

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC OF ALGERIA

Ministry of Higher Education
and Scientific Research

M'hamed Bougara University
Boumerdes



وزارة التعليم العالي
والبحوث العلمي

جامعة امحمد بوقرة
بومرداس

كلية التكنوأوجيا

Faculty of Technology

Département : Génie des procédés

Polycopié Pédagogique

TITRE DU POLYCOPIE

MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Cours et Travaux Pratiques, destiné aux étudiants de :

Première année **master** en ingénierie et gestion de l'eau

Réalisé par

Dr BOUMECHHOUR Fatima

Année Universitaire : 2025/2026

Avant-propos

Le présent cours s'adresse aux étudiants en première année master en ingénierie et gestion de l'eau. Il couvre en deux parties le cours et les travaux pratiques de la microbiologie générale et appliquée.

La première partie de cours comporte 9 chapitres dont 4 relatifs à la microbiologie générale et 5 chapitres traitent la biodégradation de différents composés (polysaccharides, produits aromatiques, protéine et lipides), les méthodes de bioremédiation, le traitement biologique des eaux usées ainsi que l'analyse microbiologique de l'eau.

La deuxième partie est constituée de 8 travaux pratiques. Les trois premiers traitent les aspects de la microbiologie générale (Présentation et conception d'un laboratoire de microbiologie, microscopie et ensemencement). Les autres chapitres consistent à illustrer les méthodes utilisées pour le contrôle de l'environnement et l'analyse microbiologique de l'eau.

Table des matières

Chapitre 1 : Le monde microbien	1
1. Généralités	1
2. Historique de la microbiologie	1
3. Place des microorganismes dans le monde vivant	1
Chapitre 2 : Activité biochimique des microorganismes	4
1. Cycle du carbone, cycle de l'azote, cycle du soufre, cycle du fer	4
2. La dégradation des matériaux cas particulier de la biocorrosion	9
Chapitre 3 : les microorganismes eucaryotes	11
1. Champignons	11
2. Protozoaires	14
3. Algues	15
Chapitre 4 : les virus	16
1. Définition	16
2. Structure	16
3. Agents antiviraux	18
Chapitre 5 : Microorganismes procaryotes	19
1. La cellule bactérienne, structure et fonction des constituants de la cellule bactérienne	19
2. Nutrition bactérienne, conditions physico-chimiques	26
3. Chimiotrophie, phototrophie, auto et hétérotrophie	28
4. Croissance bactérienne, moyens d'étude, paramètres cinétiques	29
Chapitre 6 : Les biofilms	36
1. Métabolisme bactérien	36
2. Etapes de formation d'un biofilm, conditions de développement d'un biofilm	40
3. Effet des biofilms sur les milieux	41
4. Microbiologie de l'eau, étude de quelques microorganismes dans les eaux de surface, eaux souterraines et dans les eaux de distribution	42

5. <i>Microbiologie du sol, Microflore du sol</i>	46
6. <i>Eaux usées</i>	47
Chapitre 7 : Les agents anti-microbiens	50
1. <i>Agents d'élimination</i>	50
2. <i>Agents physiques de stabilisation ou de destruction</i>	50
3. <i>Agents chimiques pour la stabilisation et la destruction</i>	52
TP N° 1 – Présentation du laboratoire de microbiologie, matériel et règles à suivre durant les travaux pratiques de microbiologie	56
1. <i>Objectifs :</i>	56
2. <i>Visite des locaux :</i>	56
3. <i>Présentation d'un poste de travail :</i>	56
4. <i>Les consignes de sécurité :</i>	57
5. <i>Conseils généraux</i>	58
TP N°2 - L'examen microscopique des bactéries à l'état frais	60
1. <i>Objectifs :</i>	60
2. <i>Le microscope</i>	60
3. <i>Examen à l'état frais</i>	63
TP N° 3 - Techniques d'ensemencement	65
1. <i>Objectifs :</i>	65
2. <i>Ensemencement d'un bouillon</i>	65
3. <i>Technique du transfert à l'öse</i>	66
TP N° 4 -Contrôle de l'environnement (surface, Air et eaux)	68
1- <i>Contrôle de surface</i>	68
2. <i>Contrôle de l'air</i>	71
3. <i>Contrôle de l'eau</i>	74
TP5 : Recherche et dénombrement des germes revivifiables	79
1. <i>Incubation</i>	79
2. <i>Lecture</i>	80
3. <i>Dénombrement</i>	80

TP6 : Colimétrie. Recherche et dénombrement des Coliformes en milieux	82
liquides	82
<i>1. Technique en milieu liquide sur BCPL</i>	82
Colimétrie : test de confirmation	89
89	
TP7 : Streptometrie, Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieux	
liquides 90	
<i>1. Méthode de recherche en milieu liquide</i>	90
Streptometrie : test de présomption	95
Streptometrie : test de confirmation	95
Streptometrie : test de confirmation	96
96	
TP 8 : Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobies	97
Sulfito-Réducteurs	97
<i>1. Mode opératoire</i>	97
<i>2. Lecture</i>	98
<i>3. Interprétation des résultats.</i>	98
Références bibliographiques	99
Annexe : Table NPP	101

Chapitre 1 : Le monde microbien

1. Généralités

La microbiologie est la science des formes de vies microscopiques. Cette définition englobe de nombreux êtres vivants nommés micro-organismes : protozoaires, champignons microscopiques, bactéries, algues.

L'étude des micro-organismes a apporté beaucoup à la compréhension des phénomènes du monde vivant et de l'origine de la vie. Ces dernières années, ils sont devenus des outils indispensables à la recherche en biologie fondamentale. Les microorganismes sont également très étudiés pour leur place et leurs rôles dans l'environnement et en agriculture. Ils interviennent dans les processus de fertilisation des sols et dans tous les cycles biologiques. Depuis longtemps, ils sont utilisés dans les procédés de conservation des aliments : ils sont à la base de la fabrication des boissons fermentées, des fromages et du pain. Depuis quelques décennies, des micro-organismes souvent génétiquement modifiés sont utilisés pour la synthèse de produits industriels ou de médicaments (hormones, vaccins).

2. Historique de la microbiologie

Les événements les plus marquants de cette histoire sont les suivants :

- XVII^e siècle à Delf : Invention du microscope par Van Leeuwenhoek qui décrivait des formes de vie microscopiques dans l'eau et la salive.
- À la fin du XVIII^e siècle, en Angleterre, Jenner imaginait de prévenir la variole, maladie strictement humaine, en inoculant la vaccine, maladie des bovins, proche de la variole. Il posait ainsi les bases de la vaccination.

3. Place des microorganismes dans le monde vivant

Classification contemporaine

- Les animaux
- Les végétaux
- Les protistes : englobent tous les microorganismes (Figure 1) :



Figure 1 : Protistes

Selon l'organisation cellulaire, les protistes se subdivisent en :

- Protistes supérieurs ou eucaryotes (vrai noyau)
 - Les algues (sauf les algues bleu-vert)
 - Les protozoaires,
 - Les champignons

- Protistes inférieurs ou procaryotes (faux noyau) :
 - Les algues bleu-vert ou Cyanophycées

 - les archéobactéries ou archées sont un groupe particulier, car il ne comprend essentiellement que des espèces anaérobies (n'ayant pas besoin d'oxygène, voire souvent ne tolérant pas l'oxygène), vivant dans des environnements extrêmes : on parle d'organisme extrémophile. Les environnements extrêmes sont à la limite des conditions tolérées par les cellules biologiques (milieu salin très acide ou très alcalin, milieu à température proche de l'ébullition). Les archéobactéries ne sont pas que des extrémophiles, ce sont aussi des organismes plus communs qui vivent dans des conditions de vie classique comme les marais ou les rumens des ruminants. Il ne faut

pas associer systématiquement archéobactéries à des organismes extrêmes même si on retrouve parmi eux la plupart des extrémophiles

-Les eubactéries (ou « vraie-bactérie ») sont les plus proches des bactéries actuelles. On retrouve les eubactéries dans notre quotidien, sol, nourriture, etc. Ce sont les bactéries les plus connues. Cependant certaines eubactéries sont aussi extrémophiles. Elles prennent en compte les bactéries contemporaines, les mycoplasmes et les cyanobactéries.

Chapitre 2 : Activité biochimique des microorganismes

1. Cycle du carbone, cycle de l'azote, cycle du soufre, cycle du fer

1.1. Cycle du carbone

Le cycle du carbone est d'une importance capitale pour la biogéochimie. La vie étant principalement composée de carbone, les estimations de la production et de la destruction mondiales de carbone organique nous donnent un indice global de la santé de la biosphère, passée et présente. L'augmentation des concentrations de dioxyde de carbone et de méthane étant associée au réchauffement climatique par l'effet de serre, le cycle global du carbone est directement lié aux considérations relatives au changement climatique mondial et aux efforts internationaux de lutte contre le réchauffement climatique.

La Terre contient environ 32×10^{23} g de carbone. Environ 7×10^{22} g C se trouvent dans le manteau supérieur. Dans la croûte terrestre, le carbone se trouve dans les roches sédimentaires, où il est contenu dans des composés organiques. On estime que les combustibles fossiles conventionnels contiennent 4×10^{18} g C. La biomasse microbienne vivante est une petite composante du carbone organique sédimentaire, contenant peut-être jusqu'à 100×10^{15} g C (figure 3)

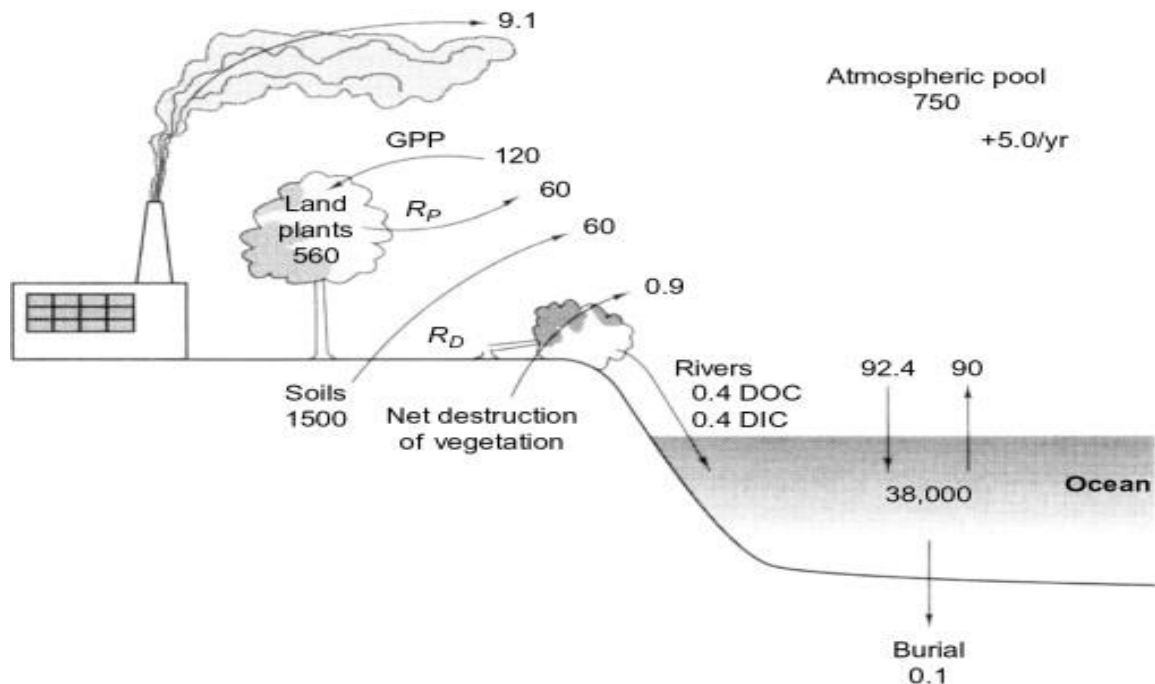


Figure2 : Le cycle global du carbone.

Tous les réservoirs sont exprimés en unités de 10¹⁵ g C et tous les flux annuels en unités de 10¹⁵ g C/an, estimés pour 2010. Cycle du carbone en s'insérant dans l'altération des roches de surface.

1.2. Cycle de l'azote

L'azote (N) est abondant à la surface de la Terre, mais moins de 2 % est disponible pour les organismes.

L'azote subit de nombreuses réactions complexes dans les systèmes aquatiques (figure 2, [Tableau 1](#))

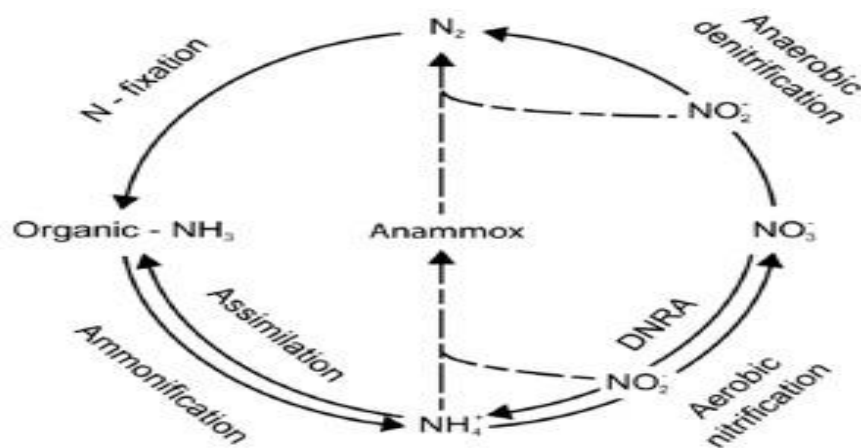


Figure 3 : Cycle simplifié de l'azote illustrant la complexité des transformations de l'azote en eau douce.

NO_3^- est le nitrate, NO_2^- le nitrite, NH_4^+ est l'ammonium, NH_3 est l'ammoniac, N_2 est le diazote et DNRA est la réduction dissimilaire de NO_3^- en NH_4^+ . L'anammox est l'oxydation anaérobie de NH_4^+ .

Tableau 1 : Définition des principales transformations de l'azote et de leur section

Transformations de l'azote	Définition du processus
N-fixation	L'azote atmosphérique est converti par des bactéries ou des cyanobactéries en NH_3
Ammonification (identique à la minéralisation)	Les bactéries convertissent l'azote organique en NH_4^+
Assimilation	Les organismes assimilent le NH_4^+ et le convertissent en azote organique
Nitrification aérobie	Oxydation biologique de NH_4^+ en NO_2^- suivie de l'oxydation de NO_2^- en NO_3^-
Dénitrification anaérobie	Les microbes réduisent finalement le NO_3^- en diazote (N_2) par l'intermédiaire d'une série de produits intermédiaires d'oxyde d'azote gazeux
Réduction dissimilatoire de NO_3^- en NH_4^+ (DNRA ; identique à l'ammonification $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$)	Les microbes oxydent la matière organique et réduisent le NO_3^- en NO_2^- , puis en NH_4^+ dans des conditions anaérobies
Oxydation anaérobie de NH_4^+ (anammox)	Les microbes convertissent le rapport moléculaire 1:1 de NH_4^+ et $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ en diazote en l'absence d'oxygène et sans apport de carbone

1.3. Cycle de soufre

À la surface des continents, le soufre est donc présent sous ces mêmes deux formes majoritaires, à savoir les évaporites de sulfate (gypse, anhydrite) et les pyrites et autres sulfures de fer. On trouve également du soufre réduit, ou du soufre élémentaire, dans les roches basaltiques ou dans les fluides hydrothermaux. Sous l'effet des eaux de surface, les évaporites peuvent se dissoudre, libérant les ions Ca^{2+} et SO_4^{2-} . Ces ions sont ensuite transportés par les rivières jusqu'à l'océan. La pyrite, sous l'effet combiné de l'eau et des conditions oxydantes de la surface terrestre, s'oxyde. Cette réaction produit de l'acide sulfurique, H_2SO_4 , qui, lui aussi, se retrouve dans les eaux de surface.

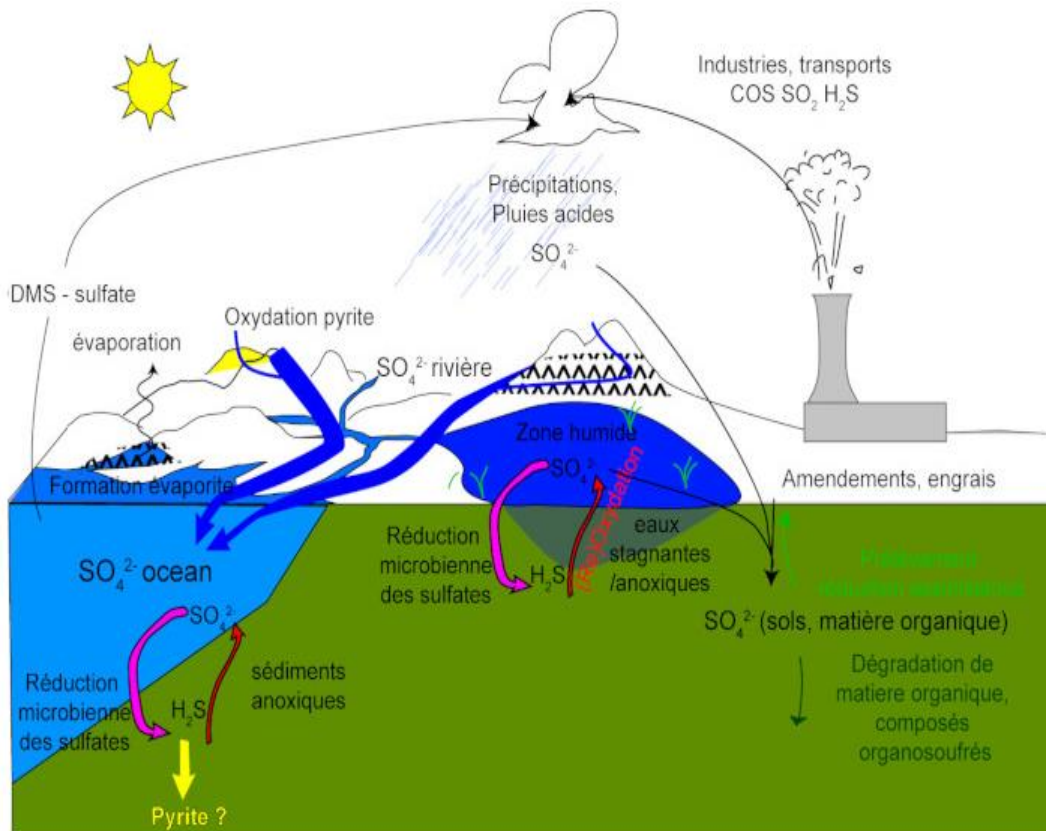


Figure 4 : Cycle du soufre

1.4. Cycle de fer

La minéralisation du fer dans son cycle biogéochimique est principalement contrôlée par des microbes, notamment des bactéries et des archées, qui interviennent dans l'oxydation et la réduction du fer (Figure 5).

Quelques Microorganismes oxydants et réducteurs du Fer.

- Microorganismes oxydants du fer ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)

Ces bactéries favorisent la formation de minéraux de fer en précipitant le Fe^{3+} sous forme d'oxydes et d'hydroxydes ferriques.

Quelques Microorganismes oxydants et réducteurs du Fer.

➤ Microorganismes oxydants du fer ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$)

Ces bactéries favorisent la formation de minéraux de fer en précipitant le Fe^{3+} sous forme d'oxydes et d'hydroxydes ferriques.

- Bactéries oxydantes du fer en milieu neutre : *Gallionella*, *Leptothrix*, *Sideroxydans*
- Bactéries oxydantes du fer en milieu acide : *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*
- Archées oxydantes du fer : *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*.

➤ Microorganismes réducteurs du fer ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$)

Ces bactéries dissolvent les minéraux ferriques en réduisant le Fe^{3+} en Fe^{2+} , influençant ainsi la dissolution des oxydes et hydroxydes ferriques.

