et forme des réserves d'amidon. Uni ou pluricellulaires (filament 1m) généralement immobiles mais ils peuvent être mobiles par des flagelles. Et on les classe selon la nature du pigment :
- Les diatomées (ont une coque de silice), algues vert, chrysophytes, cryptophytes, rhodophycées, phaeocystis, dinophlagellés, euglenophytes.

### **2.2.2. Les protozoaires (proto : premier et zoa : animal) (Protistes) :**

Ce sont des microorganismes unicellulaires qui peuvent s'associer en colonies, ils adoptent l'endocytose (la phagocytose) des substances organiques en solution déjà élaborée ou organisée comme les bactéries comme mode de nutrition donc ils participent à l'autoépuration de l'eau. Ils sont considérés comme des algues qui ont perdu leur pouvoir photosynthétique, la plupart des protozoaires mobile et ils vivent exclusivement dans l'eau ou dans la terre humide.

On les classe selon l'appareil locomoteur en : Rhizopodes, flagellés, ciliés, sporozoaires.

2.2.3. Les champignons (moisissure et levure) :

Présents dans l'eau le sol, plantes, et parasitent l'homme et les animaux. Ils sont hétérotrophes (absorbent et décomposent de la matière organique), ce sont donc des « recycleurs » : décomposent les corps morts d'autres organismes et recycle le C et d'autres éléments dans la nature. Généralement aérobies à l'exception des levures de tube digestif des mammifères.

- Organismes unicellulaires ou pluricellulaires.
- Certains sont pathogènes de plantes et des invertébrés
- Ils peuvent être saprophytes mais certaines espèces parasitent les animaux et l'homme et symbiotiques aussi.
- La plupart sont des producteurs d'antibiotiques ou d'acides organiques.
- Ils ont une organisation cénocytique (chitine+cytoplasme+ensemble de noyaux), ils sont formés par un ensemble de cellules associées en filament organisé (mycélium) siphonné ou cloisonné.
- Ils se reproduisent par reproduction asexuée (fragmentation du mycélium) ou reproduction sexuée par formation de spore qui se forme à l'extrémité de l'hyphe et qui se détache ensuite et dissémine par l'eau, vent, insecte, donc selon leur reproduction sexuée on les classe : phycomycète, ascomycète, basidiomycète, deutéromycète selon les spores (Fig.3).

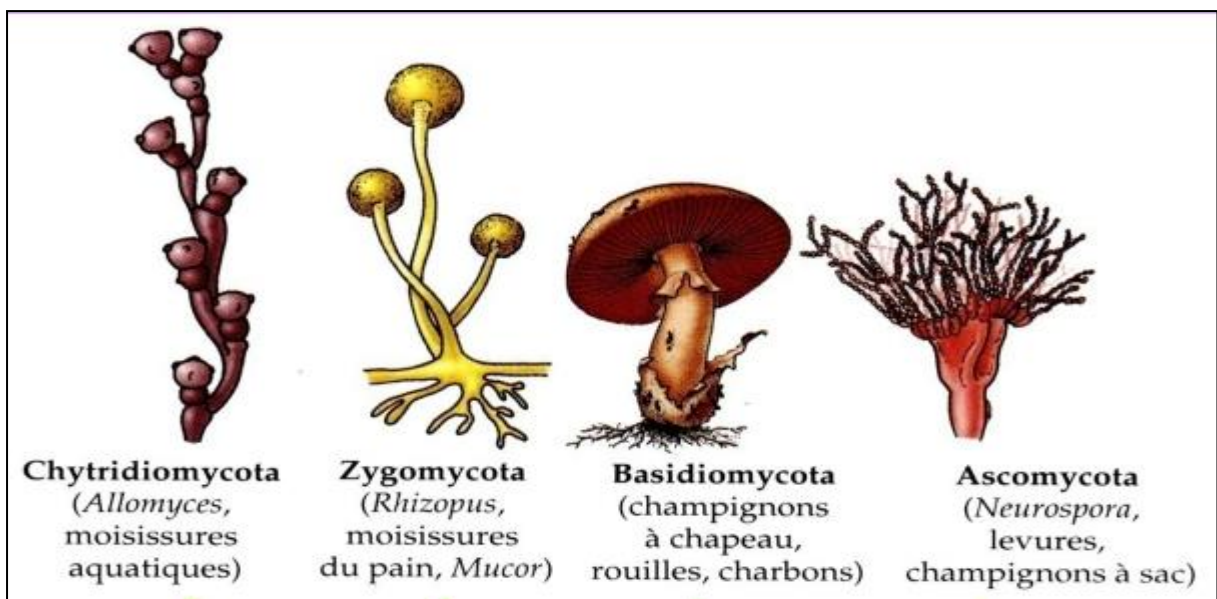


Figure 3. Le règne des champignons.

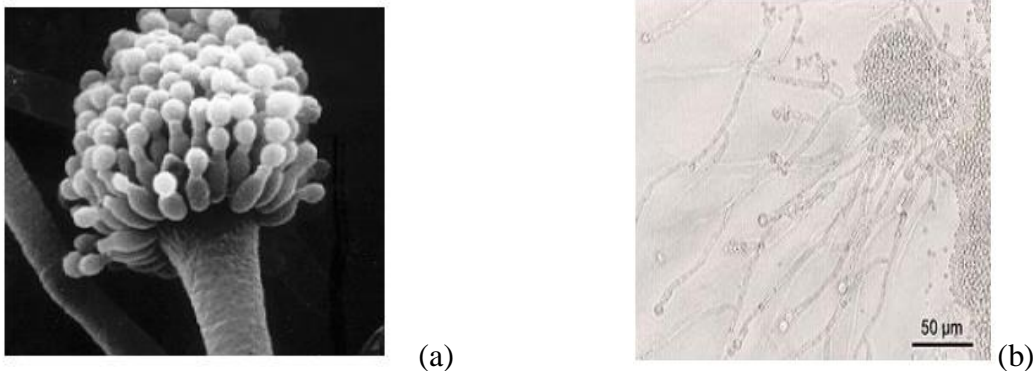
NB : la levure et un champignon qui perdu sa structure cénocytique et devenu unicellulaire de forme sphérique.

### ***2.2.3.1. Les Champignons filamenteux***

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux, de type moisissure qui possèdent un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. Présents dans l'environnement humain, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière, l'air. On trouve de 1 à 20 spores par mètre cube (Fig.4.a).

### ***2.2.3.2. Les champignons levuriformes***

*Candida* est un genre de levures (dont l'espèce la plus importante est *Candida albicans*). Un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale. Il devient pathogène et provoque parfois des mycoses (candidose) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli (Fig.4.b).



**Figure 4. Aspect microscopique des mycètes.**

### ***2.3. Les virus :***

Ce sont des acaryotes ou entités présentant une grande capacité évolutive. Ils sont constitués d'acides nucléiques et d'enveloppe protéique.

Ce sont des parasites endocellulaires obligatoires qui ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur des cellules qu'ils infectent, en détournant à leur profit, grâce à l'information génétique portée par leur génome, les systèmes cellulaires. Généralement spécifique à l'espèce de bactérie, de plante ou d'animal infecté.

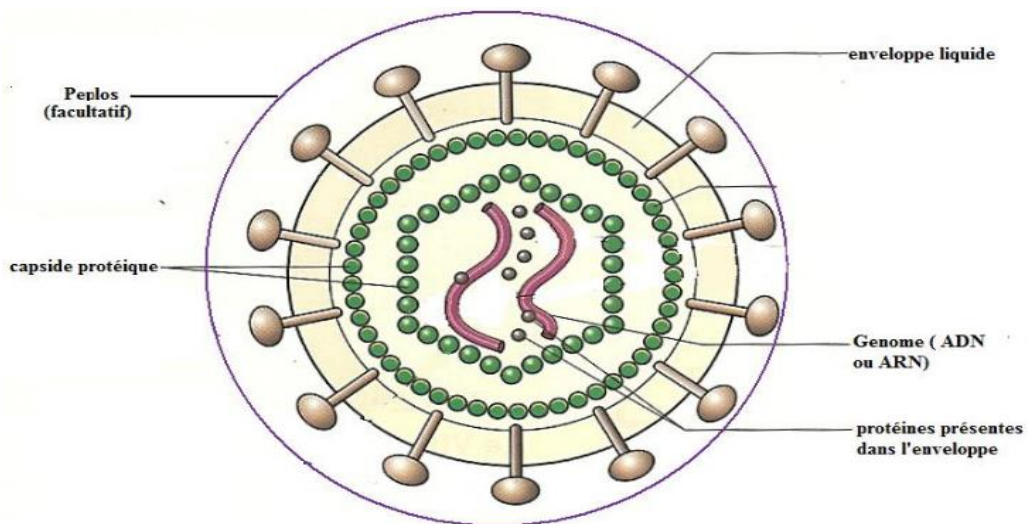
Ils ont été découverts en 1892 par Ivanovski, ils sont de 10 -100 fois plus petits que les bactéries. Abondants dans l'eau l'air et le sol et peuvent être pathogènes ou non.

Ils ne contiennent pas d'eau donc ils ne possèdent aucune activité métabolique, sa particule infectieuse ou virion ou nucléocapside est formée de capsidite et d'acide nucléique.

La classification des virus s'effectue selon (Lwoff 1962):

- La nature de matériel génétique : Un virus ne contient qu'un seul acide nucléique soit de l'ADN soit de l'ARN, mais jamais les deux à la fois.
- Types de symétrie de capsidite : L'acide nucléique est entouré d'une coque protéique: la capsidite et l'ensemble capsidite et nucléoïde constitue la nucléocapsidite
- Présence ou absence d'enveloppe entourant la capsidite : La nucléocapsidite peut constituer à elle seule un virus complet, dans ce cas elle est nue. Si elle est recouverte d'une enveloppe externe, on dit que le virus est enveloppé.
- On peut citer aussi :

Le type de cellule infectée (Animaux, plantes, insectes, champignons, bactéries) et Selon les maladies associées ou leur mode de transmission (virus transmis par les arthropodes (Arbovirus = Arthropod Borne Virus)( Fig.5).



**Figure 5. Structure moléculaire d'un virus.**

**NB :** Ils existent un groupe de bactérie appelé les Actinomycètes qu'on les trouve dans le sol, c'est une forme intermédiaire entre bactérie et fungi et ils sont des producteurs d'antibiotiques.

La croissance microbienne est définie comme une augmentation des constituant cellulaire, et peut se traduire par une augmentation de taille (moisissures) ou du nombre (bactéries) des microorganismes.

En absence de conditions favorable de croissance, certains microorganismes adoptent une forme de résistance (spores) pour continuer à survivre, mais sans se multiplier. Lorsque le milieu devient favorable, les spores se retransforment en forme végétative.

Pour se développer comme tous les êtres vivants, les micro-organismes se nourrissent des substances minérales et organiques se trouvant dans l'environnement. Ces substances sont nécessaires à la synthèse des constituants cellulaires assurant ainsi la croissance et la multiplication. Outre ces nutriments les microorganismes nécessitent des conditions physicochimiques, ces paramètres ont un effet sélectif sur la flore microbienne (ils favorisent ou inhibent le développement des microorganismes).

### ***1. Les conditions physicochimiques de la croissance :***

#### ***1.1. Effet du pH :***

Les microorganismes peuvent se développer sur une large gamme de pH allant de 2 à 11. Cependant la résistance microbienne au pH est très variable, en fonction de leur pH optimum de croissance, on classe les microorganismes en 3 groupes :

Acidophiles : 0 et 5.5

Neutrophiles : 5.5 et 8

Alcalophiles : 8 et 11.5

Les bactéries d'une manière générale se développent mieux sur les milieux dont le pH est proche de la neutralité (6 à 7.5). La diminution du pH affecte la thermorésistance des spores, on considère qu'en dessous de pH 4.5 la thermorésistance des spores est nulle.

Les levures et les moisissures sont généralement acidorésistant, leur pH optimum de croissance se situe entre 4 et 6 avec des valeurs extrêmes de 2 à 9 pour les levures et de 2 à 11 pour les moisissures. Les germes pathogènes ne se développent pas dans les aliments ayant un pH au-dessous de 4.5.

### **1.2. Effet de l'activité de l'eau :**

L'activité de l'eau indique la disponibilité de l'eau dans un milieu pour des réactions chimiques, biochimiques un changement d'état ou un transfert au travers d'une membrane semi perméable. L'activité de l'eau correspond au rapport entre la pression de vapeur saturante du milieu à la pression de vapeur saturante d'eau pure à la même température. Ce rapport est toujours inférieur ou égale à 1.

Les bactéries ne peuvent pas se développer sur les produits alimentaires ayant une  $A_w$  inférieur à 0.90.

L' $A_w$  limite de croissance d'un microorganisme est inférieur à l' $A_w$  limite nécessaire pour la production de sa toxine.

### **1.3. Effet de L'O<sub>2</sub> :**

En fonction de leurs exigences en O<sub>2</sub>, on classe les microorganismes en 4 catégories :

**Les aérobies strictes** : qui se développent qu'on présence de l'O<sub>2</sub> ( *Pseudomonas*, *Bacillus*).

**Les aérobies facultatifs** : qui se développent en présence et en absence d'oxygène (*Staphylococcus*).

**Les anaérobies stricts** : qui ne se développent pas en présence de l'oxygène ( *Clostridium*).

**Les microaérophiles** : qui se développent qu'en présence de quantité faible d'O<sub>2</sub>. (*Streptococcus*).

### **1.4. Effet de la température :**

Selon la température optimale les microorganismes sont classés comme suit :

**Les psychrophiles et psychrotrophes :**

**Les psychrophiles** sont des microorganismes qui se développent dans des températures allant de 0 à 20°C avec un optimum à 15°C. exp les *Bacillus psychrophilus*.

**Les psychrotrophes** se développent dans la plage allant de 0 à 35°C avec un optimum de 20 à 35°C. exp : *Pseudomonas*.

**Les mésophiles :**

Ce sont des microorganismes qui se multiplient à des températures allant de 20 à 40°C avec un optimum de 37°C. exp : *E coli, salmonelles*.

**Les thermophiles :**

Ce sont des microorganismes qui se développent à des températures allant de 40 à 65°C avec un optimum de 55°C. exp : *Clostridium, Bacillus*. Les thermophiles sont souvent sporulantes et se répartissent en 2 groupes selon la température de germination des spores :

Les thermophiles obligatoires : leurs spores ne peuvent germer et se développer en dessous de 50°C.

Les thermophiles facultatifs : leurs spores peuvent germer et se développer en dessus et en dessous de 50°C.

**2. La Nutrition et les besoins élémentaires :**

Toutes les bactéries ont besoin d'eau de sources d'énergie, d'une source de Carbone, d'une source d'azote et d'élément minéraux. Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de prototrophe.

**2.1. L'eau :**

L'eau représente 80 à 90% du poids cellulaire. Elle joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse.

La disponibilité de l'eau est quantifiée par  $L'Aw$

**2.2. Source d'énergie :**

Selon la source d'énergie les bactéries se divisent en phototrophes et chimiotrophes.

La source d'énergie des bactéries phototrophes est la lumière, ensuite si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont qualifiées de photolithotrophe et si la source d'électrons est organique, les bactéries sont photoorganotrophes.

La source d'énergies des bactéries chimiotrophes est les composés organiques ou minéraux, puis si la source d'électrons est minérale, les bactéries sont qualifiées de chimiolithotrophe et si le donneur d'électrons est organique, les bactéries sont chimioorganotrophes.

### **2.3. Source de carbone :**

Le carbone est l'élément constitutif le plus abondant chez les bactéries. Les bactéries phototrophes et la plupart des bactéries chimiolithotrophes peuvent utiliser le  $CO_2$  comme seule source de carbone et elles sont dites autotrophes. Pour les autres bactéries la source de carbone assimilable doit être un substrat organique et ces bactéries sont qualifiées de hétérotrophes.

### **2.4. La source d'azote :**

La synthèse des protéines nécessite des substances azotées.

Pour la plupart des bactéries la source d'azote est constituée par des composés inorganiques (ammoniac, nitrites) ou par des sources organiques (groupements amines), aussi l'azote moléculaire est fixé par quelques bactéries vivant en symbiose avec les légumineuses.

### **2.5. Les éléments minéraux :**

Le soufre et le phosphore sont particulièrement importants. Le soufre est présent dans certains acides aminés (groupement thiol) et il est souvent incorporer sous forme de composés soufrés organique. Le phosphore fait parties des acides nucléiques, des coenzymes, il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

Le Na, le K, et le chlore jouent un rôle dans l'équilibre physicochimique de la cellule. D'autres éléments comme le fer, le manganèse, le calcium, le cobalt son **des oligoéléments** nécessaires a des concentrations très faibles.

## **3. Les besoins spécifiques :**

### **3.1. Les facteurs de croissances :**

Les bactéries auxotrophes nécessitent, en plus, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser. Exp : *proteus vulgaris* nécessite l'adjonction supplémentaire de nicotinamide.

Un facteur de croissance ne doit pas être confondu avec un métabolite essentiel, les deux sont des composés organiques strictement nécessaires à la nutrition, toutefois **un métabolite essentiel** peut être synthétisé par la bactérie alors qu'un facteur de croissance doit être présent dans l'environnement car la bactérie est incapable de le synthétiser.

Les besoins en facteur de croissance d'une bactérie peuvent parfois être satisfaits par la présence d'une autre bactérie c'est la **syntrophie**.

**Un anti métabolite** est de structure analogue à un facteur de croissance, capable d'entrer en compétition avec ce dernier et d'inhiber la croissance d'une souche **auxotrophe**.

#### **4. Croissance bactérienne**

La croissance bactérienne se traduit par un accroissement ordonné de tous les composants de la cellule qui aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. On observe également un allongement de la taille et une augmentation du volume, plus visibles chez les formes en bâtonnets. Ces dimensions, lorsqu'elles sont atteintes, déclenchent la division cellulaire par scissiparité. Une bactérie donne deux cellules filles (Fig.6).

La croissance et le métabolisme des bactéries sont propres à chaque genre bactérien, permettant ainsi de les différencier

Au cours de la croissance qui peut être étudiée en milieu liquide ou solide, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et d'autre part, un enrichissement en sous- produits du métabolisme, éventuellement toxiques.

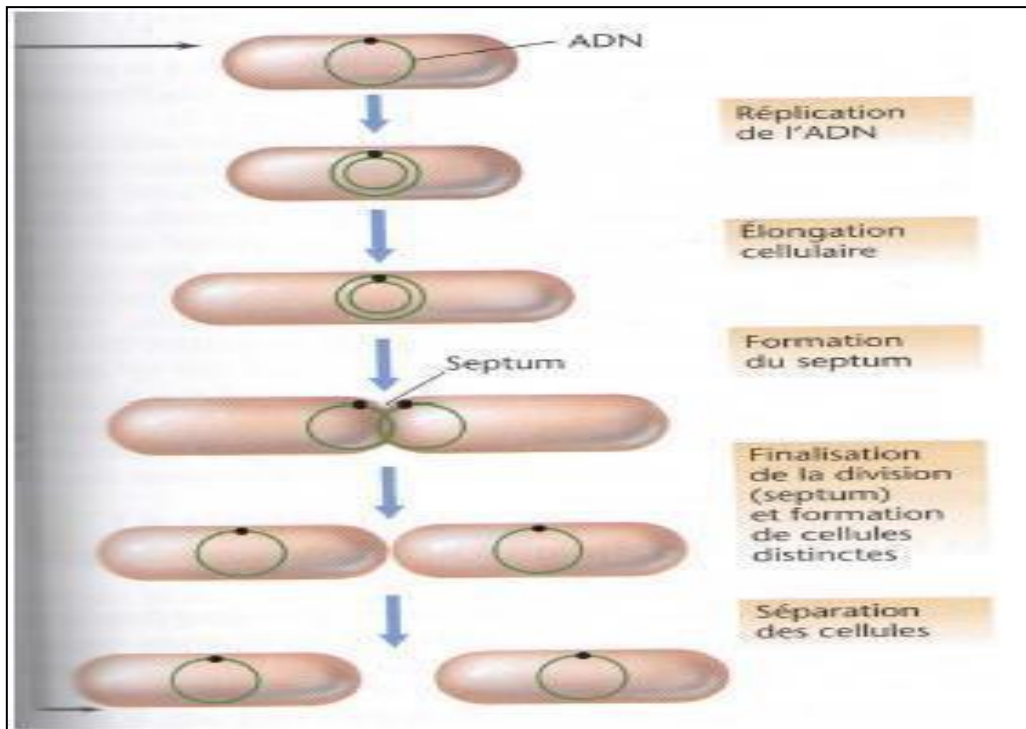


Figure 6. La division par scissiparité.

#### 4.1. Courbe de croissance :

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide en 5 phases qui dont l'ensemble constitue la courbe de croissance, comme le montre la figure 7.

