



Prévision et prévention de la pollution des eaux souterraines

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE ET DE LA RECHERCHE
BUREAU DE RECHERCHES GÉOLOGIQUES ET MINIÈRES

SERVICE GÉOLOGIQUE NATIONAL

Département Eau

DIRECTION DU PERSONNEL
ET DES RELATIONS SOCIALES
Département Formation Permanente

DOCUMENT PUBLIC



ÉLÉMENTS DE MICROBIOLOGIE DES EAUX

Rapport du B.R.G.M.

83 SGN 386 EAU

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE ET DE LA RECHERCHE

BUREAU DE RECHERCHES GÉOLOGIQUES ET MINIÈRES

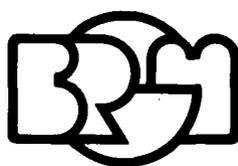
DOCUMENT PUBLIC

ÉLÉMENTS DE MICROBIOLOGIE DES EAUX

Rapport coordonné

par

A. LANDREAU, M. SAUTER



SERVICE GÉOLOGIQUE NATIONAL

Département Eau

B.P. 6009 - 45060 Orléans Cedex - Tél.: (38) 63.80.01

**DIRECTION DU PERSONNEL
ET DES RELATIONS SOCIALES
Département Formation Permanente**

Rapport du B.R.G.M.

83 SGN 386 EAU

Juin 1983

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE ET DE LA RECHERCHE

BUREAU DE RECHERCHES GÉOLOGIQUES ET MINIÈRES

DOCUMENT PUBLIC

ÉLÉMENTS DE MICROBIOLOGIE DES EAUX

Rapport coordonné

par

A. LANDREAU, M. SAUTER



SERVICE GÉOLOGIQUE NATIONAL

Département Eau

B.P. 6009 - 45060 Orléans Cedex - Tél.: (38) 63.80.01

**DIRECTION DU PERSONNEL
ET DES RELATIONS SOCIALES
Département Formation Permanente**

Rapport du B.R.G.M.

83 SGN 386 EAU

Juin 1983

ÉLÉMENTS DE MICROBIOLOGIE ET D'ÉPIDÉMIOLOGIES
LIÉS À LA NATURE DES EAUX

problèmes spécifiques de la microbiologie des eaux

*
* *

Dr. J. VIAL

Institut Pasteur de Lyon

R É S U M É

Dans le cadre de la formation continue, un stage de microbiologie des eaux à l'attention des hydrogéologues s'est déroulé du 26 au 28 octobre 1982.

Ce rapport résume l'intervention des différents conférenciers. Les aspects suivants sont présentés :

- *Eléments de microbiologie et d'épidémiologies liées à la nature des eaux* Dr. J. VIAL
Institut Pasteur de Lyon

- *Bactéries du soufre - Corrosion* Pr. RIVIERE
Institut National Agronomique
M. MAZOIT
Directeur honoraire du Service de
Contrôle des eaux de la Ville de Paris

- *Bactéries du fer - Corrosion* Pr. KAISER
Institut National Agronomique

- *Rôle des microorganismes dans le cycle de l'azote* Mme FAURIE
Laboratoire de biologie des sols,
Faculté des Sciences de Lyon

- *Transferts des microorganismes dans le sol* M. MAZOIT
Directeur honoraire du Service de
Contrôle des eaux de la Ville de Paris

- *Réglementation en matière d'eaux thermominérales* Dr. NINARD
Membre du Conseil Supérieur d'Hydro-
climatisme

S O M M A I R E

1. NOTIONS GENERALES SUR LES MODIFICATIONS DES APTITUDES DE L'EAU A UNE UTILISATION DONNEE, PAR SUITE DE VARIATIONS DANS LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE

2. LES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE NUISANCES VIS-A-VIS DE LA SANTE DE L'HOMME

2.1. LES VIRUS

2.1.1. *Virus contaminant par voie digestive*

2.1.2. *Virus contaminant par voie cutanéomuqueuse*

2.2. LES BACTERIES

2.2.1. *Bactéries contaminant par voie digestive*

2.2.2. *Bactéries contaminant par voie transcutanée*

2.2.3. *Bactéries contaminant par voie cutanéomuqueuse*

2.3. LES LEVURES ET CHAMPIGNONS

2.4. LES PROTOZOAIRES

2.5. LES VERS

2.5.1. *Vers contaminant par voie digestive sans passage par hôte intermédiaire*

2.5.2. *Vers contaminant par voie transcutanée sans passage par hôte intermédiaire*

2.5.3. *Vers contaminant par voie digestive après passage par hôte intermédiaire*

2.5.4. *Vers contaminant par voie transcutanée après passage par hôte intermédiaire*

2.6. CONCLUSION

3. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE SOMMAIRE DES MALADIES D'ORIGINE HYDRIQUE

3.1. NOTIONS PERMETTANT D'APPRECIER LE RISQUE EPIDEMIOLOGIQUE

3.1.1. *Dose minimale infectante*

3.1.2. *Variation de la concentration des microorganismes pathogènes dans les milieux récepteurs*

- 3.2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES
 - 3.2.1. *Données concernant les maladies provenant des eaux de boisson*
 - 3.2.2. *Données concernant les maladies provenant des baignades*
 - 3.2.3. *Données concernant les maladies provenant de la consommation d'huîtres et de coquillages*
 - 3.2.4. *Données concernant les maladies résultant de l'emploi d'eaux usées brutes dans l'agriculture*

4. APPRECIATION DES RISQUES SANITAIRES RESULTANT DE LA PRESENCE DES MICRO-ORGANISMES PATHOGENES DANS LES EAUX AU STADE DE LEUR UTILISATION (EAUX "NATURELLES" ou "TRAITEES")
 - 4.1. UTILISATION DES INDICATEURS DE POLLUTION
 - 4.1.1. *Indicateurs fécaux*
 - 4.1.2. *Autres indicateurs de pollution*

 - 4.2. UTILISATION DES INDICATEURS D'EFFICACITE DE TRAITEMENT
 - 4.2.1. *Choix d'indicateurs d'efficacité de traitement*
 - 4.2.2. *Limites des indicateurs d'efficacité de traitement*

 - 4.3. DIFFERENCES ENTRE LES INDICATEURS D'EFFICACITE ET LES INDICATEURS DE TRAITEMENT

5. IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES (PATHOGENES OU INDICATEURS) DANS L'EAU - PRECISIONS DES RESULTATS - SENSIBILITES DES METHODES - DIFFICULTES TECHNIQUES EN FONCTION DE LA NATURE DE L'EAU
 - 5.1. PRINCIPES - PRECISION ET SENSIBILITE DES PRINCIPALES TECHNIQUES DE DENOMBREMENT DES BACTERIES
 - 5.1.1. *Principes des méthodes*
 - 5.1.2. *Précision des méthodes*
 - 5.1.3. *Sensibilité des techniques*

 - 5.2. PRINCIPALES DIFFICULTES DE L'IDENTIFICATION D'UNE ESPECE BACTERIENNE DANS UN ECHANTILLON CONTENANT UNE GRANDE VARIETE DE MICROORGANISMES
 - 5.2.1. *Difficultés dans les recherches et dénombrements de germes pathogènes*
 - 5.2.2. *Difficultés dans les dénombrements d'indicateurs*

 - 5.3. PRECISIONS DANS LA PRATIQUE DES DENOMBREMENTS BACTERIENS

1. NOTIONS GENERALES SUR LES MODIFICATIONS DES APTITUDES DE L'EAU A UNE UTILISATION DONNEE, PAR SUITE DE VARIATIONS DANS LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE

La microbiologie de l'eau, c'est-à-dire l'étude des microorganismes que l'on peut trouver dans l'eau, intéresse l'ingénieur dans la mesure où la présence de ces microorganismes provoque des modifications dans les possibilités d'utilisation de cette eau, en vue d'un usage déterminé.

Les variations de la qualité microbiologique ont une influence particulièrement importante sur les usages sanitaires de l'eau. C'est dans ce cadre que se situera presque exclusivement cet exposé. Mais elles peuvent avoir également une influence dans d'autres utilisations intéressant l'ingénieur chargé de l'équipement urbain.

Les microorganismes que l'on trouve dans l'eau ont des origines très variées : certains peuvent être d'habitat essentiellement hydrique ; la plupart proviennent du sol (entraînés par ruissellement), des végétaux et animaux, vivant ou non dans le milieu aquatique, et enfin de l'homme.

Les bactéries assurent un rôle important dans l'épuration des eaux, en détruisant les matières organiques ; c'est le rôle qui est utilisé pour la détermination de la D.B.O. L'ingénieur qui fabrique ou utilise un produit chimique nouveau, dont on peut supposer qu'à un certain stade de son utilisation il sera déversé dans une eau naturelle, doit s'assurer de son devenir dans son milieu. Il devra notamment vérifier que ce produit pourra être dégradé par ces microorganismes aquatiques, soit spontanément, soit après une adaptation.

Lorsque par suite de la trop grande abondance de substances organiques déversées, cette défense naturelle résultant de l'action des microorganismes est submergée, il s'installe une vie aquatique en anaérobiose, avec le plus souvent production de substances malodorantes et inesthétiques.

Une telle nuisance se constitue in situ : il est difficile d'y remédier de façon curative : une oxygénation d'une rivière, d'un lac, est une opération difficile. Le remède doit être une action préventive : éviter le déversement polluant.

La présence de bactéries, ou de certaines espèces de bactéries, peut également constituer une nuisance redoutable dans l'utilisation non sanitaire de l'eau :

- L'abondance globale des bactéries dans des canalisations de refroidissement, et la présence entre autres, de bactéries sulfato-réductrices, puis de bactéries ferrugineuses, est un facteur important de corrosion.

- La présence de bactéries gélatinolytiques dans l'industrie alimentaire où la présence de leurs spores (qui résistent à des températures élevées) peuvent provoquer des nuisances organoleptiques, qui, même sans conséquences hygiéniques pour le consommateur, peuvent être responsables

d'un préjudice commercial important. La présence de pseudomonas dans les eaux utilisées dans les industries liées aux films photographiques peut également donner des nuisances de cet ordre.

Mais dans ce type de nuisances industrielles, l'eau étant prélevée dans son milieu naturel, puis transportée loin de là sur le milieu d'utilisation, il est possible d'instituer entre ces deux localisations un traitement pour éliminer les microorganismes nuisibles.

Ces deux situations, correspondant aux utilisations in situ et à distance se trouvent dans les problèmes sanitaires posés par l'altération de la qualité microbiologique des eaux, qui seront dès maintenant le seul sujet de cet exposé.

2. LES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE NUISANCES VIS-A-VIS DE LA SANTE DE L'HOMME

2.1. LES VIRUS

2.1.1. Virus contaminant par voie digestive

Les virus les plus importants sont ceux qui infectent l'homme par voie digestive et sont éliminés avec les matières fécales. Les principaux virus de ce groupe sont les enterovirus (de petite taille, 20 à 30 nanomètres), les parvovirus également de petite taille, et les reovirus ainsi que les adenovirus de plus grande taille (70 à 80 nanomètres). Au contraire des précédents, le virus de l'hépatite A, très proche des enterovirus, n'a pu être cultivé in vitro.

Parmi les enterovirus, les virus agents de la poliomyélite sont les plus dangereux pour l'homme ; les virus Echo et Coxsackie A et B sont impliqués dans des processus à manifestation très diverse. L'origine hydrique d'une contamination par ces organismes, notamment par les virus polio, n'a été qu'exceptionnellement mise en évidence de façon indubitable. Au contraire, la transmission par l'eau joue un rôle très important pour l'hépatite A. Récemment, on a mis en évidence le rôle des rotavirus.

L'hépatite infectieuse A

Jusqu'aux années 1945, "l'hépatite ou jaunisse" avait pour dénomination médicale "ictère catarrhal", c'est-à-dire "ictère de cause inconnue". La connaissance de la nature virale de l'affection ne date que de la deuxième guerre mondiale.

Schématiquement jusqu'en 1977, il existait deux hépatites virales :

- l'une dite hépatite B ou "hépatite sérique", d'incubation longue (60 à 180 jours) transmise par la voie parentérale : transfusion, dialyse, injections, ou simplement par effraction cutanée ;
- la seconde dite hépatite A ou "hépatite épidémique", à incubation plus courte (15 à 40 jours), transmise selon le mode des affections digestives.