- Bactéries réductrices du fer : *Geobacter*, *Shewanella*, *Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria (DIRB)*
- Archées réductrices du fer : *Pyrobaculum*, *Ferroglobus*

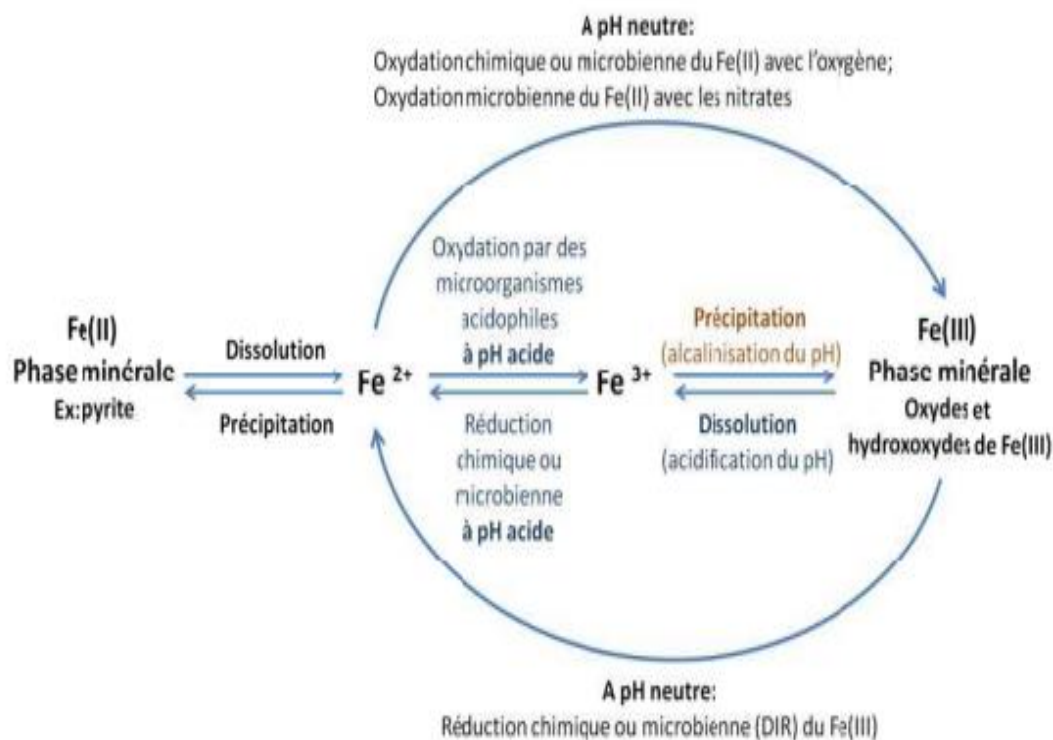


Figure 5 : cycle du fer

2. La dégradation des matériaux cas particulier de la biocorrosion

La colonisation microbienne des métaux et alliages à usage industriel se produit par la formation de biofilms composés de bactéries, de substances polymères extracellulaires (PSE) et principalement d'eau. Ces dépôts biologiques peuvent modifier radicalement le comportement à la corrosion des métaux et alliages de structure, accentuant des altérations localisées du type et des concentrations d'ions, du pH et des niveaux d'oxygène. Cependant, les biofilms facilitent également la formation de barrières diffusionnelles empêchant les échanges d'espèces chimiques depuis et vers l'interface métal/solution. Les problèmes liés à la biocorrosion et à l'encrassement biologique des systèmes industriels vont d'une forte contamination microbiologique entraînant des pertes d'énergie et d'efficacité à des défaillances structurelles dues à la corrosion.

L'utilisation de stratégies de surveillance appropriées, complétées par des techniques microbiologiques de terrain et de laboratoire, est nécessaire pour bien comprendre les effets de l'activité microbiologique et le rôle des biofilms dans la réaction de corrosion, afin de mettre en

œuvre ultérieurement des mesures de contrôle et de prévention efficaces. Il est important de souligner que cette évaluation doit être réalisée pour chaque système industriel, en tenant compte de son historique, de ses conditions d'exploitation actuelles, de la composition physicochimique de l'eau d'alimentation, ainsi que du nombre et de l'identité des contaminants microbiens.

Une utilisation correcte des équipements, combinée à un nettoyage régulier, optimise l'application des mesures de prévention. Les méthodes mises en œuvre pour prévenir la biocorrosion doivent répondre aux points fondamentaux suivants :

- Inhibition de la croissance et/ou de l'activité métabolique des micro-organismes.
- Modification de l'environnement dans lequel se déroule le processus de corrosion pour éviter l'adaptation des micro-organismes aux conditions existantes.

Chapitre 3 : les microorganismes eucaryotes

Les eucaryotes sont plus complexes que les procaryotes et possèdent un véritable noyau et des organites cellulaires entourés d'une membrane. Parmi les groupes importants de micro-organismes eucaryotes environnementaux figurent les champignons, les protozoaires et les algues.

1. Champignons

Bien que les bactéries puissent représenter les micro-organismes les plus abondants en termes de nombre d'individus, les champignons, qui sont un groupe physiquement plus important de micro-organismes eucaryotes, ont la plus grande biomasse.

Les champignons sont omniprésents et se trouvent principalement dans le sol où ils peuvent s'adapter à diverses conditions et jouent un rôle primordial de décomposeurs. Comme les bactéries, certains champignons sont pathogènes pour l'homme et les plantes (en fait, économiquement, les champignons sont les phytopathogènes les plus importants). D'autres champignons jouent un rôle important dans les procédés industriels impliquant la fermentation et en biotechnologie pour la production de composés antimicrobiens (tableau 2).

Les champignons peuvent être divisés en trois groupes généraux en fonction de leurs descriptions morphologiques : les moisissures, les champignons et les levures (figure 6).

Tableau 2 : Exemples de champignons et leur rôle dans l'environnement

Champignon	Environnements communs	Rôle
Moules		
<i>Rhizopus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Nourriture avariée; sol; cultures Nourriture avariée; sol; cultures	Dégradation ; maladies des plantes, par exemple, brûlure des semis de riz Dégradation ; production d'antibiotiques (pénicilline)
Champignons		
<i>Polyporus squamosus</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	Arbres morts et matériel végétal Sol; peut être en suspension dans l'air	Décomposition Dégradation ; provoque <i>Cryptococcus</i> (infection des poumons et du système nerveux central chez l'homme)
levures		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida albicans</i>	Fruits ; sols ; milieux aquatiques Microbiote normal des animaux	Fermentation; dégradation Provoque une candidose (infections à levures) de la peau ou des muqueuses

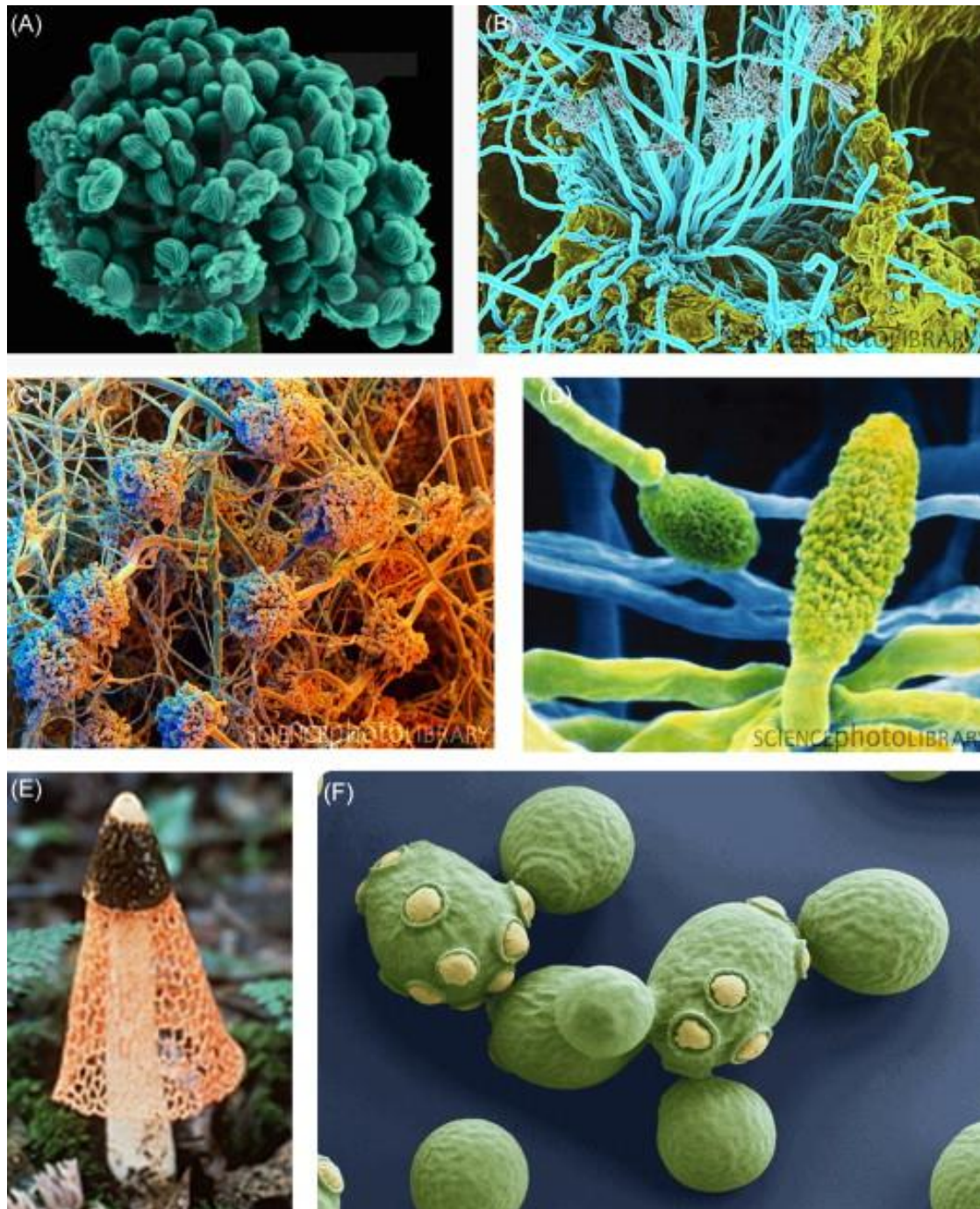


Figure 6 : Différents types de champignons. (A)–(D) montrent les fructifications de diverses moisissures. (E) illustre le champignon *Dictophora indusiata* au sein de la famille des *Basidiomycètes* (champignons). (F) montre la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Protozoaires

. Tous les protozoaires dépendent de l'eau et, de ce fait, on les observe le plus souvent dans les habitats d'eau douce et marins, bien que certains soient terrestres dans les sols humides et d'autres exclusivement présents dans le tractus gastro-intestinal des animaux. Les protozoaires sont importants pour l'environnement car ils constituent la base de la chaîne alimentaire dans de nombreux écosystèmes aquatiques, constituant une grande partie du plancton dont se nourrissent les animaux aquatiques

2.1. Structure et fonction

La morphologie cellulaire des protozoaires est extrêmement diversifiée, peut-être en raison de l'absence de paroi cellulaire et d'une large gamme de tailles (de 5 μm à 1 mm) (figure 7).

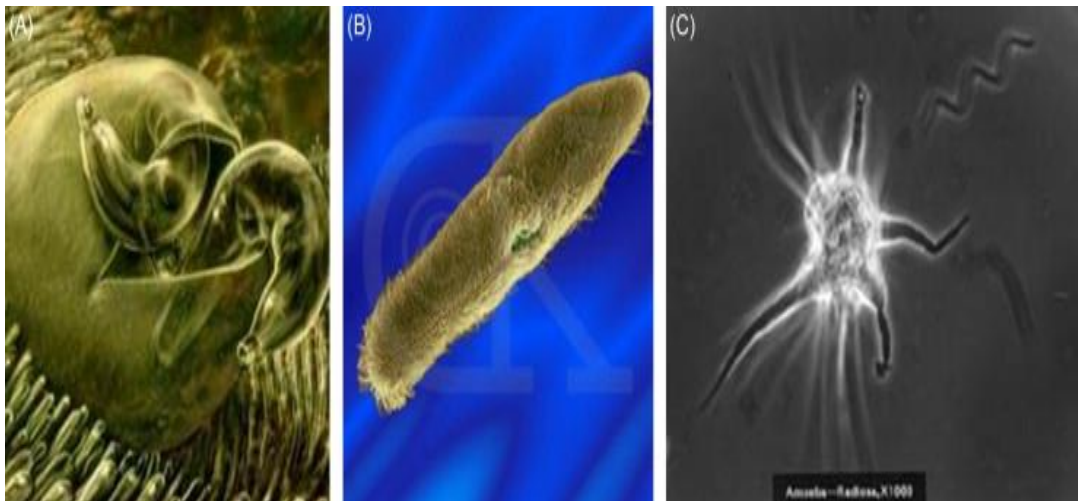


Figure7 : Diversité morphologique observée chez les protozoaires.

(A) Infection d'une cellule intestinale par *Cryptosporidium* (un apicomplexe). Un sporozoïte est fixé à une cellule épithéliale intestinale, laissant émerger plusieurs mérozoïtes. (B) Les paramécies sont des membres de la famille des Ciliophora. On les trouve couramment en eau douce où elles se nourrissent de cellules bactériennes. (C) *Amoeba radiosa* est un membre de la famille des Sarcodina. On la trouve dans de nombreux environnements différents et elle se nourrit en l'entourant et en l'engloutissant.

2.2. Aspects environnementaux des protozoaires

Les protozoaires jouent un certain nombre de rôles écologiques importants.

Rôles des protozoaires en microbiologie environnementale :

- Servir de base à la chaîne alimentaire dans les systèmes aquatiques
- Contrôle de la population par la prédation des bactéries, des algues et même d'autres protozoaires
- Parasites humains et vertébrés, maladies d'origine alimentaire et hydrique
- Dégradation de matières organiques complexes, telles que la cellulose
- Symbioses avec certains animaux, comme les termites et les ruminants

3. Algues

Les algues sont un groupe de micro-organismes eucaryotes oxygénés photosynthétiques qui contiennent de la chlorophylle *a* (comme chez les plantes). Les algues vont des organismes unicellulaires aux organismes multicellulaires complexes comme les algues (figure 8).



Figure 8 : Une prolifération d'algues laisse une substance verte semblable à de l'écume sur les eaux du lac de Zurich, en Suisse.

3.1. Structure cellulaire

Les algues peuvent être unicellulaires, coloniales (se présentant sous forme d'agrégats cellulaires) ou filamenteuses, ce qui entraîne une grande diversité dans leur composition globale. Morphologie cellulaire. Les parois cellulaires des algues entourent les membranes

3.2. Aspects environnementaux des algues

Les algues sont principalement des photoautotrophes oxygénés, bien que quelques-unes soient chimio-hétérotrophes et utilisent des composés organiques simples, comme l'acétate, pour soutenir le métabolisme cellulaire. La photosynthèse oxygénée produit de l'oxygène comme déchet, obtenant de l'énergie par la décomposition de l'eau. La production d'oxygène est l'un des effets bénéfiques de la croissance algale dans certains systèmes aquatiques. La photosynthèse oxygénée des algues est également responsable de la production primaire (production de matière organique) dans de nombreux habitats aquatiques. Ainsi, la production primaire des algues soutient le réseau trophique dans de nombreux milieux aquatiques et joue un rôle équivalent à celui des plantes dans les systèmes terrestres

Chapitre 4 : les virus

1. Définition

Les virus constituent un groupe unique d'entités biologiques capables d'infecter les organismes eucaryotes ou procaryotes. Bien que certains virus contiennent quelques enzymes, ce sont des parasites obligatoires dépourvus de capacité métabolique et dépendant du métabolisme de l'hôte pour produire des fragments viraux auto-assemblés.

2. Structure

Les virus sont constitués d'acide nucléique encapsulé dans une enveloppe protéique appelée capsid, de taille (Figure 9) et de morphologie (Figure 10) variables. Les acides nucléiques viraux peuvent être constitués d'ADN ou d'ARN simple ou double brin.

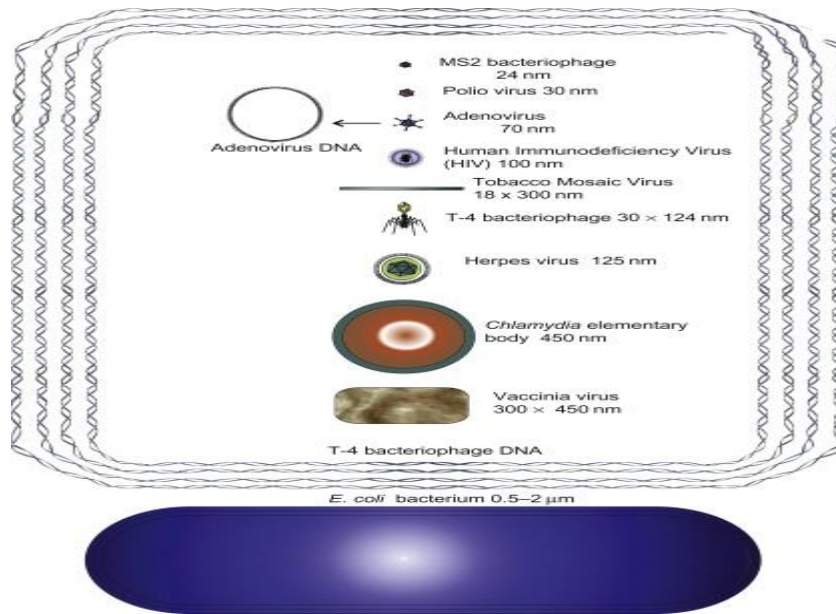


Figure 9 : Tailles comparatives de virus sélectionnés par rapport à une cellule bactérienne et à des acides nucléiques.

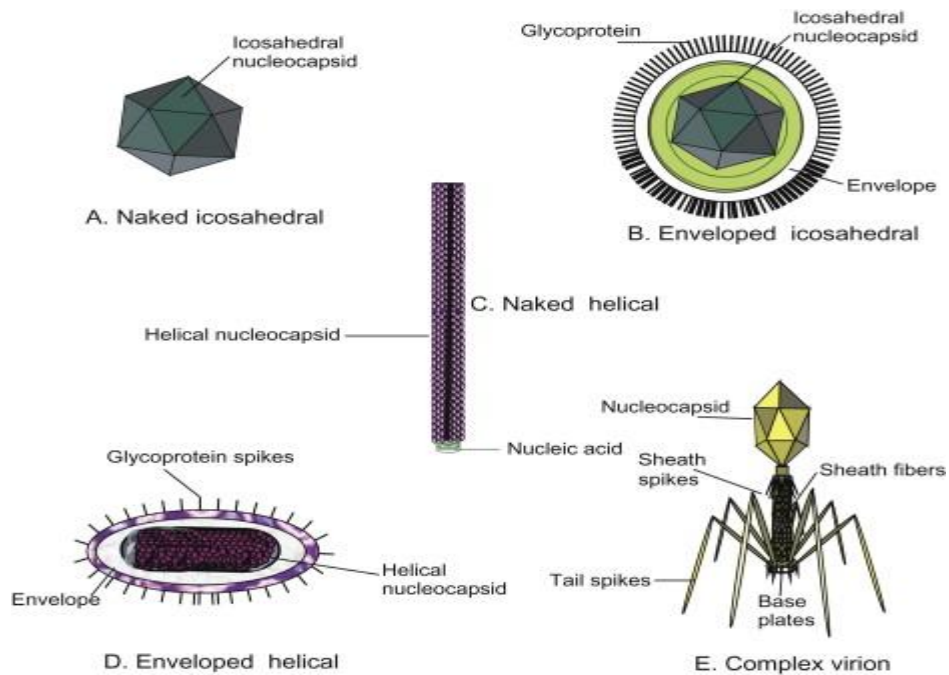


Figure 10 : Formes simples de virus et leurs composants

(A) Les virus icosaédriques nus ressemblent à de petits cristaux ; (B) les virus icosaédriques enveloppés sont constitués de nucléocapsides icosaédriques entourées par l'enveloppe ; (C) les virus hélicoïdaux nus ressemblent à des bâtonnets avec un motif hélicoïdal régulier et fin sur leur surface ; (D) les virus hélicoïdaux enveloppés sont des nucléocapsides hélicoïdales entourées par l'enveloppe ; et (E) les virus complexes sont des mélanges de formes hélicoïdales, icosaédriques et autres formes structurelles.

3. Agents antiviraux

Même 56 ans après la première Conférence sur les substances antivirales, parrainée par la New York Academy of Science, plusieurs virus représentent toujours une menace significative pour notre société moderne. À cette époque, la réplication virale était considérée comme assurée par certaines enzymes cellulaires, qui pouvaient être « rapidement » bloquées par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs. Plus tard, la première protéine virale a été signalée par Kates et McAuslan en 1967. Il s'agissait d'une enzyme, l'ARN polymérase ADN-dépendante, isolée du Poxvirus (Poxviridae), qui a constitué la première base mécanistique pour le développement d'agents antiviraux, suivis par plusieurs autres cibles virales. L'intérêt pour le développement de nouveaux agents contre le virus de l'herpès simplex (HSV) a permis au domaine des médicaments antiviraux de se développer rapidement, principalement avec le développement de l'acyclovir (Zovirax). Cependant, l'intérêt majeur pour les médicaments antiviraux est apparu face au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), lors de son premier rapport en 1981 ; donnant rapidement naissance à de nombreux agents anti-VIH capables d'inhiber différentes enzymes virales.

Tout comme les antibiotiques utilisés pour traiter les maladies bactériennes, la quasi-totalité des médicaments antiviraux actuels ciblent un gène ou une fonction spécifique du virus. Cependant, l'utilisation continue de ces composés accroît la capacité des virus à acquérir des mutations résistantes, ce qui peut conduire à l'émergence de souches résistantes aux médicaments.