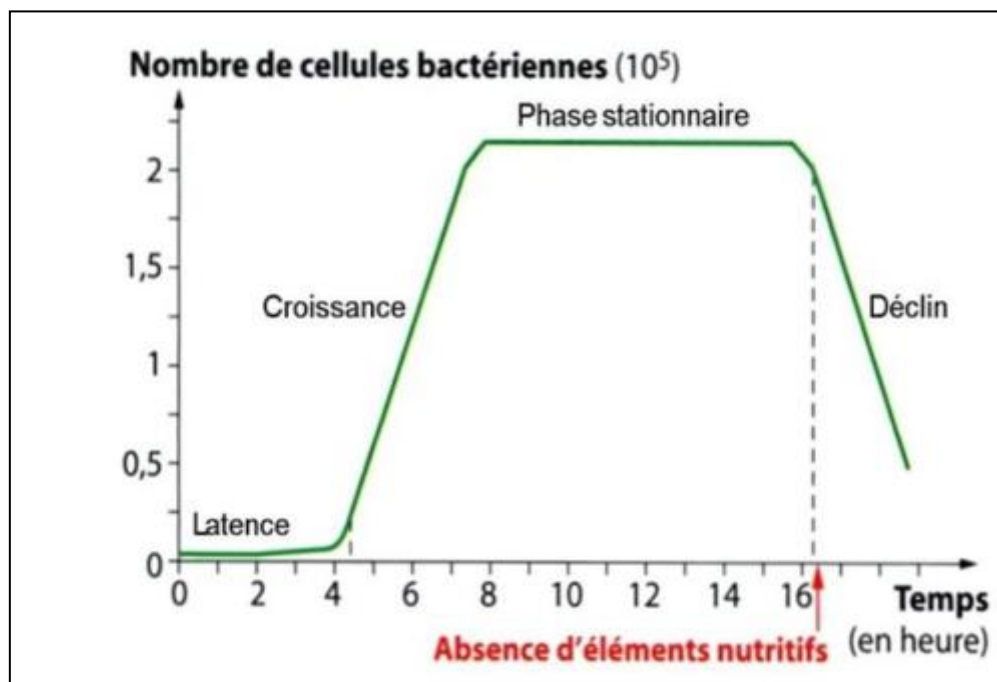


Figure 7. Courbe de croissance bactérienne.

**1-phase de latence** : C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat ou le taux de croissance nul ( $u = 0$ ) et la durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

**2-Phase de Croissance exponentielle** : C'est Le temps de doublement des bactéries est le plus court la masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle) et le taux de croissance atteint un maximum ( $u = \max$ ), cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante.

**3-Phase de ralentissement** : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

**4-Phase stationnaire** : le taux de croissance devient nul ( $u = 0$ ). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

**5-Phase de déclin** : le taux de croissance est négatif ( $u < 0$ ). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances libérées lors de la lyse (croissance cryptique).

les micro-organismes sont présents dans tous les types d'environnement présents dans la nature : ils colonisent tous les écosystèmes, comme les sols, les eaux douces et les eaux marines, l'air, mais aussi des environnements plus hostiles tels que les pôles, les déserts, les geysers, le fond des océans, etc. De nombreux micro-organismes sont associés aux plantes ou aux animaux, les muqueuse les tubes digestifs et la peau et c'est grâce a leurs propriétés physicochimiques et métaboliques.

### ***1. Les Bactéries en milieux aquatiques :***

L'état de la cellule bactérienne est un état dynamique qui lui permet de s'adapter aux modifications des facteurs de l'environnement. Dans les milieux aquatiques (eaux souterraines, eaux de surface) les eaux potables distribuées avec ou sans traitement contiennent une variété infinie de bactéries.

Les principaux groupes de bactéries rencontrées dans l'eau peuvent avoir trois origines différentes :

- Origine purement aquatique : germes aquicoles, dont le métabolisme est parfaitement adapté aux conditions de température et aux concentrations en différents nutriments minéraux ou organiques ;
- Origine terrestre, avec des propriétés d'adaptation ou de résistance, qui leur permettent de survivre, et même de se développer dans le milieu aquatique ;
- Origine animal ou humaine : ce sont des germes de contamination, le plus souvent fécale, parfois rhino-pharyngée (baignades et piscines), dont la température normale de développement est aux alentours de 37°C, et qui sont accoutumés à un milieu nutritif (matières fécales, ou mucus des voies respiratoire), riche en matières organique.

En milieu aquatique certaines bactéries pathogènes comme salmonella typhi, les shigella, parasites de l'homme, pourront survivre plus ou moins longtemps, mais en aucun cas se multiplier. D'autres, au contraire, comme les legionella, sont des espèces aquaphiles ; elles se multiplient abondamment dans l'eau du robinet stérilisée et, à partir des cultures ainsi obtenues en fin de croissance exponentielle, de très nombreux transferts successifs peuvent être opérés. Parmi les indicateurs de contamination fécale, certains comme l'E.coli, particulièrement adaptés au tube digestif de l'homme ou des animaux à sang chaud, survivront plus ou moins durablement.

D'autre, comme les *Klebsilla pneumoniae*, sont connus pour se multiplier abondamment dans les eaux riches en matière organique.

## **2. Les interrelations et intra-relations des microorganismes**

### **2.1. Saprophytisme :**

« Qui vit sur la matière en décomposition », microorganismes menant une vie indépendante d'un autre organisme vivant. Ils vivent dans la nature, soit en consommant des matières minérales (autotrophe) soit sur les déchets organiques dont ils assurent la destruction (hétérotrophes).

### **2.2. Commensalisme :**

Permet à un partenaire de tirer profit sans dommage ni bénéfice pour l'autre partenaire. « Qui mangent à la même table », les microorganismes ne peuvent vivre qu'au contact ou dans un autre être vivant, appelé hôte. Exp : la flore commensale de l'intestin, flore cutanée.

### **2.3. Symbiose ou mutualisme :**

Union bénéfique mutuel important. exp : les microorganismes du rumen, les rhizobium

### **2.4. Parasitisme :**

L'union est bénéfique à sens unique, celui du microorganisme, et entraînant des dégâts chez l'hôte, voire sa mort.

### **2.5. Prédation :**

Mode de nutrition très répandu dans le règne animal, et qui consiste à s'emparer d'une proie (animale ou végétale) pour la dévorer (tuer) et se nourrir de sa substance. Il existe aussi chez les bactéries, exp : *Bdellovibrio bacteriovorus*.

### **2.6. Compétition :**

Interaction entre les populations d'espèces existe lorsque :

- des individus de la même espèce ou d'espèces différentes, recherchent et exploitent la même ressource présente en quantité limitée

- les ressources ne sont pas limitées mais que les organismes en concurrence se nuisent (un abri).

### **2.7. Pathogénicité**

Pouvoir d'un organisme (virus, bactéries...), d'une substance à causer une maladie.

### **2.8. Le pouvoir pathogène des bactéries :**

C'est la capacité d'un microorganisme à provoquer une maladie chez l'hôte.

**La virulence :** est la quantification du pouvoir pathogène et elle dépend de trois paramètres :

- \*le nombre de microorganismes pathogènes
- \*la production de facteurs pathogènes par le microorganisme
- \*la résistance de l'hôte a ces facteurs

#### **2.8.1. Les facteurs du pouvoir pathogène :**

**Facteurs liés au microorganisme :**

- **Fixation / adhésion :**

Les pili : protéine agglutinant avec une variété d'hématie

Les adhésines : protéineantigéniques qui adhèrentaux cellules intestinales et aux hématies

Le glycocalix : fibres polysaccharidiques qui adhèrent aux surfaces des cellules humaines

- **Résistance a la phagocytose : rôle de la capsule**
- **Toxinogénèse**
- **Les exotoxines :**

Toxines vraies : exp : toxine tétanique

Enzymes : fibrinolysine.

**2.8.2. Facteurs liés à l'hôte :**

Pour un microorganisme pathogène, il existe des espèces animales sensibles et d'autres réfractaires. A l'intérieur d'une espèce animale, tous les individus n'ont pas la même réceptivité, d'où la notion de « terrain ». Par ailleurs, les traumatismes créent des portes d'entrée pour les microorganismes.

**Pathogènes spécifiques :**

Désignent des germes qui déclenchent une primo-infection caractéristique chez un sujet sain. Dans ce cas :

- Infection due à la multiplication des bactéries
- Infection due à la libération de toxines
- Infections due à la fois a un pouvoir invasif et a un pouvoir toxique

**Pathogènes opportunistes :**

Ce sont des bactéries peu toxiques et peu invasives qui engendrent des infections qu'à l'occasion d'un affaiblissement des résistances de l'organisme

**2.9. Notions :**

**Ecologie :** Etude de l'interaction des organismes avec leurs milieux.

**Ecosystème :** est l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants(ou biocénose) et son environnement biologique, géologique, édaphique, hydrologique, climatique, etc. (le biotope).

**Environnement :** est défini comme « l'ensemble des conditions naturelles (physiques, chimiques, biologiques) et culturelles (sociologiques) susceptibles d'agir sur les organismes vivants et les activités humaines »

**Microbiote** (microflore) : est l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique (appelé microbiome). Par exemple, le microbiote intestinal.

**Biofilm :** est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe, souvent symbiotique, de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à

une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. Il se forme généralement dans l'eau ou en milieu aqueux.

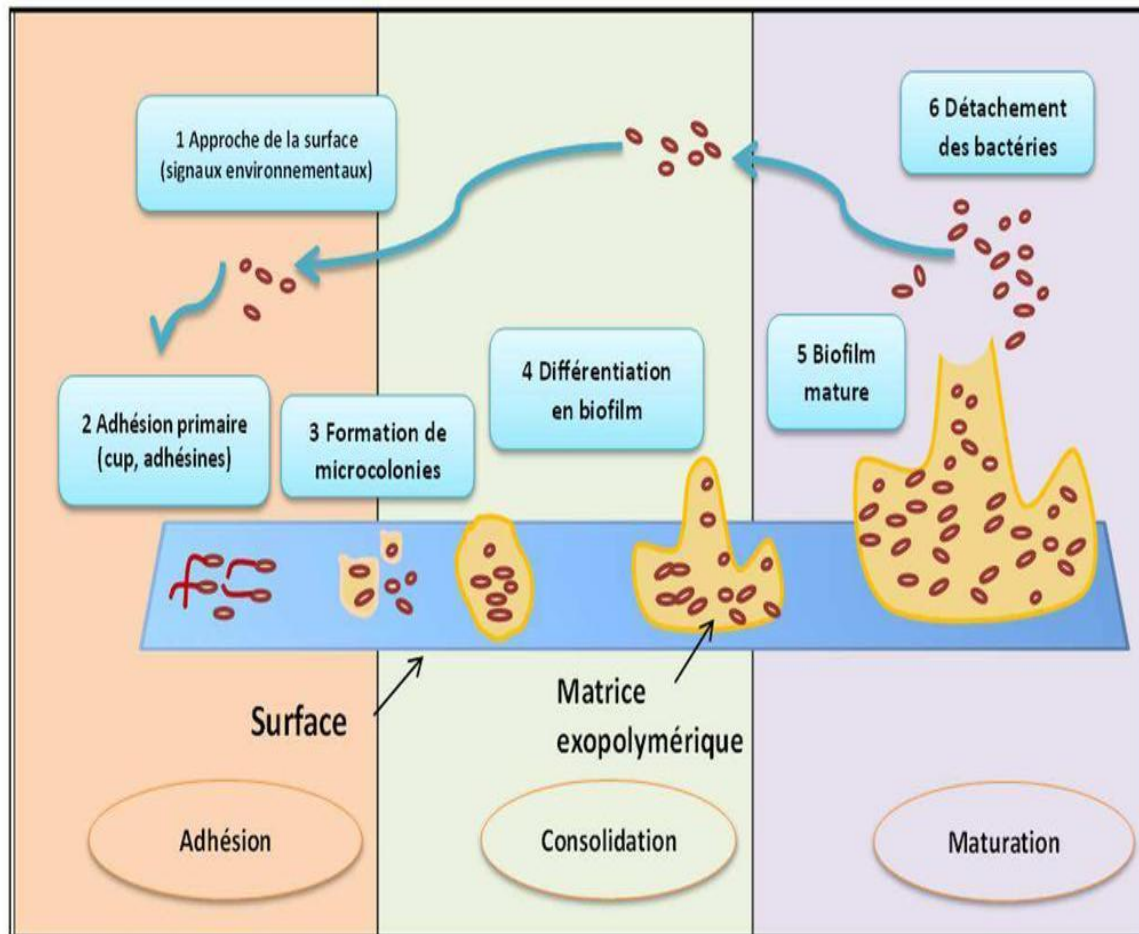


Figure 8. La formation de biofilm.

**Espèce allochtone (zymogène)** : espèces d'origine étrangère au biome local. Il s'agit le plus souvent d'organismes introduits.

**Espèce autochtone (indigènes)** : espèce que l'on trouve naturellement dans un endroit géographique donné.

Les micro-organismes comprennent non seulement des bactéries mais également des champignons (levures, moisissures) et des protozoaires. En fait tout organisme dont la taille est inférieure à environ 20  $\mu\text{m}$ . L'identification précise de micro-organismes, qu'il s'agisse de bactéries, de levures ou de moisissures est un préalable indispensable à de nombreuses analyses.

### ***1. Mesure de la croissance :***

Plusieurs techniques sont utilisées pour analyser, suivre et mesurer la croissance. Chacune a des avantages et des inconvénients. On distingue les Techniques classiques de numérations (méthodes directes) et les méthodes indirectes. Certaines distinguent les cellules vivantes des cellules mortes et d'autres, en sont incapables, d'autres s'avèrent incapables de compter individuellement les cellules microbiennes lorsque celles-ci sont associées (Staphylococcus, Streptococcus, mycélium, etc) et permettent d'évaluer des unités formant colonies (UFC) ou des unités formant trouble (UFT).

#### ***1.1. Mesures directes :***

Le terme « dénombrement d'une flore » signifie que l'analyse microbiologique doit permettre de quantifier dans l'échantillon une flore particulière. Le résultat d'une telle analyse quantitative est rendu sous forme d'une concentration en micro-organismes (appartenant à une flore particulière) par unité de masse ou de volume d'échantillon.

##### ***1.1.1. Dénombrement des bactéries après culture (méthodes de dilutions) :***

###### ***1.1.1.1. Numération en milieu solide***

Le résultat est exprimé en nombre de bactéries par ml. On peut partir de 1 ml de l'échantillon à analyser, dans 9 ml d'eau stérile (première dilution 1/10). On procède ensuite à une dilution en série de 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000. Sur chaque boîte l'origine de l'analyse, le milieu utilisé et la dilution correspondante sont enregistrés (sur le côté de façon à ne pas être gêné par la suite pour le comptage).

En utilisant des milieux solides sur boîte de Pétri. Ensuite, 1 ml de chaque dilution est étalé soit en surface soit en profondeur (L'inoculum peut être réparti en gouttes sur le fond de la boîte. Afin de n'utiliser qu'une seule pipette stérile pour toutes ces opérations il est recommandé de commencer l'ensemencement par la dilution la plus grande pour

terminer avec le liquide non dilué. Les essais sont pratiqués en duplicata (ou triplicata si possible) pour chaque dilution).

On prend en considération les boites de 30 à 300 colonies. Ce nombre est obtenu en multipliant le nombre de bactéries par son facteur de dilution, puis à le diviser par le volume de l'inoculum ( $UFC=N/(V \cdot F)$ ). Le calcul se fait comme suit : (dilution  $1/10000$ , 125 colonies obtenues) :  $125 \times 10000 = 1,25$  million bactérie par ml. On suppose dans ce cas que chaque colonie est issue d'une bactérie, mais en réalité c'est faux. On parle d'unités formant colonies (UFC). Chaque colonie provient de plusieurs bactéries en chainettes ou en amas. L'ensemencement par étalement présente l'inconvénient que l'échantillon peut ne pas être absorbé dans sa totalité. L'ensemencement en profondeur ou en masse exige que les bactéries puissent supporter la température de la gélose liquide en surfusion ( $50^{\circ}C$ ). L'échantillon est mélangé avec la gélose et les colonies vont pousser en profondeur et en surface.

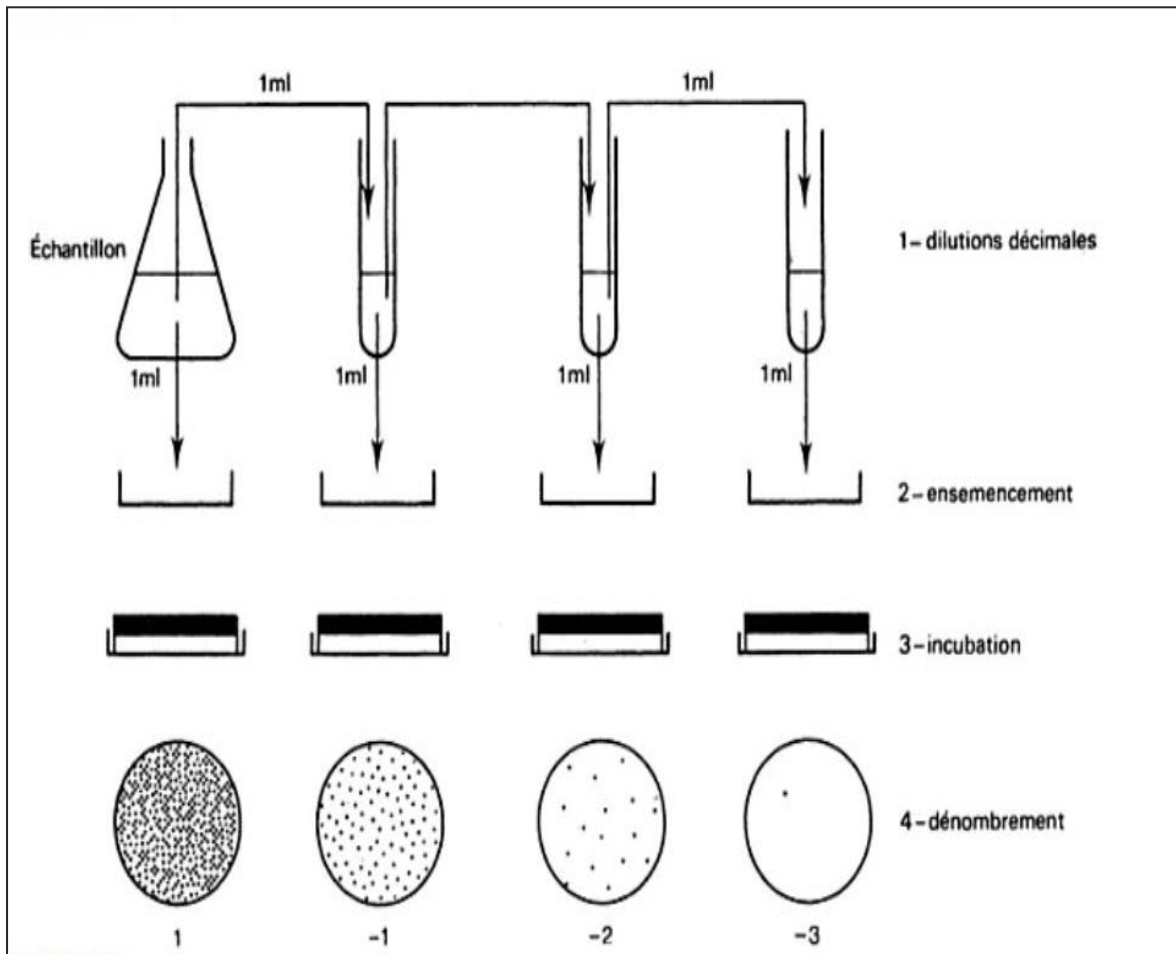


Figure 9. Dénombrement sur milieu solide.

***1.1.1.2. Numération en milieu liquide***

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification. Si les conditions optimales de croissance sont réunies, un seul micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans un milieu liquide se développe en y créant un trouble. Le volume de l'inoculum : le plus souvent = 1 ml (parfois 10 ml)

Le choix des dilutions à tester : dépend de la population estimée, le but étant d'obtenir, pour une analyse statistique optimale des résultats.

Le choix du nombre d'essais par dilution dépend de la précision souhaitée pour les résultats en fonction de leur analyse statistique. En général trois tubes sontensemencés par dilution, un ou deux tubes sontensemencés si une précision moins importante est suffisante, cinq tubes ou même plus sontensemencés si une précision plus importante est demandée. D'où on a la méthode dénombrement à un seul essai ou le dénombrement à essais multiples «technique du nombre le plus probable NPP».

***1.1.2. Mesure directe du nombre de cellules sous microscope :***

Il s'agit d'un dénombrement par observation directe. A partir d'un volume connu d'une suspension bactérienne on peut faire une numération ou bien un comptage total des cellules sous microscope. On utilise une lame spéciale appelée chambre de comptage ou Cellule de numération hématimétrie (Cellule de Thoma, Cellule de Malassez Cellule de Pétroff- Hauser).