L'hépatite épidémique ou hépatite A peut être considérée comme "la maladie hydrique virale". Son incidence en effet augmente régulièrement depuis une vingtaine d'années, de sorte qu'elle représente, tout au moins dans les climats tempérés, une des maladies transmissibles parmi les plus fréquentes.

Les virus en cause, s'éliminant notamment par les matières fécales, sont de très petites particules de taille voisine de celle du virus poliomyélitique, c'est-à-dire parmi les plus petites, 24 à 40 nanomètres.

L'hépatite A se manifeste de façon endémique et donne souvent lieu à des épidémies plus ou moins importantes.

L'épidémiologie a démontré que des poussées épidémiques peuvent être provoquées par des eaux polluées en contact avec les eaux d'égoûts, ou consommation d'eau contaminée.

Les coquillages jouent un rôle très important, la preuve en a été faite aux U.S.A., au Canada, en Suède, en France, ... La propagation de l'hépatite A s'explique aisément par la grande résistance du virus : il supporte une heure à 60°C, et sa conservation à -70°C ne modifie nullement son pouvoir infectant. Il faut une teneur en chlore de 1 mg/l pendant 30 minutes pour l'inactiver.

La poliomyélite

Avant l'ère vaccinale, sous nos climats, la poliomyélite était une maladie endémique ou épidémique atteignant électivement le jeune enfant. Avec l'amélioration des conditions de vie, l'âge d'acquisition des anticorps s'est peu à peu élevé. De nombreux cas sont apparus avec aggravation du caractère épidémique dans les pays à niveau sanitaire le plus élevé. Les campagnes de vaccination ont arrêté ce processus.

Le virus poliomyélitique possède la particularité d'être extrêmement résistant dans les milieux extérieurs ; dans l'eau douce, il peut survivre quelques semaines à température normale et plusieurs mois à 0°C, il peut résister au processus d'épuration des eaux usées ; "il faut un contact d'au moins une heure à une teneur en chlore actif de 0,50 mg/l pour l'inactiver". Il est éliminé pendant une période qui peut atteindre trois mois, par les malades, mais également par les porteurs sains beaucoup plus nombreux. Ces conditions sont très favorables à une dissémination par l'eau.

Les diarrhées à rotavirus

C'est une affection de connaissance récente, les premiers cas humains ont été décrits en 1973 frappant électivement nourrissons et enfants au-dessous de 3 ans et jeunes animaux. Maladie intestinale très contagieuse, elle est caractérisée par une incubation courte, une diarrhée avec déshydratation, fatigue et anorexie ; l'évolution est en général bénigne en une semaine. Son agent peut être mis en évidence par examen des selles au microscope électronique, ce qui est d'un très grand intérêt diagnostique ; il semble en effet que 50 à 80 % de diarrhées non étiquées ont cette étiologie. Les rotavirus semblent très peu sensibles aux antiseptiques.

2.1.2. Virus contaminant par voie cutané-muqueuse

On peut signaler le rôle attribué entre autres aux adenovirus. En étudiant en 1969, 155 cas de fièvre pharyngo-conjonctivale ou de conjonctivite folliculaire, TARABCAK et col. ont isolé des adenovirus comme agents responsables chez 77 patients, qui, tous, s'étaient baignés en étangs ou rivières quelques jours avant le début de la maladie. On a attribué à ces virus également des conjonctivites dans les eaux de piscines.

2.2. LES BACTERIES

2.2.1. Bactéries contaminant par voie digestive

2.2.1.1. Première catégorie

Elle rassemble les bactéries de caractères biologiques assez proches, dont l'habitat normal est l'intestin de l'homme, parfois celui de certains animaux à sang chaud. La contamination se fait par les matières fécales. Ce groupe rassemble les agents de la plupart des grandes épidémies hydriques historiques : épidémies de choléra (dues à *Vibrio cholerae*), de typhoïdes ou affections voisines (dues à *Salmonella typhi*, paratyphi B et quelques sérotypes voisins), de dysentéries bacillaires (dues aux *Shigella*). Les gravités de ces épidémies ont fait que jusqu'à ces dernières décades, la prophylaxie hydrique et le traitement des eaux ont été orientés essentiellement contre le risque qu'elles représentaient. Aux bactéries désignées dans ce premier groupe, il convient d'ajouter les *Escherichia coli* pathogènes, dont le rôle dans les épidémies de gastro-entérites a été mis en évidence ces dernières années.

La typhoïde

La typhoïde a une distribution universelle. Dans les pays tempérés où de longue date elle a sévi à l'état endémo-épidémique, elle représente la maladie hydrique type par excellence. C'est une maladie sérieuse dont la mortalité en l'absence d'antibiotiques est de l'ordre de 10 %. Grâce au chloramphénicol le pronostic est très amélioré ; néanmoins, une certaine inquiétude s'est fait jour pour l'avenir avec l'apparition au Mexique de souches résistantes à cet antibiotique. Le rôle de l'eau dans son apparition, établi avec certitudes il y a un siècle par les élèves de Pasteur, a été à l'origine des grands travaux et mesures d'hygiène collective, notamment des adductions d'eau potable. En France, le taux de morbidité annuel se maintient autour de 2 pour 100 000 habitants. Par ailleurs, nombre de cas sont contractés au cours de voyages, à l'étranger.

Le choléra

*Cette maladie due classiquement à *Vibrio cholerae*, récemment à *Vibrio elitor* a réalisé au maximum le type de maladie aigüe épidémique à propagation catastrophique.*

Le choléra est resté localisé en Asie jusqu'au XIX^e siècle ; il a commencé à émigrer en 1817 ; depuis six pandémies ont été recensées. En France, la dernière incursion date de 1892 c'est-à-dire avant la généralisation des adductions d'eau potable.

Actuellement, nous vivons la septième pandémie. En Europe, l'expérience acquise depuis 1970 démontre, par opposition à ce qui s'est passé au siècle dernier, que la maladie ne s'implante pas dans les pays où les conditions sanitaires sont satisfaites.

Selon l'O.M.S., dans le monde en 1978, 74 632 cas ont été notifiés et 40 pays ont été atteints.

La dysentérie bacillaire

Maladie universelle très contagieuse, épidémique ou endémique. Elle est due à diverses espèces du genre *Shigella*. Elle se traduit par un syndrome gastro-intestinal plus ou moins grave. La forme majeure la plus grave a pratiquement disparu de nos contrées. Ce qui s'observe ce sont des formes mineures bénignes qui touchent essentiellement les collectivités enfantines. En France, *Shigella sonnei* est la plus courante, son origine est souvent alimentaire plus rarement liée à une contamination de l'eau.

2.2.1.2. Seconde catégorie

Elle rassemble des bactéries telles que des *Salmonella* autres que celles responsables des typhoïdes décrites précédemment, des staphylocoques pathogènes, des *Clostridium perfringens*. D'origine pouvant être fécale (*Salmonella*) mais aussi cutanée (staphylocoques), elles sont responsables des "intoxications alimentaires", mais celles-ci ne peuvent résulter que de l'absorption d'un nombre considérable de ces germes : l'aliment doit contenir au moins 10^5 germes par gramme. De telles concentrations ne peuvent en pratique être obtenues directement dans l'eau, milieu pauvre, mais elles peuvent survenir dans des aliments contaminés par une eau contenant une faible quantité de ces germes.

2.2.1.3. Troisième catégorie

Elle peut rassembler des germes qui, depuis peu de temps, semblent devoir jouer un rôle non négligeable dans la pathologie hydrique ; deux d'entre eux semblent plus particulièrement dignes d'être cités : *Yersinia enterocolitica* et *Vibrio parahemolyticus*, ce dernier dans les eaux marines en particulier.

On peut également citer un germe dont le rôle est connu depuis beaucoup plus longtemps, *Mycobacterium tuberculosis* - agent de la tuberculose - qui peut provoquer des affections tuberculeuses après avoir été absorbé dans des circonstances tout à fait exceptionnelles.

2.2.2. Bactéries contaminant par voie transcutanée

Parmi les bactéries de ce type, les leptospires, seules, présentent un intérêt pratique pour les pays d'Europe occidentale (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona*,...).

Pasteurella tularensis - agent de la tularémie - est à l'origine de maladies hydriques dans les pays nordiques (Canada) ou de l'Europe orientale (U.R.S.S.).

La leptospirose

C'est une maladie de l'animal qui n'est qu'accidentellement transmise à l'homme. Son agent, le leptospire, est une bactérie hélicoïdale de grande taille, 20 à 30 microns, particulièrement sensible à la dessiccation, à la dissémination universelle. La maladie se transmet de vertébré à vertébré, l'homme n'est qu'un chaînon terminal et occasionnel, la contamination inter-humaine est pratiquement inexistante.

Le réservoir de germes est représenté essentiellement par les rongeurs. Des animaux domestiques peuvent être porteurs sains. Les leptospires dans l'organisme sont localisés dans le parenchyme rénal, ils sont excrétés par les urines pendant des mois et parfois même des années. Les formes pathogènes, lorsqu'elles sont éliminées dans l'eau peuvent conserver pendant un temps limité leur virulence et être l'occasion d'une contamination humaine.

Les loisirs, baignade ou pêche en eau douce sont l'origine la plus courante, expliquant la recrudescence saisonnière de l'affection pendant les mois chauds. La maladie se présente sous des aspects divers, parfois grave, parfois bénigne.

2.2.3. Bactéries contaminant par voie cutané-muqueuse

Ce dernier groupe rassemble les bactéries susceptibles de provoquer surtout des infections cutanées ou cutané-muqueuses. Elles ne traversent pas la peau, mais se fixent sur des téguments altérés ou muqueuses irritées, et provoquent des suppurations et infections locales. Jouent un rôle important : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, mais aussi certaines espèces de *Streptococcus*, d'*Aeromonas*, et de nombreux autres germes. Ces microorganismes peuvent provenir dans une certaine mesure des matières fécales (*Pseudomonas aeruginosa*), mais le plus souvent de suppurations rhinopharyngées ou cutanées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou autres pyogènes). On ne doit pas négliger non plus l'action de certaines mycobactéries atypiques comme agents de granulomes ou de suppurations cutanées.

2.3. LES LEVURES ET CHAMPIGNONS

On trouve fréquemment dans les sédiments marins, et en particulier dans les points les plus exposés à une contamination humaine, des champignons ou levures dont certains peuvent être pathogènes pour l'homme et provoquer notamment des affections cutanées. Quelques-uns de ces microorganismes peuvent avoir une origine fécale, tel *Candida albicans* ; la plupart sont des champignons dermatophytes ayant une origine cutanée.

Les dimensions sont évidemment très variables, les mycelium ont généralement plusieurs microns de large, et se prolongent parfois sur plusieurs centaines de microns ; les spores ont généralement quelques microns de diamètre.

2.4. LES PROTOZOAIRES

Parmi les nombreux protozoaires pathogènes pour l'homme, on peut citer en particulier : *Entamoeba histolytica* (Rhizopode, agent de la dysentérie amibienne), *Giardia intestinalis* (Flagellés), et *Balantidium coli* (Infusoires). Tous trois provoquent des troubles intestinaux parfois de grande gravité. Ils sont éliminés par les matières fécales, notamment sous forme de kystes très résistants. L'homme est infecté par voie digestive.

La dysentérie amibienne

Elle est due à un Rhizopode : *Entamoeba histolytica*, amibe de 20 à 30 microns de diamètre. Elle est contagieuse par l'intermédiaire de l'eau, à sa phase chronique où sont rejetées les formes kystiques, très résistantes dans les milieux extérieurs. Les kystes peuvent se conserver dans l'eau 15 jours à 3 semaines et sont insensibles au chlore aux doses courantes utilisées pour la désinfection des eaux ; ils sont par contre arrêtés par les filtres.

L'amibiase sévit actuellement dans les régions chaudes et humides et dans les régions tropicales. De petites épidémies s'observent dans les pays tempérés à partir de cas importés, spécialement dans les ports et centres industriels groupant une main d'oeuvre étrangère.

L'entérocolite à Giardia

Elle résulte de la présence dans l'intestion de *Giardia intestinalis*, flagellé piriforme de 10 à 20 microns de longueur, éliminés avec les matières fécales des kystes sont très résistants dans le milieu extérieur. Ils résistent à des températures supérieures à 60°, et une teneur en chlore résiduel de 5 mg/l pendant 60 minutes est nécessaire pour les détruire.