Chapitre 5 : Microorganismes procaryotes

1. La cellule bactérienne, structure et fonction des constituants de la cellule bactérienne

1.1. Schéma général d'une cellule bactérienne

Les bactéries ont une taille de l'ordre de 1 à 10 μm . Ce sont des organismes unicellulaires, cependant, dans de nombreux cas, ces cellules apparaissent groupées. Les morphologies et les types de groupement, qui reflètent surtout le mode de division des cellules, sont des critères très utilisés pour identifier les bactéries (Figure 11). Les cellules bactériennes les plus communes se présentent sous deux formes principales : des formes en bâtonnet (ou bacilles) et des formes en sphère (ou coques). Les coques peuvent se regrouper en grappes (staphylocoques), ou en chaînettes plus ou moins longues (streptocoques). Les bacilles peuvent être de forme régulière ou irrégulière (corynébactéries), être droits (*Clostridium*), incurvés (vibrions) ou spirales (spirochètes). Ils peuvent également rester groupés en chaînettes comme les *Bacillus*.

Ces caractères morphologiques sont en général observés sur des bactéries colorées par la coloration de Gram et observées à fort grossissement. L'affinité tinctoriale (Gram positif ou négatif) vient en général compléter la description des bactéries étudiées.

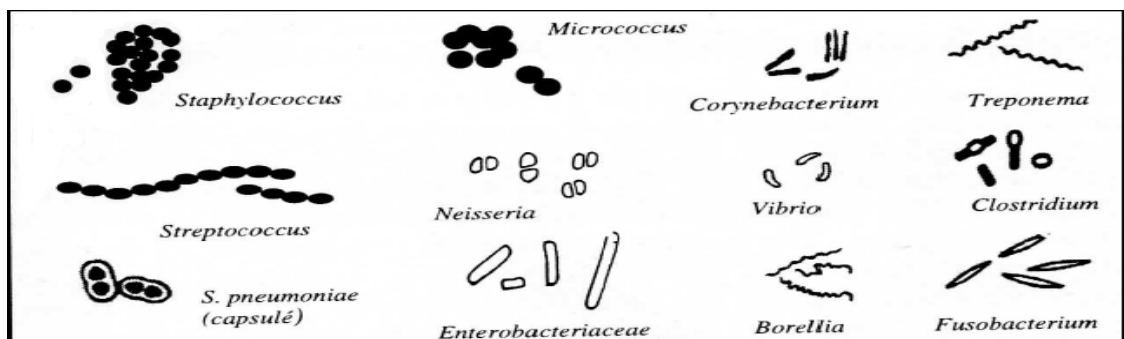


Figure 11 : Principales morphologies des cellules bactériennes

1.2. Ultra-structure de la cellule bactérienne

Les données ultra-structurales sont fournies par l'observation des cellules au microscope électronique.

La structure de base de toutes les cellules bactériennes (figures 12 et 13) est plus simple que celle des cellules eucaryotes. Cette structure comprend des éléments constants présents en permanence chez toutes les bactéries et des éléments inconstants ou facultatifs (présents chez

certaines espèces seulement ou transitoires (qui apparaissent lors de certaines circonstances de la vie bactérienne).

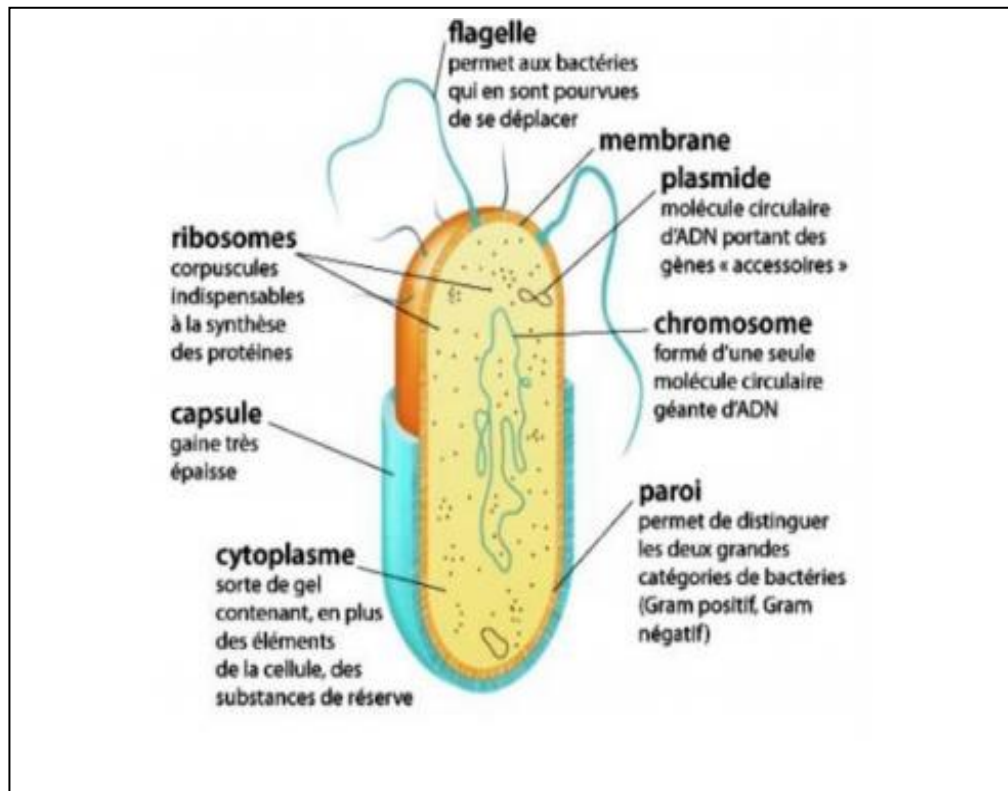


Figure 12 : Schéma d'une cellule bactérienne en microscopie électronique

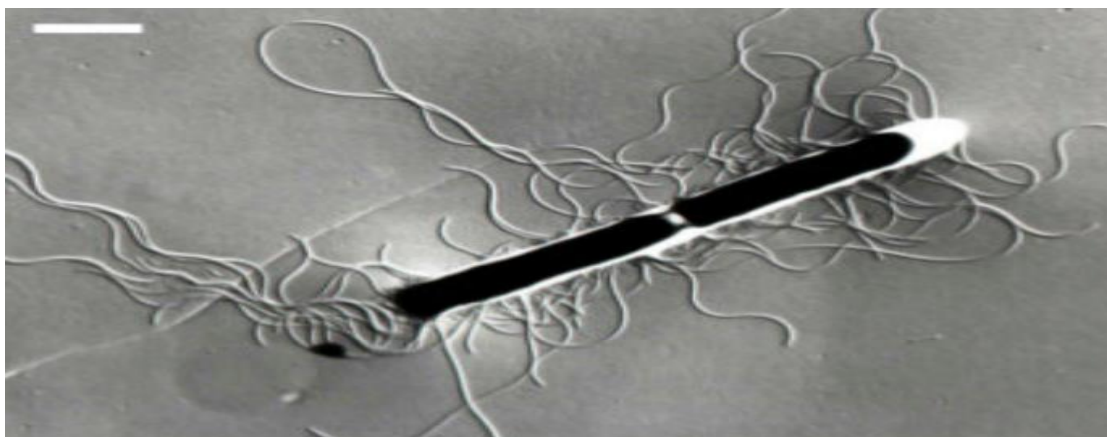


Figure 13 : Bactérie avec flagelles polaires (Les filaments blancs) en microscopie électronique

Rôle de la paroi

- Protection de la cellule

La paroi protège la cellule des variations de pressions osmotiques

La paroi protège la cellule vis-à-vis d'autres facteurs de l'environnement (température, pH, radiations...) et confère sa forme à la cellule.

- Interface avec le milieu extérieur :

La paroi est un lieu d'échange nutritionnel et de régulation de ces échanges.

- Cibles des antibiotiques :

Plusieurs familles d'antibiotiques (dont la plus importante : les β -lactamines) ont pour cible biochimique des enzymes intervenant dans la synthèse du peptidoglycane.

1.2.2. Les structures externes

La cellule bactérienne est très souvent entourée de structures ou de composants plus externes que la paroi. La présence de ces structures est souvent conditionnée par le milieu dans lequel se trouve la bactérie (structures transitoires).

- Les pili ou **fimbriae**

Ce sont des structures fibrillaires visibles seulement en microscopie électronique (Figure 15).

- Les pili communs : forment une sorte de fourrure à la surface de la bactérie. Ils interviennent fréquemment dans les phénomènes d'adhésion aux surfaces et constituent des antigènes majeurs.

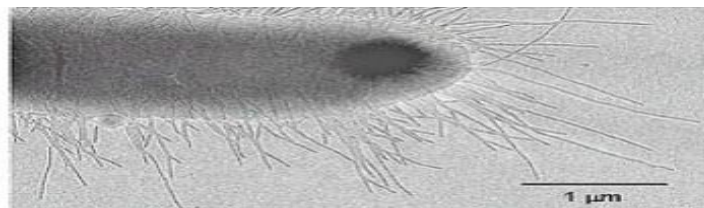


Figure 15 : Pili communs chez *Escherichia coli*.

- Les pili sexuels : Ils interviennent dans les échanges génétiques entre cellules bactériennes (figure 16).

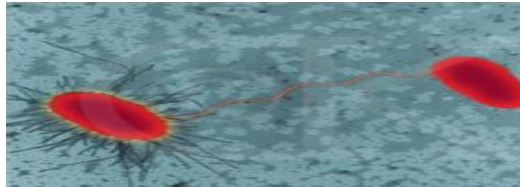


Figure 16 : Bactéries en conjugaison, liées par un pili sexuel

- Les flagelles

Ce sont les organes locomoteurs des bactéries. Il s'agit de longs filaments (15 à 20 μm) très fins (20 nm) visibles en microscopie électronique ou au microscope optique après coloration (technique de Leifson à la Fuchsine basique).

1.2.3. La membrane cytoplasmique

C'est l'enveloppe la plus interne de la cellule bactérienne. La partie interne de la membrane supporte les enzymes de la chaîne respiratoire et leurs co-enzymes. La membrane est l'équivalent fonctionnel des mitochondries eucaryotes.

1.2.4. Le cytoplasme

Il est formé d'un hydrogel protéique dans lequel sont dispersés des organites dont les plus nombreux sont les ribosomes

- Les ribosomes bactériens

Ce sont des organites de 20 à 30 nm de diamètre. Ils peuvent être séparés du cytosol par ultracentrifugation en gradient de densité. Leur constante de sédimentation est de 70 unités Svedberg (S] (elle est de 80 S pour les ribosomes eucaryotes).

- **Autres particules cytoplasmiques**

On peut trouver dans le cytoplasme des produits de réserves énergétiques comme des granules de glycogène ou de poly-hydroxybutyrates visibles au microscope après coloration spéciale.

1.2.5. La spore

Ce sont des structures de résistance formées par certaines bactéries lorsque les conditions deviennent défavorables. Elle permet aux bactéries sporulantes de survivre dans des conditions difficiles et extrêmes de l'environnement. Les genres bactériens les plus connues qui forment des endospores sont *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*. Ce sont toutes des bactéries Gram (+). D'autres genres sont capables également de sporuler.

La sporulation est le phénomène de différenciation qui conduit de la forme végétative à la spore. La transformation inverse est appelée la germination (Figure 17). Le processus de sporulation débute à la fin de la phase exponentielle et se déroule en 6 étapes (Figure 18).

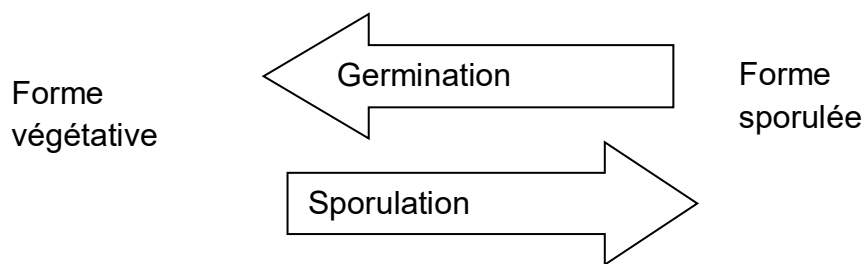


Figure 17 : Sporulation et germination

Stade I formation du filament axial : La division nucléaire n'étant pas suivie d'une division cellulaire, les deux génomes fusionnent donnant un filament chromatique axial.

Stade II : les deux génomes se séparent et en même temps la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum de sporulation qui partage la cellule en deux parties inégales. Ce septum va envelopper le cytoplasme de la plus petite partie pour former une préspore caractéristique.

Stade III : Englobissement de la présore.

Stade IV : entre les deux membranes limitant la présore se forme la paroi sporale puis apparaît rapidement le cortex.

Stades V and VI : apparition des tuniques et après maturation.

Stades VII : la cellule végétative se lyse et libère la spore.

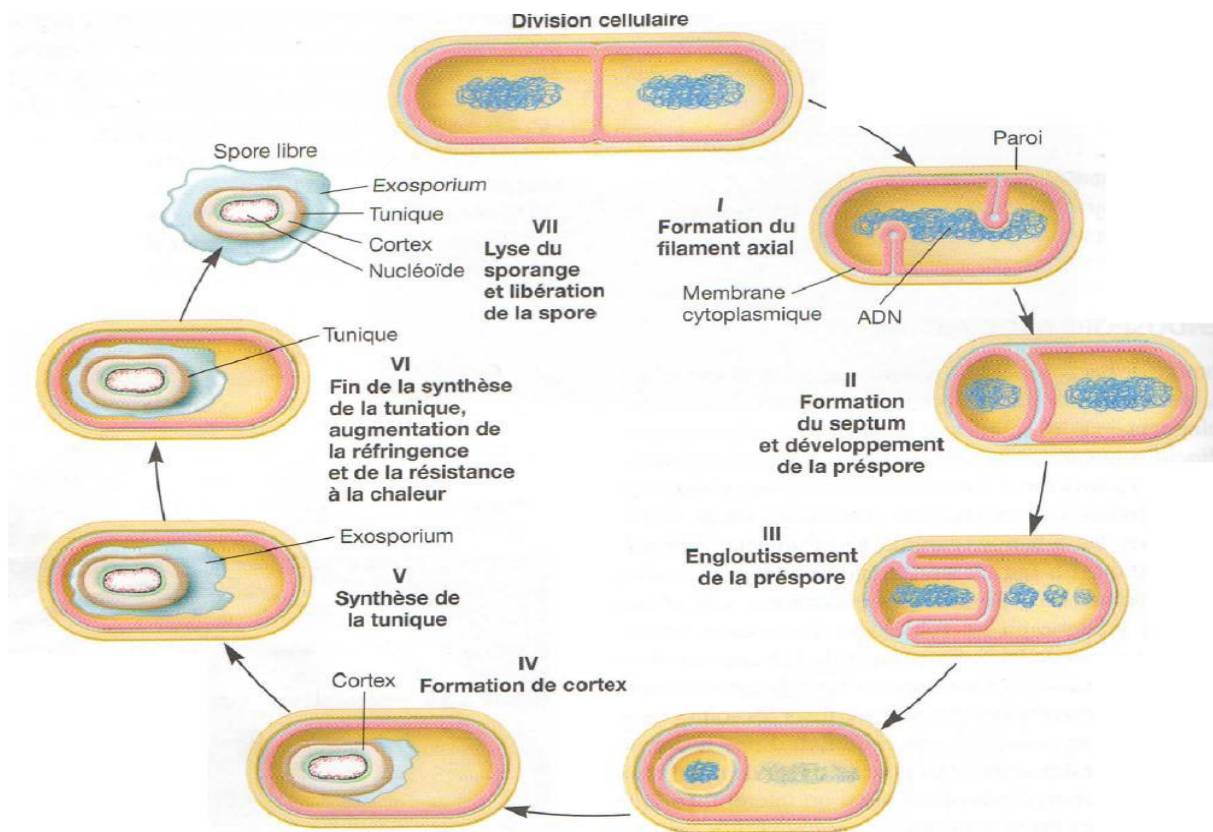


Figure 18 : Le cycle sporal

2. Nutrition bactérienne, conditions physico-chimiques

2.1. Besoins élémentaires

2.1.1. Macro-éléments et microéléments

La matière sèche d'une bactérie telle qu'*E. coli* est composée de quelques macro-éléments : C, O, H, N, S, P, constituants des molécules organiques ; K, Ca, Na, Mg et Fe, à l'état de cations dans la cellule et ayant des rôles divers. Certains éléments ne sont retrouvés qu'à l'état de « traces » : Mn, Zn, Co, Ni, Cu, Mo... Ce sont des oligo-éléments (ou micro-éléments), nécessaires au métabolisme microbien, car ils interviennent en tant que cofacteur ou activateur de réactions enzymatiques. Les besoins élémentaires sont différents d'une espèce à une autre, en fonction du milieu de vie notamment.

2.1.2. Source de carbone

Les exigences nutritionnelles en carbone conduisent au classement des micro-organismes en deux grandes catégories :

- les autotrophes sont capables de se développer en milieu minéral (inorganique) en utilisant le dioxyde de carbone (CO_2) ou les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-) comme seule source de carbone pour synthétiser leurs constituants carbonés ;
- les hétérotrophes, exigent des molécules organiques (sucres et dérivés, acides organiques, peptides et acides aminés...), pour leur croissance. Certains micro-organismes sont capables d'assimiler de nombreuses substances organiques différentes, tandis que d'autres ont des capacités métaboliques restreintes à quelques substrats (voir un seul).

2.1.3. Source d'énergie

Il existe seulement deux sources d'énergie disponibles pour les êtres-vivants :

- l'énergie lumineuse, transformée en ATP par les phototrophes, grâce à des pigments (chlorophylles, bactériochlorophylles, carotènes...) ;
- l'énergie chimique, provenant de l'oxydation de molécules minérales (chimolithotrophes) ou organiques (chimioorganotrophes).

2.1.4. Source d'azote, de soufre et de phosphore

Les micro-organismes peuvent puiser l'azote dans des molécules organiques (acides aminés, bases azotées) ou plus généralement dans des composés minéraux :

- les ions ammoniums, NH_4^+ ;
- les ions nitrates, NO_3^- (grâce à la nitrate réductase B dite assimilatrice) ;
- l'azote atmosphérique, N_2 (grâce à la nitrogénase, présente chez *Rhizobium* et *Azotobacter*).
 NO_3^- et N_2 sont transformés en ions NH_4^+ , qui sont ensuite incorporés à des acides α -cétoniques, formant ainsi des acides α -aminés.

Les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) peuvent fournir le soufre aux micro-organismes. Dans de nombreux milieux de culture, le soufre est fourni sous forme d'ions sulfates (SO_4^{2-}), réduits en sulfites (SO_3^{2-}) puis en sulfures (H_2S). H_2S est ensuite incorporé à la sérine pour former la cystéine.

Le phosphore entre généralement dans la cellule sous la forme d'ions phosphates (PO_4^{3-})

2.2. Besoins en facteurs de croissance

Un facteur de croissance est une molécule organique qu'un micro-organisme doit puiser dans son milieu car il ne peut pas le synthétiser. Les facteurs de croissance sont répartis en trois classes :

- les acides aminés, nécessaires à la synthèse des protéines ;
- les bases azotées (purines et pyrimidines), nécessaires à la synthèse des acides nucléiques ;
- les vitamines, coenzymes (ou leurs précurseurs) indispensables pour de nombreuses réactions

2.3. Conditions physico-chimiques

Les besoins énergétiques et nutritionnels étant satisfaits, la bactérie ne peut survivre et se multiplier que si un certain nombre de conditions environnementales sont réalisés.

2.3.1. Température : Elle influence profondément la multiplication microbienne, selon la meilleure température de croissance, on distingue :

- Organismes psychrophiles : température optimale $< 10^\circ \text{C}$

- Organismes psychotropes : température optimale entre 5°C et 15 °C
- Organismes mésophylles : température optimale entre 20°C et 40 °C
- Organismes thermophyles : température optimale >50 °C : Les bactéries sporulées peuvent, sous forme de spore, résister à des températures supérieures à 100 °C. Cependant, elles ne se multiplient pas à ces températures. Les spores sont des formes de résistance qui, dès que les conditions du milieu redeviennent favorables, se transforment en formes végétatives et se multiplient alors à des températures comprises entre 20°C et 40 °C.

2.3.2. pH : La plupart des bactéries médicales se développent de façon optimale à un pH compris entre 7 et 7,5. Certaines espèces sont cependant encore capables de se multiplier à des pH très acides (Lactobacilles), ou très alcalins (Vibrio cholerae).

2.3.3. Exigences gazeuses : C'est surtout vis-à-vis de l'O₂ que les exigences gazeuses des bactéries sont précises :

- Aérobie strict : exigent de l'O₂ pur.
- Anarobies strictes : ne poussent qu'en absence d'O₂. -Aéro-anaérobies ou anaérobies facultatifs : qui peuvent vivre en absence ou en présence d'O₂
- Aérophiles : se reproduisent de préférence à la surface des milieu liquides en formant un voile.
- Micro-aérophiles : ne se développent qu'en présence d'une faible tension d'O₂.

2.3.4. Pression osmotique : La plupart des bactéries, protégées par leur paroi, sont insensibles aux variations de pression osmotique. Certaines espèces cependant, sont adaptées à la vie en milieu. Hypersalé ; ce sont les espèces halophiles qui exigent pour leur culture jusqu'à 35 g/l de NaCl. Les espèces dépourvues de paroi comme les Mollicutes ou les souches dont la paroi a été altérée par les antibiotiques doivent être cultivées en milieu hypertonique.