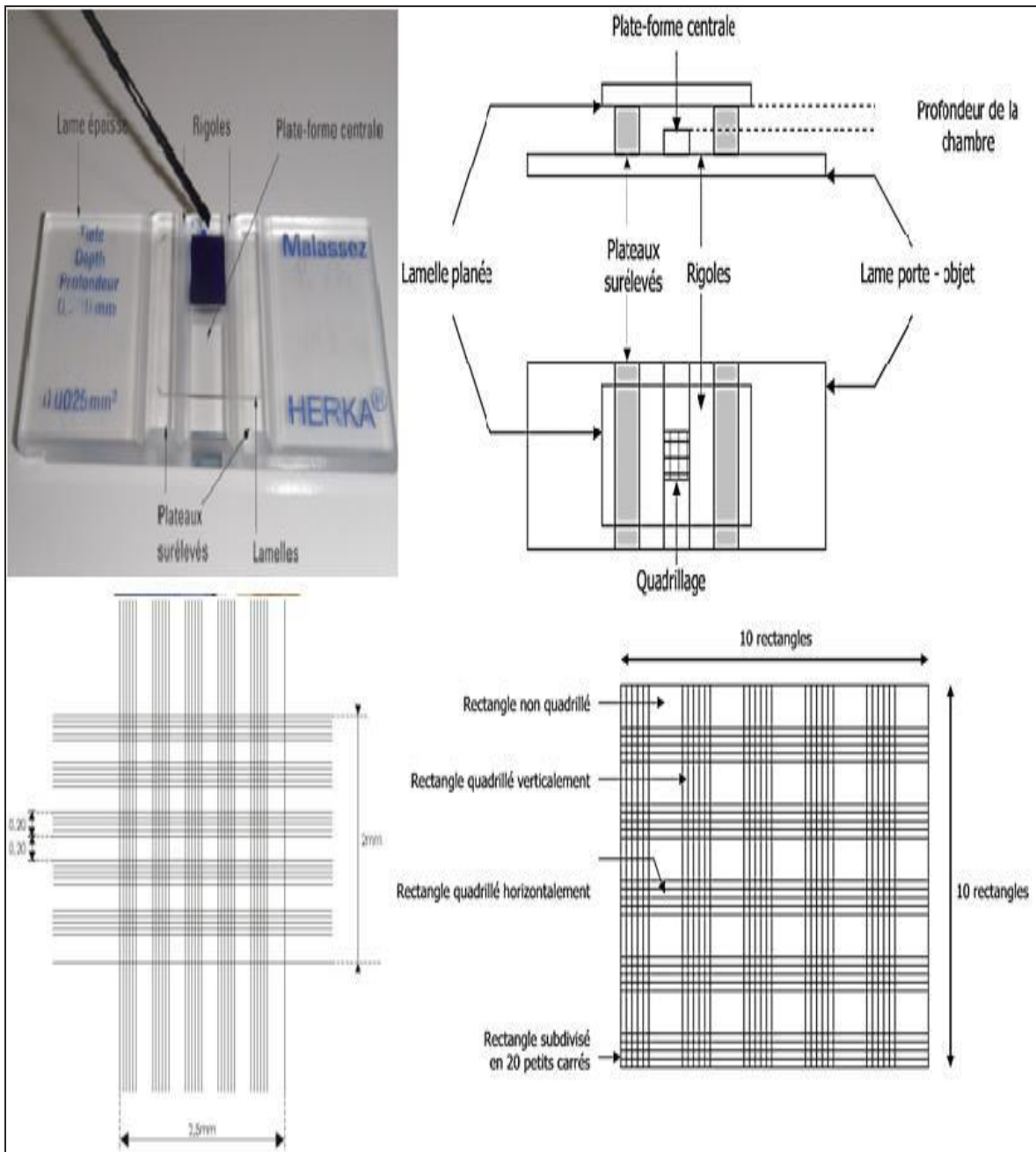
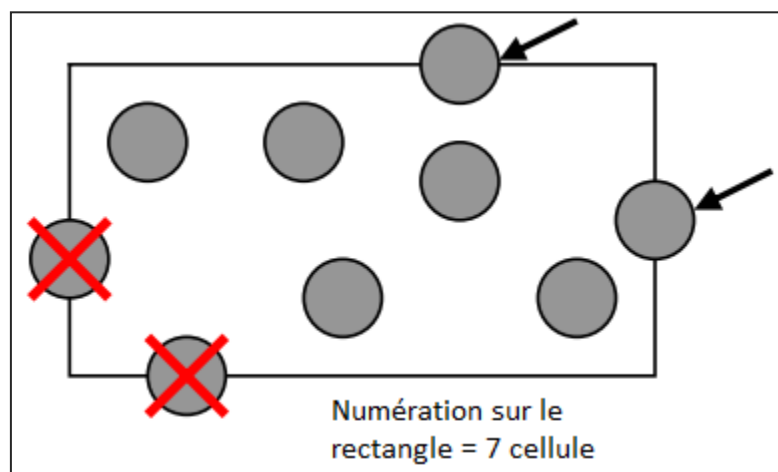


Figure 10. Cellule de Malassez.

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable de façon à permettre le comptage des cellules au microscope. Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

- Imbiber les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.
- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Figure 11. Lecture de la cellule de Malassez.**

• Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.  $N = (n / V) \times f$

-**n** : nombre de cellules comptées

-**V** : volume de comptage

-**f** : facteur de dilution

-**N** : nombre de cellules par litre

### *1.1.3. Compteur électrique (Compteur de particules) :*

Cet appareil réalise automatiquement le dénombrement des particules ou cellules en suspension dans une solution. Cette suspension microbienne doit passer au travers d'un orifice, où un courant électrique est appliqué. Le mouvement de cellules au travers de l'orifice modifie  $\lambda$  (augmente) la résistance électrique mais elle est utile pour des micro-organismes de grande taille ou des cellules sanguines, mais pas pour des procaryotes.



**Figure 12. Automate ou coulter.**

1.1.4. Mesure par filtration sur membrane :

Dans certains produits liquides (eau, solutés pharmaceutiques buvables ou injectables...), les microorganismes sont à une concentration très faible (voire nulle si le produit est stérile). Leur dénombrement (en UFC par unité de volume) impose donc de «concentrer les microorganismes» pour pouvoir compter des colonies. Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon (ou de ses dilutions) au travers d'une membrane filtrante dont la porosité moyenne de 0,45  $\mu\text{m}$  ou 0,22  $\mu\text{m}$  sur laquelle sont retenus les microorganismes recherchés.

Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu gélosé, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation, les colonies formées à la surface du filtre sont comptées. Très utiles lorsque le nombre des bactéries est très bas. Utilisée pour la recherche des coliformes dans l'eau, comme preuve de contamination fécale. On procède par filtration sur membrane de 100 ml d'eau puis la membrane est mise en culture sur boîte de Petri (Gélose).

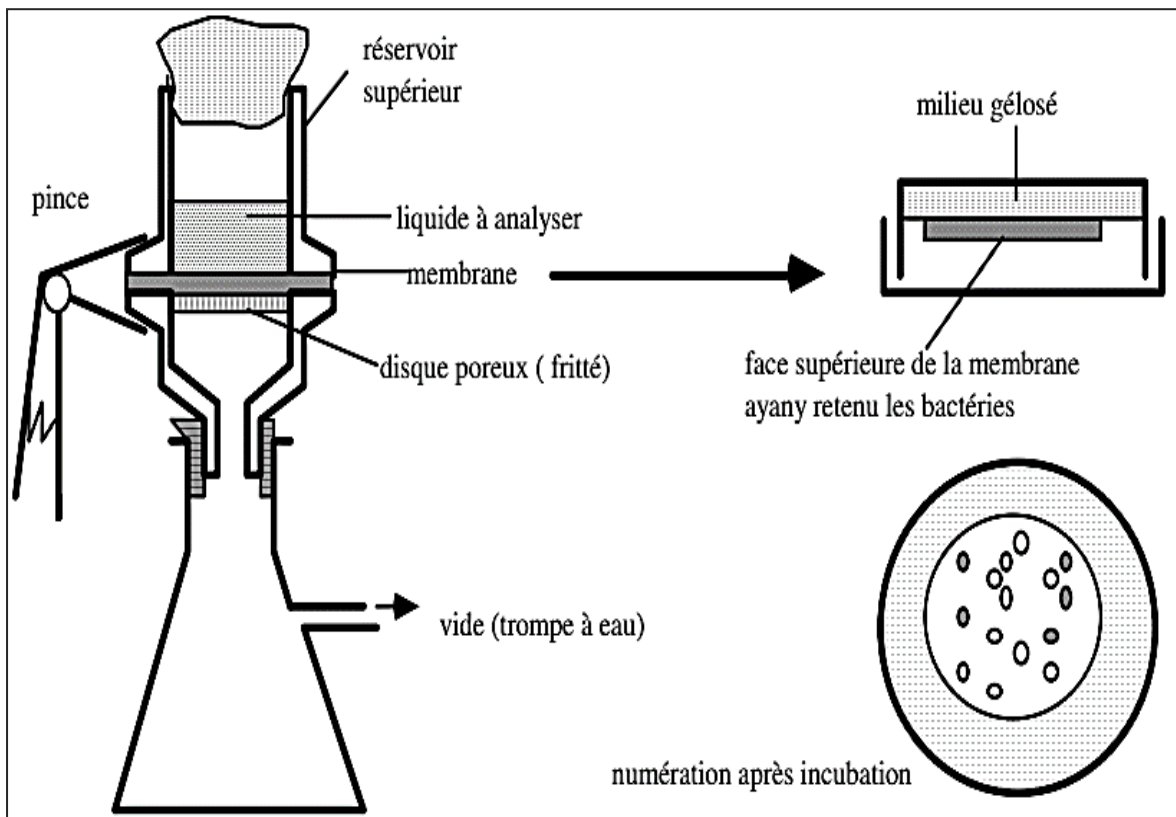


Figure 13. Filtration sur membrane.

Le nombre de colonies présentes sur la membrane permet de calculer la concentration bactérienne N en nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) par ml selon la formule suivante :

$$N_{\text{UFC/mL}} = \frac{n}{V}$$

Où **n** : nombre d'UFC sur la membrane, **V** : volume de produit filtré en ml.

#### ***1.1.5. La technique d'épifluorescence :***

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome (Orange d'acridine ou Erythrosine), des colorants qui se fixe sur l'ADN, puis observées au microscope en lumière UV. Cette méthode permet de compter sélectivement les bactéries vivantes fluorescentes à une couleur différente des cellules mortes. Les bactéries vivantes apparaissent vertes (ADN double brin) alors que les bactéries mortes apparaissent rouges (ADN dénaturé). Cette technique a des inconvénients du fait que la couleur des cellules peut changer avec le pH du milieu par exemple.

### ***1.2. Mesures indirectes***

#### ***1.2.1. La mesure de la turbidimétrie :***

Plus un microorganisme (bactéries, levures) pousse dans un liquide plus ce dernier devient trouble. Il y a formation d'un voile. On utilise un spectrophotomètre (La mesure de la densité optique) pour mesurer cette turbidimétrie.

##### ***1.2.1.1. Spectrophotométrie***

Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. De même le trouble d'une suspension microbienne est proportionnel à la biomasse présente dans la suspension. Cette technique ne distingue pas la biomasse morte de la vivante, mais son intérêt principal est sa rapidité et sa facilité d'application.

Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600-650 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible). Ce principe est également celui de la méthode des étalons de Mac Farland (solutions troubles obtenues traditionnellement par précipitation de sulfate de baryum). On peut comparer visuellement le trouble d'une suspension microbienne à celui d'un étalon artificiel pour en

estimer sa concentration. En effet, le trouble développé par chaque étalon est assimilable à une concentration bactérienne selon le tableau de correspondance suivant :

**Tableau 02 : Concentration cellulaire approximative par spectroscopie**

<b>Etalon Mac Farland numéro</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Chlorure de Baryum à 1% (ml)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
<b>Acide sulfurique à 1% (ml)</b>	<b>9,95</b>	<b>9,9</b>	<b>9,8</b>	<b>9,7</b>	<b>9,6</b>
<b>Concentration cellulaire approximative (x10<sup>8</sup> UFC/ml)</b>	<b>1,5</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>9,0</b>	<b>12,0</b>
<b>Absorbance à 600nm</b>	<b>0,132</b>	<b>0,257</b>	<b>0,451</b>	<b>0,582</b>	<b>0,669</b>

(Haichour, 2019)

### *1.2.2. Mesure de la biomasse :*

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse : détermination du poids sec, mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits d'excrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc.

#### *1.2.2.1. Impédancemétrie*

L'impédance est une technique indirecte d'estimation d'une flore microbienne. Elle utilise les modifications de conductance d'un milieu de culture, en raison de la croissance et du métabolisme de la flore microbienne de l'échantillon. Ces modifications sont liées à la dégradation des substrats du milieu en molécules plus petites, plus mobiles et d'une charge électrique plus élevée comme celle des protéines en acides aminés ou des hydrates de carbone en lactate.

Généralement, cette production d'ions devient suffisante pour entraîner une modification significative de la conductance du milieu (seuil de détection) lorsque le niveau de la population microbienne atteint 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> micro-organismes/ml. Le temps (ou nombre de doublements de la population) nécessaire pour atteindre le seuil de détection sera d'autant

plus grand que le niveau de germes initial sera faible. Il existe une relation linéaire décroissante entre le temps de détection du changement de conductance et le nombre initial de micro-organismes.

#### *1.2.2.2. Spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse peut être utilisée dans les laboratoires de microbiologie comme une alternative ou un complément aux techniques d'identification de bactéries. L'analyse nécessite une colonie isolée, à partir de laquelle le spectre de masse obtenu est comparé avec la bibliothèque de spectres de l'appareil. Une identification est alors proposée avec une indication du niveau de confiance allant de 0 à 3. L'identification est correcte pour plus de 80% des isolats voire davantage. La lyse incomplète des bactéries peut-être l'une des causes d'une non-identification. L'enrichissement progressif de la bibliothèque de spectres contribue à réduire les erreurs d'identification de microorganismes rares.

#### *1.2.2.3. Cytométrie de flux*

Il s'agit d'une alternative rapide (24 h) pour réduire le temps de stockage en industrie agroalimentaire pour remplacer la méthode traditionnelle lente. La technique est basée sur le marquage fluorescent des organismes viables présents dans le produit. L'échantillon à analyser est envoyé dans une veine liquide. Un rayon laser permet d'activer la fluorescence des bactéries vivantes. Un système optique permet de détecter et de mesurer l'émission de fluorescence. La comptabilisation des signaux détectés pour un volume d'échantillon donné permet de connaître le nombre de bactéries vivantes par unité de masse ou de volume de l'échantillon à analyser.

**1. Les milieux de culture :**

Un milieu de culture est une préparation au sein duquel, les micro-organismes peuvent se multiplier. Il est nécessaire de savoir choisir le milieu de culture adapté à la bactérie étudiée ou à la recherche envisagée. Les milieux de culture sont utilisés pour l'isolement, le dénombrement et l'identification bactérienne.

**1.1. Les caractéristiques des milieux de culture :**

Les milieux de culture doivent contenir quantitativement et qualitativement, les éléments nécessaires à la croissance de la bactérie :

- Des nutriments organiques et minéraux.
- De l'eau.
- Des facteurs de croissances.

Il faut aussi choisir des paramètres physico-chimiques adéquats à la culture. Si on veut un milieu solide, liquide ou semi-solide, il faut ajouter, si nécessaire, des agents de solidifications.

**1.2. Les constituants fondamentaux :**

**A. L'extrait de viande :**

- **La préparation :** Faire macérer ou infuser des tissus animaux. Filtrer le liquide ainsi obtenu. Concentrer.
- **Apport nutritifs :** Il apporte des sels minéraux, des facteurs de croissances et des protéines.

**B. L'extrait de levure :**

- **La préparation :** C'est une hydrolyse acide de levure de boulanger ou de levure de brasserie.
- **Apports nutritifs :** des acides aminés, des vitamines et des bases azotées hydrosolubles.

**C. Les peptones :** Ils apportent des acides aminés.

Ils sont ajoutés dans les milieux de cultures empiriques et semi-synthétiques.

***D. Les substrats dont on veut voir l'utilisation :***

Ils sont ajoutés dans des milieux d'orientation et d'identification.

- **Les produits biologiques :** Ils sont ajoutés le plus souvent dans des milieux enrichis.
- **Les indicateurs de pH :** C'est un couple acide/base e nature organique, faible dont les deux formes acide et base ont des couleurs différentes. Ils sont ajoutés dans les milieux d'isolement et d'identification.
- **Les inhibiteurs :** Ils sont ajoutés dans les milieux sélectifs.

***1.3. Classification des milieux de culture :***

***1.3.1. Selon leur composition :***

- ***Les milieux naturels ou empiriques :***

Ils contiennent des substances d'origine naturelles, animales ou végétales. Leur composition n'est pas exactement connue. Les milieux empiriques sont assez simples à réaliser et peu onéreux. Ce sont les milieux les plus couramment utilisés.

- **Les milieux synthétiques :**

Ces milieux sont composés de substances purifiées présentes en quantité bien précises. Leur composition est donc connue de façon précise à la fois qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont utilisés dans :

- L'étude de la nutrition et des besoins en facteur de croissance des bactéries.
- La recherche de caractères biochimiques particuliers.
- La réalisation des dosages microbiologiques de facteurs de croissance.

- **Les milieux semi-synthétiques :**

Ces milieux sont obtenus en ajoutant une substance naturelle à un milieu synthétique. Leur composition est donc parfaitement connue que pour certains composés chimiques.

Ils sont très nombreux et très utilisés actuellement.

**1.3.2. Selon leur utilisation :**

- **Les milieux minimums :**

Milieu ne contenant que des éléments minéraux. Il s'agit d'un milieu d'étude apportant les nutriments de bases correspondants aux besoins élémentaires d'un micro-organisme.

- **Les milieux usuels dits de base :**

On regroupe sous ce terme les milieux de composition et de préparation assez simple, en général peu coûteux et permettant le développement d'une grande variété de microorganismes.

- **Les milieux enrichis :**

Ils sont obtenus en ajoutant à des milieux de base des composés de valeur nutritive plus élevée.

- **Les milieux sélectifs :**

Ces milieux inhibent la croissance de la majorité des micro-organismes et stimulent celles des bactéries qu'on cherche à isoler. Ils sont utilisés pour l'isolement sélectif d'une catégorie de bactérie dans un mélange poly microbien.

L'effet inhibiteur peut être obtenu de diverses façons :

En jouant sur les facteurs physicochimiques.

En ajoutant des substances bactériostatiques.

- **Les milieux d'enrichissement :**

Ces milieux permettent la culture de certaines bactéries tout en empêchant la culture d'autres bactéries. Ainsi, si dans un mélange une souche est peu représentée par rapport aux autres, il est difficile de déceler la présence de cette souche, dans ce cas, l'utilisation d'un milieu d'enrichissement adapté permettra la culture sélective de cette souche peu représentée et sa détection.

- **Les milieux d'identification ou d'orientation :**

La plupart des milieux d'isolement sont conçus pour mettre en évidence des caractères biochimiques permettant une orientation du diagnostic grâce à des constituants ajoutés dans le milieu.

- **Les milieux d'isolement :**

Ces milieux ont une consistance ferme car ils renferment de l'agar-agar. Par étalement en surface de ces géloses, il est possible d'isoler les bactéries d'un prélèvement pathologiques, alimentaires ou autre.

- **Les milieux différentiels :**

Contiennent un indicateur (colorant) qui permet de différencier deux types bactériens qui poussent sur le même milieu, mais ne dégradent pas tous les deux un substrat particulier.

- **Les milieux de conservation :**

Ce sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

Le terme d'écosystème désigne une unité naturelle qui associe un milieu de vie, ou biotope, aux animaux et aux végétaux qui le peuplent. Il désigne aussi l'ensemble des échanges et des interactions entre ces êtres vivants et leur biotope.

Les lacs et cours d'eau mais aussi les zones inondables ou humides (marais et tourbières), les nappes souterraines constituent les écosystèmes aquatiques.

Le milieu aquatique est caractérisé par :

- un habitat (pentes plus ou moins accentuées au niveau des berges),
- des populations végétales,
- des populations animales,
- la qualité physico-chimique de l'eau (température, nutriments, ...).

Il est influencé par : • le climat, • la géologie, • l'ensoleillement, • les activités humaines.

### ***1. Fonctionnement de l'écosystème aquatique :***

On distingue quatre grands groupes d'acteurs dans ces écosystèmes :

Tout d'abord, **les plantes aquatiques et les algues** (= la matière première) : à partir de l'énergie du soleil et des sels minéraux, elles produisent leur « corps » (feuilles, tiges, fleurs...). Puis, **les consommateurs**, qui se nourrissent de ces matières végétales, sont des animaux aquatiques, très variés (crustacés, poissons...). Ensuite, **les prédateurs**, qui mangent les animaux consommateurs (c'est à dire les poissons ou crustacés qui se sont nourris de végétation). Et enfin, **les décomposeurs**, comme les bactéries ou les champignons, qui se nourrissent des matières organiques (les animaux ou végétaux morts), et ainsi produisent des sels minéraux servant à nouveau aux végétaux. Ainsi, le cycle est bouclé. Ces quatre grands groupes participent à la chaîne alimentaire.

### ***2. Les types d'écosystèmes aquatiques :***

#### ***2.1. Les systèmes aquatiques continentaux superficiels :***

Ils sont repartis en deux domaines : le domaine lotique et le domaine lentique (ou limnique).

- Les écosystèmes du domaine lotique sont caractérisés par un écoulement apparent de l'eau, la plupart du temps permanent. Ils correspondent aux ruisselets, ruisseaux, torrents, rivières.
- Les écosystèmes du domaine lentique (ou limnique) présentent des eaux stagnantes piégées dans des dépressions du sol exp : Les lacs.

## **2.2. Les écosystèmes aquatiques marins (Salinité : 33-34g/l) :**

On peut également séparer le domaine marin horizontalement, en fonction de l'éloignement à la cote, de la profondeur de la colonne d'eau et des relations d'échanges possibles entre le fond et les eaux de surface, en deux provinces :

- les provinces néritiques sont les zones marines partant de la cote et s'étalant généralement sur l'ensemble du plateau continental. D'une profondeur maximale d'environ 200 m, ces provinces présentent des biocénoses riches et diversifiées
- les provinces océaniques s'ouvrent au bord du plateau continental pour occuper l'ensemble des masses d'eau marines. La profondeur de la colonne d'eau s'étend de 200 m (bord du talus continental) à plus de 11000 m (fosse océanique) pour une profondeur moyenne mondiale d'environ 4000 m.