La dysentérie balantidienne

Cette maladie répandue dans le monde entier provient de la présence dans l'intestin de *Balantidium coli*, infusoire de 20 à 200 microns de long sur 20 à 70 de large, parasitant l'homme, le porc et divers singes. L'infection est chronique et dure plusieurs années. La forme libre ne peut se multiplier que dans des conditions favorables (pH alcalin notamment), mais en l'absence de celles-ci, il se forme des kystes de 50 à 60 microns de diamètre très résistants, qui assurent la conservation de l'infusoire à l'extérieur et constitue la forme d'infestation.

La méningo-encéphalite amibienne

Elle n'est pas vraiment une affection due à une pollution artificielle de l'eau, toutefois elle mérite d'être signalée en raison de sa connaissance récente et de sa gravité. Son agent est une amibe courante du milieu ambiant *Naegleria fowleri*. La pénétration du parasite se fait par les voies respiratoires supérieures. Pour des raisons indéterminées, chez certains sujets, l'amibe déclenche une méningo-encéphalite suraigüe. L'évolution est fatale le plus souvent en quelques jours. Les premiers cas de guérison ont été obtenus en 1978 grâce au diagnostic et au traitement précoce, une quarantaine de cas sont connus.

2.5. LES VERS

Le cycle des helminthes est souvent complexe, nécessitant parfois le passage de certaines formes larvaires sur des hôtes intermédiaires. Disons simplement que les modes d'infestation sont extrêmement variés : soit absorption d'oeufs ou de larves, ou même de mollusques qui sont des hôtes intermédiaires hébergeant les larves ; soit pénétration de larves à travers la peau. La plupart des maladies provenant d'infestation par les vers dans les pays tempérés sont en général relativement bénignes. Par contre, dans les pays chauds beaucoup sont d'une grande gravité.

2.5.1. Vers contaminant par voie digestive sans passage par hôte intermédiaire

Dans les régions tempérées, les vers agents de maladies parasitaires les plus fréquemment rencontrées appartiennent aux genres *Enterobius* (oxyures), *Ascaris*, *Trichuris* (trichocephales). Les oeufs sont éliminés par les matières fécales. Pour les oxyures, les oeufs sont pondus embryonnés et sont donc directement infectant, ce qui fait que la contamination est le plus souvent directement fécale-orale ; la transmission par l'eau, possible, est plus rare, d'autant que la survie de l'oeuf embryonné dans l'eau est courte. Pour les autres vers, *ascaris* et *trichocephale*, les oeufs s'embryonnent dans l'eau ou la terre humide après leur émission ; la résistance de ces oeufs est considérable (plusieurs années).

2.5.2. Vers contaminant par voie transcutanée sans passage par hôte intermédiaire

Les deux vers les plus courants dans les pays chauds mais aussi dans nos régions tempérées sont les anguillules (genre : *Strongyloïdes*) et *ankulostomes* (genre : *Ancylostoma*). Les oeufs d'*ankylostome* et les embryons des *Strongyloïdes* sont rejetés avec les matières fécales et donnent des larves infectantes qui pénètrent dans l'organisme en traversant la peau, et déterminant des troubles cutanés ou généraux constituant l'anguillulose et l'*ankylostémose* (maladies fréquentes dans les pays chauds, et chez les mineurs dans les pays tempérés).

2.5.3. Vers contaminant par voie digestive après passage par hôte intermédiaire

L'eau peut jouer un rôle dans la transmission des Cestodes parasites (*Echinococcus granulosus* - responsables du kyste hydatique et les vers solitaires *Taenia saginata*, *Diphyllobotrium*) mais ce rôle est particulièrement important pour les vers responsables de deux affections graves : la douve, maladie de nos régions, et la dracunculose, maladie des pays chauds.

La douve du foie

Cette maladie est due à un certain nombre de genres appartenant à l'ordre des Trematodes. Le ver parasite des animaux domestiques. Les oeufs donnent naissance à des embryons ciliés (*miracidium*) dans le milieu extérieur aquatique, et ces embryons des mollusques, hôtes intermédiaires, (*Limnée*, ou *Bithynia*). Après transformation et multiplication, ces *miracidium* donnent naissance à des *cercaires* qui s'enkystent dans l'eau mais aussi à la surface de plantes aquatiques tel le cresson, et pour certains genres, dans les muscles des poissons. L'homme ou le bétail est contaminé en buvant l'eau des mares, en consommant ces végétaux ou les poissons. Chez l'homme, la maladie n'a, en France, qu'une diffusion restreinte, mais elle est très répandue dans les troupeaux.

Les Tenia (T. Solium - chez porc ; T. Saginata - chez boeuf)

Les oeufs sortant de l'intestin de l'homme sont avalés par l'hôte intermédiaire (porc ou boeuf). Les embryons sont libérés par le suc digestif et donnent des larves (cystiarques) qui se fixent surtout dans les muscles. Par consommations de viande l'homme s'infecte.

La dracunculose ou ver de Guinée ou filariose de Médine

La dracunculose est une maladie strictement humaine, à transmission exclusivement hydrique. L'homme est l'hôte définitif de l'adulte : le ver femelle qui mesure un mètre environ, vit dans les couches profondes d'un membre inférieur le plus souvent. A maturation, le ver émigre vers le tissu cellulaire sous-cutané, perfore la peau, et émet ses larves à l'extérieur. Celles-ci sont absorbées par leur hôte intermédiaire, un "cyclops", dans l'organisme duquel elles deviennent infectantes. L'homme se contamine en ingérant le cyclops avec son eau de boisson.

La maladie sévit en Afrique équatoriale et tropicale, au Moyen-Orient et dans la zone ouest des Indes.

2.5.4. Vers contaminant par voie transcutanée après passage par hôte intermédiaire

Un ver plat, appartenant à l'ordre des trematodes, du genre Schistosoma, est responsable d'une maladie chronique, découverte déjà dans les momies égyptiennes datant de 1000 avant J.C. et affectant de nos jours plus de deux cent millions d'individus.

La Bilharziose (ou schistosomiase)

Cette maladie des pays chauds et en voie de développement est exclusivement transmise par de l'eau douce polluée.

La voie cutanée est le seul mode de propagation : il suffit d'un contact avec l'eau, partiel ou de courte durée, pour que le parasite puisse perfore la peau et s'introduire dans l'organisme.

Trois espèces de Trematodes sont en cause : Schistosoma mansoni et Schistosoma japonicum sont à localisation intestinale, Schistosoma haematobium à localisation génito-urinaire ou vésicale.

Le cycle évolutif du parasite est extrêmement complexe. La forme adulte vit dans les gros vaisseaux à proximité de la vessie ou de l'intestin. Leurs oeufs sont excrétés dans les fèces ou l'urine. Ils ne pourront éclore que s'ils sont au contact d'une nappe d'eau douce ensoleillée et à une température de 25 à 30°C. Dans ces conditions, ils donneront naissance en 2 à 3 jours à une larve "le miracidium" qui devra rencontrer, pour poursuivre son cycle évolutif, un mollusque hôte temporaire vivant dans les eaux tranquilles. C'est celui-ci qui émettra dans l'eau par milliers les larves infectantes ou cercaires qui nageront dans l'eau à la recherche de leur hôte définitif, l'homme.

La lutte réside essentiellement dans la destruction des mollusques et des plantes sur lesquels ils se fixent ; mais son application se heurte à beaucoup de difficultés.

L'information des populations sur le risque fécal et l'opportunité des moyens de protection : moyen de protection : port de bottes pour les travaux dans les rizières ou dans les zones d'irrigation serait pour les adultes la meilleure prophylaxie.

2.6. CONCLUSION

Cette description des microorganismes pathogènes montre qu'ils sont très variés :

- en taille - depuis les virus (quelques nanomètres) aux oeufs et larves des vers (près de 1 mm),
- en résistance - de certaines bactéries fragiles aux kystes de vers et de protozoaires, très résistants,
- par le mode d'infestation de l'homme : voie orale, voie transcutanée, action locale sur les téguments et les muqueuses,
- par l'origine de la contamination : fécale le plus souvent, mais aussi urinaire ou cutanée.

Il convient d'insister sur ce dernier point : les agents des maladies hydriques sont à de rares exceptions près des hôtes de l'intestin humain ou animal. Ils sont rejetés dans le milieu extérieur essentiellement par les matières fécales, par des sujets malades en période d'état d'incubation ou de convalescence, par de porteurs sains non connus ou sujets présentant une affection cliniquement inapparente, en nombre souvent beaucoup plus élevé que celui des malades. Ce point essentiel explique toutes les actions entreprises pour assurer la qualité des eaux destinées à usages sanitaires - si bien qu'on oublie parfois qu'il y a d'autres sources de contamination.

3. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE SOMMAIRE DES MALADIES D'ORIGINE HYDRIQUE

Les principaux germes pathogènes ayant été décrits, ainsi que sommairement les maladies qui en résultent et les modalités par lesquelles celles-ci peuvent être contractées, il convient d'étudier les données épidémiologiques qui permettent de définir l'importance du risque sanitaire provenant de ces germes. Le risque est évidemment différent selon la voie de contamination, et selon que celle-ci est directe ou indirecte.

3.1. NOTIONS PERMETTANT D'APPRECIER LE RISQUE EPIDEMIOLOGIQUE

Deux notions sont à définir pour apprécier le risque épidémiologique.

3.1.1. Dose minimale infectante

3.1.1.1. Difficulté de la détermination de la dose minimale infectante

Le déclenchement d'une maladie ne dépend pas de la pénétration dans l'organisme ou les téguments, d'un seul des microorganismes cités précédemment : il dépend souvent d'un nombre minimum de ces microorganismes. Mais en réalité, la détermination précise d'une dose minimale infectante (D.M.I.), pour un organisme donné, est extrêmement difficile ; les résultats obtenus ne sont guère reproductibles et leur interprétation doit être prudente.

En outre, les rapports doses-effets varient en fonction de divers facteurs, notamment : les souches utilisées, les modalités d'administration ou l'état physique de l'individu infecté.

3.1.1.2. Exemples de résultats d'expériences de détermination de D.M.I.

Avec des écarts importants entre des résultats obtenus pourtant avec les mêmes souches, la D.M.I. peut être établie entre 10^3 et 10^5 dans le cas de *Shigella dysenteriae* ou *flexneri*, entre 10^5 et 10^7 dans le cas de *Salmonella typhi*, au-delà de 10^8 dans le cas d'*Escherichia coli* entéropathogène. A une souche "Inaba" de *Vibrio cholerae* correspond une D.M.I. de 10^4 si l'absorption en est faite avec du NaHCO_3 , et de 10^8 en l'absence de ce sel.

BRADLEY et FEACHMEN estiment après étude de documents bibliographiques (1978) que la D.M.I. est inférieure à 10^2 pour *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Balantidium coli*, *Enterobius*, qu'elle est de 10^4 pour les *Shigella*, et supérieure à 10^6 pour *Salmonella typhi* et les autres *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* souches entéropathogènes, *Vibrio cholerae*.

En ce qui concerne les virus, il y a une dizaine d'années on estimait qu'une seule particule virale pouvait être contaminante, mais des essais menés notamment sur de jeunes enfants avec du virus polio atténué contredisent cette assertion. On estimerait actuellement que la D.M.I. devrait être au moins égale à 10^3 unités virales formant plaque.

3.1.2. Variation de la concentration des microorganismes pathogènes dans les milieux récepteurs

Il est difficile de dénombrer exactement la concentration en microorganismes pathogènes au lieu même de l'utilisation. Il est parfois plus facile en partant d'une estimation en un lieu donné d'apprécier la concentration en un autre point en tenant compte par exemple de la dilution, mais aussi de la durée de survie ou des possibilités de multiplication de ces microorganismes.

Nous n'insisterons pas sur la dilution, étudiée dans de nombreux modèles mathématiques, qui doit tenir compte non seulement de la distance mais aussi des courants dans les eaux de surface de grandes étendues, lacs ou eaux marines.

La notion de survie des microorganismes prête à discussion.

En milieu aquatique, les bactéries fixées sur des particules plus grosses, peuvent être entraînées dans les sédiments. Les virus fixés sur ces bactéries peuvent sédimenter avec elles. Dans ce cas, plutôt que de parler de "mortalité", il serait préférable de parler de "disparition".

Plus importante que la notion de diminution, est celle de multiplication, qui tend à sous-estimer le risque. Cette multiplication est exceptionnelle dans les milieux naturels.

Les virus ne peuvent pas se multiplier lors des cellules vivantes. Les bactéries pourraient le faire si dans ces milieux se trouvaient des substances nutritives et des conditions favorables.