3.Chimiotrophie, phototrophie, auto et hétérotrophie

3.1. Source de carbone

Les exigences nutritionnelles en carbone conduisent au classement des micro-organismes en deux grandes catégories :

- les **autotrophes** sont capables de se développer en milieu minéral (inorganique) en utilisant le dioxyde de carbone (CO_2) ou les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-) comme seule source de carbone pour synthétiser leurs constituants carbonés ;

- les **hétérotrophes**, exigent des molécules organiques (sucres et dérivés, acides organiques, peptides et acides aminés...), pour leur croissance. Certains micro-organismes sont capables d'assimiler de nombreuses substances organiques différentes, tandis que d'autres ont des capacités métaboliques restreintes à quelques substrats (voir un seul).

3.2. Source d'énergie

Il existe seulement deux sources d'énergie disponibles pour les êtres-vivants :

- l'énergie lumineuse, transformée en ATP par les **phototrophes**, grâce à des pigments (chlorophylles, bactériochlorophylles, carotènes...);

- l'énergie chimique, provenant de l'oxydation de molécules minérales (**chimolithotrophes**) ou organiques (chimioorganotrophes).

4. Croissance bactérienne, moyens d'étude, paramètres cinétiques

Dans un milieu de culture convenable, les bactéries croissent et se multiplient.

- **En milieu liquide**, il y a augmentation du nombre de cellules et de la biomasse par unité de volume .

- **Et en milieu solide**, chaque cellule donnant naissance à un clone, il y a apparition de colonies.

4.1. Croissance en milieu liquide

Ce sont les conditions idéales d'étude de la croissance car rien n'entrave la multiplication bactérienne, au moins pendant un certain temps. Les déchets sont dilués et ne sont donc pas inhibiteurs, les nutriments sont renouvelés rapidement dans l'environnement de la cellule.

4.1.1. Mesure de la croissance

On estime les variations de la masse bactérienne (m) ou du nombre de cellule (N), par unité de volume et en fonction du temps.

- *Mesure de la masse bactérienne*

Plusieurs méthodes sont possibles :

La détermination du poids sec, de l'azote total, mesure de l'activité métabolique (variation du pH, consommation d'oxygène, Libération de CO₂). La méthode la plus simple et la plus utilisée consiste à mesurer la turbidité du milieu à 520 nm. Si la taille des cellules reste constante, il y a proportionnalité entre la DO à 520 nm et la masse bactérienne m .

$$DO = k.m \quad (1)$$

- *Dénombrement des cellules bactériennes*

La méthode la plus utilisée est cependant le dénombrement des cellules viables par unité de volume. Pour cela, on cultive en milieu gélosé une quantité connue de la suspension convenablement diluée. Le nombre de colonies obtenu est rapporté à l'unité de volume de suspension non diluée et correspond au nombre de cellules viables ou nombre d'unités formant colonie (UFC) par unité de volume (Figure 19).

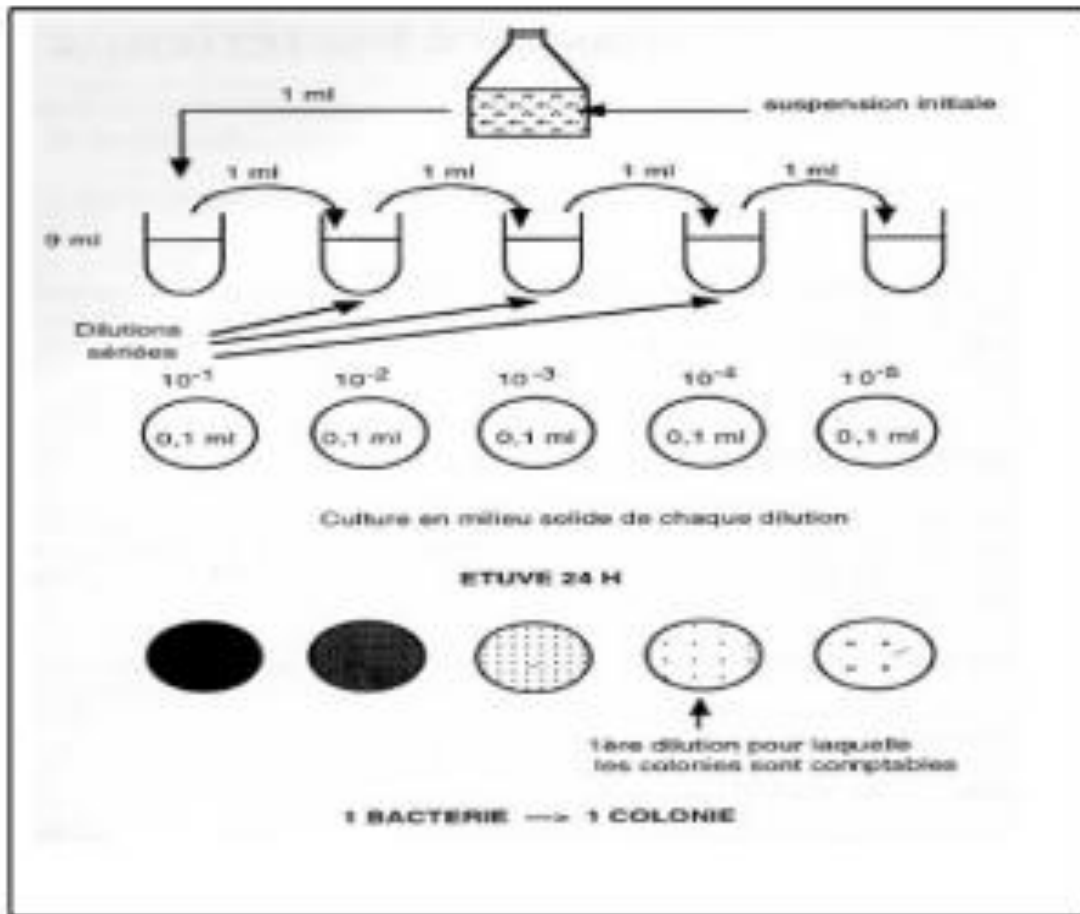


Figure 19 : Dénombrement des UFC.

4.1.2. Cinétique théorique de croissance en milieu liquide non renouvelé

Si le milieu de culture convient à une bactérie étudiée, si les conditions de pH et de température sont correctes, si le volume du milieu est relativement élevé et si ce milieu est agité régulièrement, la croissance bactérienne peut être prédite par une loi exponentielle. La vitesse de croissance au temps t est définie par l'équation (1) dans laquelle dm est la variation de masse bactérienne pendant un temps dt .

$$\frac{dm}{dt} = \mu \cdot m \quad (2)$$

Avec :

dm : la variation de masse ;

dt : la variation du temps ;

m : la masse au temps t ;

μ : représente le taux de croissance, c'est-à-dire la valeur de la variation de masse par unité de masse et unité de temps (équation (2)).

$$\mu = \frac{dm}{m} \times \frac{1}{dt} = \frac{dm}{m \cdot dt} \quad (3)$$

L'équation (4) peut être écrite sous forme différentielle ou sous forme intégrée. Sous forme intégrée, la masse bactérienne au temps t apparaît comme une fonction exponentielle du temps et du taux de croissance.

$$\int_{m_0}^{m_1} \frac{1}{m} dm = \int_0^t \mu dt$$

Soit $\text{Log } m_t - \text{Log } m_0 = \mu t$ (4)

Ou $m_t = m_0 \cdot e^{\mu t}$

La croissance bactérienne est donc régie par une loi exponentielle. Exemple numérique : si on calcule la masse bactérienne de *E. coli* obtenue en 24 h à partir d'une seule cellule ($m=1 \mu\text{g}$), on trouve 7. 108 tonnes.

Ce résultat n'est jamais observé expérimentalement car en fait μ n'est pas constant, il varie avec le temps.

4.1.3. Courbe expérimentale de croissance en milieu liquide

Cette courbe peut être obtenue en mesurant régulièrement la masse bactérienne ou le nombre d'UFC par unité de volume au cours d'une culture. Elle a l'allure de la figure 20.

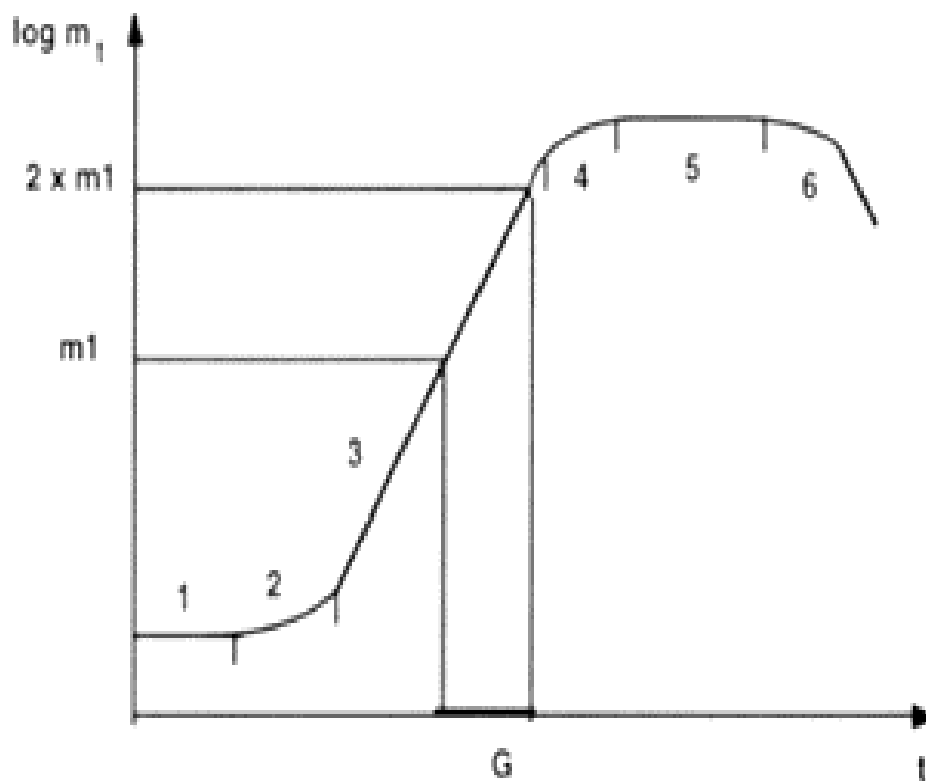


Figure 20 : Courbe de la croissance bactérienne

1=Latence : $\mu=0$

2=Accélération : μ

3=Phase exponentielle : μ constant, >0 et maximum

4= Décélération μ

5= Phase stationnaire : $\mu >0$

6= Phase de déclin : $\mu <0$

G= Temps de génération

La courbe de croissance en milieu liquide se caractérise par six phases qui sont caractérisées par des valeurs différentes de μ .

La phase de latence (1) ou $\mu = 0$, correspond à une phase d'adaptation de la souche au milieu. Elle est d'autant plus longue que la souche est moins adaptée et que l'inoculum initial est faible. La longueur de cette phase correspond aussi à la sensibilité de la méthode d'évaluation de la masse bactérienne. Pendant cette phase, des enzymes sont induits et quand le métabolisme est adapté au milieu, μ commence à augmenter. Cette phase est pratiquement non détectable si l'inoculum est déjà en phase exponentielle et est repiqué dans le même milieu.

Pendant la phase d'accélération (2) μ augmente régulièrement.

La phase exponentielle (3), où μ est constant et maximum, correspond à une valeur maximum de la vitesse de croissance. Pendant cette phase, chaque cellule se divise à peu près à la même vitesse et elles ont une taille moyenne constante. C'est pendant cette phase que la masse bactérienne est proportionnelle au nombre d'UFC. Sur la courbe expérimentale, cette phase est une droite en coordonnées semi-logarithmiques. Il est alors facile d'évaluer graphiquement la valeur de μ par la pente de cette droite et de calculer également graphiquement le temps de doublement de la masse bactérienne, c'est-à-dire le temps de génération (G) de la souche.

Ordre de grandeur de :

G. Vibrio : 10 mn

E. coli : 20 mn

Mycobacterium tuberculosis: 14 h

Tous les paramètres de la phase exponentielle sont des caractéristiques de la souche mais dépendent aussi du milieu et des conditions de culture.

Pendant la phase de décélération (4) μ diminue régulièrement. Cette phase correspond au début d'épuisement du milieu. Les nutriments commencent à manquer et les déchets deviennent toxiques.

La phase stationnaire (5) où μ redevient nul, correspond au maximum de la masse : bactérienne qu'il est possible d'obtenir dans ces conditions expérimentales. Cette phase survient dès qu'un nutriment devient limitant. La mesure de la masse bactérienne à la phase stationnaire est une façon d'évaluer la quantité d'un aliment dans un milieu donné. Cette méthode a été utilisée pour le dosage biologique de facteurs de croissances comme les vitamines.

La phase de déclin (6) où μ devient négatif correspond à une lyse de la culture. 4. Facteurs physiques influençant la croissance

Chapitre 6 : Les biofilms

1. Métabolisme bactérien

1.1. Introduction

Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : sources d'énergie, de carbone, d'azote, etc... Ces éléments doivent être apportés dans un milieu où règnent des conditions physicochimiques favorables (température, pH, pression osmotique, etc...). Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques mises en jeu par un organisme pour permettre sa croissance (Figure 21).

Les réactions métaboliques peuvent être classées en deux catégories :

- celles qui produisent de l'énergie : catabolisme.
- celles qui consomment de l'énergie : anabolisme ou biosynthèse.

La bactérie produit de l'énergie au cours du catabolisme par le biais de réactions exergoniques. Pour éviter toute perte sous forme de chaleur, ces réactions exergoniques (productrices d'énergie) sont couplées à des réactions dites endergoniques (absorbent l'énergie). L'énergie est ainsi emmagasinée dans des molécules d'ATP ou immédiatement consommée dans une réaction qui nécessite de l'ATP.

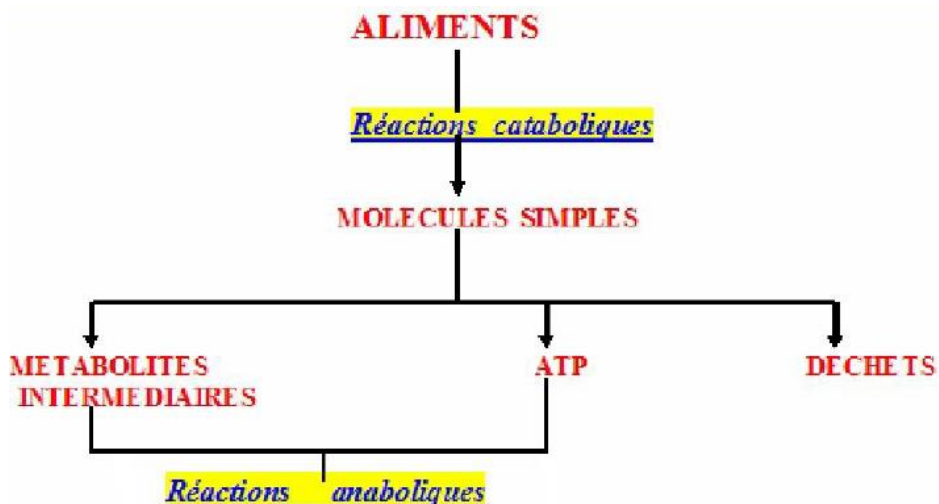


Figure 21 : Métabolisme bactérien

1.2. Catabolisme des polysaccharides

Les polysaccharides sont abondants dans la nature et représentent une source de nutriments pour les micro-organismes. Les polysaccharides sont de longues chaînes de monosaccharides (sucre) assemblés par des liaisons glycosidiques. L'amidon, le glycogène et la cellulose sont des polysaccharides de grande taille composés de glucose. Ils se différencient par la nature des liaisons entre les sucres. L'amidon et le glycogène ne sont pas chimiquement stables et sont facilement dégradés par des enzymes. Ce sont néanmoins deux formes majeures de substrats de réserve pour les cellules. La cellulose beaucoup plus stable et un matériel de structure pour les plantes les xylanes qui entre également dans la structure des plantes sont des polymères hétérogènes. Ils contiennent de faibles quantités d'hexoses et sont très complexes. La chitine est un polymère de la N-acétylglucosamine dont les longues chaînes très résistantes sont assemblées par des liaisons hydrogènes.

Les paragraphes suivants développent les voies impliquées dans le catabolisme microbien de certains polysaccharides.

- La cellulose

La cellulose est considérée comme le produit de biosynthèse le plus abondant sur terre. C'est un constituant majeur des plantes qui est également synthétisé par un nombre limité d'espèces bactériennes (*Acetobacter*, *Xylinum*, *Sarcina ventriculi*). Dans la nature les champignons et les bactéries sont les principaux organismes qui décomposent la cellulose. Les champignons sont particulièrement actifs dans les sols acides et dans les tissus du bois où la cellulose est protégée des attaques enzymatiques par la lignine. La composition et les propriétés de la lignine sont développées plus loin.

Les bactéries aérobies qui décomposent la cellulose sont les myxobactéries, les cytophages les sporocytophages et quelques autres espèces.

Le polymère de la cellulose est composé de molécules de glucose associées par des liaisons β -1,4. Une fibre non ramifiée de cellulose peut comporter jusqu'à 14000 molécules de glucose (figure 22). La décomposition de la cellulose résulte de l'action conjointe de différentes enzymes (figure 23).

- L'endo β -1,4 glucanase hydrolyse des liaisons situées à l'intérieur de la chaîne libérant de longs fragments

- L'exo β -1,4 (glucanase libère une molécule composée de deux unités de glucose (cellobiose) à l'extrémité des longues chaînes.
- Les α,β -glucosidases hydrolysent le cellobiose en glucose

La conversion de la cellulose en glucose présente un grand intérêt industriel, le glucose produit de cette façon sert de substrat de fermentation pour la production d'éthanol et d'autres produits chimiques industriels.

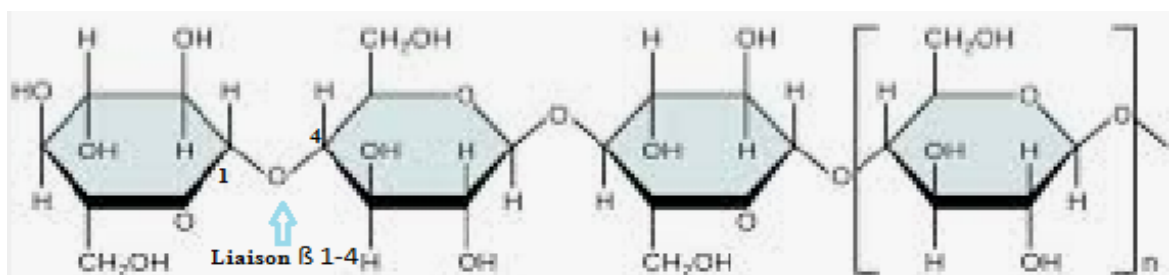


Figure 22 : Structure de la cellulose

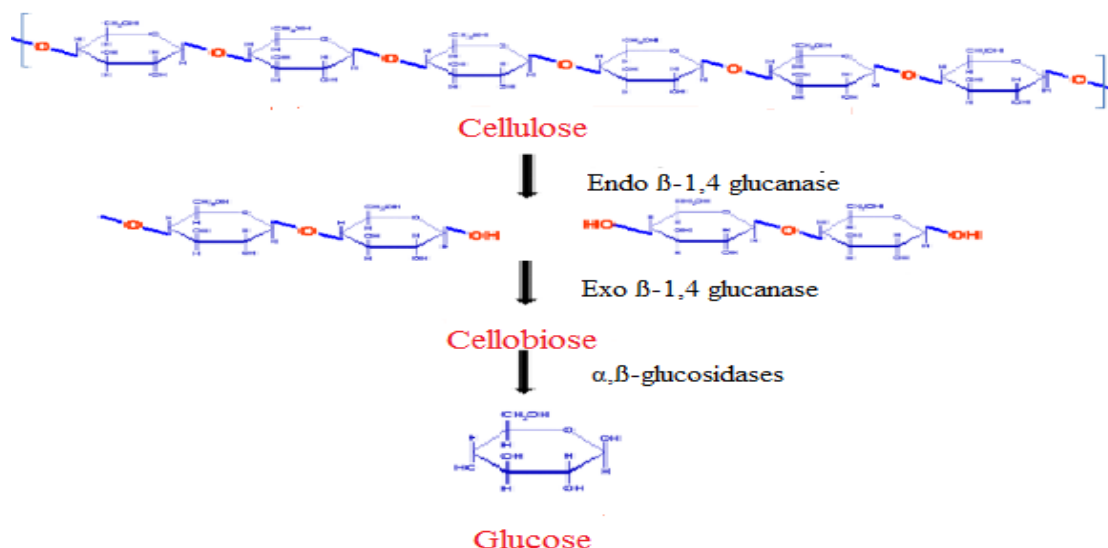


Figure 23 : Dégradation de la cellulose en glucose

1.3. Catabolisme des lipides

Un élément de structure indispensable commun à toutes les cellules procaryotes ou eucaryotes est la membrane cytoplasmique. Cette membrane est principalement composée de phospholipides polaires à l'exception des lipides des Archaea qui contiennent des liaisons éther. Les organites des eucaryotes (mitochondries, noyau, etc) sont également entourés par des membranes phospholipidiques. Les phospholipides sont essentiellement composés de longue chaîne d'acide gras ou de chaîne ramifiées d'alcool chez les Archaea associés à un résidu de glycérol.