## **2.3. Les écosystèmes de transition (les écotones) :**

Les écotones sont les zones de transition entre des écosystèmes fortement identifiées par la stabilité et l'homogénéité de leurs facteurs abiotiques dominants. Ces écotones s'établissent notamment entre les milieux terrestres et les milieux aquatiques, mais également entre différents systèmes aquatiques. Ils sont caractérisés par une très forte biodiversité,

- Les « zones humides » correspondent à une diversité d'écosystèmes répondant à cette description : ce sont les terrains riverains des systèmes lotiques ou lenticules inondés ou gorges d'eau douce, saumâtre ou salée, de façon temporaire ou permanente et dont la végétation est à dominante hygrophile
- Les zones médiolittorales représentent la frontière étroite entre le milieu continental terrestre et le domaine marin, zone soumise à l'alternance des marées.

## **3. Classification des eaux**

### **3.1. Eaux brutes**

**Eaux brutes = eaux douces souterraines ou superficielles.**

**Eaux souterraines :** faible turbidité, rares pollutions accidentelles mais longues à s'éliminer, température basse toute l'année.

**Eaux de surface :** variations saisonnières de la disponibilité, de la qualité, pollutions accidentelles plus fréquentes mais plus faciles à éliminer, traitées pour être potables.

### **3.2. Eaux potables :**

Une eau est dite **potable** quand elle satisfait à un certain nombre de caractéristiques la rendant propre à la consommation humaine.

- Eaux d'adduction publique

Eau d'adduction publique (ou eau du robinet) rendues potables par traitement respectant des normes physico-chimiques et bactériologiques strictement

- 1.2.2 Eaux embouteillées Eaux dites « de table » contenant simplement de l'eau rendue potable après un traitement précisé sur l'étiquette devant respecter les normes de potabilité,
- 1.2.3 Eaux des activités agro- alimentaires A des fins de fabrication (y compris le lavage du matériel en contact avec le produit), de traitement, de conservation ou de mise sur le marché de produits ou substances destinées à être consommés par l'homme et qui peuvent affecter la salubrité de la denrée alimentaire finale.
- 1.2.4 La glace alimentaire

### **3.3. Eaux usées :**

- **Eaux usées domestiques**

Eaux ménagères riches en détergents, graisses, solvants et débris organiques (cuisine, salles de bains)

Eaux « vannes » riches en matières organiques azotées et germes fécaux (rejets des toilettes)

- **Eaux usées industrielles**

De composition variée d'une industrie à l'autre souvent prétraitées par les industriels (avec leur mélange aux eaux de collecte)

- **Eaux pluviales :** polluant les cours d'eau suite à des orages par des impuretés issues de l'air des toits Canalisées dans un réseau secondaire des sols

### **3.4. Eau de mer**

L'eau de mer est dessalée (35g/L de sel en moyenne Mer morte 330 g/L). Deux procédés de dessalement les plus couramment utilisés sont :

- la distillation : évaporation de l'eau de mer,
- L'osmose inverse nécessite quant à elle de traiter au préalable l'eau de mer en la filtrant et en la désinfectant afin de la débarrasser des éléments en suspension et des micro-organismes qu'elle contient. Le procédé consiste ensuite à appliquer à cette

eau salée une pression suffisante pour la faire passer à travers une membrane semi perméable.

-

#### **4. L'eau potable**

Les nappes d'eau souterraines résultent de l'infiltration des eaux de pluie dans le sol puis de leur circulation dans le sous-sol, à travers une roche poreuse ou fissurée. Les eaux qui s'écoulent à la surface du sol - appelées eaux superficielles ou eaux de surface - telles les rivières et les fleuves. Ainsi, les captages sont majoritairement réalisés dans les nappes souterraines. Ces dernières, en effet, présentent des avantages indéniables : leur eau, épurée par le sol, est généralement de bonne qualité et moins vulnérable aux pollutions. A l'inverse, les eaux superficielles sont exposées à tous les types de pollutions et de disponibilité variable selon les saisons. Cependant l'eau brute captée en milieu naturel n'est pas toujours potable. Elle doit alors être acheminée par des canalisations jusqu'à une usine spécialisée dans le traitement de l'eau, qui la rend "potable" c'est à dire consommable sans risque.

A partir des recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), des réglementations nationales et internationales ont été mises en place afin d'éviter la présence de micro-organismes et de substances chimiques indésirables dans l'eau potable.

##### **4.1. Les étapes de la production d'eau potable :**

L'eau brute subit donc plusieurs traitements :

**a. Dégrillage et tamisage :** L'eau est d'abord filtrée à travers une grille afin d'arrêter les plus gros déchets, puis elle passe dans des tamis à mailles fines retenant des déchets plus petits.

**b. Clarification :** elle permet de rendre l'eau limpide en la débarrassant des petites matières en suspension qu'elle contient.

- **Floculation/coagulation et décantation :** Un produit chimique (chlorure de fer ou sulfate d'aluminium) est ajouté à l'eau qui provoque le regroupement (agglomération) des particules encore présentes (poussières, particules de terre, etc.). en flocons. Ceux-ci s'agglomèrent et se déposent au fond du bassin par décantation. 90 % des matières en

suspension (MES) sont ainsi éliminées.

- **Filtration** : Pour éliminer les 10 % de MES restantes, l'eau traverse un filtre, lit de sable fin et/ou un filtre à charbon actif. La filtration sur sable élimine les matières encore visibles à l'œil nu. Les filtres à charbon actif retiennent en plus les micropolluants comme les pesticides, les composés à l'origine des goûts et des odeurs (cette filtration peut avoir lieu après la désinfection également car ils retiennent également des sous-produits de désinfection). Il existe des procédés de filtration encore plus poussés comme la filtration sur membranes.

**c. Désinfection** : c'est la dernière étape : elle élimine tous les micro-organismes qui pourraient être dangereux pour notre santé.

- **Ozonation** : L'eau est désinfectée grâce à l'ozone, qui a une action bactéricide et antiviral. Ce gaz, mélangé à l'eau, agit aussi sur les matières organiques en les cassant en morceaux. Il améliore également la couleur et la saveur de l'eau.

- **Chloration**. Du chlore est ajouté à la sortie de l'usine de production et sur différents points du réseau de distribution afin d'éviter le développement de bactéries et de maintenir la qualité de l'eau tout au long de son parcours dans les canalisations.

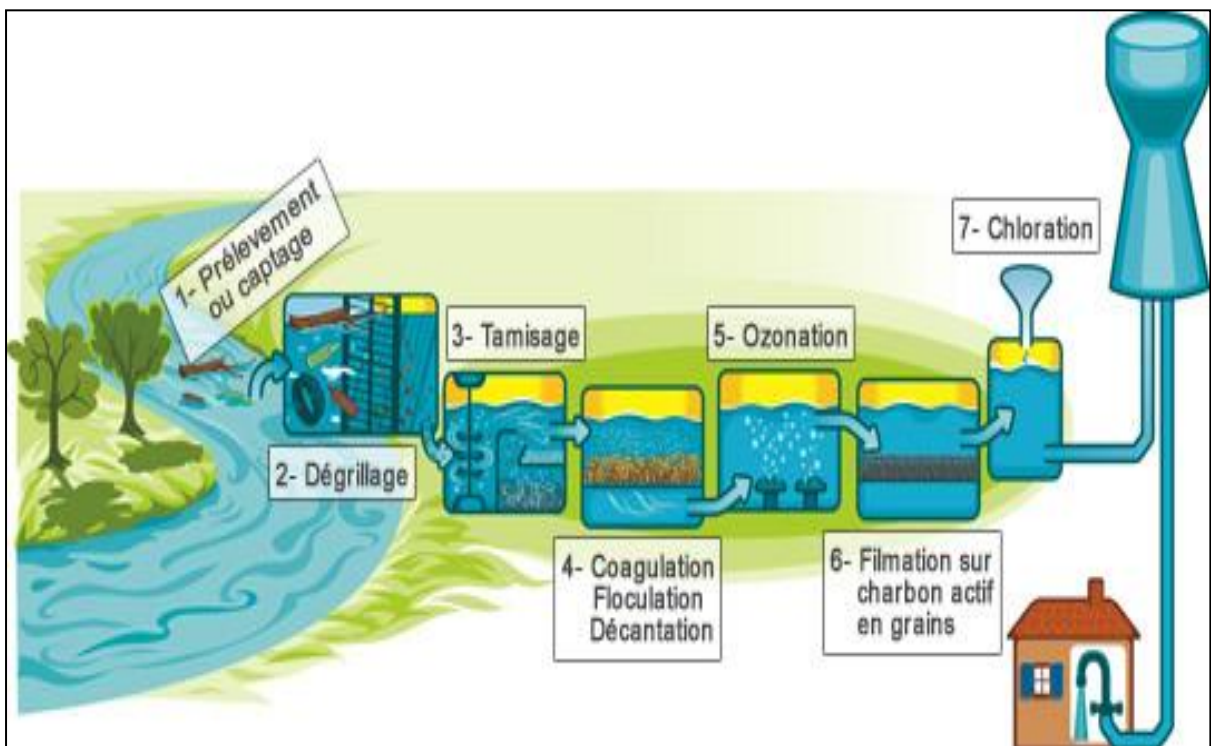


Figure 14. La production de l'eau potable.

## **5. Les eaux usées :**

Les eaux usées, aussi appelées « effluents liquides » sont des « eaux polluées », sont des eaux qui ont été altérées par l'activité humaine.

### **5.1. Traitement des eaux usées :**

De l'entrée à l'usine jusqu'au rejet dans le milieu naturel, les différentes étapes de traitement des eaux usées et les principales tâches effectuées sont les suivantes :

#### **5.1.1. Le prétraitement**

Élimination des éléments pouvant endommager les équipements de la Station de Traitement des Eaux Polluées.

- **Dégrillage** : élimination des corps étranger

À l'arrivée, l'eau usée en provenance des égouts passe entre les barreaux métalliques d'une grille (ou d'un tamis) qui retiennent les déchets volumineux et l'effluent est relevé jusqu'au niveau de l'usine à l'aide de vis d'Archimède ou de pompes.

- **Dessablage** : extraction des sables

Les sables et graviers susceptibles d'endommager les installations en aval se déposent au fond de bassins conçus à cet effet. Ils sont récupérés de différentes façons ; raclage ou par des pompes.

- **Dégraissage- déshuilage** : extraction des huiles et des graisses

L'injection de fines bulles d'air dans un bassin permet de faire remonter les huiles et les graisses en surface où elles sont raclées selon le principe de l'écumage.

#### **5.1.2. Le traitement primaire**

Libérées des déchets les plus volumineux, les eaux sont envoyées vers la décantation primaire. Elle s'effectue dans des bassins, le plus souvent de forme cyclonique, mais il existe bien d'autres types de décanteurs. Elle permet d'éliminer environ 70% des matières minérales et organiques en suspension qui se déposent au fond du bassin où elles constituent les boues primaires. Celles-ci sont récupérées par raclage au fond du bassin et envoyées dans un épaisseur pour y être traitées.

Les performances de la décantation peuvent être améliorées par l'adjonction de produits chimiques (sulfate d'alumine..), cette technique qu'on appelle « flocculation » permet de capter 90% des matières en suspension.

### **5.1.3. Le traitement biologique secondaire :**

Après décantation, l'effluent est introduit dans des bassins d'activations biologiques équipés de dispositifs d'aération ou des microorganismes naturellement présents dans l'effluent, dégradent les matières organiques dissoutes. L'air insufflé leur fournit l'O<sub>2</sub> nécessaire pour respirer et ils se développent en se nourrissant de cette pollution organique. Ces microorganismes exercent également un effet physique de rétention de la pollution par leur propension à se rassembler en films ou flocons. Les techniques de traitement biologiques les plus couramment employées sont :

Les boues activées

Les lits bactériens (bactéries fixées)

Les biofiltres( bactéries fixées)

Comme les boues primaires, les boues obtenues dans les clarificateurs, sont traitées dans des Épaississeurs.

### **Clarification et rejet des effluents :**

La clarification permet de séparer par décantation l'eau épurée des boues secondaire issues de traitement biologique. Cette décantation se fait dans des ouvrages spéciaux, le plus souvent circulaires, appelés clarificateurs ou décanteurs secondaires. Une partie des boues secondaires est évacuée en aval vers le traitement des boues ; l'autre partie est recyclée vers le bassin d'aération pour maintenir la masse biologique nécessaire au fonctionnement de l'installation.

Dans la plupart des cas, l'effluent peut être rejeté dans le milieu naturel après la clarification. Le rejet se fait par un canal équipé de capteurs de mesure pour l'auto surveillance de la station.

### **5.1.4. Le traitement tertiaire complémentaire :**

Pour obtenir une épuration plus poussée, notamment lorsque la sensibilité du milieu récepteur l'exige (exp : zones de baignade, des eaux destinées à l'irrigation), il peut être nécessaire d'effectuer des traitements complémentaires afin d'en éliminer les bactéries et le reliquat de matières en suspension. De type :

- Coagulation : ajout de chlorure ferrique pour supprimer les répulsions inter colloïdales
- Flocculation : ajout de polymères pour assurer la formation de floccs
- Filtration sur lit du sable : élimination finale des matières en suspension
- Traitement bactériologique : désinfection UV et chloration ou d'autres produits oxydants (ozone...)
- Elimination de l'azote, du phosphore.

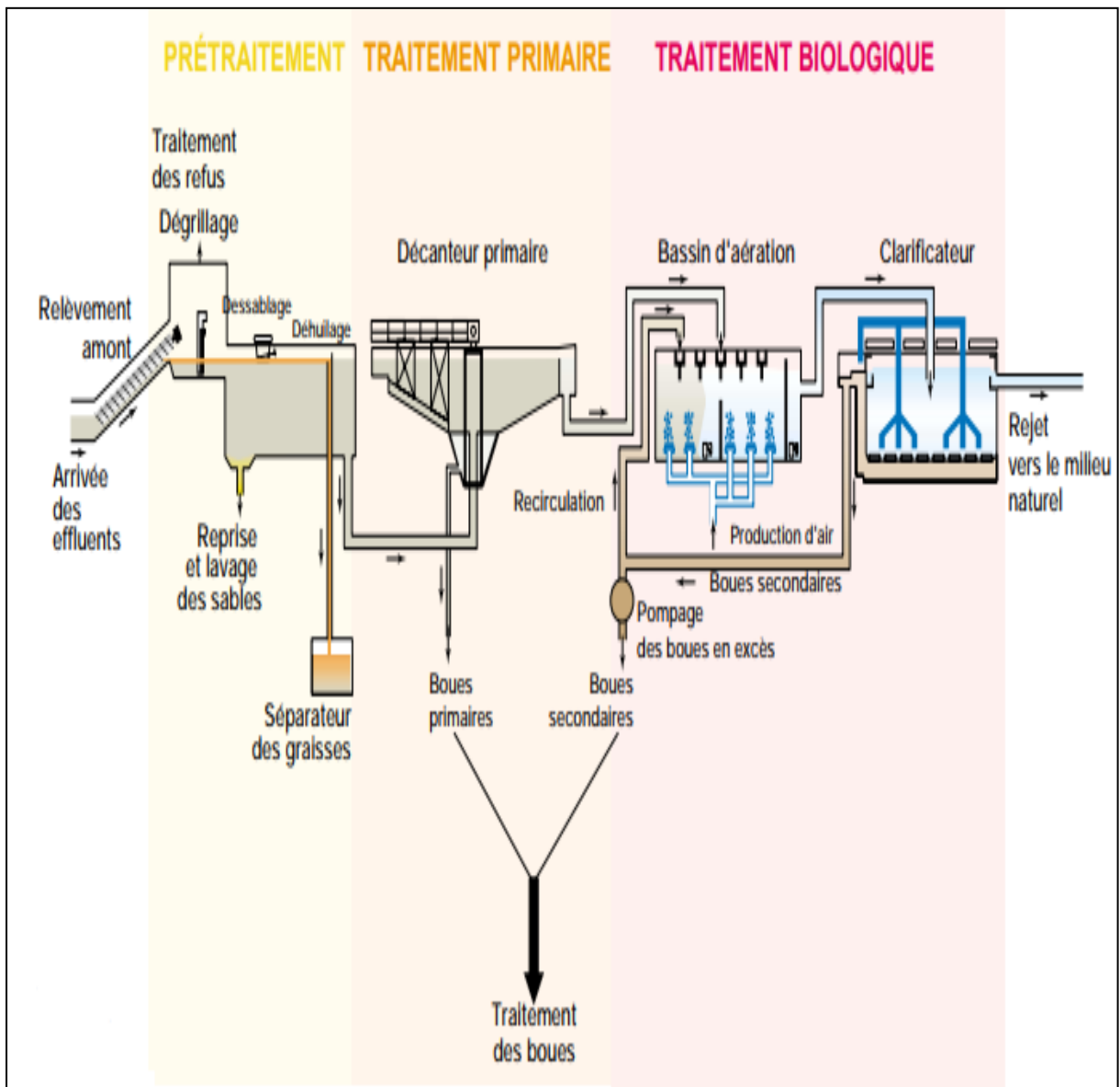


Figure 15. Le traitement des eaux usées.

L'objectif de l'examen microbiologique de l'eau est de fournir des informations quant à la potabilité, c'est à dire sans risque d'ingestion de micro-organismes qui causent des maladies, provenant généralement d'une contamination par des matières fécales humaines ou d'autres animaux à sang chaud. Soulignons que les micro-organismes présents dans les eaux naturelles sont pour la plupart inoffensifs pour la santé humaine. Mais dans la contamination par les eaux usées certains micro-organismes qui sont présents peuvent être nocifs pour la santé humaine. Ces micro-organismes pathogènes incluent notamment les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes.

La détection et la quantification de tous les micro-organismes présents dans l'eau et potentiellement pathogènes prend du temps, les coûts sont élevés et les résultats obtenus ne sont pas toujours positifs ou ne permettent pas de confirmer la présence de micro-organismes.

**Une eau potable** ne doit pas contenir de micro-organismes pathogènes et doit être libre de bactéries indicatrices de contamination fécale.

### ***1. Les indicateurs de contamination fécale (ICF)***

Il n'est pas actuellement possible de rechercher systématiquement tous les germes pathogènes susceptibles d'être présents dans l'eau, étant donné leur variété et l'irrégularité de la présence ; ainsi que la diversité et le coût des analyses qu'il convient de mettre en œuvre pour les détecter.

Néanmoins, comme l'origine de la plupart des micro-organismes pathogènes véhiculés par l'eau est fécale, le principe du contrôle de la qualité de l'eau repose sur la démonstration que l'eau distribuée ne contient pas de germes provenant de contamination fécale. Pour cela, on recherche des indicateurs de contamination fécale, appelés aussi germes témoins de contamination fécale. On parle également d'indicateurs de traitement qui permettent d'évaluer l'efficacité des différents traitements de potabilisation mis en œuvre vis-à-vis de différents germes. .

Donc un germe « témoin » ou indicateur de contamination fécale est un germe commensal de l'intestin de l'Homme ou des animaux, et dont la présence traduit une contamination fécale.

### *1.1. Un bon indicateur de contamination fécale*

La raison du choix de ce groupe de bactéries comme indicateur de contamination de l'eau est due aux facteurs suivants:

- **Spécificité et écologie:** Il doit être présent dans une eau qui a été souillée par des matières fécales des animaux à sang chaud, y compris les humains; et absent d'une eau qui est exempte de toute contamination fécale (*Germes de contamination fécale* : Bactéries associées aux fèces (excréments) qui sont issues du tractus digestif de l'homme et des animaux).
- **Résistance équivalente:** il a la durée de survie la plus importante chez les bactéries pathogènes intestinales, car elles sont moins exigeantes sur le plan nutritionnel et sont incapables de se multiplier dans le milieu aquatique ou se multiplient moins que les bactéries entériques. On préfère généralement, que l'indicateur soit légèrement un peu plus résistant que le ou les microorganismes qu'il représente et ainsi d'introduire la notion de risque de contamination fécale.
- **Accessibilité du contrôle:** ils sont facilement détectables et quantifiables et contrôlable rapidement et facilement par des techniques simples et économiquement
- **Coexistence :** avec les germes pathogènes
- **Abondance :** il doit être présent en grand nombre et viables, sur n'importe quel type d'eau.

### *1.2. Les ICF utilisés*

#### *1.2.1. Les coliformes totaux :*

Regroupe plusieurs espèces bactériennes de la famille des

Entérobactéries correspondent à des bacilles Gram négatif, non sporulé, oxydase négatif, aérobie et anaérobie facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et de fermenter le lactose avec production de d'acide et de gaz en 48h à une température de 35- 37°C. Ils se répartissent en fait en deux catégories :

- Les germes d'origine fécale stricte : *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *serratia*.
- Les germes provenant d'autre sources environnementales (aquatique et tellurique) : *Enterobacter intermedium* et *Amnigenus*, *klebsiella terrigena*.