Les protozoaires ne se multiplient pas en dehors de l'hôte. Dans le cas particulier des helminthes, lorsqu'il n'y a pas passage chez des hôtes intermédiaires, il n'y a pas multiplication des oeufs dans le milieu naturel. Par contre, lorsque le cycle comporte un passage chez ces hôtes, tels les mollusques, celui-ci peut correspondre à la naissance d'un très grand nombre de formes transitoires du développement du parasite.

En dehors de cette multiplication dans l'eau qui contamine directement l'homme, il faut signaler les multiplications ou concentrations qui se produisent dans les aliments contaminés par l'eau (multiplication dans le lait contaminé, ou concentration par filtration par les huîtres, par exemple).

3.2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Les données précédentes permettent de dégager quelques conclusions théoriques. Par exemple, on envisage difficilement que les maladies qui exigent pour se manifester l'absorption orale d'une D.M.I. élevée de bactéries (telle que 10^5 ou 10^6) puissent, sauf exception, résulter d'une baignade. Il semble par contre plus facile de voir se développer des maladies dues à des protozoaires, voire des virus, dont la D.M.I. semble en général plus basse.

3.2.1. Données concernant les maladies provenant des eaux de boisson

Aux U.S.A., le "CENTER FOR DISEASE CONTROL" d'ATLANTA (GEORGIE) publie les statistiques des maladies et épidémies reconnues d'origine hydrique. Au cours des années 1972-73-74, 80 épidémies de cette origine furent recensées : 19 étaient dues à des Salmonella et des Shigella, 12 à des Giardia, 13 étaient des hépatites infectieuses ; en outre 9 relevaient d'intoxications chimiques, et pour les 27 dernières, on ne put identifier l'agent toxique ou infectieux.

On constate que parmi les maladies hydriques "historiques", le choléra a disparu, mais les typhoïdes et dysentérie bacillaires subsistent encore ; elles ne représentent toutefois qu'une faible proportion du total alors que sont apparues des maladies "nouvelles", comme l'hépatite infectieuse, l'entérite à Giardia. S'agit-il vraiment de maladies nouvelles, ou de maladies que les progrès du diagnostic clinique et microbiologique ont permis d'identifier et d'extraire du lot des maladies hydriques "d'origine inconnue".

L'expérience semble montrer que typhoïdes et hépatites infectieuses sont sans doute les maladies les plus importantes, du moins parmi les affections présentant une gravité certaine.

3.2.2. Données concernant les maladies provenant des baignades

Les maladies envisageables sont de trois ordres : les maladies internes provenant soit d'une absorption orale, soit d'une infestation transcutanée, et les maladies externes, cutané-muqueuses, résultant du contact avec l'eau.

3.2.2.1. Affections transmises par voie digestive

Des études prospectives conduites aux U.S.A. sur ce dernier modèle ont montré que s'il y a plus de troubles gastro-intestinaux chez les nageurs fréquentant des eaux polluées que chez ceux se baignant dans des eaux peu contaminées, les troubles sont cependant d'intensité minime, n'entraînant qu'exceptionnellement un repos à domicile, et jamais d'hospitalisation.

Ce n'est que dans des cas exceptionnels qu'une relation précise a été évoquée entre la présence de pathogènes dans une eau de surface et une épidémie, et souvent la relation n'a pas été établie de façon indubitable.

3.2.2.2. Affections internes transmises par voie transcutanée

Aux U.S.A., 119 cas de leptospiroses furent rapportés en 1975 : 36 soit 30 % étaient vraisemblablement dus au contact avec des eaux souillées par des urines de bétail et cela explique que le mode de contagion le plus fréquent dans ce cas est la baignade dans de petits étangs non protégés d'une telle souillure.

En France, sur 150 dossiers hospitaliers de leptospiroses, entre 1972 et 1977 il fut établi que la maladie avait été contractée dans 42 cas au cours de baignades, et dans 30 cas au cours de parties de pêche. Parmi ces 72 cas, 61 ont été contractés en juillet, août et septembre.

3.2.2.3. Affections externes

Elles sont nombreuses et d'origines variées. Aux U.S.A. et au Canada, mais aussi en Europe, de nombreux cas de dermatites ("gâle des nageurs") sont dus à l'action sur la peau de cercaires de certaines Schistomosa, parasites d'oiseaux aquatiques.

De nombreuses publications relatent des infections des muqueuses oculaires, de l'appareil auditif externe, de plaies cutanées, par des bactéries, dont les plus importantes semblent appartenir aux genres Aeromonas, Pseudomonas (P. aeruginosa), Mycobacterium, et dans le cas de l'eau de mer au genre Vibrio (V. parahaemolyticus ou V. alginolyticus).

Enfin, le rôle des levures et des champignons dermatophytes ne paraît pas négligeable dans les affections cutanées de cette origine.

3.2.3. Données concernant les maladies provenant de la consommation d'huîtres et de coquillages

Les données sont extrêmement nombreuses concernant entre autres les typhoïdes et les hépatites infectieuses succédant à des consommations de coquillages ou d'huîtres. Cela s'explique aisément du fait que les huîtres concentrent ces microorganismes en proportion importante.

Si typhoïdes et hépatites sont les deux affections les plus importantes transmises par les huîtres ou coquillages contaminés, on ne peut pas passer sous silence les affections à Vibrio parahemolyticus qui semblent jouer un rôle de plus en plus important.

3.2.4. Données concernant les maladies résultant de l'emploi d'eaux usées brutes dans l'agriculture

De nombreux cas de maladies infectieuses ont été considérés comme résultant de la consommation de légumes ou fruits crus, après arrosage ou irrigations par des eaux usées brutes : pour certains 8 % des hépatites virales d'origine alimentaire résulteraient de consommation de ce type (légumes notamment irrigués avec des eaux usées).

Des expériences en Israël ont montré que la morbidité de la population est plus forte lorsqu'on utilise pour les travaux agricoles des eaux usées non traitées au lieu d'eau de bonne qualité microbiologique.

De même, on a constaté que la morbidité du bétail était plus élevée lorsque les prairies sont irriguées avec des eaux usées non traitées.

4. APPRECIATION DES RISQUES SANITAIRES RESULTANT DE LA PRESENCE DES MICRO-ORGANISMES PATHOGENES DANS LES EAUX AU STADE DE LEUR UTILISATION (EAUX "NATURELLES" ou "TRAITEES")

Le dénombrement direct au point d'utilisation, ainsi que dans l'eau usée elle-même est généralement difficile à réaliser : les pathogènes sont la plupart du temps peu nombreux et presque toujours accompagnés de germes divers en quantité beaucoup plus importante rendant techniquement très délicate la numération du seul pathogène recherché.

On est amené à rechercher souvent, non pas les germes pathogènes eux-mêmes mais certains germes indicateurs soit d'une contamination, soit d'une possibilité de contamination par ces pathogènes.

L'utilisation de ces indicateurs (ainsi d'ailleurs que les recherches de pathogènes eux-mêmes) sont à envisager dans deux circonstances :

- dans une eau naturelle non traitée, pour apprécier les risques courus par son utilisation, et pour prendre éventuellement les mesures nécessaires,
- dans une eau traitée, pour apprécier la contamination résiduelle et évaluer l'efficacité du traitement institué.

4.1. UTILISATION DES INDICATEURS DE POLLUTION

On a vu que la très grande majorité des microorganismes pathogènes sont d'habitat fécal. Déterminer une présence de pollution fécale dans une eau d'alimentation, apprécier l'importance de cette pollution dans une eau de surface ou une eau usée qui s'y déverse sont donc des actions d'un intérêt hygiénique considérable. D'où l'importance des indicateurs de pollution fécale.

4.1.1. Indicateurs fécaux

Certaines bactéries, en particulier les *Escherichia coli*, mais aussi certains germes voisins rassemblés sous le vocable de coliformes fécaux ainsi que les streptocoques fécaux sont des germes qui ne se multiplient que dans l'intestin de l'homme ou de certains animaux à sang chaud.

4.1.1.1. Rapport entre les indicateurs fécaux et la pollution des matières fécales

La proportion des catégories de germes fécaux varie dans les égoûts en fonction de l'origine des matières fécales qui s'y déversent. D'une façon très générale, on peut admettre que la teneur d'un égoût urbain en coliformes fécaux est de l'ordre de 10^5 à 10^7 et en streptocoques fécaux de 10^5 à 10^6 .

On peut admettre que dans une eau réceptrice, la plus ou moins grande concentration de coliformes fécaux permet d'apprécier l'importance de la contamination fécale, alors que l'importance de la concentration en streptocoques fécaux montre l'impact d'eaux usées subissant une contamination plus spécialement d'origine animale.

Des limites réglementaires peuvent donc être fixées en fonction de la présence ou de la concentration de ces germes indicateurs.

C'est ainsi qu'une eau naturelle utilisée directement pour l'alimentation humaine doit absolument être à l'abri de contamination fécale.

Mais dans une eau naturelle de surface destinée à des utilisations à implication sanitaire, directes (baignades) ou indirectes (conchyliculture, irrigation), on ne peut exiger une absence complète de pollution fécale. La limite acceptable de cette pollution fécale, doit tenir compte de l'importance du risque de concentration en pathogènes.

Deux cas peuvent se présenter :

- dans l'un, on redoute un danger imprécis provenant de pathogènes non précisés, voire mal connus, sinon inconnus,
- dans l'autre, on redoute un danger résultant de la présence de pathogènes fécaux bien déterminés, et l'établissement de valeurs limites dans la concentration d'un indicateur dépend de la relation entre les concentrations de l'indicateur choisi et du pathogène envisagé.

Une application de ce premier cas est la fixation de concentrations limites pour certains indicateurs fécaux dans une eau naturelle, en particulier une eau de surface (directive du Conseil des Communautés européennes du 16 juin 1975), en vue de son utilisation pour la transformer en eau d'alimentation, après un traitement approprié.

4.1.1.2. Rapport entre la concentration en indicateurs fécaux et la concentration en microorganismes pathogènes

Bien qu'on puisse établir une relation entre les concentrations en pathogènes et les concentrations en indicateurs, en une période donnée correspondant à une situation sanitaire normale et en une région donnée, une telle relation ne peut être établie de façon générale.

De nombreux travaux, notamment dans le cadre des eaux destinées aux loisirs, ont tenté d'établir des relations entre concentration en coliformes fécaux et fréquence de la présence de Salmonella ou de virus entérique. On constate, certes, que plus il y a de coliformes fécaux, plus les chances de présence de ces pathogènes augmentent, mais il n'est pas fait état généralement de la concentration en ces pathogènes, ce qui est essentiel pour établir le risque, même avec l'incertitude des doses minimales infectantes. On constate également que même pour des teneurs très faibles en coliformes fécaux, il y a des chances de présence de Salmonella non négligeables.

Les seules relations valables sont celles qui sont établies sur des bases épidémiologiques, c'est-à-dire établies entre les concentrations en coliformes fécaux (ou autre indicateur) et la fréquence de maladies caractérisées ou, à défaut, de syndromes cliniques isolés.

4.1.2. Autres indicateurs de pollution

Les indicateurs fécaux ne présentent théoriquement d'intérêt que vis-à-vis de microorganismes pathogènes d'origine fécale.

Cependant, provenant généralement d'origine humaine, les coliformes fécaux peuvent éventuellement dans une certaine mesure faire envisager la possibilité de pollution non obligatoirement fécale, mais d'origine également humaine.

Le seul autre type d'indicateur utilisé est le "dénombrement bactérien global" qui n'a de valeur que dans le domaine des eaux potables et qui constitue un signal d'alarme plus précoce que l'indicateur fécal.

Intérêt des "dénombrements bactériens" comme indicateurs de pollutions

Tout passage possible bactérien ou viral du sol vers la nappe laisse place à une éventualité de passage de bactéries fécales donc de bactéries pathogènes, ou également de bactéries pathogènes non fécales.

A défaut d'indicateurs constitués par des espèces définies, on utilise des tests globaux de dénombrements bactériens. Ce n'est plus alors l'identité d'un microorganisme qui joue un rôle mais sa taille qui conditionne sa retenue éventuelle par le filtre naturel que présente le sol ; des variations notables de la population surtout en période pluvieuse, et surtout dans la fraction de la flore qui pousse à 37°, témoignent donc d'une pénétration des bactéries de la surface du sol. La recherche de telles indications est préconisée dans les textes réglementaires de 1962 concernant les eaux de distribution publique.