Les phospholipides représentent environ 10 % du poids de matière sèche d'une cellule procaryote ou eucaryote typique. Ils sont continuellement libérés dans l'environnement lors de la dégradation des cellules mortes. La biodégradation des phospholipides s'effectue par la libération séquentielle des acides gras. L'action conjointe de phospholipases spécifiques qui est nécessaire au démantèlement des phospholipides libère 2 acides gras à longue chaîne, une molécule de glycérol et une de phospho-sérine. L'acide gras est alors catabolisé par β – oxydation.

1.4. Catabolisme des protéines

Les protéines sont des constituants majeurs de toutes les cellules, elles sont continuellement libérées dans l'environnement par la décomposition des cellules mortes et des déchets. Les micro-organismes (bactéria, archea et champignons) qui participent à la dégradation des protéines sont largement répandues dans la nature. Les micro-organismes débutent la digestion de ces grandes molécules sécrétant des enzymes qui hydrolyse les protéines en molécule plus petites. Les peptides libérés sont alors transportés à l'intérieur de la cellule où ils sont utilisés comme substrats. Les enzymes protéolytiques extracellulaires protéase hydrolysent les protéines en polypeptides qui seront à leur tour clivés par des enzymes endopeptidases. Les endopeptidases ou protéinases hydrolysent les liaisons peptidiques des chaînes polypeptidiques. Leur activité est spécifique, le site de clivage étant défini par la présence d'acide aminés déterminé. Par exemple la thermolysine une endopeptidase de *Basilus thermoprotéoticus*, clive les liaisons peptidiques dans lesquels sont impliqués la leucine, la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine.

Une exopeptidase est une enzyme qui hydrolyse de façon récurrente les acides aminés à partir d'une extrémité de la chaîne peptidique.

Les acides aminés libérés par l'hydrolyse d'une protéine sont transportés dans les cellules des champignons ou des bactéries grâce à des systèmes de transport spécifiques. Des oligopeptides peuvent également être transportés à l'intérieur des cellules où ils sont hydrolysés par l'action des peptidases. Les acides aminés libres peuvent être utilisés pour la synthèse des protéines de la cellule ou être désaminés ou catabolisés comme source de carbone ou /et d'énergie pour la croissance.

2. Etapes de formation d'un biofilm, conditions de développement d'un biofilm

Les cellules microbiennes se fixent inévitablement aux surfaces et initient la division cellulaire, formant des microcolonies et des polymères extracellulaires. Les canaux hydriques transportent les nutriments essentiels et de l'oxygène aux cellules microbiennes en croissance au sein des biofilms. Le développement des biofilms comprend cinq étapes principales : la fixation réversible, la fixation irréversible, la maturation I, la maturation II et la dispersion (figure 24).

- Les micro-organismes s'attachent de préférence sur les surfaces rugueuses, hydrophobes et qui présente un film conditionnant.
- Leur fixation va être favorisée lors de l'augmentation de la vitesse du flux, de la température du milieu et aussi de la concentration en nutriments. L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de flagelles et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface
- De bonnes conditions nutritives sont nécessaires pour l'étape de formation du biofilm, elles peuvent être moins bonnes pour les phases de développement tardif.

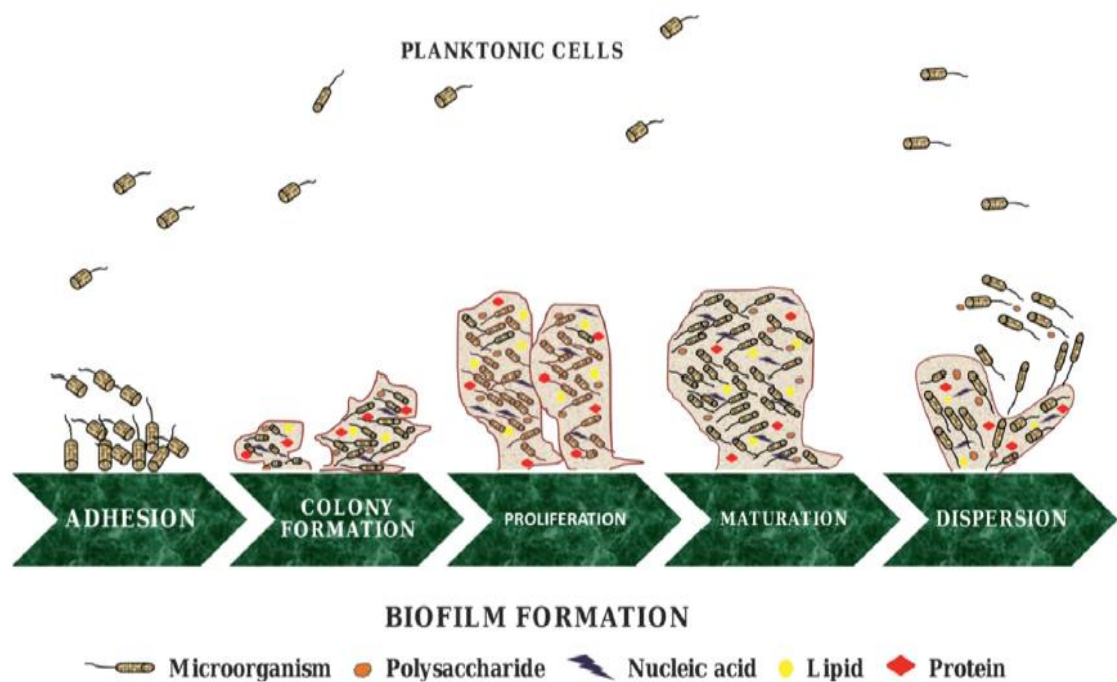


Figure 24 : Différentes étapes de la formation du biofilm : (1) Fixation réversible, (2) Fixation irréversible, (3) Maturation I, (4) Maturation II, (5) Dispersion.

3.Effet des biofilms sur les milieux

Les biofilms jouent un rôle écologique prometteur et significatif et sont utilisés dans le traitement des eaux usées industrielles. La littérature scientifique rapporte que les biofilms bactériens peuvent dégrader les polluants chimiques des industries considérées comme récalcitrantes et servir de source de carbone. Certains chercheurs affirment également que les biofilms sont un élément essentiel de la chaîne alimentaire aquatique, notamment celle des rivières et des ruisseaux, car ils fournissent de la nourriture aux invertébrés et peuvent être ingérés par les poissons vivant dans le milieu aquatique. Les biofilms jouent également un rôle important dans le système d'épuration des eaux usées

4. Microbiologie de l'eau, étude de quelques microorganismes dans les eaux de surface, eaux souterraines et dans les eaux de distribution

4.1. Introduction

Selon la source d'eau, le traitement peut consister en une simple désinfection par chloration ou supposer un traitement bien plus coûteux. Considérant le cas d'une ville située sur les rives d'un fleuve tel que la Seine. Supposant que cette ville soit située en aval de nombreuses autres villes, il est important dans ce cas que la ville utilise un système de traitement extensif constitué de 4 étapes :

- Coagulation,
- Sédimentation,
- Filtration,
- Désinfection.

Ces étapes sont accomplies dans une station de traitement destinée à fournir de l'eau potable (figure 25)

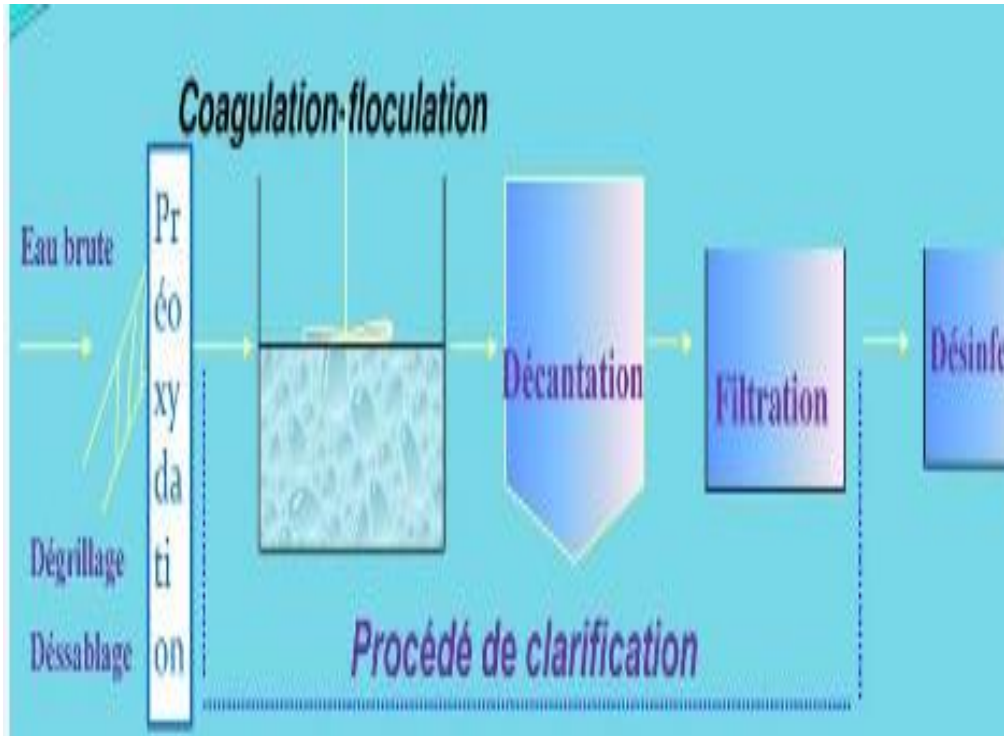


Figure 25 : Station de traitement pour l'obtention de l'eau potable

4.2. Etapes de traitement de l'eau

La coagulation est réalisée par l'ajout d'un sel de sulfate d'aluminium à l'eau, ce produit forme des floccs d'hydroxyde d'aluminium qui absorbe les particules de matière ces floccs sont ensuite éliminées par sédimentation dans une cuve de rétention l'étape suivante et la filtration. L'eau s'écoule à travers des systèmes de sable filtrant qui retiennent les bactéries. Des filtres à sable rapide ou long peuvent être utilisés et les deux sont efficaces pour éliminer les particules de matière compris les cellules bactériennes. Si le système de traitement opère d'une manière efficace environ 99 % des bactéries présentes dans l'eau brute non traitée sont éliminer après filtration sur sable l'étape finale et la désinfection de l'eau. Elle est généralement réalisée par l'ajout de chlore. Le gaz dissout forme une solution d'hypochlorite (comme dans l'eau de javel ménagère) qui rompt de manière efficace les membranes cellulaires des bactéries et entraîne leur mort. Cependant la désinfection ne tue pas toutes les bactéries et de faible quantité de bactéries résiduelle se retrouve dans l'eau traitée.

L'eau potable doit ensuite passer dans un système de distribution avant sa consommation. Afin de s'assurer du caractère potable de l'eau distribuée, celle-ci doit être testée. Deux approches sont possibles pour s'assurer de la sécurité sanitaire de l'eau potable.

La première approche consiste à analyser le taux de chlore résiduel. Si du chlore est encore présent dans l'eau de robinet au taux de 1 ppm, l'eau peut être considéré comme eau potable. Cependant même en présence de chlore résiduelle les bactéries peuvent être toujours présentes, des tests microbiologiques sont donc réalisés en routine pour déterminer le caractère potable de l'eau.

4.3. Contrôle bactériologique de l'eau

Le contrôle bactériologique d'une eau potable devrait logiquement consister à rechercher les germes pathogènes qu'elle pourrait contenir. C'est une opération très difficile à mettre en œuvre en raison du nombre d'analyses à réaliser et de leur coût. Mais, il existe une alternative réaliste à cette situation : La recherche des indicateurs de contamination fécale. Plusieurs germes indicateurs sont proposés et rechercher dans le cadre de protocole technique rigoureusement normalisé. Chacun d'eux est porteur d'une signification particulière mais pris dans leur ensemble, ils offrent des informations complémentaires satisfaisantes pour l'évaluation de la qualité bactériologique de l'eau. Les indicateurs les plus couramment recherchés sont le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile FTAM, Les coliformes fécaux, les

streptocoques fécaux et dans une moindre mesure les Clostridium sulfite-réducteur. Mais selon les pays, la liste des indicateurs officiellement retenus recoupera plus les indicateurs cités ou en inclura d'autres par exemple aux USA, les normes de potabilité tolèrent la présence de coliformes totaux dans moins de 5 % des échantillons analysés (de nombre supérieur à 100) et exigent l'absence totale dans 100 ml d'eau : de coliformes fécaux de Giardia (un protozoaire parasite de l'homme) et de virus

4.3.1. Indicateur de contamination fécale

Les germes pathogènes : bactéries, protozoaires, virus sont rejetés essentiellement dans les matières fécales et dans les urines de l'homme et des animaux malades ou porteurs sains. Ils peuvent par diverses voies contaminer les eaux d'alimentation. Dans les matières fécales, ces germes sont toujours accompagnés d'une microflore saprophyte d'origine digestive considérablement plus importante et donc potentiellement plus facile à rechercher.

Le contrôle bactériologique de l'eau potable est justement basé sur la mise en évidence d'éléments de la microflore fécale saprophyte utilisés comme indicateur de contamination fécale et spécifiquement sélectionnés à cause de leur propriété particulière, dont principalement :

- Il est présent dans les eaux polluées et absent des eaux potables,
- Il est présent dans l'eau en même temps que des pathogènes,
- La quantité d'organismes indicateurs est proportionnelle aux taux de pollution,
- Il survit plus facilement que les pathogènes,
- Ses propriétés sont uniformes et stables,
- Il ne nuit ni aux humains ni aux animaux,
- Il est présent en plus grand nombre que les pathogènes,
- On peut le mettre en évidence par des techniques de laboratoires simples.

La mise en évidence d'une contamination fécale ne signifie pas pourtant la présence obligatoire de germes pathogènes, elle indique seulement la probabilité de leur présence qui suffit alors à déclarer l'eau non potable.

FTAM : Cette microflore est dénombrée sur des milieux gélosés inoculés de l'échantillon d'eau et de ses dilutions. Les cultures sont incubées à 20 °C pour différencier la flore saprophyte

de l'eau et à 37 °C (température du corps humain) pour favoriser les bactéries d'origine intestinales improprement qualifiées de « pathogènes » car elles ne le sont pas obligatoirement.

La signification de la FTAM est en elle-même peu importe pour la potabilité de l'eau puisqu'une eau parfaitement saine peut avoir une FTAM élevée mais composé de bactéries saprofités. Mais si le test est réalisé de manière régulière dans le temps, il donne alors des indications valables sur les variations de la qualité de l'eau liée aux variations de sa FTAM.

Coliformes fécaux

Les coliformes regroupent des bactéries très hétérogènes faisant partie de la famille des Entérobactériaceae. Certains : les coliformes fécaux, sont des hauts spécifiques du tube digestif de l'homme et des animaux homéothermes (telles *Escherichia coli*), alors que d'autres sont saprofités d'écosystème aquatique et tellurique divers. Les premières sont thermotolérantes et se développent encore à 44 °c. tandis que les seconds sont psychotrophes et incapables de croître à cette température. Ce test capital permet donc de les distinguer et d'établir (ou d'affirmer dans le cas échéant) la présence d'une contamination fécale, par la croissance avérée de coliformes à 44 °C.

Leur mise en évidence est très significative mais *Escherichia* reste l'indicateur privilégié. Car hautement spécifique de l'habitat intestinal, elle possède des propriétés similaires à celle des bactéries pathogènes fécales et sa recherche est aisée. Quand la présence de coliformes thermophiles est établie, il est souvent utile de poursuivre l'investigation par l'identification de *Escherichia coli* même si elle représente effectivement 99 % des coliformes thermo tolérant.

La recherche des coliformes thermo tolérant et *Escherichia coli* et classiquement réalisée sur milieu liquide respectivement bouillant lactosé biliés au vert brillant mini d'une cloche de DURHAM pour recueillir les gaz et bouillant peptonné après 48 heures d'incubation à 44 °C. La production de gaz dans le premier milieu et d'indol dans le second milieu indique la présence respective de coliformes thermo tolérant et de l' *Escherichia coli*

Streptocoques fécaux : c'est un groupe de bactéries ayant la propriété commune de posséder l'antigène sérologique D. Certains sont spécifiques de l'intestin de l'homme et /ou d'autres mammifères alors que d'autres ont des habitats divers et quelques-uns sont ubiquitaires. Le groupe des streptocoques fécaux est en réalité composée de streptocoque et d'entérocoques. Bactéries physiologiquement différentes qui forment maintenant des groupes taxonomiques

distincts : les entérocoques ayant été Érigé en genre (*Enterococcus*). Si bien que l'on parle maintenant aussi d'entérocoques fécaux.

Leur présence dans l'eau à une signification discutable, d'autant qu'il n'existe pas de test capable de les différencier en fonction de leur origine, comme c'est le cas chez les coliformes. On considère leur recherche comme un complément à celle des coliformes thermo tolérant notamment en raison de leur meilleure résistance aux conditions de l'environnement qui permettrait de détecter une contamination ancienne.

Clostridium sulfito réducteur : ce sont des bactéries anaérobies sporulantes d'habitats naturels très variés, certaines étant ubiquitaires. Elles sont mises en évidence dans les eaux par la germination de leur sport dans un milieu adéquat ou elles forment des colonies noires en présence de sulfites de sodium et d'Alain de fer.

De nombreux auteurs suggèrent de rechercher *Clostridium perfringens* ou les *clostridium sulfito-réducteurs* ou, plus généralement encore les bactéries sulfitoréductrices (dont *Bacillus*) comme les témoins de l'efficacité d'un traitement pour votre signification.

5. Microbiologie du sol, Microflore du sol

La diversité des populations microbiennes indique qu'ils profitent de toutes les niches trouvées dans leur environnement. Différentes quantités d'oxygène, de lumière, ou de nutriments peuvent exister au sein de quelques millimètres dans le sol. L'activité microbienne est plus grande dans les couches superficielles du sol riches en matières organiques, en particulier dans et autour de la rhizosphère. Le nombre et l'activité des microorganismes du sol dépendent dans une large mesure des quantités de nutriments présents. Les nutriments limitant dans les sols sont souvent les nutriments minéraux tels que le phosphore et l'azote. Comme une population d'organismes aérobies consomme l'oxygène disponible, les anaérobies sont capables de croître. Si le sol est perturbé par le labour, les vers de terre, ou autre activité, les micro-organismes aérobies seront de nouveau en mesure de croître et à répéter cette succession. La croissance microbienne la plus étendue a lieu sur les surfaces des particules du sol et est fortement favorisé à l'intérieur, même

une seule particule de sol peut contenir de nombreux microenvironnements différents et peut ainsi favoriser la croissance de plusieurs types physiologiques de micro-organismes

5.1. Les bactéries

Les bactéries et les champignons utilisent différentes stratégies fonctionnelles pour profiter de cette matrice physique complexe. La plupart des bactéries du sol sont situées sur les surfaces des particules du sol et nécessitent de l'eau et des éléments nutritifs qui doivent être situés dans leur voisinage immédiat. Les bactéries se trouvent le plus souvent sur les surfaces intérieures des pores plus petits du sol (2 à 6 μm de diamètre). Là, elles sont probablement moins susceptibles d'être consommées par les protozoaires, contrairement à celles qui se trouvent exposées sur la surface extérieure d'un grain de sable ou une particule de matière organique.

5.2. Les champignons

Les champignons filamenteux terrestres établissent des ponts dans les zones entre les particules du sol ou des agrégats, et sont ainsi exposés à des niveaux élevés d'oxygène. Ces champignons ont tendance à former des structures imperméables à l'oxygène, comme les sclérotés et des cordes hyphales. Ceci est particulièrement important pour le fonctionnement des basidiomycètes, qui forment des structures étanches à l'oxygène. Dans ces structures, les champignons filamenteux déplacent les éléments nutritifs et l'eau sur de grandes distances, y compris à travers les espaces aériens. Ces polymérisations oxydatives ne se produisent habituellement pas chez les champignons aquatiques

6. Eaux usées

Dans l'environnement naturel, les matières fécales des animaux sont dégradées dans un premier temps par des activités microbiennes. De même, les systèmes de traitement des eaux usées urbaines utilisent la dégradation microbienne comme principal moyen pour dégrader ces matières organiques. Cependant, jusqu'aux années 1900, les villes ne traitaient pas leurs eaux usées. Elles collectaient simplement les eaux usées brutes (ou non traitées) en utilisant un système d'égout et rejetaient cette eau usée dans une rivière ou l'environnement marin selon la localisation de la ville. Cependant, ce rejet dans l'environnement devint vite inadéquat pour deux raisons principales :

- Les impacts écologiques défavorables pour les eaux de réception

- Les impacts nocifs pour la santé publique, certains micro-organismes présents dans les eaux usées étant susceptibles d'être pathogènes.