**1.2.2. Les coliformes thermotolérants (fécaux):**

Les coliformes thermotolérants sont un sous-groupe des coliformes. Ils se définissent comme des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées, en forme de bâtonnet et produisant des colonies bleues à 44°C. Les coliformes thermotolérants ne sont pas tous d'origine fécale ; c'est pourquoi la dénomination "coliformes fécaux" de l'ancienne nomenclature a été remplacée par le terme "coliformes thermotolérants".

**Les *Escherichia coli*:**

Les *E. coli* sont des coliformes thermotolérants associés à la contamination fécale. *E. coli* est un hôte normal de notre intestin et de celui des animaux à sang chaud. A l'heure actuelle, *E. coli* est sans doute le plus utilisé des indicateurs de contamination fécale. Les *E. coli* présentent néanmoins le désavantage d'être peu résistants dans certaines conditions environnementales. Une absence de *E. coli* ne garantit pas forcément que l'eau est exempte de microorganismes fécaux potentiellement pathogènes et le risque de contamination ne peut donc être écarté.

**Intérêt :**

- Recherche et dénombrement des coliformes totaux à 37°C cet examen est intéressant pour juger de l'efficacité de la désinfection d'une eau est d'un intérêt moindre pour déceler une contamination fécale sure
- La recherche et le dénombrement des coliformes thermotolérants ou fécaux à 44°C : la présence de coliformes thermotolérants signe l'existence quasi certaine de la contamination fécale.
- La recherche et le dénombrement des seules *Escherichia coli* ou présumés : parmi les coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* est l'espèce la plus représentée dans la flore intestinale de l'homme et des animaux.

**1.2.3. Les entérocoques:**

Les entérocoques sont les streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield à l'exception des quelques streptocoques du complexe "*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*". Ce sont des bactéries sphériques, en paire ou en chaîne, à Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatives. Ils ne forment

pas d'endospores et certaines espèces font preuve de mobilité. Les entérocoques se développent en 48 heures à 35 °C sur un milieu de culture. La présence des entérocoques d'origine fécale est généralement associée à celle des coliformes fécaux bien qu'il existe également des entérocoques d'origine non fécale provenant de matières végétales, du sol et des insectes. Ces espèces ne sont pas associées à la présence de coliformes fécaux. Étant donné qu'il est difficile de discriminer les entérocoques d'origine fécale et les entérocoques d'origine non fécale, ils doivent être perçus comme un indicateur de pollution d'origine organique au même titre que les coliformes totaux.

Ils sont plus résistants face à des conditions environnementales difficiles (par exemple pH élevé et forte concentration en sel) que les coliformes mais ils ne se multiplient pas dans l'eau. En général, comme il n'y a pas de croissance des entérocoques dans l'eau, ils sont considérés comme des indicateurs de contamination fécale ancienne tandis que les coliformes fécaux témoignent d'une contamination d'origine fécale récente.

**Intérêt :**

- L'apport des entérocoques par rapport aux coliformes consiste en leur plus grande résistance dans les eaux naturelles ; leur présence serait donc le signe d'une contamination fécale de l'eau plus ancienne.
- La résistance des entérocoques aux agents désinfectant est également plus importante, probablement du fait de leur mode groupement en chainettes, et est comparable à celle des entérovirus. cette propriété pourrait permettre aux entérocoques de mieux représenter la contamination virale d'une eau.
- Par contre une partie des espèces est peu spécifiques des contaminations fécales. On retrouve par exemple *Streptococcus faecalis var liquefaciens* dans l'environnement, sur les végétaux ou sur des sols non contaminés.

**1.2.4. *Clostridium perfringens*:**

*Clostridium perfringens* et plus particulièrement ses spores ont une résistance qui se rapproche de celle des microorganismes fécaux les plus résistants. Les spores de *Clostridium perfringens* sont des indicateurs de contamination à la fois récente et ancienne. Leur absence indique que le risque de contamination fécale est très faible. Leur désavantage est qu'ils sont très peu nombreux dans une eau contaminée par des matières fécale, il faut dès lors un grand volume d'échantillon afin de les détecter.

**Intérêt :**

L'intérêt de la recherche de tels indicateurs réside dans la propriété qu'ils sporuler, ce qui les rend particulièrement résistant aux traitements de désinfection.

- l'origine de la pollution : les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente.
- la protection d'une nappe, et en particulier d'une nappe alluviale : les *Clostridium* sulfito-réducteurs étant pratiquement toujours présents dans les rivières et le sol, leur absence dans une nappe sous-jacente, et surtout l'absence de leurs spores, de moindre taille et plus difficiles à retenir, constituent un bon signe de l'efficacité de la filtration naturelle ;
- l'efficacité d'un traitement physique :

Une filtration sur sable dans une usine de traitement d'eau reproduisant artificiellement le phénomène naturel, une absence de spores, à l'aval du traitement est donc, de même, un bon signe de son efficacité.

**1.2.5. Les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) ou flore totale aérobie mésophile (FTAM) :**

Facultatifs présentes dans un échantillon d'eau, Elle est une mesure quantitative des bactéries viables sur un milieu de culture déterminé. Les bactéries dénombrées requièrent de la matière organique comme source de carbone (hétérotrophes) et sont cultivées à des températures optimales situées entre 20 °C et 45 °C (mésophiles) avec ou sans présence d'oxygène (aérobies et anaérobies facultatifs). Cette méthode permet d'isoler et de dénombrer un groupe relativement varié d'espèces de bactéries sans égard à leur étiologie (pathogénicité). Cette méthode ne permet pas de revivifier et de dénombrer toutes les bactéries présentes dans un échantillon d'eau. En effet, les populations microbiennes présentes dans des milieux aquatiques pauvres en substances nutritives subissent des carences importantes et ces conditions les rendent extrêmement sensibles au choc de la température inhérent à la technique proposée.

**Intérêt :**

Le dénombrement des germes revivifiants est utilisé comme indicateur de pollution :

- dans les milieux de très bonne qualité microbiologique pour contrôler une possible contamination bactérienne. Ce sont essentiellement des eaux souterraines des nappes profondes qui seront contrôlées.
- Dans l'usine de potabilisation, il permet de contrôler l'efficacité des différentes étapes du traitement.
- dans les réseaux : une augmentation de la concentration bactérienne après la station de traitement peut être le signe d'une multiplication bactérienne dans le réseau ou d'une intrusion de bactéries à l'intérieur de celui-ci.
- Dans les réservoirs et châteaux d'eau, on suit les effets du stockage et de la stagnation sur la qualité de l'eau et sur la reviviscence des germes

**2. Les normes de la qualité de l'eau**

Dans le domaine alimentaire, la plupart des seuils, limites et références de qualité adoptés sont issus de « valeurs guides » déterminées au niveau international.

**2.1. Les valeurs guides :**

Les « valeurs guides » sont recommandées par l'OMS - organisation mondiale de la santé- ou le JEFCA - Joint Expert Committee on Food Additives-, comité conjoint entre l'OMS et la FAO - Food and Agriculture Organisation. Le processus d'élaboration est le suivant :

- L'estimation part d'une connaissance du danger et du risque.

Le danger est une propriété de la molécule. Il peut s'agir d'une perturbation physiologique, d'une lésion organique, d'une maladie, d'une altération des capacités et des performances (fertilité par exemple). Le risque est la probabilité d'être exposé au danger.

- On applique ensuite un coefficient d'incertitude, une marge de sécurité, pour tenir compte des différences de sensibilité entre espèces (le passage de l'animal à l'homme est affecté d'un facteur 10 à 100), et de différences de sensibilité entre

individus (avec un nouveau facteur 10). Le facteur d'incertitude peut donc aller de 100 à 1.000.

## **2.2. La valeur limite**

Cette valeur guide sert de référence à ce que deviendra ensuite une réglementation sous forme de concentration maximale autorisée (CMA) ou de valeur limite.

Exemple : Comment calculer le seuil des teneurs en eau en microcystines ?

La microcystine est une toxine de cyanobactéries, appelée aussi algues bleues, qui sont des bactéries d'eau douce qui prolifèrent dans les eaux stagnantes. Dans plusieurs pays, les cyanobactéries ont provoqué des intoxications chez des personnes qui avaient bu de l'eau insuffisamment traitée ou mal traitée (adjonction de sulfate de cuivre pour détruire les algues). La microcystine LR a été identifiée comme étant la principale toxine des cyanobactéries.

Le calcul de la limite de qualité a suivi les étapes suivantes. Une étude chez les souris a permis d'évaluer la dose sans effet identifié observable (DSEIO) : 40 ug/kg de poids corporel. Cette dose a été appliquée à l'homme après prise en compte d'un facteur d'incertitude de 100 pour tenir compte du passage de la souris à l'homme, et d'un nouveau coefficient d'incertitude de 10, en raison du manque de données sur la toxicité chronique. La dose journalière tolérable a donc été fixée pour l'homme à 0,04 ug/kg de poids corporel.

Un facteur de 0,8 a été appliqué pour établir la contribution relative de l'eau de boisson. Le coefficient est souvent beaucoup plus faible pour les autres contaminants qui peuvent prendre la voie d'une contamination par des aliments, mais pour les cyanobactéries, la cause principale d'exposition est l'eau de boisson.

On arrive ainsi à une valeur guide, dite « provisoire » pour tenir compte de l'évolution des connaissances, reprise dans la réglementation française sous forme de référence de qualité à 1 ug/litre d'eau.

### **2.3. Le classement de substances cancérigènes**

Le Centre National de Recherche du Cancer qui dépend de l'Organisation Mondiale de la Santé classe les substances selon quatre niveaux de cancérigénicité :

. Catégorie I : cancérigènes prouvées chez l'homme (arsenic, amiante..). Des résultats épidémiologiques concluent à une relation causale entre la substance et le cancer.

. Catégorie II a : cancérigènes probables (cadmium, PCB ...) Cette classe regroupe les substances pour lesquelles les connaissances épidémiologiques sont limitées mais avec des données animales concluantes constatant une fréquence accrue des tumeurs cancéreuses dans au moins deux espèces différentes.

. Catégorie II b : cancérigènes possibles (DDT ...). Dans ce cas, les connaissances épidémiologiques et les données chez l'animal sont limitées.

. Catégorie IV : absence d'effets cancérigènes.

### **3. Le classement des maladies hydriques**

#### **3.1. Les bactéries qui survivent dans l'eau**

La *salmonelle*, responsable de la typhoïde, première cause de mortalité d'origine hydrique jusqu'à la seconde guerre mondiale. La bactérie est très sensible à la désinfection.

*L'Escherichra coli*, ou *E-coli*, bactérie de l'intestin, surtout dans le bétail, indicateur de contamination fécale. L'E-coli n'est pas directement toxique, elle a même a son utilité dans l'intestin, en supprimant des bactéries nuisibles, mais elle crée une toxine, la vérotoxine, qui entraîne des diarrhées et de hémorragies., tout comme la campylobacterie, surtout présente dans les intestins et par conséquent les fientes des oiseaux.

#### **3.2. Les bactéries pathogènes qui se développent dans l'eau**

Les *pseudomonas*, très fréquentes dans les eaux usées et les eaux pluviales. La bactérie est très résistante aux antibiotiques. Elle entraîne des diarrhées.

Les *aéromonas*, naturellement présentes dans l'eau claire, se développent dans les eaux usées et chaudes.

Les *légionelles* : on compte 42 espèces de légionelles dont une, la légionelle pneumophila, responsable de la maladie du légionnaire. Elle est peu sensible à la chaleur. La maladie est liée à l'inhalation de microgouttelettes.

### **3.3. Les parasites ou protozoaires**

Ce sont des parasites dits « opportunistes », car ils se développent sur un hôte. Les plus connus sont les gardia et le cryptosporidium, découvert en 1955, à l'origine de l'épidémie du Milwaukee, en 1993. Ces parasites sont rejetés par les animaux et les hommes. Le cryptosporidium est résistant aux désinfectants. La dose infectieuse n'est pas connue avec précision mais pourrait démarrer avec un seul microorganisme.

### **3.4. Les virus**

Parmi les virus présents dans l'eau, on compte le virus de l'hépatite A, le virus de l'hépatite E, plutôt confiné dans les milieux tropicaux, le virus commun des gastroentérites, qui comprennent plusieurs familles (virus de Norwich, de Sapporo, etc.). On compterait plus de 140 virus identifiés, dont la plupart se retrouveraient dans les selles. Le seuil de déclenchement des maladies est encore ignoré mais paraît très bas. Leur résistance aux traitements de désinfection est variable.

## **4. L'importance des contaminations**

Attention, il n'y a pas de stricte concordance entre les contaminations bactériennes et l'apparition de maladies ou de troubles pathogènes.

D'une part, il existe des porteurs sains. L'exemple le plus connu est celui d'une cuisinière du XIX<sup>e</sup> siècle connue sous le nom de « Marie-Typhoïde ». Partout où elle travaillait, des gens mouraient. Elle était « porteuse saine » de typhoïde qui, faute d'une hygiène suffisante, se transmettait aux familles.

D'autre part, la gravité des troubles varie beaucoup selon les populations exposées. La forme habituelle est la diarrhée ou gastro-entérites aiguës- GEA La plupart évoluent vers une guérison spontanée, mais il existe des populations vulnérables aux contaminations hydriques, repérées aux Etats-Unis sous l'appellation YOPI, Young, Old, Pregnant, Immunodeficient - jeunes, personnes âgées, femmes enceintes et, surtout, immunodéprimés, quelle qu'en soit l'origine (transplantation, rougeole, SIDA, etc.).

Enfin, l'importance des maladies d'origine hydrique est très sous-estimée. Un médecin voit, en moyenne, une gastroentérite par jour ; s'il en voit 4 ou 5, il est alerté, s'il en voit seulement deux au lieu d'une, cela passera inaperçu. Seules les épidémies sont repérées. On compte en moyenne deux épidémies par an, souvent à la suite de contacts entre des eaux contaminées et l'eau distribuée.

Selon une étude américaine, 10 à 50 % des gastroentérites sont liées à l'eau, avec la répartition suivante :

- 70 % des cas d'origine virale,
- 25 % des cas d'origine bactérienne,
- 5 % des cas d'origine parasitaire.

#### ***5. Caractéristiques communes aux eaux souterraines et superficielles***

On trouvera toujours dans l'eau :

- Des gaz dissous provenant de l'atmosphère, les plus importants étant l'oxygène et le gaz carbonique qui jouent un rôle fondamental pour la vie aquatique mais aussi pour le traitement.
- Des matières dissoutes provenant des roches traversées ou lessivées. Ces matières dissoutes se présentent sous forme de quelques milligrammes d'ions, soit des cations (ions positifs) tels que calcium, magnésium, sodium, potassium ; soit des anions (ions négatifs): tels que bicarbonates, sulfates, chlorures, nitrates....
- De fines particules d'argile en suspension, c'est-à-dire des particules maintenues en équilibre dans l'eau sous l'effet de charges électriques. Elles donnent à l'eau sa turbidité, et constituent une « éponge » absorbante qui attire les bactéries et les molécules organiques ou inorganiques.
- Des bactéries de l'eau, c'est-à-dire des bactéries qui prolifèrent dans le milieu aquatique en utilisant pour leur métabolisme, soit l'oxygène dissous (bactéries aérobies), soit l'oxygène d'un anion - sulfate ou nitrate - (bactéries anaérobies). Leur présence en grand nombre dans l'eau joue, lors du traitement, un rôle fondamental. Il ne faut pas les confondre avec les bactéries pathogènes qui sont étrangères à l'eau et n'y prolifèrent pas.

· Des matières organiques, qui sont des éléments provenant du cycle de décomposition des végétaux. Parmi ces matières organiques, les acides humiques, constituant l'essentiel de l'humus, jouent un rôle important. Ce sont de très grosses molécules qui se trouvent dans l'eau sous forme colloïdale. Elles participent peu à la turbidité de l'eau, mais lui confèrent en partie sa couleur.

### ***5.1. Caractéristiques particulières aux eaux souterraines***

Elles sont surtout liées à l'absence de lumière et au non renouvellement de l'oxygène, et sont également influencées par la filtration dans les terrains poreux que l'eau traverse très lentement.

S'il s'agit de terrains calcaires, on trouvera donc souvent une charge importante en éléments minéraux (calcium en particulier), peu de particules colloïdales, peu d'oxygène, donc peu de bactéries aérobies. Par contre, les bactéries anaérobies pourront être présentes et on trouvera de l'ammoniaque et des sulfures provenant de la réduction par les bactéries des nitrates et des sulfates.

On trouvera également souvent des quantités importantes, jusqu'à quelques milligrammes par litre, d'ions ferreux et manganoux résultant de la réduction des sels ferriques et manganiques contenus dans les roches. Ainsi, sans qu'elle ait été polluée, il est possible qu'une eau prélevée dans un puits soit privée d'air dissous, sente le gaz sulfhydrique, c'est-à-dire l'oeuf pourri, devienne rouge ou noir dès qu'elle en contact avec l'air - les ions ferreux et manganoux redevenant ferriques et manganiques et précipitant.

Les eaux souterraines sont à température constante toute l'année, 12 à 15 °C généralement, sauf pour le cas de nappes très profondes pour lesquelles les températures sont supérieures.

### ***5.2. Caractéristiques particulières aux eaux superficielles***

Les éléments minéraux sont identiques à ceux rencontrés dans les nappes. D'ailleurs, les rivières sont en partie alimentées par les nappes. Toutefois, du fait de la dilution avec les eaux de ruissellement, leur teneur est moins élevée.

Les eaux de ruissellement apportent, par contre, beaucoup plus d'argile et d'acides humiques, rendant ainsi les eaux de rivières plus turbides et plus colorées. Mais c'est la lumière et l'oxygène qui jouent le rôle fondamental. Les algues, qui sont souvent très fines,

participent à la turbidité de l'eau et posent des problèmes délicats au cours du traitement. La conséquence de cette vie est que les teneurs en matières organiques sont beaucoup plus élevées.

Les eaux superficielles sont aussi plus sensibles que les eaux souterraines aux pollutions d'origine anthropique. L'activité humaine modifie en effet les caractéristiques de l'eau brute naturelle en entraînant plusieurs pollutions :

- les germes pathogènes, liés aux déchets animaux et humains. L'assainissement des eaux usées protège les nappes souterraines et concentre les rejets dans les rivières, qui peuvent ainsi être polluées par des parasites et des virus. C'est la principale source de pollution de l'eau.
- les autres pollutions d'origine domestique (qui proviennent de l'ammoniaque, l'azote, le phosphore et les matières organiques), des eaux pluviales, issues des agglomérations ou de l'activité agricole, ou des pollutions industrielles.

L'objectif de l'analyse bactériologique d'une eau n'est pas d'effectuer un inventaire de toutes les espèces présentes, mais de rechercher soit celles qui sont susceptibles d'être pathogènes, soit celles qui sont indicatrices de contamination fécales. L'analyse débute par l'acte de prélèvement qui doit mettre en œuvre des méthodes assurant l'absence de contamination et la survie bactérienne.

### ***1. Méthodes de prélèvement :***

- L'objectif est d'obtenir un échantillon aussi représentatif que possible de l'eau à examiner, sans contaminer ni modifier l'échantillon.
- Pour les analyses bactériologiques, les échantillons sont prélevés au moyen des flacons en verre d'une contenance de 250 ml fermés hermétiquement et préalablement bien stérilisés dans un four Pasteur à une température de 170° - 180°C pendant 30 minutes à 1 heure. Les flacons de prélèvement sont plongés dans l'eau du Lac fermés, nous les ouvrons à une profondeur de 30 cm et nous les rinçons 2 à 3 fois avec l'eau de Lac avant de les remplir et fermer hermétiquement dans l'eau sans laisser de bulles d'air.
- **NB :** Le prélèvement s'effectue à environ 30 à 40 cm où a mi profondeur si l'hauteur de l'eau est faible, en évitant la remise en suspension des dépôts.
- Le fait de prélever un échantillon d'eau et de le séparer de son milieu naturel entraîne des modifications plus ou moins importantes selon les paramètres. Certains peuvent être considérés comme stables à l'échelle de temps à laquelle on travaille, mais d'autres varient très rapidement, diverses réactions chimiques et biologiques se produisent tels la précipitation de sels, favoriser la mise en solution de gaz...ainsi que la prolifération bactérienne. Donc les échantillons sont transportés directement au laboratoire dans des glacières (4 à 6 °C)

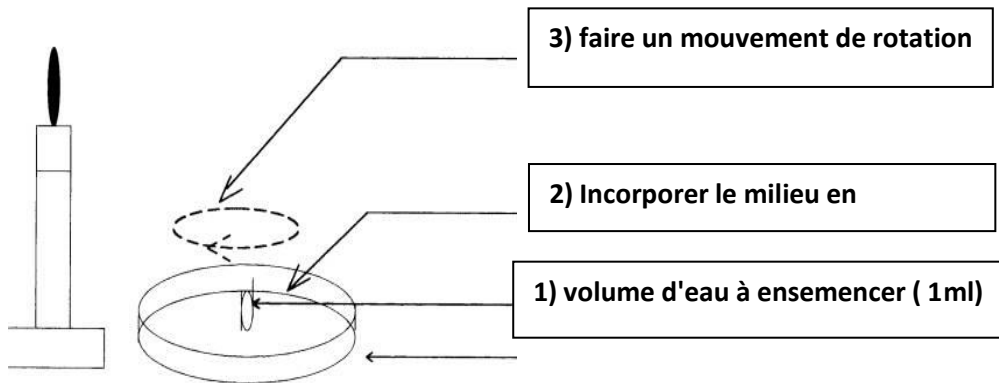
### ***2. Méthodes générales de dénombrement :***

#### ***2.1 Méthodes de dénombrement en milieu solide***

##### ***2.1.1 Méthode par incorporation :***

**Principe :** L'échantillon d'eau à analyser est mélangé au milieu de culture solide préalablement fondu et refroidi à une T proche de la T de solidification. Après incubation, les colonies qui se développent à la surface et à l'intérieur du milieu sont comptées.