Mais le facteur "taille" n'est pas seul en cause. Dans le cas des virus, les phénomènes d'adsorption liés à la surface et à la structure jouent un rôle essentiel. Aussi, non seulement les bactéries ne peuvent servir d'indicateur, mais il n'est pas possible, a priori, d'extrapoler d'un virus à l'ensemble de ceux-ci.

4.2. UTILISATION DES INDICATEURS D'EFFICACITE DE TRAITEMENT

Vérifier l'efficacité d'un traitement par un abattement de la concentration en pathogènes avant et après celui-ci est l'attitude qui paraît logique. Elle n'est pas cependant sans inconvénients ; inconvénients pratiques : la teneur en pathogènes est souvent très faible et il n'est pas facile techniquement d'apprécier des différences qui soient statistiquement valables ; inconvénients théoriques : dans le cas où le traitement est préventif et destiné à assurer l'élimination des pathogènes, s'il devait en survenir (cas fréquents dans les traitements d'eau destinée à l'alimentation), on ne pourrait en l'absence des dits pathogènes vérifier l'efficacité éventuelle de ce traitement.

Ainsi, on apprécie l'efficacité d'un traitement à l'aide de microorganismes indicateurs dont l'élimination ne constitue pas en soi la finalité de ce traitement.

4.2.1. Choix d'indicateurs d'efficacité de traitement

Le choix des indicateurs doit être fait avec beaucoup de prudence. Un indicateur d'efficacité de traitement doit en effet se comporter vis-à-vis d'un traitement, qui doit être bien précisé, de même façon que le pathogène que l'on veut éliminer, et son choix nécessite une vérification expérimentale sérieuse.

Le choix des indicateurs dépend de l'utilisation de l'eau et de l'efficacité exigée du traitement (facteurs généralement en liaison étroite), ainsi que de la nature de ce traitement. Il est très difficile de donner des règles générales.

4.2.1.1. Exemples d'indicateurs pour les procédés tendant à l'élimination physique des microorganismes

Ces procédés utilisent les différences de taille, de poids entre les divers microorganismes ainsi que les phénomènes d'adsorption.

L'élimination totale ne peut être réalisée que par quelques rares procédés comme l'ultrafiltration. La vérification de l'efficacité se fera par la recherche de n'importe quel microorganisme qui doit être négative, puisque tous doivent être arrêtés. Il faut cependant prendre garde à ne pas confondre une recontamination de l'effluent après le traitement (extrêmement facile dans une atmosphère non stérile), avec une défaillance de celui-ci.

L'élimination partielle tendra le plus souvent à sélectionner les microorganismes en fonction de leur poids (décantation) ou de leur taille (filtration). Mais des phénomènes annexes jouent un rôle non négligeable : des microorganismes de petite taille et de faible poids (bactéries et virus) pourront s'adsorber sur des particules lourdes ou sur les parois des pores et être entraînés au cours de la décantation, ou bien retenus par la filtration. L'efficacité peut, dans une certaine mesure, être appréciée par le passage ou non de quelques éléments caractéristiques, faciles à déterminer : oeufs de parasites, bactéries (dénombrements totaux) ou spores (notamment de *Clostridium sulfito-réducteurs* plus faciles à mettre en évidence).

4.2.1.2. Exemples d'indicateurs pour les procédés tendant à une destruction des microorganismes pathogènes par action toxique

Ces procédés utilisent soit des agents chimiques (chlore, bioxyde de chlore, brome, iode, ozone, etc...) ou physiques (rayons U.V., radiations ionisantes, etc...) afin de détruire sans les séparer de l'eau, certains microorganismes ; leur action s'exerce généralement plus intensément vis-à-vis de certaines espèces et il est rare qu'elle soit limitée strictement à une seule espèce ou à un seul genre. Mais les variations dans la résistance vis-à-vis d'un agent de traitement, même pour un genre ou une espèce, sont très grandes.

Dans une certaine mesure, on peut accepter quelques analogies de comportement entre certains genres bactériens (*Escherichia coli* et *Salmonella* par exemple vis-à-vis des désinfectants oxydants) mais on ne peut étendre cette assimilation aux kystes de parasites, oeufs d'helminthes ou aux virus.

Ainsi le choix largement préconisé des coliformes fécaux comme test d'efficacité de traitement est un choix souvent dangereux s'il est mal interprété. Mais il peut servir d'indicateur de bon fonctionnement du dispositif de traitement.

4.2.2. Limites des indicateurs d'efficacité de traitement

D'une façon générale, l'exigence de similitude de comportement entre l'indicateur d'efficacité de traitement et le pathogène que l'on veut éliminer peut restreindre l'utilisation de ces indicateurs dans le cas où l'on est sûr de la présence d'un pathogène avant le traitement et où l'on doit s'assurer que celui-ci est totalement, et effectivement éliminé.

D'autres limites que celles résultant de leur spécificité doivent être apportées à la signification des indicateurs d'efficacité.

Il convient notamment d'attirer l'attention sur le fait qu'un indicateur ne témoigne que d'une réduction du nombre de microorganismes révivifiants mais ne donne aucun renseignement sur le devenir de ceux qui survivent, dans le cas où l'élimination de ces microorganismes ne serait pas totale. Il a été montré en diverses circonstances que des microorganismes soumis à une action désinfectante toxique, mais non tués, devenaient plus résistants ; la destruction ultérieure de ceux-ci par action désinfectante deviendrait ainsi plus difficile.

Les essais d'efficacité ne permettent pas non plus de juger de la possibilité de multiplication éventuelle des pathogènes survivants dans le milieu ambiant, si la composition physico-chimique du milieu le permet. Un cas particulier, est l'installation sur un réseau de distribution d'eau alimentaire d'un appareil adoucisseur à résines échangeuses d'ions : la multiplication des bactéries y est intense.

4.3. DIFFERENCES ENTRE LES INDICATEURS D'EFFICACITE ET LES INDICATEURS DE TRAITEMENT

L'hygiéniste et l'ingénieur doivent être conscients de la différence fondamentale qui existe entre les indicateurs de pollution et les indicateurs d'efficacité.

La confusion entre ces deux types d'indicateurs est fréquente car certains germes jouent, dans des circonstances différentes, les deux rôles. Bien plus, certains indicateurs a priori non pathogènes peuvent dans certains cas être également pathogènes.

C'est ainsi que les coliformes fécaux peuvent être :

- des indicateurs de pollution fécale, à condition que le dénombrement soit effectué en amont de tout traitement,
- des indicateurs d'efficacité de traitement, vis-à-vis de pathogènes bien définis et pour un traitement déterminé, par dénombrement comparé en amont et en aval du traitement,
- des pathogènes, si parmi les coliformes fécaux dénombrés, il y a un grand nombre d'*Escherichia coli* enteropathogènes.

Deux exemples montrent quels dangers pourrait entraîner une confusion entre les deux types d'indicateurs.

Signification des coliformes non fécaux dans une eau d'alimentation

Dans une eau destinée à l'alimentation, sans traitement, la réglementation française en vigueur exige l'absence d'*Escherichia coli* car ce germe témoigne d'une pollution fécale. Elle tolère cependant la présence de coliformes non fécaux parce que ceux-ci peuvent vivre et se multiplier plus spontanément dans les milieux naturels et ne sont donc pas obligatoirement témoins spécifiques d'une pollution fécale.

Dans une eau à même destination, mais traitée, la même réglementation exige l'absence aussi bien de coliformes fécaux que de coliformes non fécaux. La présence de coliformes non fécaux, sans gravité dans une eau non traitée, signifie que si l'eau avant traitement contenait des *Salmonella*, le traitement n'aurait pas été capable de les éliminer.

Signification des coliformes fécaux dans une eau de surface destinée à la production d'eau d'alimentation

La directive du Conseil des Communautés européennes du 16 juin 1975 concernant les eaux de surface destinées à la production d'eau alimentaire, propose (comme nombre guide) une limite dans la teneur des coliformes fécaux dans ces eaux.

Si dans une eau superficielle on observe au point de prélèvement une concentration en coliformes fécaux supérieure à la limite de tolérance et que l'on constate qu'elle provient d'un déversement en amont, faut-il considérer qu'un traitement désinfectant de ce déversement, abaissant la concentration au-dessous de la limite, est une solution satisfaisante ? Certainement pas, car on ne sait l'efficacité de ce traitement vis-à-vis des pathogènes non identifiés que l'on redoute ; un tel traitement serait donc dangereux car il donnerait une fausse sécurité ; il serait en outre inutile car vis-à-vis des pathogènes actuellement connus, il ne pourrait être que du même type que ceux utilisés pour l'eau d'alimentation, après son captage, dans des conditions d'application techniquement bien meilleures.

5. IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES (PATHOGENES OU INDICATEURS) DANS L'EAU - PRECISIONS DES RESULTATS - SENSIBILITES DES METHODES - DIFFICULTES TECHNIQUES EN FONCTION DE LA NATURE DE L'EAU

Les problèmes techniques de l'analyse microbiologique consistent essentiellement d'une part dans l'isolement, l'identification et le dénombrement d'une espèce bactérienne déterminée (ou d'un groupe d'espèces bactériennes) parmi de nombreuses variétés de microorganismes l'accompagnant dans l'échantillon d'eau à étudier ; d'autre part dans le dénombrement de ces espèces.

Le premier de ces types de manipulations aboutit à un diagnostic de "présence" ou "d'absence" dans le volume d'échantillon analysé. Il est souvent utilisé, sans aller au-delà, pour la recherche des microorganismes pathogènes dans un volume donné d'eau à étudier, et la recherche d'indicateurs de pollution ou d'efficacité de traitement dans le cas de l'eau potable.

Le deuxième type de manipulation, plus complexe que le premier, donnant en définitive un résultat quantitatif exprimé avec une plus ou moins grande précision, est généralement utilisé pour évaluer la concentration en germes indicateurs dans des eaux autres que les eaux potables, mais également dans une certaine mesure, dans les eaux potables.

5.1. PRINCIPES - PRECISION ET SENSIBILITE DES PRINCIPALES TECHNIQUES DE DENOMBREMENT DES BACTERIES

Pour cette étude générale, nous admettrons par l'hypothèse que dans l'eau à étudier il n'y a qu'une seule espèce de bactéries.

5.1.1. Principes des méthodes

Deux méthodes très générales de dénombrement peuvent être utilisées :

- La première méthode générale consiste à inoculer des volumes variés d'eau à étudier, dans des tubes de milieu de culture liquide adapté au germe à dénombrer.

En général, on utilise des séries de 3 ou 5 tubes, et le rapport des volumes d'une série à l'autre est de 1 à 10. Des tables statistiques, établies pour chaque système de répartition permettent d'évaluer un "nombre le plus probable" de germes présents dans 100 ml d'eau.

Ce type de méthode est connue soit sous le nom de "méthode des tubes multiples", soit sous celui de "méthode du N.P.P."

- La deuxième méthode générale consiste à dénombrer des colonies isolées sur milieu solide, chacune d'entre elles étant supposée provenir d'un seul germe (ce qui est fréquemment inexact).

Trois modalités d'ensemencement sont les plus couramment utilisées, l'expression "comptage des colonies" étant réservée à l'ensemble de ces trois modalités techniques :

- La technique par étalement de la prise d'essai d'eau à analyser sur la surface d'une gélose.
- La technique par filtration sur membrane ensuite déposée sur un milieu gélosé.
- La technique par incorporation en gélose.

5.1.2. Précision des méthodes

N'est envisagée dans ce paragraphe que la précision relevant de l'erreur aléatoire de distribution. Les deux grandes méthodes, N.P.P. et comptage des colonies de ce point de vue sont très différentes.

- Dans la méthode N.P.P., les tables statistiques indiquant ce N.P.P., indiquent également les valeurs supérieures et inférieures correspondant à un intervalle de confiance (I.C) à 95 %.

Pour les 25 combinaisons les plus courantes correspondant au système comportant trois tubes par série de dilution, les limites inférieures varient entre -64 et -86 %, et les limites supérieures entre +124 % et 494 %. Pour les 53 combinaisons correspondant à cinq tubes par dilution, les limites inférieures ne sont guère différentes, entre -65 et -88 %, mais les limites supérieures sont beaucoup moins écartées du N.P.P. : elles se situent entre 127 % et +268 %.

Il faut remarquer que dans cette méthode, la précision varie selon les types de combinaisons retenues pour la lecture et non pas en fonction de la concentration bactérienne.