Ainsi l'eau recevant ces rejets ne peut pas être utilisée pour les sports aquatiques tel que la baignade ou le ski nautique la section suivante traite de ces différents points.

6.1. Impact du rejet des eaux usées sur la santé publique

Quand de grandes villes sont localisées sur des rivières, leurs rejets dans d'eaux usées, peuvent être si abondant que le processus d'auto-écuration ne peut s'effectuer avant que l'eau atteigne la ville suivante. Les villes en aval de la rivière peuvent de ce fait subir des impacts à plusieurs niveaux. En tout premier lieu, l'eau de la rivière ne peut pas être utilisée comme source d'eau potable car elle est susceptible de contenir des agents infectieux provenant de fesses d'individus infectés dans la ville en amont (tableau3). De plus, les plages et d'autres airs de loisirs pollués par les matières fécales ne peuvent pas être utilisées pour les sports aquatiques en raison de risques de contamination par des pathogènes. Les pêcheries de coquillages peuvent être également affectés car les huîtres et les moules qui sont de véritables filtres, ingèrent des particules de matière incluant des bactéries et des virus entraînant une concentration importante de ces pathogènes dans leur tube digestifs. Des réglementations limitent les nombres de bactéries présentes dans les tissus des coquillages et dans les eaux où ils sont cultivés. Bien que les coquillages puissent ne pas être affectés par ses fortes concentrations en micro-organismes pathogène, ils ne peuvent alors pas être utilisés pour la consommation humaine.

6.2. Traitement des eaux usées

Compte tenu des problèmes soulevés par l'élimination des eaux usées, Les municipalités ont maintenant l'obligation de les traiter avant de les rejeter dans l'environnement. Les eaux d'égout sont recueillies par un système de collecteur généralement par un flux dû à la gravité et sont envoyées dans une station d'épuration des eaux usées localisés à proximité d'une rivière ou d'un environnement marin ou après traitement le rejet sera effectué. Bien que le traitement des eaux usées ne restaure pas complètement l'eau dans son état d'origine, il réduit considérablement les concentrations en matières organiques et en bactéries. Il existe trois niveaux de traitement des eaux usées : primaire, secondaire et tertiaire qui seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Tableau 3 : Liste non exhaustive des micro-organismes pathogènes présents dans l'eau

Micro-organismes	Maladies
<p>Bactéries</p> <p>Salmonela typhi</p> <p>Vibrio cholerea</p> <p>Shigella dysenteriae</p> <p>Protozoaires</p> <p>Entémoeba histolytica</p> <p>Giardia lambilia</p> <p>Naegleria</p> <p>Virus</p> <p>Hépatite infectieuse</p>	<p>Fièvre typhoïde</p> <p>Choléra</p> <p>Dysenterie bactérienne</p> <p>Dysenterie amibienne</p> <p>Giardiase</p> <p>Méningo-encéphalite</p> <p>Hépatite</p>

Chapitre 7 : Les agents anti-microbiens

La recherche de l'élimination et de la destruction des microorganismes peut viser à protéger un individu ou un produit.

Elle requiert l'application d'agents antimicrobiens destinés à la désinfection et à la stérilisation des lieux, de l'équipement, de l'eau et des denrées alimentaires.

1. Agents d'élimination

L'élimination des micro-organismes peut se faire par le biais de méthodes mécaniques :

1.1. Le lavage : C'est une méthode facile, mais pas systématiquement performante.

L'efficacité peut être augmentée en utilisant des produits désinfectants tels que l'eau chlorée.

1.2. La décantation et la centrifugation

Facilitent la réduction de la charge microbienne dans les produits liquides.

1.3. La filtration

Elle est aussi employée, sous réserve que le produit ne soit ni visqueux, ni chargé de substances

En suspension

Ces traitements permettent de faciliter des traitements ultérieurs. L'avantage de ces procédés est de ne pas modifier les qualités organoleptiques des produits traités.

2. Agents physiques de stabilisation ou de destruction

La majorité des agents physiques agissent sur tous les microorganismes, en affectant les acides

nucléiques ou les protéines.

2.1 La température

2.1.1. Lachaleur :L'emploi de la chaleur dans les laboratoires pour les milieux de culture et l'équipement est permanent .

De nombreux aliments se conservent grâce aux traitements thermiques.

Les composés organiques, notamment les enzymes, sont dénaturés par la chaleur.

On note donc une interruption de la croissance suivie de la mort des cellules.

- La pasteurisation : l'élimination des formes végétatives (microorganismes pathogènes) mais pas des formes sporulées de bactéries. 30 minutes à 60°C, environ; 10 minutes à 80°C ; quelques secondes à 90°C, et environ 1 à 2 secondes à 140°C (UHT), etc...
- La stérilisation : destruction des formes sporulées pendant 10 minutes à 115°C, 30 minutes à 121°C ou bien 2 heures à 200°C (pour le matériel et la verrerie).
- La tyndallisation : consiste à réaliser des pasteurisations successives, espacées de 12 à 24 heures à des températures de 30 à 40°C ; 56 à 58°C ; 1 heure à 90°C sur une période de trois jours (bain thermostaté / Douce). Méthode employée pour les milieux délicats (vaccin, sérum, émulsion de jaune d'œuf, soufre...). La dormance des spores thermorésistantes est levée au cours du premier chauffage, les cellules végétatives issues de la germination de ces spores sont détruites lors des traitements suivants.

2.1.2. Le Froid : Il entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes. Empêche la multiplication de nombreux germes sauf les psychrophiles

La réfrigération (0-4°C), la congélation (-18°C), la surgélation (-40°C) : permettent une stabilisation vis-à-vis des germes et entraîne une mortalité ± importante selon les germes.

2.1.3. Froid et chaud : La lyophilisation : préserve les caractéristiques de l'aliment tout en stoppant la prolifération bactérienne.

2.2. Les radiations électromagnétiques

On exploite les effets des radiations sur les cellules des êtres vivants ou végétaux pour préserver certains aliments en éliminant leurs microorganismes et parasites. L'irradiation ou

Irradiation : action de soumettre un produit ou un matériel à un rayonnement qui pénètre les objets en profondeur. Les rayonnements détruisent les endospores bactériennes mais pas toujours les virus.

Destinés à la stérilisation des antibiotiques, hormones, sutures, denrées alimentaires et articles plastiques jetables.

2.2.1. Les rayonnements ultraviolets (10 à 400 nm) : leur faible capacité de pénétration les rend particulièrement utiles pour diminuer la charge microbienne dans l'atmosphère, sur les surfaces et dans des couches liquides fines.

2.2.2. Les rayons γ (0,1 à 0,01 nm) : ont une excellente action antimicrobienne et rendent possible la pasteurisation.

2.2.3. Les rayons X : leur utilisation est rare (coût élevé, manipulation complexe).

2.2.4. Les microondes (1 mm à 1 m) : elles sont aussi en activité et causent le mouvement thermique des molécules comme celle de l'eau. La montée de la température de l'eau qui en découle (eau intracellulaire) conduit principalement à la destruction des cellules végétatives.

2.2.5. Les radiations soniques (ultrasons) : tuent les micro-organismes en suspension. Elles ne sont que rarement employées en tant qu'agents antimicrobiens, mais plutôt comme outils de lyse cellulaire et d'extraction de composants cellulaires.

3. Agents chimiques pour la stabilisation et la destruction

La sélection d'un agent antimicrobien chimique se fait en fonction de son efficacité, sa toxicité, sa durabilité, son potentiel corrosif, son parfum et d'autres critères en lien avec ses diverses applications. (Les polluants organiques ou minéraux exercent aussi une action antimicrobienne dans un écosystème).

3.1. Désinfectant

Substance chimique ayant la capacité d'éliminer les germes infectieux dans des milieux extérieurs

l'humain (eau, air, sol, etc.). On utilise généralement ce terme pour désigner les substances qui agissent sur des objets inanimés.

3.2. Antiseptique

Substance chimique apte à éliminer les microorganismes ou à inhiber leur développement (microbicide, microbiostatique). En général, il exerce une action locale sur les êtres vivants. Normalement, l'administration pour l'homme (non ingérée) à l'exception de l'eau de javel (eau potable).

3.2.1. Agents oxydants oxygénés

En solution aqueuse, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un antiseptique efficace à 3% (10V). Toutefois, sa décomposition rapide restreint son utilisation.

3.2.2. Chlore et dérivés

Le chlore sous forme gazeuse et ses dérivés sont couramment employés comme agents antiseptiques pour le traitement des piscines, l'eau potable, la désinfection des lieux, des objets contaminés et autres. La forme gazeuse est très difficile à manipuler (dangereuses, équipement adéquat). Il est plus simple d'utiliser les formes liquides : Hypochlorites et chloramines.

Eau de Javel

$NaClO$.

3.2.3. Iode et dérivés

On utilise des solutions aqueuses d'iodure de potassium ou de sodium pour la désinfection des blessures superficielles. Elles ne provoquent pas d'irritation.

3.2.4. Métaux lourds et sels

Le mercurochrome et le nitrate d'argent sont employés en tant qu'antiseptiques (notamment pour la désinfection des yeux des nouveau-nés). On utilise le sulfate de cuivre dans la désinfection des locaux et des piscines.

3.2.5. Alcools

Les désinfectants et antiseptiques les plus couramment utilisés sont à base d'alcools.

On les utilise comme désinfectant pour la peau.

3.2.6. Phénols et composés aromatiques

Le phénol était utilisé dès le 19^e siècle dans le cadre de l'asepsie en chirurgie.

Les crésols, les xylinols et l'orthophénol sont utilisés comme agents désinfectants dans les hôpitaux. Ils sont bénéfiques grâce à leur efficacité et leur persistance dans le temps, leur action n'est pas entravée par la présence de matières organiques.

3.2.7. Les aldéhydes

Le formol, aussi appelé formaldéhyde, est un désinfectant et sporicide hautement efficace. On peut l'utiliser pour garantir une stérilité totale de l'environnement, cependant ses vapeurs sont toxiques. Le glutaraldéhyde est utilisé en milieu hospitalier, moins irritant que le formol.

3.2.8. Les colorants

On les utilise pour la désinfection des plaies et autres (bleu de méthylène, vert malachite, vert brillant, violet de gentiane, violet de méthyl...etc.).

3.2.9. Savons et détergents

Le pouvoir antiseptique des savons varie selon les espèces.

On les utilise pour désinfecter la peau, les mains, le linge, etc.

On utilise des détergents pour nettoyer les équipements et les surfaces.

3.2.10. Les antibiotiques

Il s'agit de composés chimiques organiques générés par quelques micro-organismes ou issus de la synthèse chimique, qui exercent à faibles doses une toxicité sur d'autres micro-organismes.

L'efficacité antibactérienne de ces derniers est déterminée par leur composition chimique et leur spectre d'action.

3.2.11. Essences volatiles et huiles essentielles

Les essences naturelles possèdent un effet antibactérien grâce à la présence de composés phénoliques, d'alcools et autres.

Essences : clou de girofle/antiseptique utilisé en chirurgie dentaire ; Thym/agent antiseptique intestinal et respiratoire ; Eucalyptus/antiseptique pour les voies respiratoires et plus encore.

3.2.12. Autres agents chimiques

Les solvants lipidiques (comme l'éther) ont un effet sur certaines bactéries et virus ; - On utilise des gaz (tels que l'oxyde d'éthylène) pour désinfecter les espaces et les objets qui ne peuvent être stérilisés à haute température. La B propiolactone, qui est un liquide à température ambiante,

produit des vapeurs hautement réactives et est employée pour la stérilisation des équipements et des milieux de culture.

TP N° 1 – Présentation du laboratoire de microbiologie, matériel et règles à suivre durant les
travaux pratiques de microbiologie

1. Objectifs :

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement

2. Visite des locaux :

- Structure
- Présentation des gros matériels (étuves, autoclave, bain marie ...)

3. Présentation d'un poste de travail :

- Matériels (bec bunsen, pipettes, verres, béchers anse, pinces lame...) (figure 26),
- Produits (eau, alcool, colorants divers...)

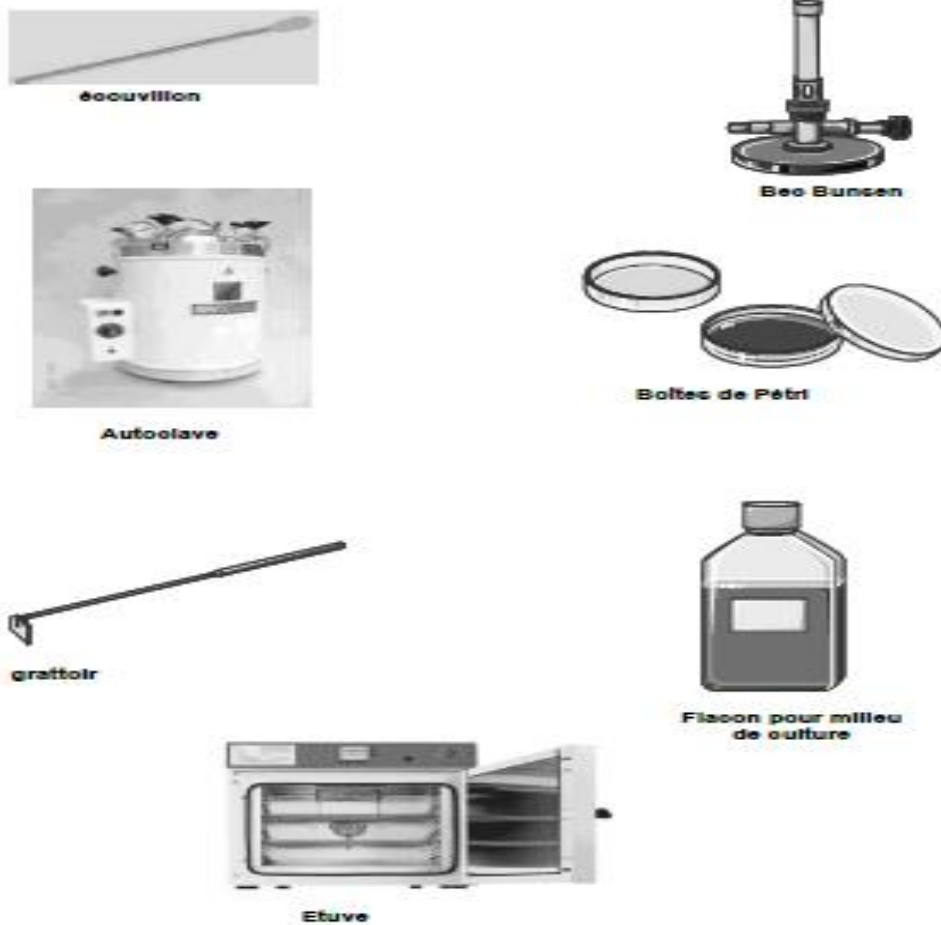


Figure 26 : Matériel d'un laboratoire de microbiologie

4. Les consignes de sécurité :

- Procéder à un lavage minutieux des mains, avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.
- Éviter les ouvertures des fenêtres pendant les manipulations

- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.

- Flamber, avant et après manipulations, les anses métalliques utilisées pour les prélèvements, en commençant par chauffer la partie moyenne de l'instrument afin de dessécher les restes de culture avant de porter l'extrémité dans la flamme, ceci pour éviter toute projection.

- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.

- Interdiction formelle de boire, manger et fumer pendant les TP

- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation

- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.

5. Conseils généraux

- Le port de la blouse est obligatoire

- Apporter une pince fine et un marqueur permanent (pointe fine)

- Travailler dans des conditions d'asepsie près de la source de chaleur et en reproduisant les gestes du démonstrateur. Par exemple : comment tenir le tube, le bouchon, la pipette ou l'anse de platine utilisée pour l'ensemencement.

-Repérer les boîtes de chaque binôme à l'aide de vos initiales sur le fond de la boîte.

a- Liste des parties

Parties Mécaniques :

1. Base supporte tout l'appareil.
2. Potence bras recourbé par lequel on saisit l'appareil pour le transporter ; supporte le tube optique et la platine.
3. Platine plateau sur lequel on dépose la préparation à observer ; elle est percée en son centre pour laisser passer la lumière.
4. Valets dispositif servant à retenir la lame en place.
5. Chariot pièce métallique située sur la platine ; sert à déplacer la préparation (contrôlé par les vis de déplacement du chariot).
6. Vis de déplacement permet de déplacer le chariot (et donc la lame) ; l'une permet les déplacements du chariot avant-arrière (haut-bas pour l'image) et l'autre les déplacements latéraux (gauche-droite).
7. Tube optique porte à ses deux extrémités les deux composantes du système optique : l'oculaire et les objectifs.
8. Revolver pièce circulaire rotative reliée au tube optique et qui porte les objectifs ; permet de placer dans l'axe optique du microscope l'objectif approprié.

9. Vis macrométrique commande le déplacement en hauteur rapide et visible de la platine ; permet une première mise au point de l'objet à observer ; ne doit être utilisée qu'avec l'objectif à faible grossissement.

10. Vis micrométrique commande un déplacement en hauteur de la platine de très faible amplitude (mouvement produit peu visible) ; sert à faire la mise au point fine.

11. Vis du condensateur permet d'ajuster la hauteur du condensateur, pour obtenir l'éclairage optimal ; attention, il s'agit d'une grosse vis, pas d'une petite (ne touchez pas aux petites vis : le condensateur pourrait tomber).

Parties Optiques :

12. Source lumineuse fixée sur la base, sous le condensateur ; vous pouvez régler son intensité (Lampe) (attention de ne pas envoyer trop de lumière : c'est plus fatigant pour les yeux et on perd des détails).

13. Condensateur système de lentilles situé sous la platine ; concentre les rayons lumineux pour augmenter la clarté de l'image. Sa hauteur est réglable par une vis.

14. Diaphragme intégré dans le condensateur ; dose la quantité de lumière qui traverse l'objet ; contrôlé par un petit levier qui se déplace latéralement (pas une petite vis : un levier).

15. Objectif fixés sur le revolver, ils sont au nombre de quatre ; chacun est un système de lentilles pointé vers l'objet à observer ; produisent des images agrandies de l'objet (4X, 10X, 40X, 100X).

16. Oculaire système de lentilles pointé vers l'œil de l'observateur ; il agrandit une nouvelle fois (10X) l'image déjà agrandie par l'objectif et la transmet à l'œil.

3. Examen à l'état frais

C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier

Leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie (figure 28).

Préparation :

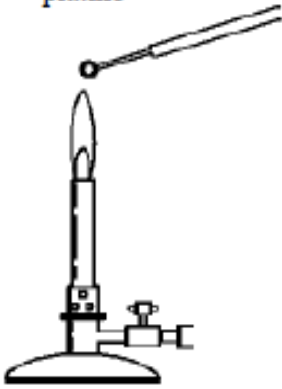
a. A partir d'une culture en milieu liquide :

Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle.

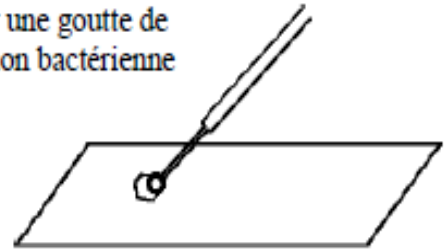
b. A partir d'une culture sur milieu solide :

Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide. Recouvrir d'une lamelle.

1. Flamber l'anse de platine



2. Déposer une goutte de la suspension bactérienne



3. Recouvrir d'une lamelle

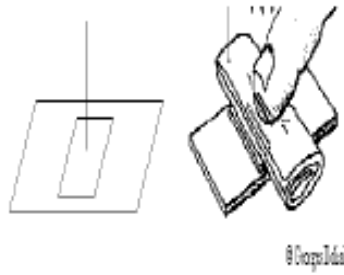


Figure 28 : Examen microscopique à l'état frais

TP N° 3 - Techniques d'ensemencement

1. Objectifs :

Afin de pouvoir identifier une espèce bactérienne de façon convenable, il faut faire des tests ou des expériences dessus. Il est souvent utile d'avoir une quantité importante de bactéries. Pour cela, on multiplie la souche en réalisant des ensemencements sur une gélose ou dans un milieu liquide adapté.

2. Ensemencement d'un bouillon

L'utilisation d'un bouillon permet *une pousse rapide et homogène* des bactéries. Cependant, il a des désavantages. En effet, s'il y a plusieurs espèces bactériennes dans un prélèvement ou une contamination extérieure, il est impossible de différencier les différentes espèces bactériennes puisque les cellules se trouvent en milieu liquide donc mélangées...

La technique d'ensemencement d'un bouillon est par contre très simple (figure 29) :

- Stériliser l'instrument servant à prendre la souche bactérienne d'origine (pipette dans le cas de bouillon, anse dans le cas d'une colonie)
- Prélever la souche à ensemer
- Stériliser l'ouverture du flacon de bouillon stérile
- Ensemencer le bouillon à l'aide du prélèvement effectué précédemment

- Restériliser l'ouverture du flacon de bouillon
- Stériliser l'instrument

Il ne reste plus qu'à incuber dans les conditions optimales

3. Technique du transfert à l'öse

Le tube de départ est saisi de la main gauche entre pouce et index. L'öse est saisie de la main droite, comme un crayon, stérilisée à la flamme et refroidie dans la zone de stérilité du bec Bunsen. Le tube de départ est présenté, orifice vers la zone de protection, et est débouché à l'aide du petit doigt de la main tenant l'öse.