**Mode opératoire :**



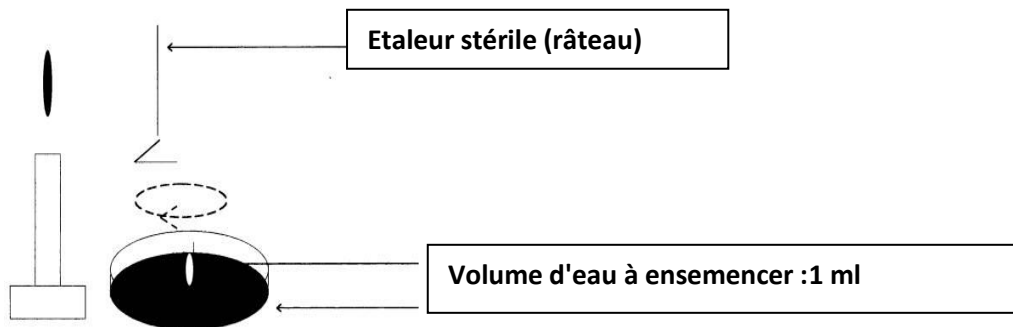
- Incuber
- Faire le dénombrement des colonies développées à la surface et à l'intérieur du milieu de culture.

**2.1.2 Méthode par étalement :**

**Principe:**

L'échantillon d'eau à analyser est étalé à la surface d'un milieu gélosé sans trace d'humidité: après incubation, les colonies qui se développent à la surface sont dénombrées.

**Mode opératoire :**

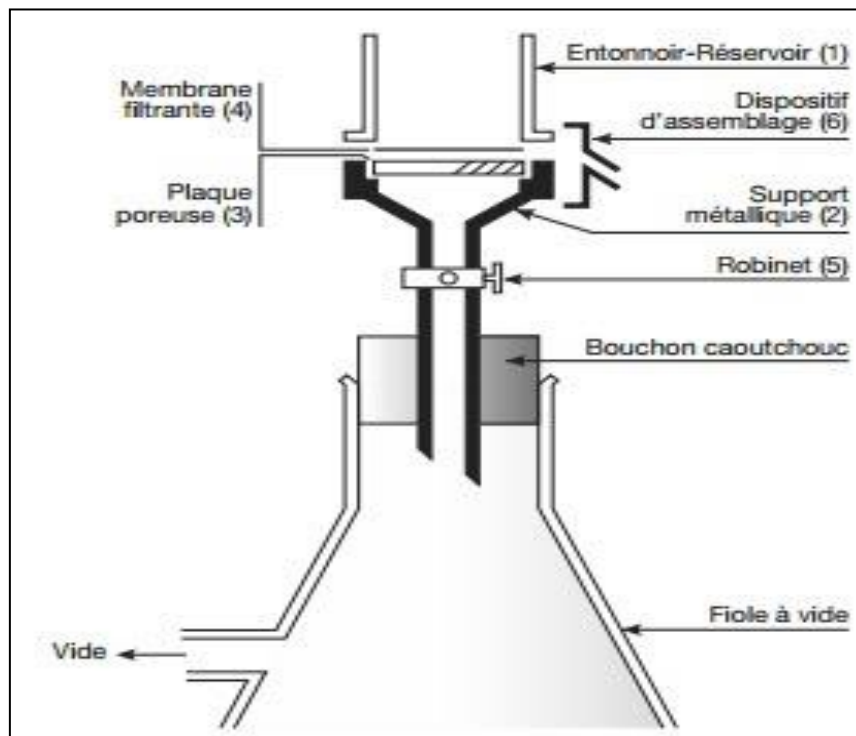


- Incuber
- Dénombrer les colonies développées à la surface.

**2.1.3 Méthode par filtration :**

**Principe :**

L'échantillon d'eau à analyser est filtré à travers une membrane qui retient les micro-organismes. La membrane est ensuite placée sur un milieu gélosé. Durant l'incubation, des colonies se forment à la surface de la membrane.



**Figure 16. Un appareil de filtration sur membrane.**

## **2.2. Méthodes de dénombrement en milieu liquide**

### **Principe générale :**

Les prises d'essais de l'échantillon d'eau ou de ses dilutions sont incorporées dans un milieu liquide conçu pour permettre la croissance d'un micro-organisme ou de groupe de microorganismes. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble du milieu et, éventuellement, une modification visible (virage d'un indicateur de pH coloré).

### **2.2.1 Méthode du nombre le plus probable :**

#### **Principe :**

Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organisme supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire. L'estimation de la densité bactérienne est obtenue par application du principe de vraisemblance, à partir de réponses

positives observées pour une ou plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne originelle. Il s'agit d'une méthode quantique et non pas énumératif.

***Mode opératoire :***

- On ensemence des dilutions successives de l'eau à analyser (par exemple 1, 0.1, 0.01) à raison de 3 à 5 tubes de milieu de culture liquide par dilution (répétition).
- On notera le nombre de tubes inoculés présentant une culture visible indiquant la présence d'au moins d'un micro-organisme.
- Les tables, en fonction du nombre caractéristique (nombre de tubes positifs pour chaque dilution) indiquent la valeur statistiquement la plus probable et son intervalle de confiance).

***3. Dénombrement des germes témoignant d'une pollution fécale:***

***3.1 Dénombrement des micro-organismes revivifiables :***

Le principe consiste à mettre en évidence les bactéries

- Qui se développent à 20°C favorisant ainsi les germes spécifiques de l'eau
- Et celles qui se développent à 37°C favorisant ainsi les germes issus de l'homme et des animaux à sang chaud.

Après avoir bien agité l'eau échantillonnée, nous avons préparé des dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,...) de l'eau en utilisant l'eau physiologique stérile (0.9% Na Cl) puis ensemencé en masse dans la gélose TGEA (Tryptone Glucose Extract Agar) une série de boîtes de pétries est placée à 37°C et à 20°C pendant 48 heures selon les normes internationales **ISO 6222**. La gélose TGEA est utilisée pour le dénombrement de la flore totale et ne présente pas d'exigences particulières.

***Lecture :***

Chaque colonie étant par convention considérée comme ayant été engendrée par un seul microorganisme. Et les résultats sont exprimés en nombre de microorganismes révivables par millilitre.

3.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux :

**Test présomptif**

On fait une dilution de  $10^{-1}$  ..... $10^{-7}$  de notre eau à analyser ensuite on prend sept tubes de BCPL (Bouillons Lactosé au Pourpre Bromocrésol) simple concentration, munis d'une cloche de Durham, à raison de 09ml par tube, pour chaque série de dilution et on réalise a total trois séries de dilution. Après l'avoir homogénéiser soigneusement, prélever 1ml d'eau à analysé à l'aide d'une pipette Pasteur et la porter dans le premier tube de la série de dilution ( $10^{-1}$ ).

La pipette ne doit entrer en contact ni avec les parois des tubes, ni avec le liquide diluant. Avec une nouvelle pipette Pasteur, homogénéisée par aspiration et soufflage le contenu de ce tube ( $10^{-1}$ ), prélever 1ml etensemencer le tube ( $10^{-2}$ ), et ainsi de suite jusqu'au tube ( $10^{-7}$ ), changer à, chaque fois de pipette.

- Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches de Durham et mélanger bien le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

- Les tubes présentant un aspect trouble de couleur jaune et du gaz dans la cloche, sont considérés comme positif autrement dit pouvant contenir des coliformes totaux.

- Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série et se reporter à la table de Mac Grady pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 1 ml d'eau à analyser.

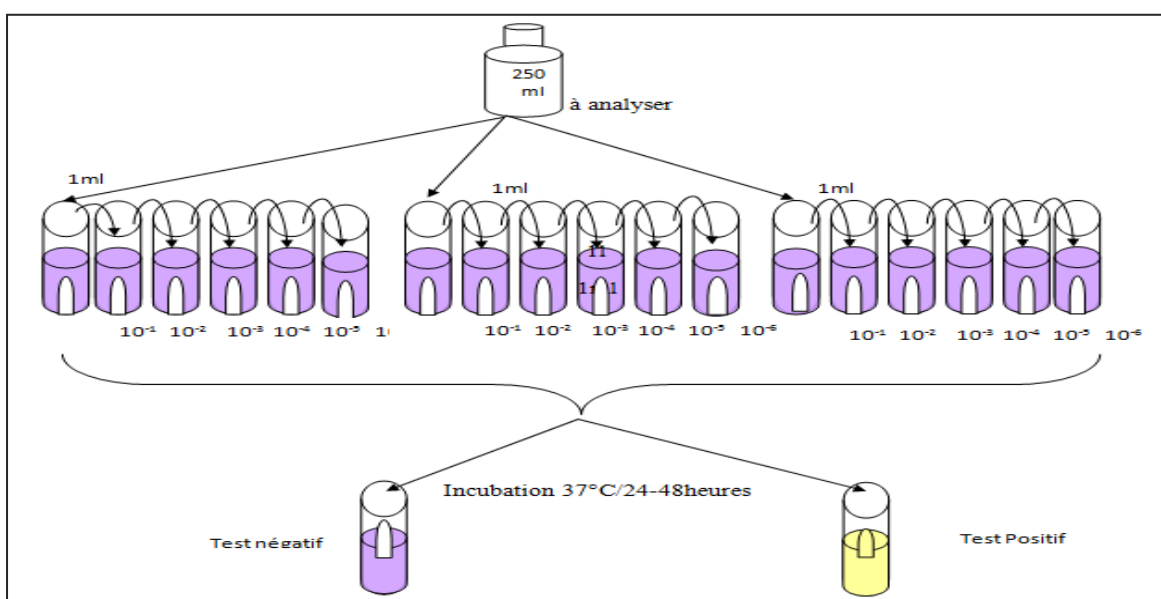


Figure 17. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (test de présomption).

3.3. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et d'*E. coli*:

Test confirmatif

Ce test fait suite à un dénombrement en milieu liquide des coliformes. Il utilise la propriété des **coliformes fécaux** de fermenter le lactose à 44°C et d'*Escherichia coli* de produire l'indole à 44°C. Pour chaque tube positif, on prélève une anse de culture que l'on reporte dans un milieu Schubert ou dans une eau peptonée. Incuber 24 h à 44°C. Dans les tubes montrant un trouble, ajouter quelques gouttes de réactif Kowacs. Une réaction considérée positive correspond à la formation d'un anneau rouge, témoigne de la production d'indole, donc la présence d'*Escherichia coli*.

Nous notons le nombre de tubes positifs dans chaque série et nous reportant aux tables de NPP. Pour obtenir le nombre de coliformes fécaux présent dans 1ml de l'échantillon.

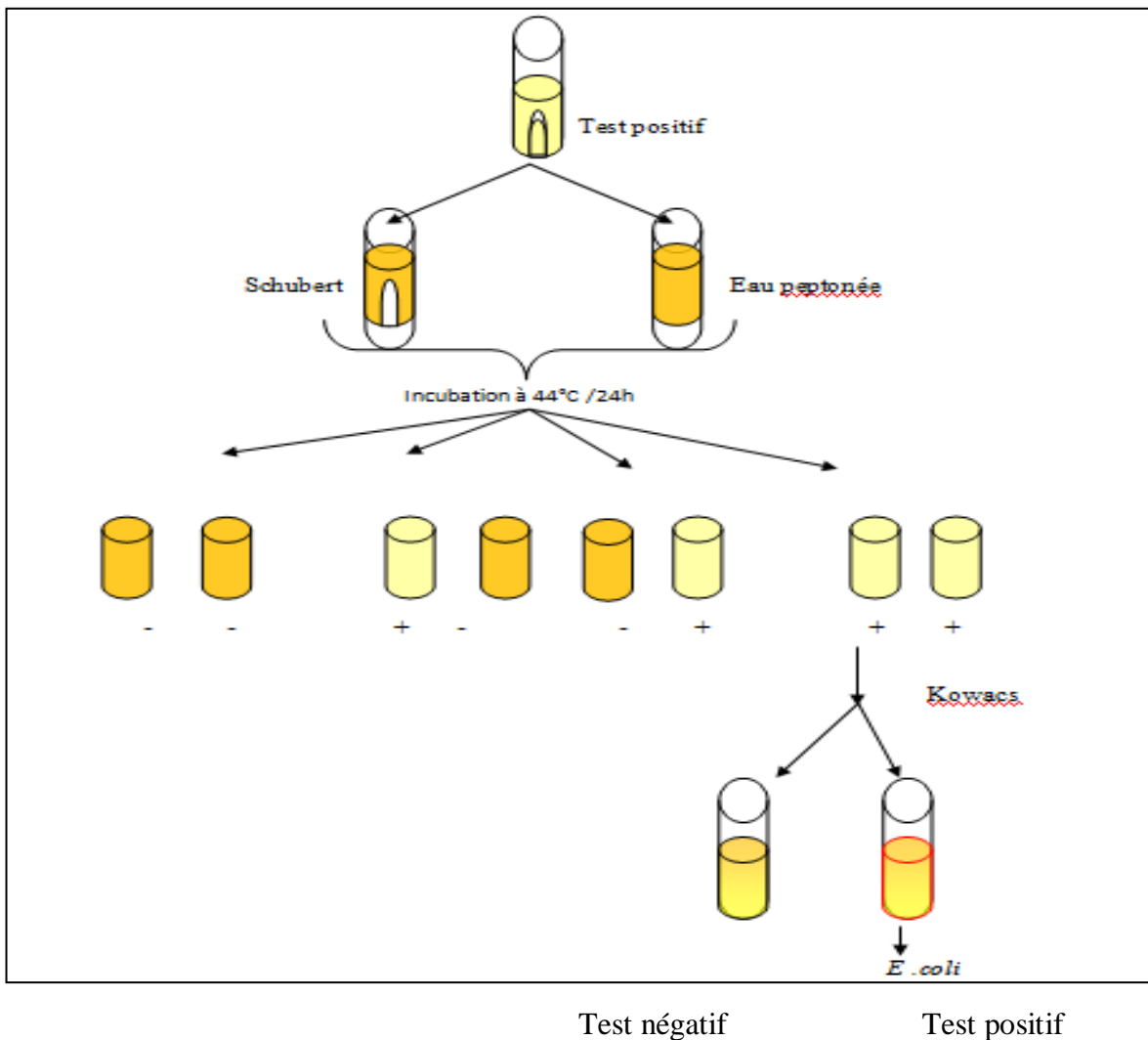


Figure 18. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (test confirmatif).

### **3.4 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux ou Entérocoques**

- **Test de présomption**

La recherche se fait en bouillon à l'azide de sodium (bouillon de Rothe), en utilisant des milieux à simple concentration et on réalise le même procédé utilisé pour la recherche des coliformes totaux autrement dit la méthode classique de dilution de 03 séries. On incube les tubes à 37°C et on les examine après 24 et 48 heures. Les tubes présentant un trouble microbien pendant cette période sont présumés contenir un streptocoque fécal et sont soumis au test confirmatif.

- **Test de confirmation**

Après agitation des tubes positifs, on prélève sur chacun d'eux successivement quelques gouttes de pipette Pasteur, et les reporter dans des tubes de Litsky à l'éthyle violet et azide de sodium. Après incubation à 37°C pendant 24 h, tous les tubes présentant une culture et un jaunissement seront considérés comme positif. On note généralement la présence dans le fond des tubes d'une pastille blanche ou violette.

Nous notons le nombre de tubes positifs dans chaque série et se reporté aux tables de NPP pour connaître le nombre de streptocoques fécaux présent dans 1ml de l'échantillon.

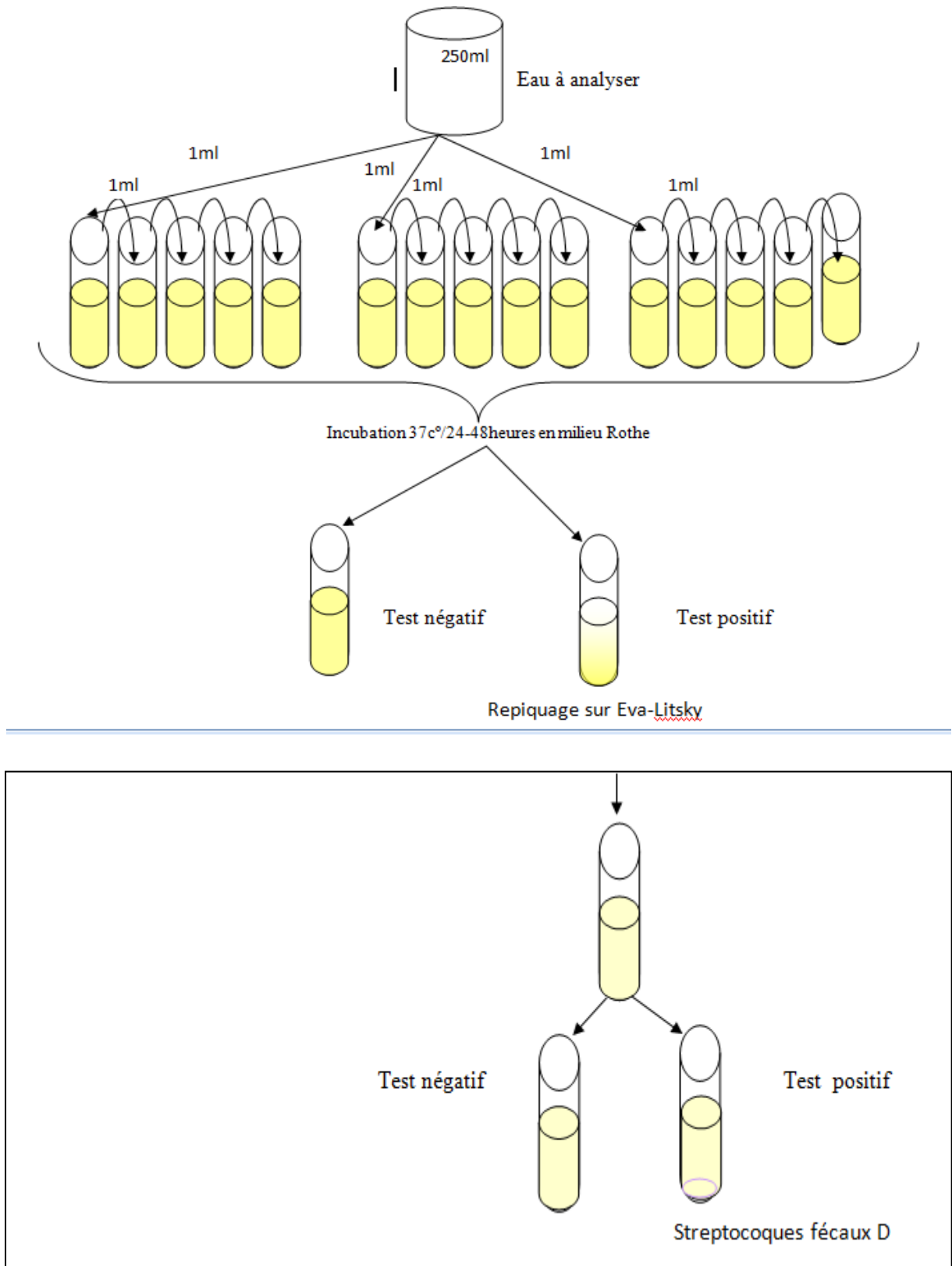


Figure 19. Recherche et dénombrement des Streptocoques

### **3.5 Recherche et dénombrement des spores de bactéries des anaérobies sulfitoréductrice et de clostridium sulfitoréducteurs**

#### **-Méthode par incorporation en gélose**

Après destruction des formes végétatives par chauffage à 80 °C, l'échantillon est incorporé à un milieu de base fondu qui est la viande de foie, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer. La composition du milieu est établie pour tenir compte d'un volume déterminé d'eau incorporée. L'incorporation se fait dans un tube et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air. Après solidification et incubation, la présence de germes sulfito-réducteurs se traduit par un halo noir autour des colonies. Placer les tubes inoculés à l'étuve ou au bain-marie réglé à 37 °C pendant 44 h ± 4 h.

Considérer comme positifs les tubes où le milieu présente un noircissement par suite de la formation de sulfure de fer due à la réduction du sulfite de sodium. Le nombre de colonies par tube est déterminé après 18 à 24 heures. Le résultat final est exprimé en nombre de spores de CSR par 100ml d'eau analysée. Le dénombrement est effectué après 18 heures d'incubation, car parfois, après 24 heures, le tube devient complètement noire, et il est alors impossible compter les spores de CSR

### **3.6. Recherche et dénombrement des levures et moisissures**

N'importe quel milieu de culture glucosé convient pour la numération des levures. Mais leur isolement est réalisée sur la gélose Sabouraud qui constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des Fungi (levures et moisissures) saprophytes ou pathogènes. Dans le cas de prélèvements fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose Sabouraud + chloramphénicol.