- Dans la méthode par comptage des colonies, la précision (facteur aléatoire) varie en fonction du nombre de colonies comptées. C'est ainsi que si l'on ne compte que 5 colonies, elle est de -65 % à 134 %, mais si l'on en compte 20 elle est de -55 % à +65 %. La précision s'améliore si l'on compte 50 colonies (-32 à + 36 %), 100 colonies (-22 à +24 %), 300 colonies (± 12 %).

5.1.3. Sensibilité des techniques

La sensibilité d'une méthode peut être envisagée à deux niveaux : ce peut être véritablement un seuil de détection, c'est-à-dire la concentration minimale décelable selon les modalités opératoires données, indépendamment de la précision envisageable à cette concentration, mais ce peut être aussi la concentration minimale comptable avec une exigence de précision donnée.

Pour la méthode "N.P.P." la sensibilité est excellente. Lorsque le plus grand volume choisi est de 10 ml, le seuil de détection est de 3 germes pour 100 ml, dans un système de séries de 3 tubes ; de 2 germes pour des séries de 5 tubes, et de 0,9 germes pour des séries de 10 tubes.

Pour la méthode par comptage de colonies, les limites de détection varient selon les trois modalités techniques envisagées, chacune d'elles ayant des exigences différentes dans la limitation du volume de la prise d'essai que l'on peut analyser.

La technique par étalement en surface, lorsqu'on utilise des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre, exige que le volume de l'inoculum ne dépasse pas 0,1 ou à la rigueur 0,2 ml. Cela veut dire que le seuil de détection minimum, c'est-à-dire une colonie se développant sur une boîte ensemencée avec 0,2 ml, correspond à une concentration de 500 germes/100 ml, mais au niveau d'une précision de $\pm 35\%$, par exemple le nombre de colonies comptées doit être de 50 au moins : l'ensemencement d'une seule boîte ne permet donc de déceler à ce niveau de précision que des concentrations supérieures à 25 000 germes par 100 ml.

La technique de filtration sur membrane accepte des prises d'essai de volume très important, on peut considérer comme normale la filtration de volumes variant entre 100 et 500 ml, c'est-à-dire correspondant à un seuil de sensibilité de 1 à 0,2 germes par 100 ml pour une seule membrane utilisée.

La technique par incorporation en gélose n'autorise pas en pratique l'inoculation de volume supérieur à 1 ml, à la rigueur de 2 ml d'eau. C'est-à-dire qu'une seule boîte inoculée avec 2 ml d'échantillon permet un seuil de détection de 50 germes/100 ml, et de déceler avec une précision de $\pm 35\%$ une concentration de 2 500 germes par 100 ml. Trois boîtes suffisent pour abaisser cette concentration à moins de 1 000/100 ml.

5.2. PRINCIPALES DIFFICULTÉS DE L'IDENTIFICATION D'UNE ESPECE BACTERIENNE DANS UN ECHANTILLON CONTENANT UNE GRANDE VARIETE DE MICROORGANISMES

Deux cas doivent être envisagés : celui des germes pathogènes et celui des indicateurs.

5.2.1. Difficultés dans les recherches et dénombrements de germes pathogènes

Nous avons supposé dans le paragraphe précédent que dans l'eau il n'y avait qu'une seule espèce bactérienne. En réalité, il n'en est jamais ainsi, et lorsqu'on veut rechercher dans un volume donné la présence ou le nombre d'une espèce déterminée, il faut tenir compte de la présence des autres espèces, en particulier dans les recherches de pathogènes

Cas d'une inoculation initiale en milieu liquide

Lorsqu'après l'incubation on décèle une pousse microbienne, il faut alors :

1. Faire un étalement sur la surface d'une gélose d'isolement, pour obtenir, par subculture, des colonies isolées les unes des autres parmi lesquelles certaines sembleront correspondre à l'espèce (ou au groupe) recherché.
2. S'assurer que ces colonies, ou l'une d'entre elles au moins est pure.
3. Faire le diagnostic grâce à des caractères biochimiques ou sérologiques.

Lorsqu'on veut dénombrer le genre, on procédera à des ensemencements selon la technique du nombre le plus probable, déjà décrite et étudiée précédemment et sur chaque tube "positif" on procédera à l'identification selon la méthodologie qui vient d'être résumée.

Mais ce travail est considérable. Aussi souvent se contente-t-on d'un diagnostic "présomptif". Pour cela on choisit des milieux d'inoculation permettant soit de mettre en évidence une propriété considérée comme une des propriétés caractéristiques de l'espèce recherchée, soit d'inhiber la pousse des bactéries autres que celles recherchées. Ces deux modalités peuvent d'ailleurs être associées dans le même milieu. Le plus souvent on repique les milieux d'inoculation "positifs" sur un second milieu dont la composition et les modalités d'incubation permettent d'accentuer cette sélectivité. On qualifie de "milieu de confirmation" ces seconds milieux, qui en fait ne conduisent qu'exceptionnellement à un diagnostic certain, mais qui en pratique donnent une sécurité acceptable.

La difficulté de la recherche des germes pathogènes, tels les *Salmonella*, réside dans le fait que leur nombre est généralement très faible en valeur absolue, mais aussi proportionnellement aux autres germes qui les accompagnent. Souvent il faut étudier 1 litre voire 5 litres d'eau. On est donc amené d'abord à effectuer une concentration (par filtration sur membrane ou floculation avec un gel d'alumine) et à ensemercer sur des milieux très sélectifs.

5.2.2. Difficultés dans les dénombrements d'indicateurs

Les difficultés précédemment décrites sont moindres dans le cas de dénombrements d'indicateurs, et notamment d'indicateurs fécaux : il est exceptionnel que l'on ait 10^3 germes pathogènes dans une eau d'égout alors que l'on a couramment 10^6 coliformes fécaux.

Cependant l'emploi des méthodes par comptage pose des problèmes lorsque l'eau à analyser provient de milieux très pollués. Actuellement, la seule technique par comptage couramment utilisée est la filtration sur membrane. Or il se produit dans ces eaux polluées des phénomènes de colmatage qui sont plus ou moins gênants selon les milieux utilisés, et qui sont responsables de résultats entachés d'erreurs importantes par défaut. Il y a donc dans ces cas des différences notables entre les résultats obtenus par le "N.P.P." et la méthode par comptage.

5.3. PRECISIONS DANS LA PRATIQUE DES DENOMBREMENTS BACTERIENS

Des essais de précision sur analyses ont été réalisés, soit à l'intérieur d'un même laboratoire par plusieurs techniciens, soit entre plusieurs laboratoires, sur des eaux naturelles ou artificielles, faiblement ou fortement polluées.

Les résultats de ces essais permettent de tirer les conclusions suivantes :

- dès que la concentration en germes permet de compter 30 ou 40 colonies, la précision des méthodes par comptage (étudiée par filtration sur membrane) est nettement supérieure (deux fois au moins) à la précision de la méthode par N.P.P.,
 - pour les très faibles concentrations ne permettant de compter qu'un petit nombre de colonies, la différence de précision entre ces deux types de méthode s'atténue et, lorsque ce nombre est très faible, disparaît,
- ces résultats expérimentaux sont en accord avec les estimations théoriques exposées en 5.1.,

- la répétabilité d'une méthode (précision obtenue pour des analyses effectuées dans le même laboratoire) est nettement supérieure à la reproductibilité (précision obtenue pour des analyses effectuées dans des laboratoires différents) : la répétabilité est deux fois supérieures à la reproductibilité dans le cas étudié,
- d'une façon extrêmement générale, on peut actuellement attendre d'une analyse de dénombrements d'indicateurs par filtration sur membrane, lorsque le nombre de colonies comptées est suffisant, une précision entre 20 et 80 %, pour des limites de confiance à 95 %. Cette précision varie entre 50 et plus de 150 % par la méthode du N.P.P.

Maladie	Agent	Géographie	Réservoir	Transmission		Prévention possible	
				inter-humaine	par l'eau	Hygiène	Vaccination
BACTERIENNES (1)							
Choléra	Vibrio cholerae	Asie - Afrique	Homme (selles)	+++	+++	+++	+
Typhoïde	Salmonella typhi et paratyphi	Mondiale	Homme (selles)	+++	+++	+++	+++
Dysentérie bacillaire	Shigella...	Mondiale	Homme (selles)	+++	+	+++	0
Gastroentérite	Colibacille Salmonelles, et autres	Mondiale	Homme (selles) Animaux	+ -	+ -	+++	0
VIRALES (2)							
Poliomyélite	Poliovirus	Mondiale	Homme (selles)	+++	+	+++	+++
Hépatite épidémique	Virus A et B	Mondiale	Homme (selles)	+++	++	+++	0
Diverses	Coxsackie, Adéno-Réo - Rotavirus	Mondiale	Homme (selles) Animaux	+	+ -	+++	0
PARASITAIRES (3)							
Dysentérie amibienne	Amibe dysentérique (Hystolytica)	Régions chaudes et humides	Homme (selles)	+++	++	+++	0
Dracunculose	Filaire de Médine	Afrique	Homme (sous-cutanée)	0	+++ (exclusif)	puits	0
Distomatose	Grande douve	Europe	Bovidés, ovidés, ... (selles)	0	+++ (exclusif)	cressonnières	0
Parasitoses communes	Giardia-Ascaris...	Mondiale	Homme (selles)	+	+ et terre	+++	0

(1) - Aiguës - épidémiques - intestinales.

(2) - Aiguës - subaiguës - épidémiques - endémiques ou sporadiques - à manifestations polymorphes.

(3) - Chroniques - à début aigu, subaigu ou latent - endémiques ou sporadiques - digestives ou cutanées.

MALADIES TRANSMISSIBLES PAR L'EAU PAR VOIE CUTANEO-MUQUEUSE

MALADIES	AGENT	RESERVOIR	HOTE INTERMEDIAIRE	GEOGRAPHIE	FREQUENCE
<u>PARASITAIRES</u>					
Bilharzirose	Schistosomes : <ul style="list-style-type: none"> . Hoematobium . Mansoni . Japonicum 	Homme (urines) Homme et animaux (selles)	Crustacés d'eau douce	Régions chaudes et humides	+++ maladie socio-économique
Anguillulose	Anguillule	Homme (selles)	-	Régions chaudes et humides	+
Méningo-encéphalite amibienne	"Naegleria gruberi"	Eaux superficielles	-	Cosmopolite probablement	environ 30 cas décrits
<u>BACTERIENNES</u>					
Leptospirose	Leptospires	Rongeurs (urines)	-	Cosmopolite	rare
Dermatite	Bacille pyocyanique et autres	Ubiquitaire	-	Cosmopolite	Quelques cas décrits

EVOLUTION DE LA FIEVRE TYPHOÏDE A PARIS DE 1895 à 1975

I - Nombre de cas déclarés

II - Décès correspondants

1900 - Création du Service local de surveillance des sources

1901 - Création du Service de surveillance médicale des sources

1914 - Vaccination aux armées

1915 - Javellisation systématique des eaux

1940 - Apparition des sulfamides commerciaux

1945 - Vaccination D.T.T.A.B.