L'orifice du tube et le bouchon doivent rester dans la zone de protection et ne toucher aucun objet. On flambe l'orifice du tube pour détruire les germes pouvant s'y trouver. L'öse est alors introduite dans le tube sans toucher les bords.

Le prélèvement est effectué soit par grattage d'une colonie à l'aide de la boucle (sans abîmer la gélose), soit par trempage de la seule boucle dans un milieu liquide. L'öse est ensuite retirée sans toucher les parois ; le bord du tube est à nouveau flambé et le bouchon remis. Pendant cette opération, l'öse chargée de germes ne doit ni sortir de la zone stérile, ni pénétrer dans la flamme du bec.

L'opération est renouvelée avec le tube d'ensemencement vierge qui est débouché et dans lequel on fait pénétrer l'öse.

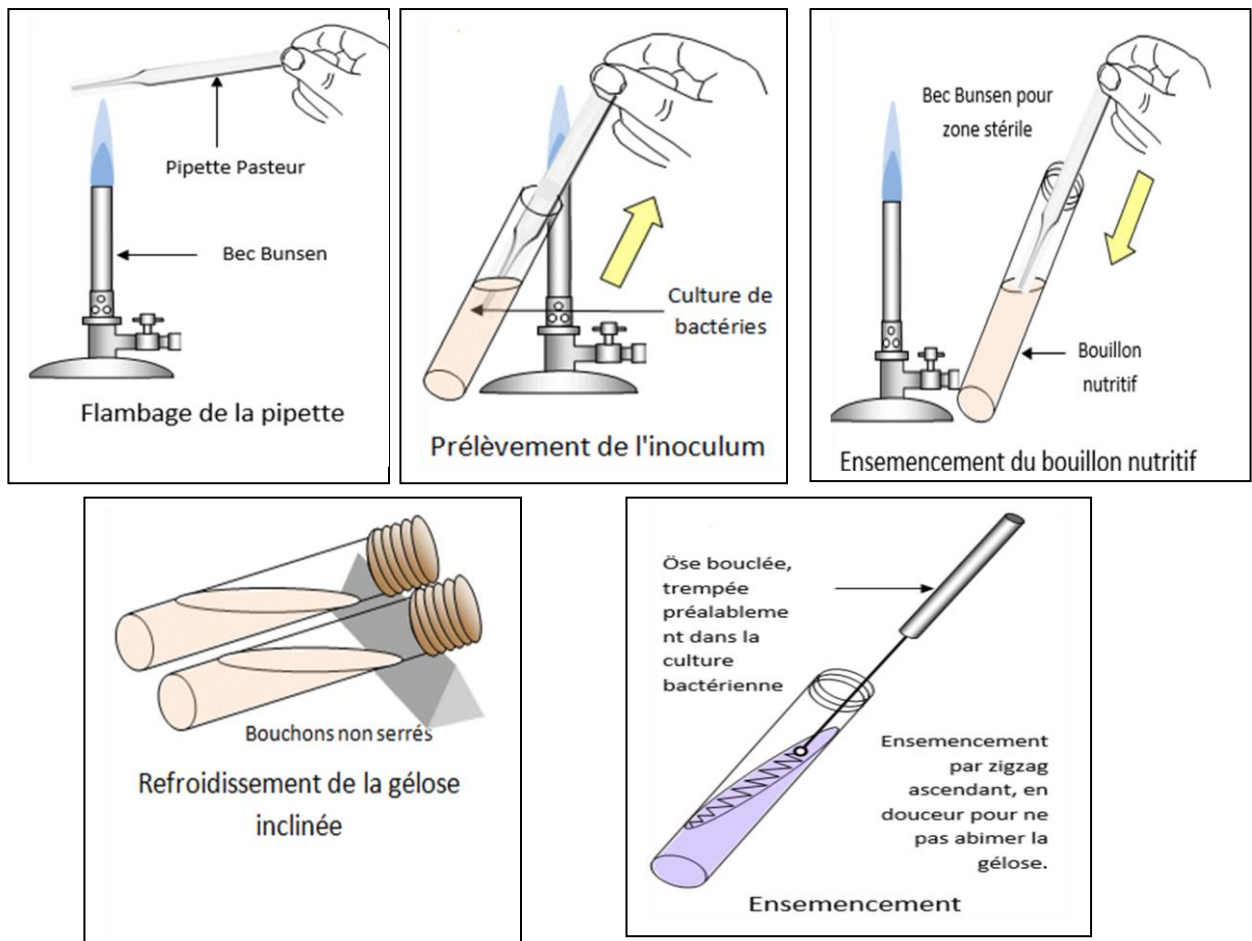


Figure 29 : Ensemencement d'un bouillon

- S'il s'agit d'un milieu liquide, la boucle est agitée légèrement en surface du milieu en raclant les bords du tube pour bien libérer et répartir l'inoculum.
- S'il s'agit d'une gélose inclinée, la boucle va se poser au fond du tube, à la surface de la gélose et l'inoculum est déposé en stries ascendantes régulières sans rayer la gélose.

TP N° 4 -Contrôle de l'environnement (surface, Air et eaux)

1- Contrôle de surface

Objectifs

- Vérifier la bonne application des procédures de bionettoyage
- Évaluer le niveau microbiologique pour une activité donnée.

Quand prélever ?

- Hors présence humaine : après la procédure de bionettoyage (vérification de l'application et de l'efficacité) avant l'activité.
- Tout au long de l'activité : permet d'étudier la recontamination

1.1. Méthode par count tact (figure 30)

- Gélose count tact d'une surface de 25 cm²
- Applicateur : 500g (\pm 50g) pendant 10 secondes.

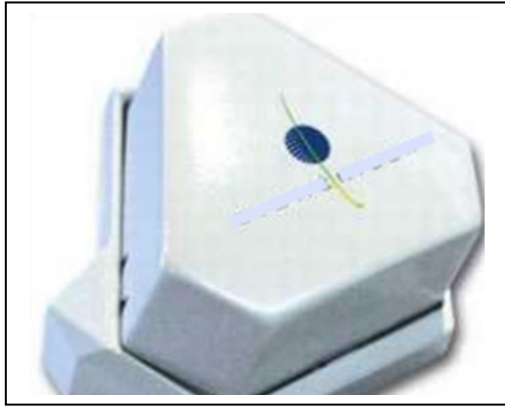


Figure 30 : Contrôle de surface par la méthode count tact

Analyses :

Incubation des géloses (TSA) à 30°C pendant 5 jours.

Lecture intermédiaire à 3 jours.

Identification systématique des microorganismes isolés

1.2. Méthode par écouvillonnage (figure 31)

Écouvillons stériles emballés dans un fourreau



Figure 31 : Contrôle de surface par écouvillonnage

-Surfaces : Après humidification à l'aide d'eau stérile, réaliser le prélèvement en quadrillant une zone d'une surface connue

-plonger l'écouvillon dans le siphon, réaliser un mouvement circulaire

Analyses

Gélose adaptée aux micro-organismes recherchés

- Flore totale : PCA, Columbia au sang
- Fongi : Gélose au malt, Sabouraud.

-Etaler sur gélose appropriée l'écouvillon en quadrillage, et en faisant tourner l'écouvillon.

-Incuber les géloses selon les recommandations du fabricant et des exigences du micro-organisme recherché.

-Identification.

2. Contrôle de l'air

2.1.Objectif :

Mettre en évidence expérimentalement la présence de micro-organismes dans l'air d'un local et énoncer leurs dangers afin d'en dégager des gestes de prévention à appliquer par le personnel dans son milieu professionnel visant à limiter le risque de contamination par la flore de l'air.

2.2. Expérience

a- Technique :

- 1) Numéroter à l'aide d'un marqueur 3 boîtes gélosées : N° 1, N° 2, N° 3
- 2) Placer les boîtes N° 1, 2 et 3 ouvertes dans les conditions suivantes :
 - boîte N° 1 à l'extérieur du laboratoire dans un endroit abrité (ex : rebord de fenêtre)
pendant 30 min. au moins,
 - boîte N° 2 à l'intérieur du laboratoire dans un endroit calme, sur la paillasse pendant 30
min. au moins,

- boîte N° 3 à l'intérieur du laboratoire, sur la paillasse pendant 30 min. au moins, dans un endroit agité

(ex. : essuyage à sec de la paillasse, mouvement de personnes ...).

- Incubation des géloses à 30°C pendant 5 jours., lecture intermédiaire à 3 jours.

Définition du terme « incubation de micro-organismes » : temps nécessaire à la multiplication des micro-organismes (bactéries, moisissures ...) sur un milieu nutritif (gélose).

b- Observation et évaluation des résultats

Examiner les boîtes après incubation et présenter les résultats dans le tableau 4.

moisissures ...) dérivée d'une cellule unique facilement observable à l'œil nu sur un milieu nutritif solide (gélose).

(Remarque : quand il y a une seule cellule, elle est microscopique donc invisible à l'œil nu ; quand le nombre de cellules devient très élevé, celles-ci deviennent macroscopiques donc visibles à l'œil nu.)

Tableau 4 : Résultats du contrôle de l'air

N° de la boîte et conditions de l'expérimentation	Nom des opérateurs (groupe de 2 élèves)	Nombre de colonies (de bactéries et de moisissures)	Aspect des colonies bactériennes (ex : couleur, taille, translucide ou opaque, bord régulier ou irrégulier) et des colonies de moisissures (couleur, taille)

Définition d'une colonie de micro-organismes : population de micro-organismes (bactéries,

Comment différencier les colonies de bactéries et de moisissures ?

- colonies bactériennes : amas de plusieurs millions de bactéries se présentant sous forme de petits ronds généralement lisses sur la gélose d'aspect et de couleurs variés (ex : blanche, crème, jaune, orange ...) selon les espèces représentées.

- colonies de moisissures : se présentent en cercles de taille parfois importante ayant un aspect de velours, cotonneux, poudreux et de couleur bleuâtre, grisâtre ou verdâtre selon les espèces.

3. Contrôle de l'eau

Objectif

L'examen microbiologique de l'eau est de fournir des informations quant à la présence de micro-organismes qui causent des maladies, provenant généralement d'une contamination par des matières fécales humaines ou d'autres animaux à sang chaud.

a- Analyse d'une eau contaminée

- Préparation des dilutions

Avant d'ensemencer les milieux, on effectue des dilutions en cascades de la solution 10^{-1} à la solution 10^{-5} (figure 32) :

On prélève le tube contenant l'eau à analyser 1mL que l'on place dans un des tubes contenant les 9mL de tryptone-sel, on homogénéise la solution à l'aide du vortex, puis on prélève 1mL de ce tube pour le mettre dans un troisième tube et ainsi de suite jusqu'au cinquième tube. (voir schéma ci-dessous)

:

10mL d'eau à analyser

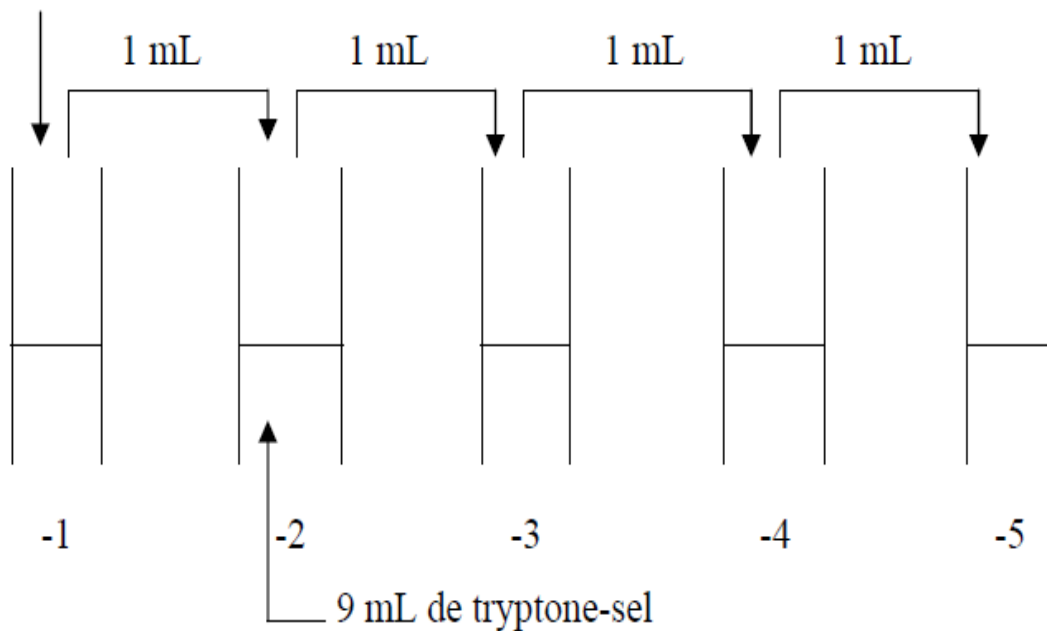


Figure 32 : technique de dilutions en cascades

- Analyse

Afin de dénombrer les microorganismes contenus dans l'eau on suit le tableau 5

Tableau 5 : Dénombrement des microorganismes contenus dans l'eau

Micro-organismes	Milieux	Dilutions	Incubation
Micro-organismes aérobie à 30°C	GTS	1mL (-1 à -5)	72h/30°C
Micro-organismes aérobie à 37°C	GTS	1mL (-1 à -5)	24h/37°C
Coliformes	Bouillon lactosé au bromocrésol pourpre	1mL (-2 à -5) (NPP à 3 tubes)	24h/30°C
Entérocoques	Rothe	1mL (-2 à -5) (NPP à 3 tubes)	24h/30°C
*Spores de Clostridium sulfito-réducteur	VF + 0.5 mL sulfite de sodium (5%) + 2 gouttes d'alun de fer (5%)	2.5mL (-1 à -5)	24h/37°C

b- Analyse d'une eau peu contaminée

Certains micro-organismes étant à une concentration très faible dans l'eau, il est logique d'envisager que par filtration d'un volume important d'eau, on puisse arrêter sur le filtre toutes les bactéries présentes. Les pores du filtre doivent être, bien sûr, de dimensions inférieures à celles des bactéries. Une fois les micro-organismes recueillis, toute analyse peut être faite en reportant le filtre sur un milieu adéquat

Méthode de filtration sur membranes

- Matériel

L'appareil est un simple système de filtration sous pression réduite (trompe à eau). Il contient un support filtre qui reçoit, sur une partie à larges pores, la membrane de filtration. Le godet permet de recevoir l'eau à analyser. Les deux parties doivent s'assembler de manière solide paraimants, par caoutchoucs. Enfin, l'ensemble doit être stérilisable. Les membranes utilisées (en ester de cellulose) sont quadrillées, et les pores ont un diamètre de 0.45 μm .

- Mode opératoire

L'ensemble de l'appareillage doit être placé près d'un bec benzène, de manière à ménager une zone de travail stérile, et à pouvoir stériliser le matériel.

- Flamber l'ensemble du système de filtration.
- Flamber une pince à bout plat permettant de saisir les membranes sans les altérer.
- A l'aide de cette pince, on saisit la membrane délicatement que l'on va placer sur le support de filtre.
- Verse doucement 100mL de l'eau à analyser.
- Faire le vide sans brutalité pour ne pas briser la membrane.
- Rincer, avec de l'eau stérile, l'ensemble de l'appareil, en particulier les bords internes du godet.
- Sécher la membrane.

- Débrancher le tuyau à vide avant le fermer le robinet.

- Retirer la membrane, à l'aide de la pince.

- Poser la membrane sur le milieu en la roulant, de manière à ne pas emprisonner de bulles d'air

- Incuber à la température choisie

TP5 : Recherche et dénombrement des germes revivifiables

La recherche et le dénombrement des germes revivifiables se réalise à deux températures différentes afin de cibler à la fois les micro-organismes à tendance psychrophiles soit à 20° et ceux franchement mésophiles soit 37°C.

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement 2fois1ml dans deux boites de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées.

Compléter ensuite chacune des boites avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à 45±1°C.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de «8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.

Laisser solidifier sur pailleasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5ml de la même gélose ou de gélose blanche. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses (figure 33).

1.Incubation

La première boite sera incubée, couvercle en bas à 20°C,

La seconde sera incubée couvercle en bas à 37°C, Pendant 72 heures avec :

Première lecture à 24 heures,

Deuxième lecture à 48heures, et

Troisième lecture à 72heures.

2.Lecture

Les germes revivifiables se présentent dans les deux cas sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse.

3.Dénombrement

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies, en tenant compte deux remarques suivantes :

Ne dénombrer que les boites contenant entre 15et300colonies,

Le résultat sera exprimé par millilitre d'eau à analyser à 22°età37°C.

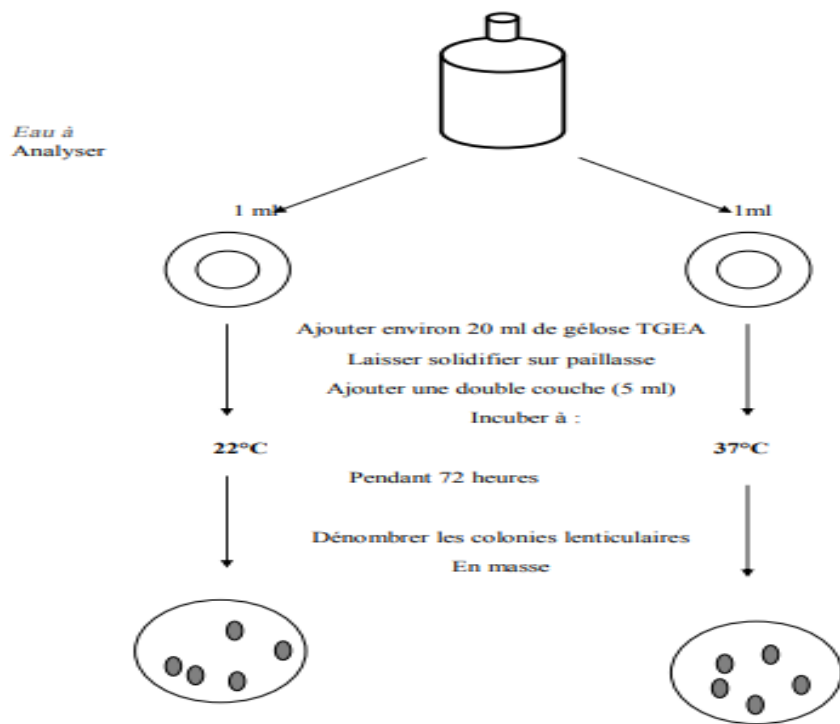


Figure 33 : Dénombrement des germes revivifiables

TP6 : Colimétrie. Recherche et dénombrement des Coliformes en milieux liquides

Les coliformes se présentent sous forme de Bacilles Gram négatifs (BGN), non sporogènes, oxydase négative, Aero-anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C.

Les coliformes sont considérés comme indices de contamination fécale.

La recherche et le dénombrement des coliformes peuvent se faire selon deux méthodes de choix :

Soit en milieu liquide sur BCPL par la technique du NPP (Nombre le Plus Probable).

Soit par filtration sur membrane à 0,45µm en milieu solide en supposant la disponibilité d'une rampe de filtration.

1. Technique en milieu liquide sur BCPL

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

Le test de présomption : réservé à la recherche des Coliformes totaux.

Le test de confirmation : encore appelé test de MacKenzie et réservé à la recherche des Coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

1.1. Test de présomption.

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPLD/C muni d'une cloche de Durham

5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPLD/C muni d'une cloche de Durham

5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPLS/C muni d'une cloche de Durham,
comme l'indique le schéma n° 2.

Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche),

Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe.

Illustration :

Inoculum	Test de présomption	Nombre Caractéristique
1X50ml	+	1
5X10ml	+	
	+	
	+	
	-	3
	-	
5X1ml	+	
	+	
	-	
	-	2
	-	

Le nombre caractéristique est donc «132 » ; ce qui correspond sur la table de Mac Grady au nombre 14.

On considère alors qu'il ya14 Coliformes par100 ml d'eau à analyser.

1.2. Test de confirmation ou test de MacKenzie.

Le test de confirmation ou test de MacKenzie est basé sur la recherche de Coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'Escherichia coli.

Les coliformes thermotolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C.

Escherichia coli est un coliforme thermo tolérant qui entre autres :

- produit de l'indole à partir du tryptophane à 44°C,
- donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl,
- ne produit pas de l'acétyle méthylcarbinol,
- n'utilise pas le citrate comme source unique de carbone.

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham.

Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation:

L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Lecture : Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

Un dégagement gazeux, et un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia Coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP en tenant compte du fait qu'Escherichia Coli est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

Illustration

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des Coliformes totaux, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

Le flacon de BCPL D/C,

3 tubes sur 5 de BCPLD/C, et

2 tubes sur 5 de BCPLS/C.

Le tableau 6 récapitule le dénombrement des Coliformes en milieux liquides

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc «111», ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 5.