Naturellement acide, il inhibe la croissance de nombreuses bactéries. Additionné de chloramphénicol à 0,5 g/L ou de gentamicine à 0,04 g/L, il inhibe une grande partie des bactéries permettant la sélection des levures et moisissures. L'addition d'actidione (cycloheximide) à la concentration de 0,5 g/L permet la sélection de moisissures et levures pathogènes. L'addition de chlorure de triphényl 2-3-5-tétrazolium (TTC) (à 0,1 g/L) permet la différenciation des levures du genre *Candida*. En effet, le TTC peut être réduit par certaines levures en produits colorés.

***Mode d'ensemencement***

Transférer l'échantillon à analyser sur le milieu .On étale l'inoculum en surface à l'aide d'un râteau en verre stérile et enfin on incubé à 20 - 25°C de 3 à 5 jours

❖ ***Identification :***

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure préalablement isolée sur le milieu gélosé Sabouraud.

❖ ***Coloration simple :***

Elle est effectuée entre lame et lamelle sur les cultures en milieu solide ayant permis d'observer les caractéristiques culturales : La forme (sphérique, ovoïde, allongée) et la taille des cellules en milieu solide.

***4. recherche des germes pathogènes :***

***4.1 Recherche de salmonella***

***Définition :***

***Les Salmonelles sont:***

- ✓ Des bacilles Gram négatifs
- ✓ (x) à la température de  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  en 24 à 48 h, sur milieu Hektoen, formant de petites colonies, lisses à contours réguliers, pigmentées en vert ou en bleu vert à centre noir.
- Les Salmonelles se divisent en deux grands groupes : les typhoidiques (Hautement pathogènes) et les non typhoidiques. (voir cours).

***Méthode de recherche : (voir schémas)***

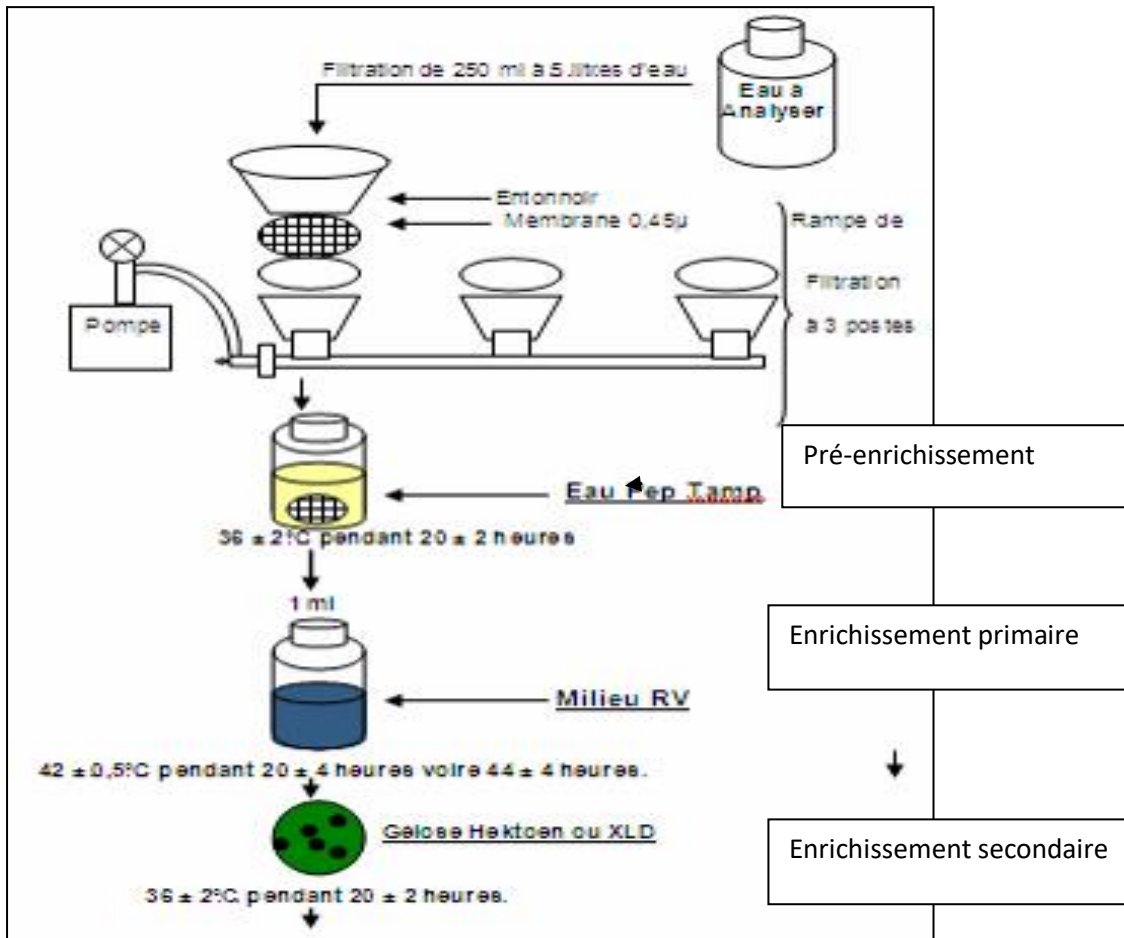


Figure 20. Méthode de recherche des salmonelles.

**Lecture et interprétation :**

- Repérer les colonies caractéristiques.
- Faire une identification biochimique basée essentiellement sur ONPG, TSI, Urée - Indole, LDC...
- Si nécessaire faire une identification antigénique basée essentiellement sur l'agglutination à l'aide des sérums de groupe OMA et OMB ou bien s'adresser au laboratoire de référence.

**4.2 Recherche de *Vibrio cholirérique* :**

**Définition :**

- Les Vibrionaceae sont :
  - ✓ Bacille Gram négatif droits ou incurvés,
  - ✓ Très mobiles,
  - ✓ Oxydase (+),
  - ✓ AAF,

- ✓ Fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S, Hautement pathogènes.

**Méthode recherche :** (voir schémas)

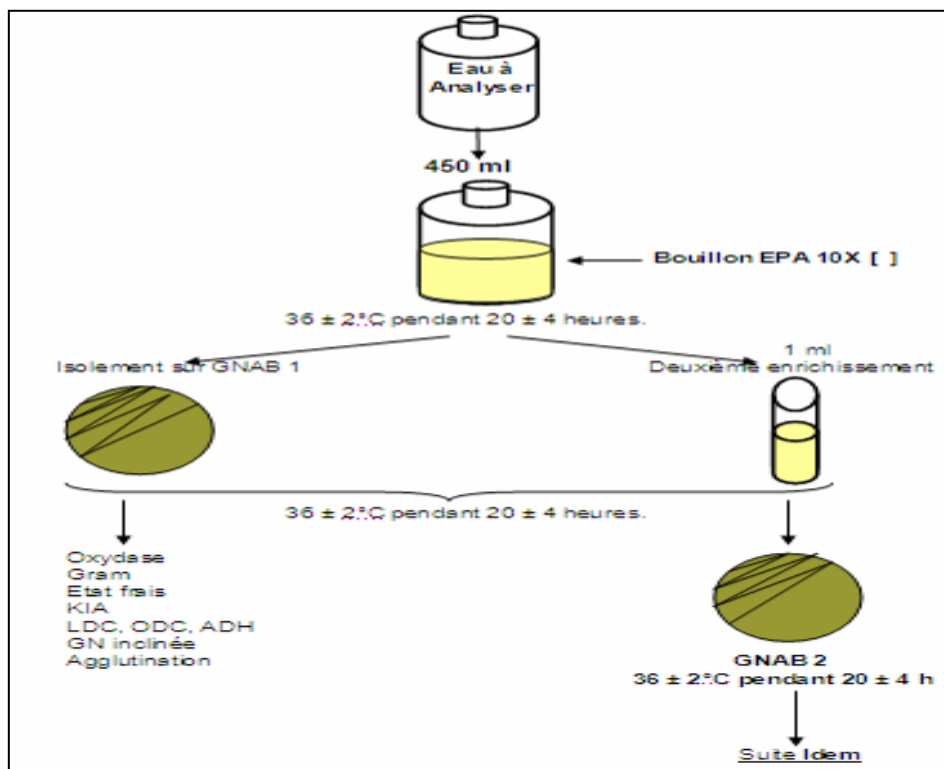


Figure 21. Méthode de recherche de *Vibrio cholérique*.

#### 4.3 Recherche de Staphylocoques à coagulase positive :

##### Définition :

On entend par Staphylocoques à coagulase (+):

- ✓ Cocci à Gram (+)
- ✓ Isolées ou en grappes de raisin,
- ✓ Catalase (+) et coagulase (+)
- ✓ (x) en 24 à 48 h à 36 ± 2°C sur un milieu sélectif Chapman au mannitol.

L'espèce type du genre est *Staphylococcus aureus*. Elle est pathogène et très redoutée.

**Méthode de recherche :** (voir schémas)

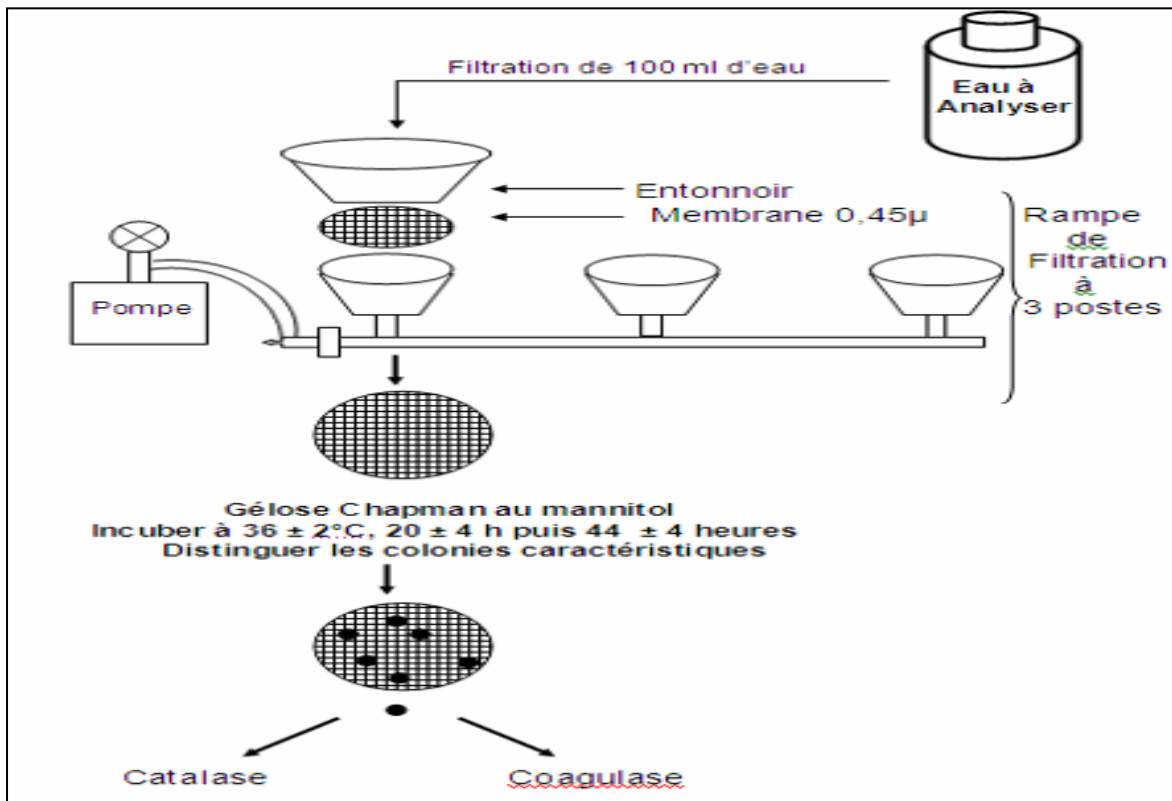


Figure 22. Méthode de recherche de *Staphylocoques* à coagulase positive.

#### 4. 4 Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

##### Définition :

*Pseudomonas aeruginosa* est:

- ✓ Un bacille Gram négatif
- ✓ Oxydase (+)
- ✓ Capable de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide.

*Pseudomonas aeruginosa*, est également une bactérie hautement pathogène et résistante à plusieurs antibiotiques.

Méthode de recherche : (voir schémas)

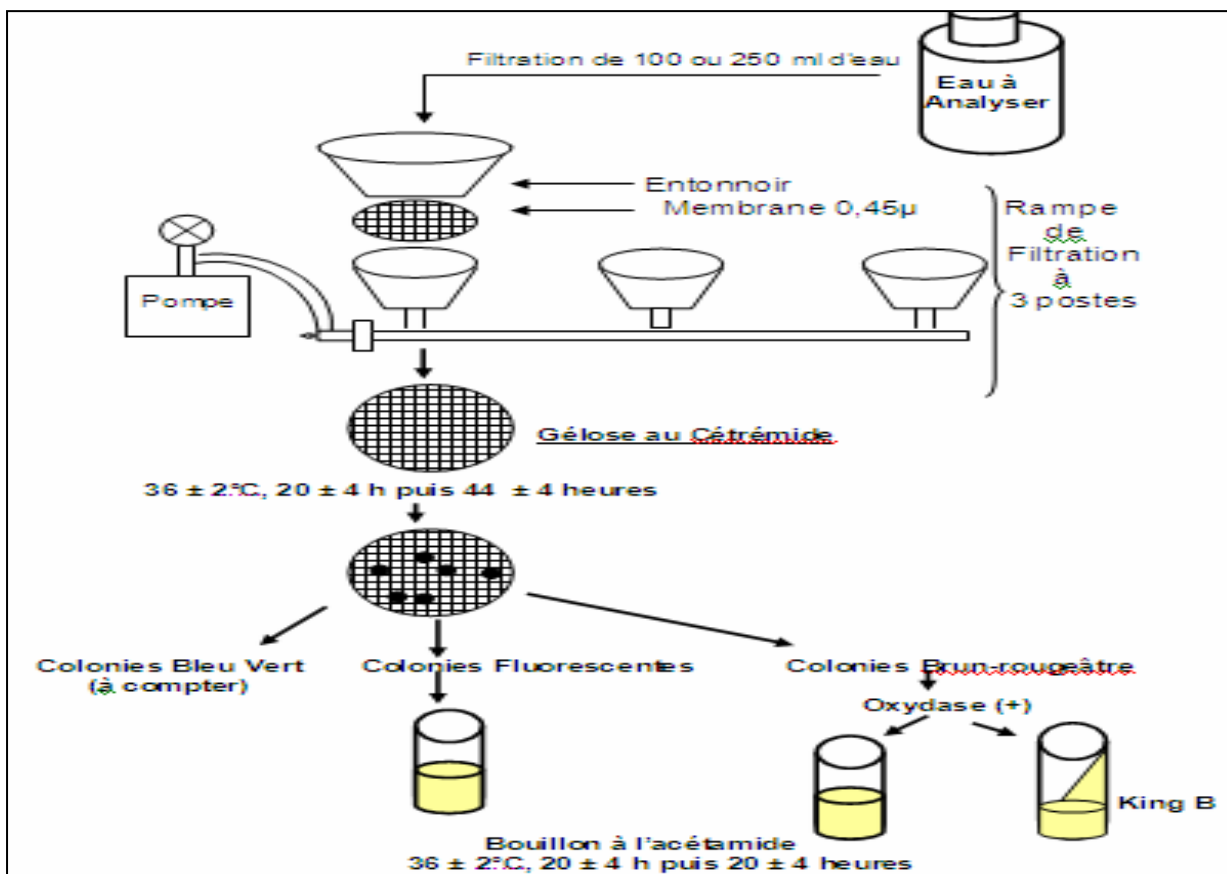


Figure 23. Méthode de recherche de *Pseudomonas aeruginosa* .

## 5. isolement et identification des microorganismes pathogènes :

### 5.1. Principe :

Les milieux utilisés afin d'isoler les microorganismes sont la gélose nutritive qui est un milieu ordinaire permettant à la culture de la majorité des bactéries. Aussi nous avons utilisé la gélose de Mac Conkey qui est un milieu différentiel utilisé pour la détection des coliformes et des Entérobactéries pathogènes et dont elle permet leur croissance. Le développement des bactéries n'appartenant pas à la famille des Entérobactéries est inhibé par les sels biliaires. Elle est utilisée pour séparer les Entérobactéries fermentant le lactose (Lac+) de celles ne le fermentant pas (Lac-).

La fermentation du lactose conduit à la production des acides qui affectent l'indicateur de pH présent dans ce milieu avec l'apparition d'un halo (sels biliaires). Les bactéries (Lac+) donnent des colonies rouges tandis que les bactéries (Lac-) forment des colonies incolores.

Enfin, nous avons utilisé la gélose de Chapman qui est un milieu sélectif pour isoler les staphylocoques et empêcher la croissance des germes Gram négatif.

### **5.2. Procédure :**

On stérilement prélevé avec une anse de platine un inoculum de l'échantillon bien homogénéisé puis nous avonsensemencé par la méthode des stries les géloses suivants (gélose nutritive, Mac Conkey et Chapman) et incubé à 37°C pendant 24 heures.

### **5.3. Isolement et purification des souches fermentant le lactose (Lac+) :**

Sur les trois géloses mises en culture, nous avons choisi les colonies suspectes ou désirées et les repiqué dans de nouvelles boîtes gélosés afin de vérifier la pureté des souches. Le repiquage sur milieu Mac Conkey permet aussi de vérifier si la fermentation du lactose est effective ou non. Ces milieux gélosés sontensemencés en surface par stries et incubés à 37°C pendant 24 heures.

### **5.4. Identification :**

#### **5.4.1. Caractéristiques morphologiques :**

Dans les conditions données, chaque espèce bactérienne développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristiques

Nous avons noté pour chaque type des colonies distinctes les caractères suivants (contour, élévation, couleur, surface).

#### **5.4.2. La coloration de Gram :**

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement des bactéries. Sur des lames dégraissées et à partir de chaque milieu d'isolement, nous avons prélevé par l'anse de platine une colonie bactérienne et l'étalé sur une goutte d'eau physiologique déposée sur la lame que nous avons laissé sécher à l'air libre puis fixé par simple passage sur la flamme de bec Bunsen.

Chaque frotti fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par la solution de Lugol et de nouveau rincé rapidement.

Nous soumettons alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'alcool. C'est l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant une à trois secondes. Celui-ci est alors rincé immédiatement à l'eau courante. À ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes. Nous soumettons ensuite le frottis à une courte coloration de trente secondes à la fushine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes. Après un bref rinçage, nous séchons le frottis avec du papier buvard et nous examinons à l'objectif à immersion×100.

Nous avons appliqué la coloration de Gram pour toutes nos cultures.

#### ***Expression des résultats :***

Les bactéries « **Gram positif** »: qui gardent leur coloration violette après décoloration par l'alcool.

Les bactéries « **Gram négatif** »: qui, décolorées par l'alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses ou rouges.

#### ***5.4.3. Identification biochimique :***

Seules les colonies qui sont apparues sur Mac Conkey ont été identifiées biochimiquement. Ces colonies sont conservées sur gélose inclinée avant d'être identifiées.

##### ***5.4.3.1. Galeries biochimiques classiques pour les coliformes :***

###### ***5.4.3.1.1. Test du mannitol- mobilité :***

###### ***❖ Principe :***

Le milieu utilisé est celui du mannitol -mobilité. Ce milieu faiblement gélosé en culot met en évidence la fermentation du mannitol par certaines bactéries qui entraînent l'acidification du milieu, indiqué par le virage d'un indicateur coloré de pH, le rouge de phénol devient jaune à pH acide et rose à pH alcalin.

Ce milieu permet simultanément d'établir la mobilité éventuelle des bactéries matérialisée lors par leur diffusion autour de la piqûre centrale d'ensemencement du milieu.

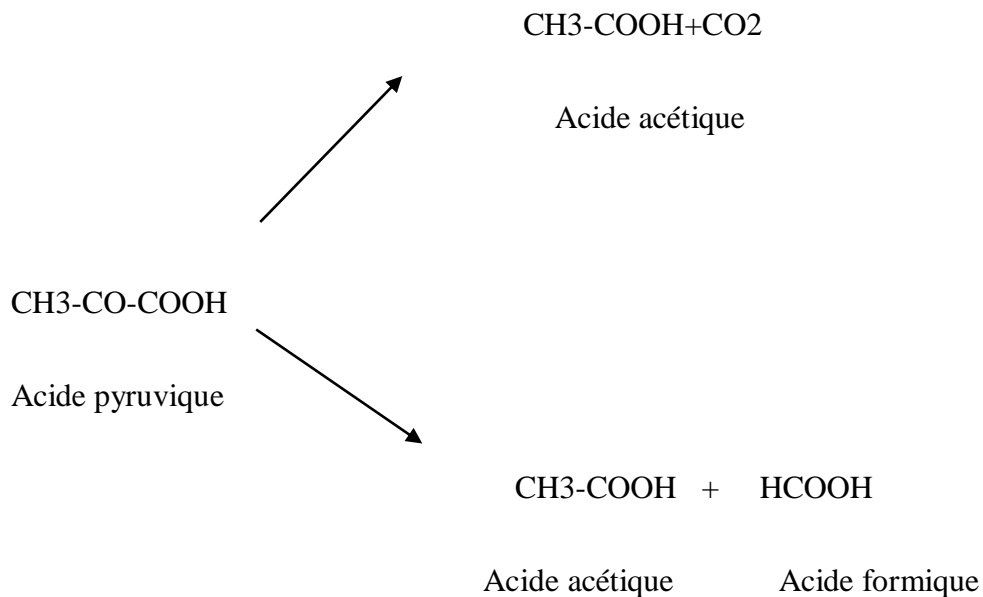
❖ **Procédure :**

Ensemencer le milieu par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine pointue à partir des boîtes d'isolement et incubé à 37°C pendant 24 heures.