1948 - Utilisation systématique du chloramphenicol

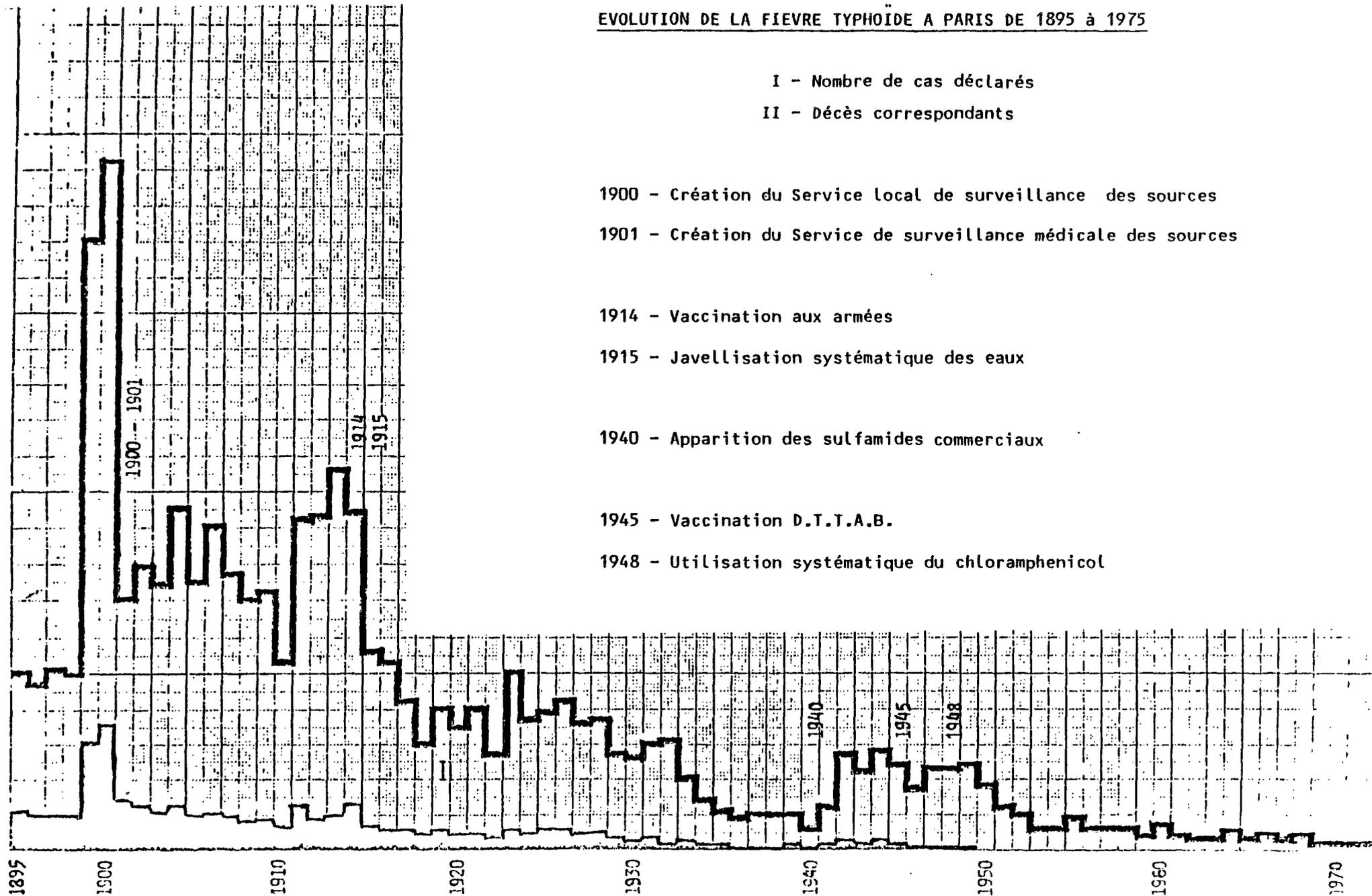


TABLE III-2 Infective Doses For Man of Bacterial Enteric Pathogens

Enteric Pathogen Dose: Viable Cells	Subjects Infected/Total Tested									
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
<i>Shigella dysenteriae</i> Strain M131	1/10	2/4	7/10	5/6						
Strain A-1		1/4		2/6						
<i>Shigella flexneri</i> Strain 2A#		6/33 ^a	33/49 ^b	66/87	15/24					
Strain 2A##				1/4	3/4	7/8	13/19	7/8		
<i>Salmonella typhi</i> Strain Quail			0/14		32/116		16/32	8/9	40/42	
<i>Vibrio cholerae</i> Strain: Inaba										
With NaHCO ₃				11/13		45/52		2/2		
No NaHCO ₃				0/2		0/4	0/4	2/4	1/2	
Enteropathogenic <i>E. coli</i> Strain 4608				0/5		0/5		4/8		

SOURCES: *Shigella dysenteriae*: Levine *et al.*, 1973; *Shigella flexneri*: Dupont *et al.*, 1972b; Dupont *et al.*, 1969; *Salmonella typhi*: Hornick *et al.*, 1970; *Vibrio cholerae*: Cash *et al.*, 1974; Enteropathogenic *E. coli*: Dupont *et al.*, 1971.

^aDose: 1.8×10^2 .

^bDose: 5×10^3 .

Microbiology of Drinking Water 103

TABLE III-8 Results of Feeding Various Quantities of Poliomyelitis Vaccine to Infants

Dose	No. Infected/ No. Fed	Percent Infected	References
PFU ^a			
0.2	0/2	0	Koprowski, 1956
2	2/3	66	Koprowski, 1956
20	4/4	100	Koprowski, 1956
5.5×10^4	16/18	89	Holguin <i>et al.</i> , 1962
TCD ₅₀ ^b			
10 ^{3.5}	28/97	29	Lepow <i>et al.</i> , 1962
10 ^{4.5}	42/96	46	Lepow <i>et al.</i> , 1962
10 ^{5.5}	48/84	57	Lepow <i>et al.</i> , 1962
10 ^{6.6}	12/20	60	Krugman <i>et al.</i> , 1961
10 ^{7.6}	15/20	75	Krugman <i>et al.</i> , 1961
10 ^{3.5}	208/308	68	Warren <i>et al.</i> , 1964
10 ^{5.5}	133/169	79	Warren <i>et al.</i> , 1964
1	3/10	30	Katz and Plotkin, 1957
2.5	3/9	33	Katz and Plotkin, 1957
10	2/3	67	Katz and Plotkin, 1957
10 ^{3.5}	4/8	50	Gelfand <i>et al.</i> , 1959
10 ^{7.5}	9/9	100	Gelfand <i>et al.</i> , 1959

^aPlaque-forming units

^bTCD₅₀ = Tissue culture dose 50%.

ELIMINATIONS FECALES

I - PRINCIPAUX GERMES TESTS DE CONTAMINATION FECALE ELIMINES JOURNELLEMENT SELON L'ESPECE (1)

ESPECE	Poids moyen de matières fécales éliminées en 24 heures en gramme.	Densité bactérienne par gramme de matières fécales en millions		Élimination bactérienne moyenne par individu et par 24 heures		
		Escherichia coli	Streptocoques fécaux	Escherichia coli en millions	Streptocoques fécaux en millions	Rapport E.coli/S.fécaux
HOMME	150	13	3	2.000	400	4,4
CANARD	336	33	54	11.000	18.000	0,6
VACHE	23.600	0,23	1,3	5.400	31.000	0,2
PORC	2.700	3,3	84	8.900	230.000	0,4
MOUTON	1.130	16,0	38,0	18.000	43.000	0,4
POULET	182	1,3	3,4	240	620	0,4
DINDE	448	0,29	2,8	130	1.300	0,1

(1) Extrait de "Sanitary significance of fecal coliforms in the environment" E.E. GELDREICH (Robert.A.TAFT Sanitary engineering Center - Cincinnati Ohio) 1966.

II - MICROORGANISMES PATHOGENES ELIMINES PAR LES MALADES OU LES PORTEURS

- SALMONELLES : (typhoïde et salmonelloses). Les porteurs peuvent éliminer jusqu'à 10^{11} salmonelles par gramme de selles pendant des semaines, des mois et même des années.
- ENTEROVIRUS : (poliovirus, coxsackie ...). 10.000 à 100.000 virions par gramme de selles pendant une durée pouvant atteindre 3 mois après l'infection.

NORMES INTERNATIONALES POUR L'EAU DE BOISSON

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

-1972-

Normes de qualité bactériologique

	Entrée du réseau		Dans le réseau
	Non désinfectée	Désinfectée	
E. coli sur 100 ml	0	0	0
Autres coliformes sur 100 ml	3	0	0 ou 10 (1) et (2)

(1) "Sur une année la proportion d'échantillons de 100 ml exempts de coliformes ne devra pas être inférieure à 95%".

(2) "Des coliformes ne devront pas être décelés dans deux échantillons successifs de 100 ml".

Fréquence des prélèvements

A l'entrée dans le réseau :

1) - Eau non désinfectée -

Population desservie	Intervalle maximal entre prélèvements successifs
Moins de 20 000 habitants	1 mois
20 000 à 50 000 habitants	2 semaines
50 000 à 100 000 habitants	4 jours
Plus de 100 000 habitants	1 jour

2) - Eau désinfectée -

Population desservie	Intervalle maximal entre prélèvements successifs
Plus de 10 000 habitants	1 jour
Moins de 10 000 habitants	1 semaine si possible, mais contrôle strict de la teneur en désinfectant

A l'intérieur du réseau :

Population desservie	Intervalle maximal entre prélèvements successifs	Nombre minimal d'échantillons à prélever sur l'ensemble du réseau
Moins de 20 000 habitants	1 mois	1 échantillon par 5 000 habitants et par mois
20 000 à 50 000 habitants	2 semaines	
50 000 à 100 000 habitants	4 jours	
Plus de 100 000 habitants	1 jour	1 échantillon par 10 000 habitants et par mois

Proposition de directive du Conseil relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

E. Facteurs microbiologiques

Paramètres	Fondementaire	Complémentaire	Résultats Volume de l'échantillon en ml	Valeurs communautaires				Observations
				Eaux de distribution		Eaux superficielles désinfectées CMA	Eaux conditionnées non désinfectées CMA	
				non désinfectées CMA	désinfectées CMA			
Coliformes totaux	+		100	5 (*)	0	0	0 (*)	(*) Au point de livraison à l'utilisateur. (**) Au captage. (†) Sous réserve qu'un nombre suffisant d'échantillons soit examiné (95 % de résultats conformes). (‡) Par type de bactériophages. (§) Recherche qualitative.
Coliformes fécaux	+		100	0	0	0	0 (*)	
Streptocoques fécaux	+		100	0	0	0	0 (*)	
Dénombrements à	37°	+	1	10	—	—	10 (*)	
	22°	+	1	100	—	—	100 (*)	
totaux	37°	+	1	—	0	0	—	
	22°	+	1	—	20	20	—	
Clostridium sulfite-réducteurs		+	20	2	2	2	0 (*)	
Salmonella		+	5 000	0	0	0	0 (*)	
Staphylocoques pathogènes		+	100	0	0	0	0 (*)	
Bactériophages fécaux		+	100	0 (‡)	0	0	0 (*)	
Virus entéropathogènes		+	10 000	0	0	0	0 (*)	
Protozoaires		+	—	absence (*)	absence	absence	absence (*)	
Animalcules		+		absence (*)				

ANNEXE

QUALITÉ REQUISE DES EAUX DE BAINNADE

Paramètres	G	I	Fréquence d'échantillonnage minimale	Méthode d'analyse ou d'inspection
Microbiologiques: Coliformes totaux /100 ml	500	10 000	bimensuelle (1)	Fermentation en tubes multiples. Repliquage des tubes positifs sur milieu de confirmation Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable)
Coliformes fécaux /100 ml	100	2 000	bimensuelle (1)	ou filtration sur membrane et culture sur milieu approprié tel que gélose lactosé au tergitol, gélose d'endo, bouillon au recpol 0,4 %, repliquage et identification des colonies suspectes. Pour les points 1 et 2, température d'incubation variable, selon que l'on recherche les coliformes totaux ou les coliformes fécaux
Streptocoques fécaux /100 ml	100	—	(2)	Méthode de Litsky Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable) ou filtration sur membrane. Culture sur un milieu approprié
Salmonelles /l	—	0	(2)	Concentration par filtration sur membrane. Inoculation sur milieu type. Enrichissement, repliquage sur gélose d'isolement, identification
Entérovirus PFU/10 l	—	0	(2)	Concentration par filtration par floculation ou par centrifugation et confirmation

G = guide.

I = impérative.

(0) Dépassement des limites prévues en cas de conditions géographiques ou météorologiques exceptionnelles.

(1) Lorsqu'un échantillonnage effectué au cours des années précédentes a donné des résultats sensiblement plus favorables que ceux prévus à la présente annexe et lorsqu'aucune condition susceptible d'avoir diminué la qualité des eaux n'est intervenue, la fréquence d'échantillonnage peut être réduite d'un facteur 2 par les autorités compétentes.

(2) Teneur à vérifier par les autorités compétentes lorsqu'une enquête effectuée dans la zone de baignade en révèle la présence possible ou une détérioration de la qualité des eaux.

BACTÉRIES DU SOUFRE - CORROSION

* * *

J. RIVIERE - Professeur à l'Institut National Agronomique

L.P. MAZOIT - Directeur honoraire du Service de Contrôle
des eaux de la Ville de Paris

Bactéries du cycle du soufre et corrosion

JACQUES RIVIÈRE
 PROFESSEUR DE MICROBIOLOGIE
 A L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
 PARIS-GRIGNON

1. - INTRODUCTION.