Le résultat final sera donc de :

14 coliformes dans 100 ml d'eau à analyser

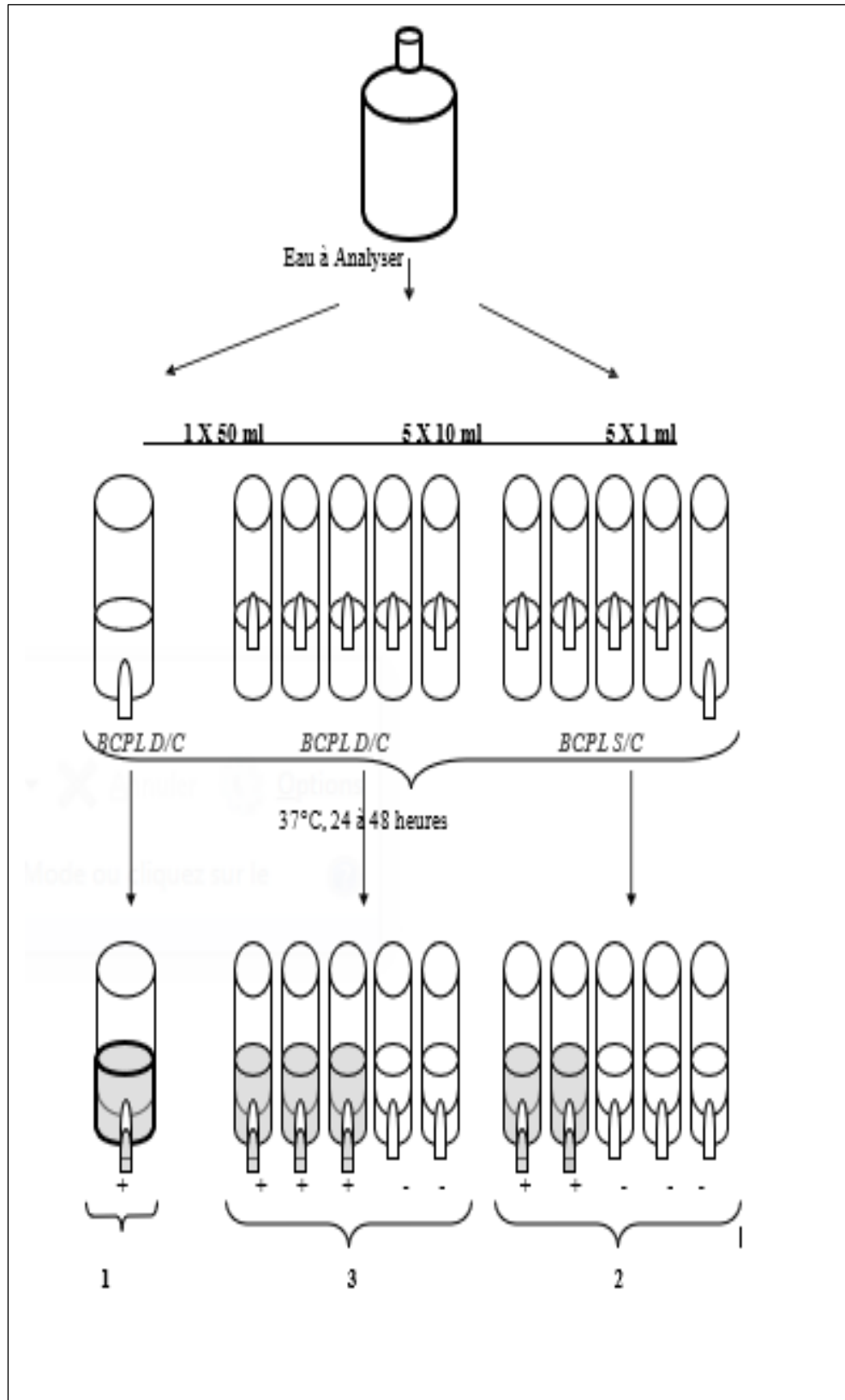
Remarque :

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

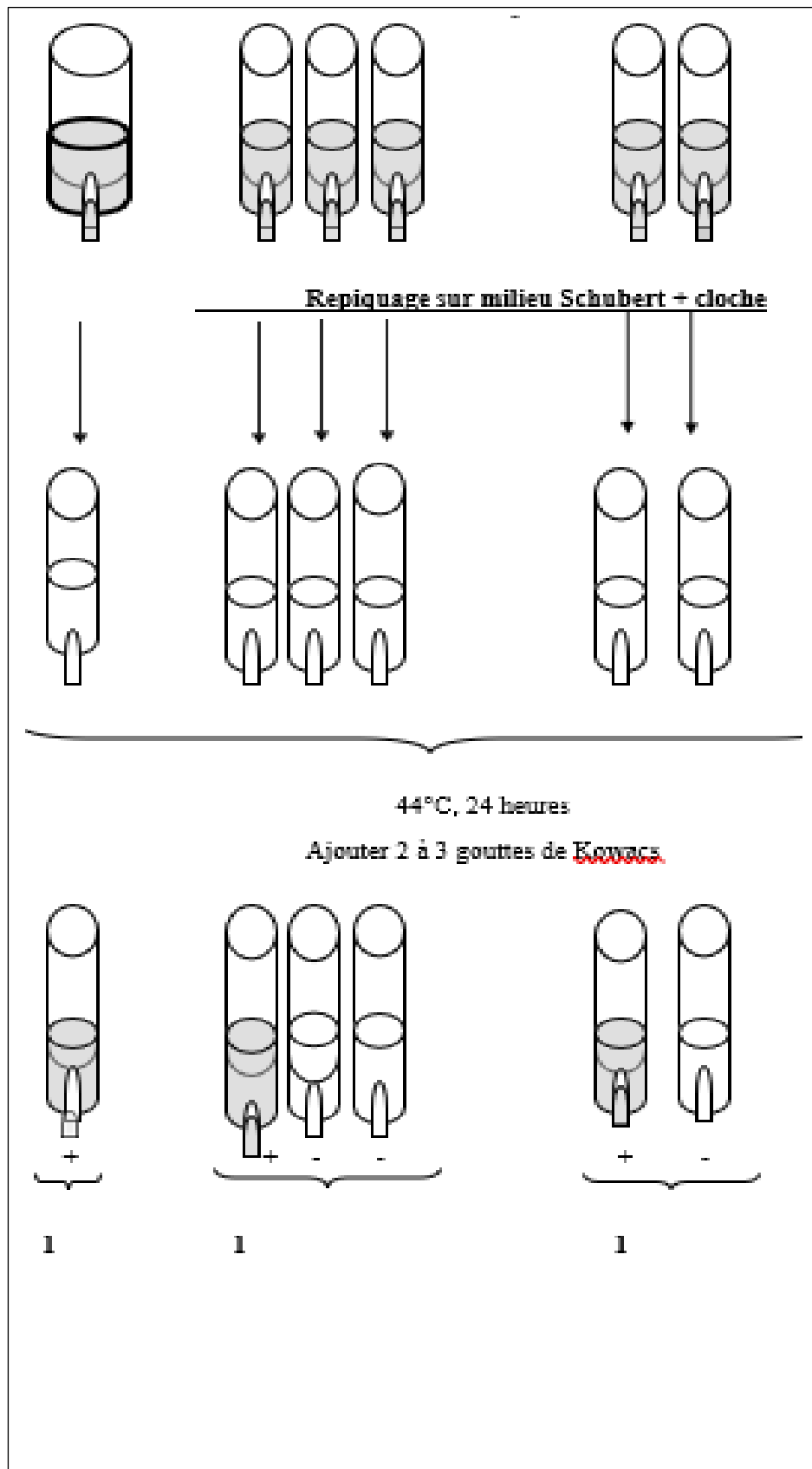
Le tableau 6 : Dénombrement des Coliformes en milieux liquides

Inoculum	Test de Présomption	Nombre Caractéristique	Test de confirmation		Nombre Caractéristique
			Gaz	Indole	
1X50ml	+	1	+	+	1
5X10ml	+	3	+	-	1
	+		+	+	
	+		-	+	
	-				
	-				
5X1ml	+	2	-	+	1
	+		+	+	
	-				
	-				
	-				

Colimétrie : test de présomption



Colimétrie : test de confirmation



TP7 : Streptometrie, Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux en milieux liquides

Les Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D de la classification de Lancefield, se présentent sous forme de cocci à Gram+, sphériques à ovoïdes formant des chaînettes, ne possédant pas de catalase mais possédant l'antigène du groupe D.

Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies caractéristiques réduisant le TTC et qui de plus hydrolysent l'esculine en 48 heures à 44°C après repiquage d'une colonie sur une gélose biliée à l'esculine. Leur recherche et leur dénombrement peut se faire de la même manière que pour les coliformes, c'est à dire à l'aide de deux méthodes distinctes selon la disponibilité ou non d'une rampe de filtration et seuls les milieux de culture changent.

1.Méthode de recherche en milieu liquide

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

Le test de présomption

Le test de confirmation : réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

1.1. Test de présomption.

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu ROTHED/C,

5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHED/C,

5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHES/C, comme l'indique le schéma n° 5.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien, seulement ces derniers ne doivent en aucun cas faire l'objet de dénombrement. Doivent par contre, absolument faire l'objet d'un repiquage sur milieu LITSKYEVA dans le but d'être confirmés.

1.2. Test de confirmation.

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu LITSKY EVA.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation :

L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures.

Illustration :

Inoculum	Test de présomption
1X50ml	-
5X10ml	+
	+
	-
	-
	-
5X1ml	+
	+
	+
	-
	-

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

Un trouble microbien, et

Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe.

Illustration

En reprenant l'exemple précédent relatif au test de présomption, cela suppose que nous avons

5 tubes à repiquer à savoir :

2 tubes sur 5 de ROTHED/C, et

3 tubes sur 5 de ROTHES/C.

Le tableau 7 récapitule le dénombrement des streptocoques en milieux liquides

Le tableau 7 : Dénombrement des streptocoques en milieux liquides

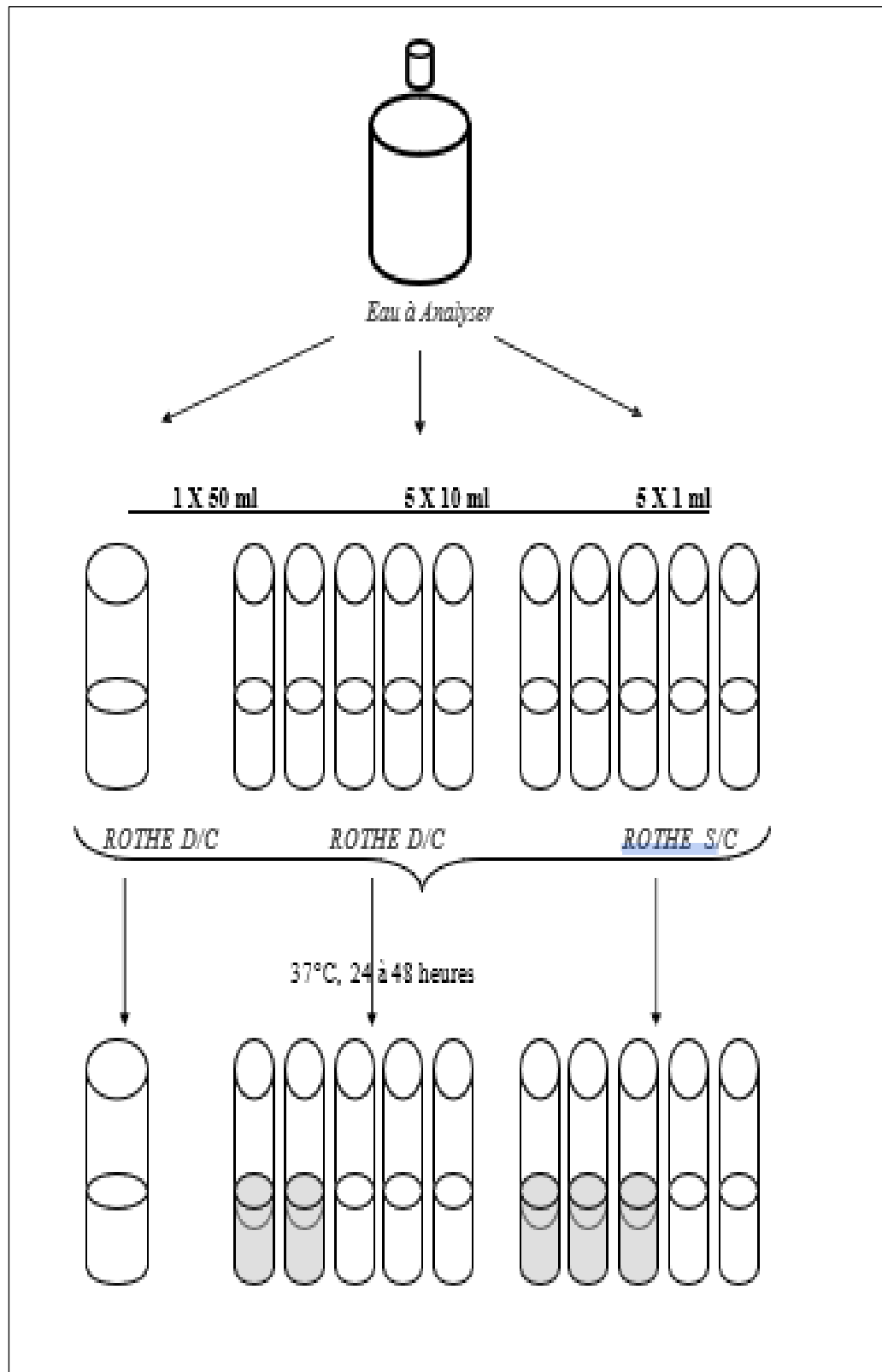
Inoculum	Test de présomption	Test de confirmation		Nombre Caractéristique
		Trouble	Pastille Violette	
1X50ml	-			0
5X10ml	+ + - - -	+ + - - -	+ + - - -	2
5X1ml	+ + + - -	- + + - -	+ + - - -	1

Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Streptocoques fécaux est donc «021

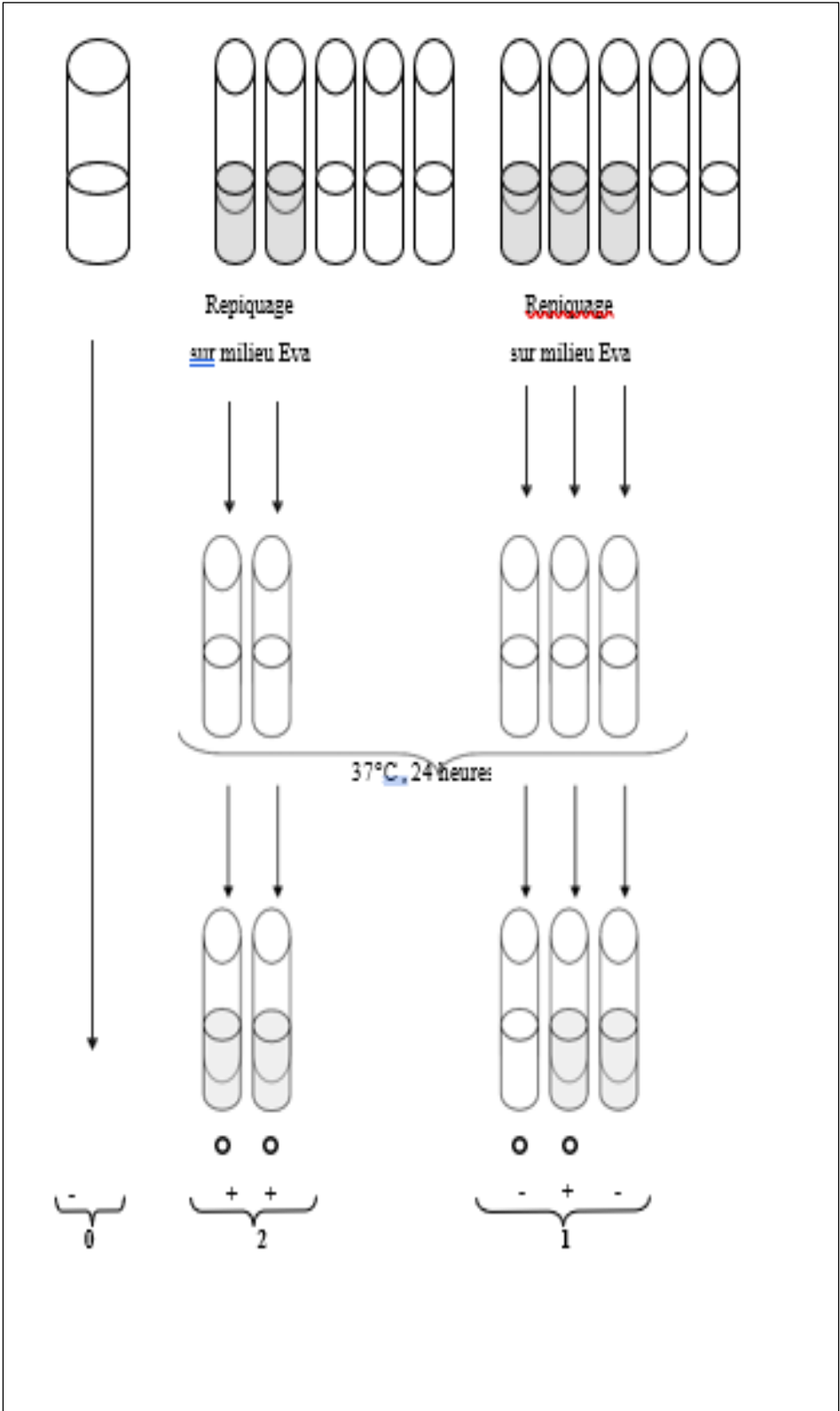
», ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 3.

Le résultat final sera donc de : 3 Streptocoques fécaux dans 100 ml d'eau à analyser

Streptométrie : test de présomption



Streptométrie : test de confirmation



TP 8 : Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobies

Sulfito-Réducteurs

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) se présentent sous forme de bactéries Gram +, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire.

Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne.

1.Mode opératoire

A partir de l'eau à analyser :

Prendre environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.

Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.

Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.

Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à 45°C , additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de Sulfite de sodium.

Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène.

Laisser solidifier sur pailasse pendant 30 minutes environ, puis incuber à 37°C, pendant 24 à 48 heures.

2. Lecture

La première lecture doit absolument être faite à 16 heures car très souvent les colonies des ASR sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant ainsi l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse sera à refaire en utilisant des dilutions décimales de 10^{-1} voire 10^{-2} , la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière à 48 heures.

Dénombrer toute colonie noire de 0,5mm de diamètre, poussant en masse.

3. Interprétation des résultats.

Il est donc impératif de repérer et de dénombrer toutes les colonies noires poussant en masse et de rapporter le total des colonies à 20 ml d'eau à analyser.

Références bibliographiques

- [1] Jean-Louis Fauchère, Jean-Loup, 2002 « Bactériologie générale et médicale Avril ». Publisher, Ellipses, ISBN, 2729807470, 9782729807474., 365 pages.
- [2] Perry Jerome, J james, T staley, 2004 « Microbiologie : Cours et questions de révision » Paris : dunod, , NA/8381. 308 Éditeur : Dunod. Date de parution : 01/05/2004 890 pages, parution le 01/05/2004
- [3] Alphonse Meyer, José Deiana, Alain, 2004 « Bernard Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés » Collection Biosciences et techniques Éditeur, Doin, 2004 ; ISBN, 2704011702, 9782704011704 ; Longueur, 430 pages.
- [5] Camille Delarras, 2014 « Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures ». Doi : 10.1016/S1773-035X (15)72777-2.
- [6] Institut pasteur d'algerie, 2002 « Cours national d'hygiene et de microbiologie des aliments, Unité : microbiologie des eaux, des boissons et des produits de la mer », Manuel des travaux pratiques.
- [7] L. Pepper, Charles P. Gerba, 2009 « Chapitre 1 - Introduction à la microbiologie environnementale » microbiologie environnementale (Deuxième Edition), Pages 3-7 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00001-8>
- [8] Héctor A Videla, 2002 « Prévention et contrôle de la biocorrosion » Biodétérioration et biodégradation internationales, Volume 49, numéro 4, pages 259-270. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00053-7)
- [9] William H. Schlesinger, Emily S. Bernhardt, 2013 « Le cycle mondial du carbone » Biogéochimie (troisième édition), pages 419-444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385874-0.00011-X>

[10] Ian L. Pepper, Terry J. Gentry, (2015) « Microorganismes présents dans l'environnement » Environmental Microbiology (Third edition), Pages 9-36
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00002-8>

[11] Susmita Datta, Soma Nag, Dijendra N. Roy (2022) « Design of experiments and relevant protocols» A Complete Guidebook on Biofilm Study. DOI: [10.1016/B978-0-323-88480-8.00004-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88480-8.00004-2)

[12] Igor José dos Santos Nascimento, Leandro Rocha Silva, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior (2023) « Défis de la conception d'agents antiviraux » Infections virales et traitements antiviraux , Pages 169-209, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91814-5.00017-9>

Annexe : Table NPP

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		