**5.4.3.1.2. Test au rouge de méthyle (RM) :**

❖ **Principe :**

C'est un test qualitatif qui permet de distinguer les Entérobactéries productrices de fortes concentrations d'acides (RM+) des bactéries faiblement productrices (RM-), par l'acidification finale d'un milieu peptoné tamponné au phosphate après fermentation du lactose. Le rouge de méthyle est l'indicateur de cette acidification, il vire au jaune à un pH>6.3 et au rouge à un pH<4.2.



❖ **Procédure :**

La réaction est étudiée dans le bouillon Clark et Lubs qui permet de mettre en évidence cette caractéristique. L'ensemencement se fait par inoculation à partir de boîtes de repiquages et l'incubation se fait dans les conditions habituelles. Après incubation, ajouter une à deux gouttes de rouge de méthyle. La réaction est instantanée.

**5.4.3.1.3. Le test de Voges-Prauskauer (VP) :**

❖ **Principe :**

Ce test détecte la capacité de synthèse de l'acétoïne par un microorganisme, (acétyl méthyle carbino) qui est un métabolite spécifique intermédiaire de la fermentation butandiolique (VP+), elle-même caractéristique de certaines Entérobactéries.

Dans un milieu bien aéré et fortement alcalinisé (par addition de NaOH), il se produit une auto oxydation de butanediol en acétoïne et en diacétyl.

L'acétoïne réagit avec le réactif VPI (soude au potasse) pour former le diacétyl ; ce dernier après addition du VPII va réagir avec le groupe guanidine de l'arginine pour former un complexe coloré en rose.

❖ **Procédure :**

Nous avons ensemencé le milieu Clark et Lubs et incubé à 37°C pendant 24 heures, puis ajouter 1 ml de la solution potasse à 16% et 0.5 ml d' $\alpha$  naphthol. Maintenir le tube couché pour favoriser l'oxydation. L'apparition de la couleur rose ou rouge au bout de 30 minutes traduit une réaction dite VP+.

**5.4.3.1.4. Le test de décarboxylase :**

❖ **Principe :**

Ce test permet de détecter la production d'enzymes de décarboxylase : la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'arginine deshydrolase qui décarboxylent respectivement la lysine, l'ornithine et l'arginine en cadaverine, putrescine et agmatine par ordre successif (Singleton, 1999).

❖ **Procédure :**

Nous avons ensemencé trois tubes contenant chacun un des trois acides aminés dissous dans du bouillon de Moeller (glucose - peptone) par le germe étudié et incubé à 37°C pendant 24 heures.

Initialement, les bactéries métabolisent en priorité le glucose, le milieu est alors acidifié et vire au jaune grâce au virage d'un indicateur de pH. Si les acides aminés sont à leur tour décarboxylés, le milieu est alors alcalinisé et devient pourpre.

**5.4.3.1.5. Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI :**

❖ **Principe :**

Le milieu TSI est utilisé pour l'identification rapide des Entérobactéries et qui permet de mettre en évidence la dégradation du glucose, du lactose, du saccharose, la production éventuelle du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et la production de gaz (CO<sub>2</sub>).

Ce milieu est composé d'un culot et une pente, et contient le rouge de méthyle comme un indicateur de pH.

Si les bactéries utilisent le glucose, le culot se colore en jaune, alors que si elles utilisent le saccharose et le lactose c'est la pente qui se colore en jaune. La production du gaz se traduit par la formation de bulles de gaz ou soulèvement de la gélose alors que la production d'H<sub>2</sub>S se traduit par un noircissement du milieu.

❖ **Procédure :**

Nous avonsensemencé le milieu TSI à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. Nous avons incubé les tubesensemencés à 37°C pendant 24 heures. La lecture est réalisée après 24 heures.

**5.4.3.1.6. Le test de l'uréase :**

❖ **Principe :**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO en dioxyde de carbone et ammoniac qui se lient entre eux pour donner le complexe du carbonate d'ammonium (composé alcalin).

Le milieu urée -indole permet de mettre en évidence ce caractère dont le virage de l'indicateur au rouge violacé en raison de l'alcalinisation du milieu indique l'utilisation de l'urée par la bactérie.

❖ **Procédure :**

Nous avonsensemencé 2 ml du milieu urée –indole par l'anse de platine stérile et incubé à 37°C pendant 24 heures.

**5.4.3.1.7. Le test de l'indole :**

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seules les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole. Ce dernier va réagir avec le réactif de Kowacs (acide nitrique nitreux) pour former un anneau rouge surnageant (nitrose indole).

❖ **Procédure :**

Nous avonsensemencé 2 ml du milieu urée –indole et incubé à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, nous avons ajouté deux gouttes du réactif Kowacs en assurant une légère agitation des tubes.

**5.4.3.1.8. Le test de réduction du nitrate :**

❖ **Principe :**

Ce test permet de détecter si un organisme possède le nitrate réductase qui est une enzyme capable de réduire le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ).

❖ **Procédure :**

L'ensemencement du bouillon nitraté permet de mettre en évidence, ce caractère par le germe étudié et incubé à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, nous avons ajouté deux gouttes du réactif nitrate réductase I (solution naphтол à 6% dans l'alcool à 60%) et deux gouttes du réactif nitrate réductase II.

Si le milieu devient rose ou rouge, la réaction est dite nitrate réductase positive.

Si le milieu reste incolore, on a deux éventualités :

- ❖ Les nitrates ont d'abord été réduits en nitrites mais la réduction s'est poursuivie.
- ❖ Ou les nitrates n'ont pas été réduits en nitrites et se trouvent donc dans le bouillon nitrate.

Dans ce dernier cas, nous provoquons la réduction chimique en ajoutant de la poudre de zinc si la couleur apparaîtra, la bactérie est dite nitrate réductase négative.

#### **5.4.3.1.9. La recherche du citrate perméase :**

❖ **Principe :**

Ce test permet d'établir l'utilisation du citrate comme seule source de carbone par la bactérie qui possède l'enzyme citrate perméase, en provoquant l'alcalinisation du milieu utilisé.

Le milieu citrate de Simmons permet de mettre en évidence ce caractère, ainsi qu'il possède un indicateur de pH « le bleu de bromothymol » dont il vire vers la couleur verte (à pH acide) et en bleue (à pH alcalin).

❖ **Procédure :**

On ensemence le milieu citrate de Simmons par des stries longitudinales de bas en haut et incubé à 37°C pendant 24 heures.

#### **5.4.3.1.10. La recherche de l'enzyme tryptophane désaminase (TDA) :**

❖ **Principe :**

L'enzyme TDA agit sur l'acide aminé tryptophane en formant l'acide indole pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brun rouge.

❖ **Procédure :**

Nous avons ensemencé 2ml du milieu urée –indole et incubé à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, nous avons ajouté deux gouttes du réactif TDA (perchlorure de fer).

**5.4.3.1.11. La recherche de l'enzyme B -galactosidase :**

❖ **Principe :**

Cette enzyme permet de scinder la molécule du lactose après leur pénétration dans la cellule bactérienne en glucose et galactose.

La présence de la galactosidase est mise en évidence à l'aide d'un analogue structural du lactose, l'ONPG (orthonitrophényl B-D-galactoside) qui diffuse librement à l'intérieur des bactéries ou il est alors dégradé par B -galactosidase en galactose et en orthonitrophénol. Ce dernier donne une couleur en jaune citron lors de sa libération dans le milieu (réaction positive).

❖ **Procédure :**

Nous avons préparé une suspension dense d'une culture de la bactérie étudiée dans 0.25 ml d'eau physiologique, et ajouté un disque ONPG pasteur. L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures.

**5.4.3.1.12. La recherche du catalase :**

❖ **Principe :**

C'est une enzyme qui élimine de sa formation chez les bactéries, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en l'hydrolysant en eau oxygénée. C'est un test important pour différencier les staphylocoques des streptocoques.

Les staphylocoques donnent des réactions positives alors que les autres donnent des réactions négatives.

❖ **Procédure :**

Sur une lame, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et nous avons ajouté la colonie étudiée. S'il y a dégagement gazeux (O<sub>2</sub>), le test est considéré comme positif.

**5.4.3.1.13. La recherche de l'oxydase :**

❖ **Principe :**

Ce test permet de mettre en évidence l'existence du cytochrome oxydase, enzyme caractéristique d'un métabolisme respiratoire aérobie spécifique de la réduction de l'oxygène moléculaire.

La présence de cette enzyme est réalisée par le disque oxydase qui se constitue de l'oxalate de diméthyle puruphénylène diamine et qui est incolore à l'état réduit et colore en rouge à l'état oxydé.

❖ **Procédure :**

Sur une lame propre, nous avons déposé un disque oxydase que nous avons imbibé d'eau distillée stérile et ajouté la colonie de bactérie à étudier puis étalé à l'aide d'une anse de platine. Les bactéries oxydases positives donnent une coloration violette au disque en quelques minutes.

**5.4.3.2. Galeries d'API 20 E :**

❖ **Principe :**

C'est une galerie multi-tests, formée d'une vingtaine de cupules, contenant chacune un milieu de culture spécifique déshydraté, correspondant à l'identification d'un caractère métabolique. Il permet en totalité d'étudier ces caractères biochimiques avec plus de fidélité.

Le principe d'utilisation repose sur la comparaison de profils biochimiques d'espèces préalablement établis et répertoires.

Avec cette galerie plus performante, l'identification est considérée comme acceptable au delà d'un degré de probabilité de 80% et une signification statistique d'autant plus grande que l'on se rapproche des 100% .

❖ **Procédure :**

Nous avons bien isolé deux bactéries (Lac +) à étudier sur le milieu Mac Conkey pour les Entérobactéries, puis reconstitué selon les indication du catalogue les différents micro-

tubes de la galerie par la suspension bactérienne préparée dans l'eau physiologique qui sert à la fois d'inoculum et d'agent de réhydratation du milieu.

Après incubation pendant 24 heures, le test positif se manifeste par une coloration directe ou après ajout du réactif correspondant.

Reporter sur la fiche d'identification tous les résultats spontanés. Vérifier si le test glucose est positif et/ou si trois tests ou plus sont positifs. Révéler les tests nécessitant l'addition ou l'ajout de réactifs.

Le test VP : la lecture se fait 10mn après de l'addition d'une goutte de réactifs VP1 et VP2.

Le test TDA : la lecture se fait immédiatement après l'ajout de réactif TDA.

Le test IND : la lecture se fait 2mn après de l'addition d'une goutte de réactif de Kowacs. La non formation d'anneau rouge indique une réaction négative.

Imprimez la fiche de lecture API 20 E, traduisez les résultats de chaque caractère par (+ ou -), les réunir en un profil numérique de 07 chiffres qui sera ensuite identifié à l'aide du catalogue API20E.

#### ❖ *Milieux utilisés*

On étudie les différents milieux utilisés dans l'ordre où ils sont placés sur la galerie.

► Tout d'abord étudions le milieu ONPG, celui-ci permet, lorsque la bactérie est lactose-, de trouver s'il y a présence d'une  $\beta$ - galactosidase que l'on reconnaît grâce à la coloration en jaune du milieu.

► Puis les milieux de Moëller (LDC=lysine décarboxylase qui transforme la lysine en une amine primaire et une cadavérine; ODC=ornithine décarboxylase qui transforme l'ornithine en une amine basique, la putrescine; ADH=arginine dihydrolase transforme l'arginine en ornithine, ammonium et gaz carbonique ce qui provoque une augmentation du pH). Ceux-ci permettent de montrer la présence de ces enzymes par la mise en évidence de l'acidification du milieu et sa réalcalinisation éventuelle.

► Le milieu Citrate permet de chercher la présence d'une citrate perméase mise en évidence par l'alcalinisation du milieu.

- ▶ Le milieu H<sub>2</sub>S devient noir s'il y a production de sulfure d'hydrogène.
- ▶ Le milieu TDA (Tryptophane désaminase) permet de montrer la présence de cette enzyme.
- ▶ Le milieu indole se fait, tout comme le milieu TDA, à partir du milieu uréase. Il permet de faire la recherche de l'indole.
- ▶ Le test VP (Voges-Proskauer) se fait sur un milieu Clark et LUBs et met en évidence la production d'acétoïne.
- ▶ Le milieu Gélatine met en évidence la gélatinase grâce à la coloration obtenue. ▶ Les milieux Hugh & Leifson permettent de trouver la voie d'attaque des glucides (fermentative, oxydative ou les deux). Le milieu Mannitol permet de voir s'il y a dégradation du mannitol.
- ▶ Enfin on a 8 milieux contenant des glucides à une concentration égale à 1g.L<sup>-1</sup> :

Man=Mannose

Ino=Inositol

Sor=Sorbitol

Rha=Rhamnose

Sac=Saccharose

Mel=Melibiose

Amy=Amygdaline

Ara=Arabinose



**Figure 24. Galerie avant incubation.**

Naturellement, des microorganismes peuvent se retrouver dans l'eau, comme des bactéries, de virus, des protozoaires. La qualité microbiologique de l'eau est évaluée en mesurant la présence de bactéries indicatrices de contamination fécale (entérocoques, *E. Coli*, coliformes). Dans les eaux de surface, elles sont naturellement présentes en plus grand nombre que dans les eaux souterraines. La législation actuelle impose l'absence de ces bactéries indicatrices dans l'eau potable, ce qui nécessite des traitements de désinfection.

Au terme de ce travail, deux conclusions essentielles peuvent être formulées. La première a trait à l'apport de connaissances théoriques concernant le monde microbien. La seconde a trait à l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau et d'identification des différents germes responsables de cette pollution aquatique.

**Adjanohoun, A., Baba-Moussa, L.S., Dagbénonbakin, G., Saïdou, A & Toukourou, F. (2017).** *Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole : Manuel de l'apprenant.* Bibliothèque Nationale (BN) du Bénin.

**Aouissi, A. (2009).** *Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie)* (Doctoral dissertation, Université 8 mai 1945 de Guelma).

**Boubendir, A. (2014).** *Polycopié Cours de Microbiologie Alimentaire.*

**Boussebouaa, H. (2002).** *Elément de microbiologie générale.* Campus-Club (2ème Edition), Algérie,

**Drapeau, A. J., Jankovic, S & World Health Organization. (1977).** *Manuel de microbiologie de l'environnement.* Genève: Organisation mondiale de la Santé.

**FUNASA. (2013).** *Manuel Pratique D'analyse De L'eau.* Fondation Nationale de la Santé, Brasilia (4ème édition). Brésil.

**Haichour, N.(2019).** *Cours Techniques de Contrôle Microbiologique*

**Landereau, A., Sauter, M. (1983).** *Eléments de microbiologie des eaux.* BRGM. Orieans Cedex.

**Leclerc, H. (2002).** « Microbiologic agents associated with waterbones diseases. *Critical review in microbiology*, 28(4), 371-409. DOI: [10.1080/1040-840291046768](https://doi.org/10.1080/1040-840291046768)

**Marchand, G., Barrette, M-C., Lesage, J & Larue, M. (2009).** *Méthode 343 - Méthode d'échantillonnage et d'identification de bactéries et de moisissures par la méthode de prélèvements de surface.* IRSST.

**Mezaache-Aichour, S., ARIF, F. (2017).** *Polycopié de microbiologie environnementale.*

**Naimi, M. (2018).** *Cahier technique-2: Techniques de contrôle microbiologiques.*

**Prescott., Harley & Klein. (1995).** *Les microorganismes et l'environnement. Dixième partie.* In : *Microbiologie.* DeBoeck Wesmael S.A. Second édition. Bruxelles.

**Rahmani, S. (2019).** *Polycopié de cours de Microbiologie Générale.*

**Rodier, J., Legube, B & Merlet, N. (2016).** *L'analyse de l'eau-10e éd.* Dunod.

- (1) Joyard, J. (2021). *Qu'est-ce que la biodiversité*. Sur : <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/quest-ce-que-la-biodiversite/>. Consulté le 8/8/2021.
- (2) *Structure des micro-organismes*. Sur : <http://mybiodoc.blogspot.com/2013/03/structure-des-micro-organismes.html>. Consulté le 8/8/2021.

*Annexe 1*

<b>Paramètres microbiologiques</b>	<b>Concentration maximale admissible eau désinfectée</b>
Germes aérobies revivifiables à 37°C, 24h LJFC/ml	(10)
Germes aérobies revivifiables à 22°C, 72h UFC/ml	(100)
Coliformes totaux / 100 ml,	0 dans 95 % des cas
Coliformes fécaux / 100 mL	0
Streptocoques fécaux / 100 mL	0
Clostridium sulfite-réducteurs / 20mL	1
Salmonelles / 100mL	0
Staphylocoques pathogènes / 100mL	0
Bactériophages fécaux / 100mL	0

## Annexe 2

Maladies	Agents
<b>Origine bactérienne</b> Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes Dysenteries bacillaires Choléra Gastro-entérites aiguës et diarrhées Pneumonies	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi A et B</i> <i>Shigella</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène <i>Campilobacter jejuni / coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella SP.</i> <i>Legionella pneumophila</i>
<b>Origine virale</b> Hépatite A et E Poliomyélite Gastro-entérites aiguës et diarrhées	Virus hépatites A et E Virus poliomyélitique Virus de Norwalk Rotavirus Astrovirus Calicivirus Coronavirus Entérovirus Adénovirus Réovirus
<b>Origine parasitaire</b> Dysenteries amibiennes Gastro-entérites	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i>

### Annexe 3

Tableau 2 – Classification des entérobactéries coliformes rencontrées en hygiène et en santé publique (HASLAY C. et LECLERC H., <i>Microbiologie des eaux d'alimentation, Technique et documentation</i> 1993)		
Coliformes d'origine fécale	Coliformes d'origine aquatique ou tellurique	Coliformes isolés en clinique : coloniseurs ou pathogènes opportunistes
<i>Escherichia</i> <i>E. coli</i>		<i>E. fergusonii</i> <i>E. hermanii</i> <i>E. vulneris</i>
<i>Citrobacter</i> <i>C. freundii</i> <i>C. koseri</i> <i>C. amalonaticus</i>		
<i>Enterobacter</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i>	<i>E. amnigenus</i> <i>E. dissolvens</i> <i>E. intermedius</i> <i>E. nimipressularis</i>	<i>E. asburiae</i> <i>E. gergoviae</i> <i>E. hormaechei</i> <i>E. sakazakii</i> <i>E. taylorae</i>
<i>Klebsiella</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. planticola</i> <i>K. terrigena</i>	<i>K. ornithinolytica</i> <i>K. ozenae</i>
<i>Salmonella</i> sous-espèce 3a* sous-espèce 3b*		
<i>Shigella sonnei</i> *		
<i>Yersinia</i> <i>Y. enterocolitica</i> *	<i>Y. aldovae</i> <i>Y. bercovieri</i> <i>Y. frederiksenii</i> <i>Y. intermedia</i> <i>Y. kristensenii</i> <i>Y. mollareti</i> <i>Y. rohdei</i>	
<i>Serratia</i>	<i>S. fonticola</i> <i>S. grimesii</i> <i>S. liquefaciens</i> <i>S. plymuthica</i> <i>S. proteamaculans</i> <i>S. rubidea</i>	<i>S. marcescens</i> <i>S. odorifera</i>
	<i>Budvicia aquatica</i> <i>Buttiauxella agrestis</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>P. dispersa</i> <i>Rahnella aquatilis</i> <i>Trabulsiella guamensis</i>	<i>Ewingella americana</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>K. cryocrescens</i> <i>Koserella trabulsii</i>
Thermotrophes ou thermotolérants**	Psychrotrophes ou psychrotolérants	Mésophiles ou thermotrophes ou psychrotrophes

Les *Salmonella* sous-espèces 3a et 3b (Arizonae), *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica* (certains sérotypes sont des pathogènes spécifiques), *Yersinia enterocolitica* (sérotypes adaptés O3, O9) est psychrotrophe mais il se développe aussi aux températures élevées (+ 42 °C).

**Annexe 4**

**Les milieux de culture**

<b>LIQUIDES</b>	<b>Bouillon lactosé bilié au vert brillant + cloche BLBVB</b>	<b>Bouillon lactosé au BCP + cloche simple concentration</b>	<b>Bouillon lactosé au BCP + cloche double concentration</b>
Peptone	10	5	10
Extrait de viande		5	10
Lactose	10	5	10
Désoxycholate de sodium	présence <sup>(1)</sup>		
Vert brillant	0,013 g		
pH final	7,4	BCP : 25 mg 6,9	BCP : 50 mg 6,9
qsp	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>

<b>SOLIDES</b>	<b>Gélose au désoxycholate 0,1 %</b>	<b>Gélose VRBL</b>
Peptone	10 g	7 g
Extrait de viande		3 g
Extrait de levure		
Lactose	10 g	10 g
Saccharose		
Citrate de sodium	1 g	
Citrate de fer III	selon le fabricant <sup>(2)</sup>	
Désoxycholate de sodium	1 g	1,5 g
Cristal violet		2 mg
Tergitol 7		
Éosine		
Bleu de méthylène		
TTC		
pH final	RN : 30 mg 7,3	RN : 30 mg 6,8
Na Cl	5	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	
	15	15
qsp	1 dm <sup>3</sup>	1 dm <sup>3</sup>