Le soufre est un élément indispensable à la nutrition des animaux, des végétaux et des microorganismes. Les plantes utilisent surtout du soufre minéral, sous forme de sulfates dans les sols et d'anhydride sulfureux dans l'atmosphère. La présence de ce dernier a une double origine : pollution industrielle due à la combustion du charbon et du pétrole, et oxydation spontanée à l'air de l'hydrogène sulfuré. L'hydrogène sulfuré provient de la décomposition microbienne de matières organiques en anaérobiose dans les sols inondés, les vases et les marécages.

Ce soufre minéral sert à la biosynthèse d'acides aminés (méthionine et cystine), de facteurs de croissance (thiamine, biotine, coenzyme A, acide lipoïque), de métabolites (glutathion, glutamylcystéinylglycine), que l'on retrouve dans les tissus animaux et végétaux et dans les cellules microbiennes.

Les besoins en soufre d'une culture intensive varient entre 9 et 39 kg par hectare et par an. Ils peuvent être couverts dans les zones industrialisées par le retour au sol du soufre émis dans les fumées. Les apports de soufre sous forme d'anhydride sulfureux dans la pluie varient de 168 kg par hectare et par an (site industriel) à 16 kg (zone rurale non polluée). Si les sols sont pauvres en sulfate, plus de la moitié du soufre nécessaire à la plante peut être absorbé par les parties aériennes. Le tabac peut même utiliser uniquement le soufre de l'atmosphère.

En dehors de ce qui se trouve dans les eaux de pluie et les engrais minéraux, le soufre fait retour au sol à l'état organique (résidus végétaux, déchets animaux). Il faut noter que la plus grande part des réserves en soufre du sol existent sous forme organique, acides aminés, polysaccharides soufrés, ester sulfates tels que les sulfates de choline et de tyrosine, tous inutilisables par les plantes.

C'est pourquoi les microorganismes du sol et des eaux jouent un grand rôle dans ce cycle (fig. 2).

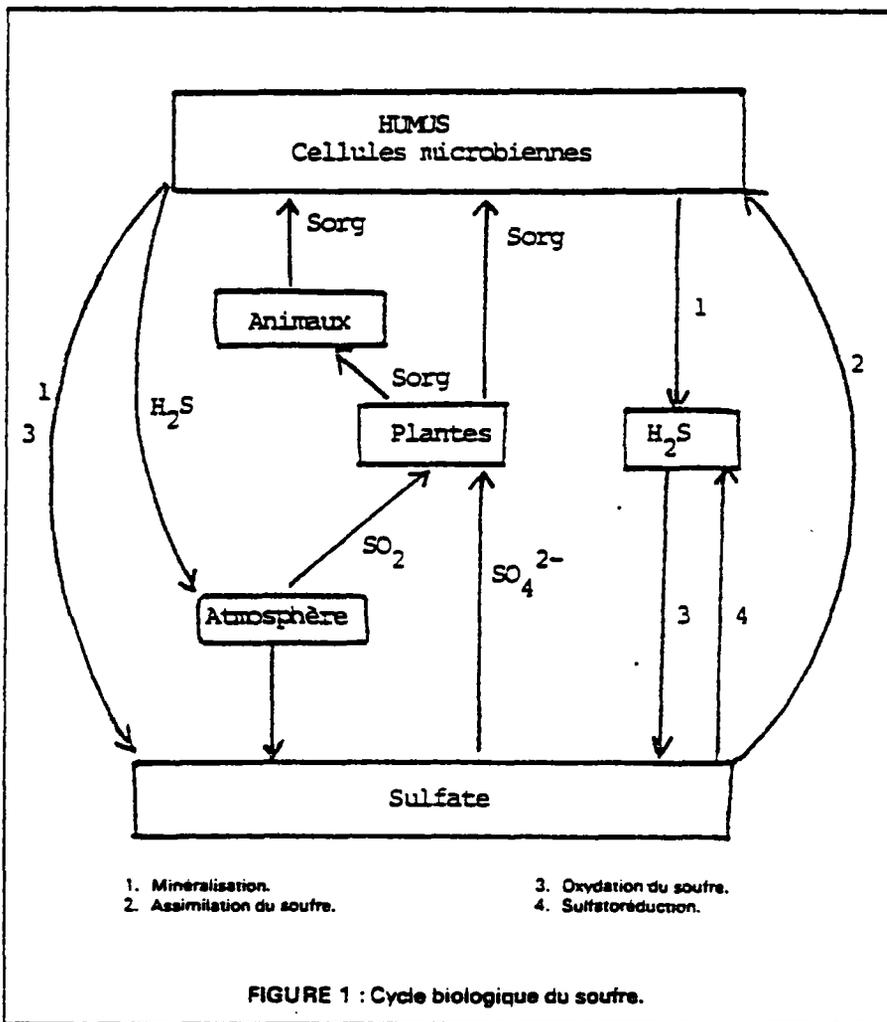


FIGURE 1 : Cycle biologique du soufre.

que l'on schématise dans le cycle biologique du soufre (fig. 1) : assimilation du soufre, oxydation du soufre ou des composés minéraux du soufre (sulfures, soufre élémentaire, thiosulfates, polythionates), sulfatoréduction.

Les microorganismes du sol et des eaux jouent un grand rôle dans ce cycle (fig. 2).

1.1. - Minéralisation.

De nombreux microorganismes du sol (bactéries, moisissures) non spécialisés

sont capables de minéraliser le soufre organique. Les produits terminaux obtenus sont des sulfures, des sulfates ou des composés soufrés volatils tels que le méthylmercaptan (CH_3SH) et le diméthylsulfure (CH_3SCH_3).

1.2. - Assimilation du soufre minéral ou immobilisation.

Là encore, de nombreux microorganismes du sol (bactéries, algues, levures et moisissures) non spécialisés sont capables d'utiliser du soufre minéral (sulfates

en aérobie, soufre réduit en anaérobie) pour leur croissance. La teneur en soufre des cellules microbiennes est variable, entre 0,1 et 1 p. cent du poids sec, et l'on retrouve le soufre présent surtout dans les acides aminés sulfurés. On a pu démontrer qu'il s'agissait d'une absorption active du sulfate de la solution du sol vers l'intérieur des cellules.

Par contre, des bactéries spécialisées sont responsables de l'oxydation du soufre et de la sulfatoreduction qui peuvent être la cause de corrosion.

En effet, la corrosion peut être définie comme une attaque destructrice d'un métal par suite d'une réaction chimique ou électrochimique avec le milieu. Les bactéries oxydant le soufre produisent un acide minéral, l'acide sulfurique, agressif pour le métal, tandis que les bactéries sulfatoreductrices dépolarisent les électrodes, tout en formant des sulfures qui sont également corrosifs. Nous avons étudié un certain nombre de cas qui font l'objet de la deuxième partie de cet article.

2. - OXYDATION DU SOUFRE ÉLÉMENTAIRE ET DES COMPOSÉS MINÉRAUX-SOUFRÉS.

C'est le fait de microorganismes ayant des métabolismes très différents, dont seul le groupe des chimolithotrophes ou Thiobactéries joue un rôle dans la corrosion.

Dans les biotopes pauvres en soufre, des microorganismes variés peuvent oxyder les composés minéraux sulfurés sans que l'on ait une idée des processus métaboliques en cause, et de l'importance quantitative du phénomène.

Dans les biotopes riches en soufre, cette oxydation est due à trois groupes bien distincts de bactéries du soufre :

- des bactéries filamenteuses, aérobies strictes, présentes dans les eaux douces ou marines proches d'une source de sulfures, d'origine géologique ou biologique. Deux genres, *Thiothrix* et *Beggiatoa*, ont été étudiés. Les filaments contiennent des granules de soufre provenant de l'oxydation des sulfures, granules qui disparaissent quand il n'y a plus de sulfures, le soufre étant alors oxydé en acide sulfurique. Dans le lac Ixpaco (Guatemala), l'eau est acide (pH 2,7) et contient 100000 de ces bactéries viables par ml, bactéries existant également dans le lac d'Enghien ;
- des bactéries phototrophes anaérobies, vertes ou rouges, utilisant l'énergie lumineuse et réduisant le gaz carbonique ou les carbonates, grâce aux électrons des sulfures :



Elles sont abondantes dans des milieux aquatiques, anaérobies, riches en sulfures et éclairés où elles peuvent parfois se développer abondamment, colorant les eaux en rouge ou en vert ;

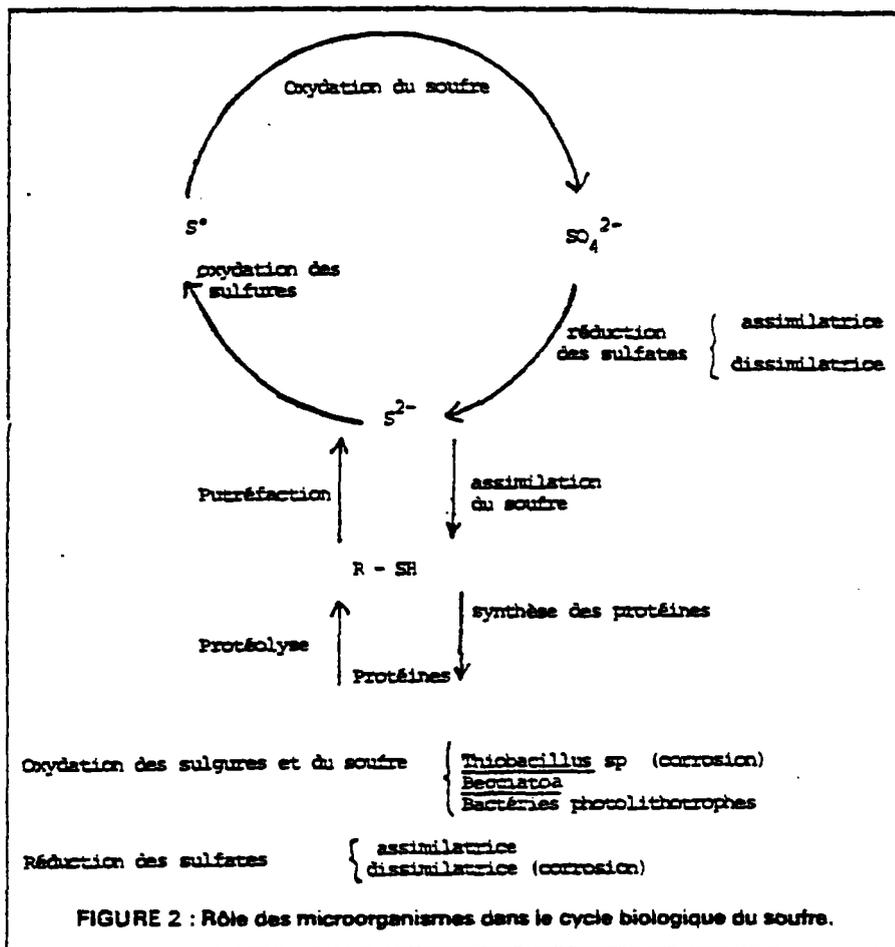


FIGURE 2 : Rôle des microorganismes dans le cycle biologique du soufre.

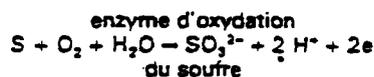
- des bactéries chimolithotrophes, tirant leur énergie de l'oxydation du soufre élémentaire ou de composés minéraux sulfurés, assimilant le gaz carbonique ou les carbonates, aérobies. Elles peuvent donc croître dans des milieux pauvres, contenant quelques sels minéraux, puisqu'on signale même des souches utilisant l'azote gazeux.

Ce sont des bâtonnets Gram négatif, non sporulés, mobiles avec des flagelles polaires, de petite taille (0,2-1,3 μ), appartenant au genre *Thiobacillus*.

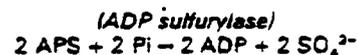
Un certain nombre d'espèces ont été décrites (tableau I) bien qu'il soit souvent très difficile d'obtenir des cultures pures à l'aide de milieux gélosés.

2.1. - Oxydation du soufre élémentaire.

La présence d'une enzyme d'oxydation du soufre a été démontrée chez plusieurs espèces et le premier produit formé est le sulfite :



Le sulfite formé est ensuite oxydé en sulfate par l'intermédiaire de 2 enzymes, l'APS (adénosine 5 phosphosulfate) réductase et l'ADP (adénosine diphosphate sulfurylase).

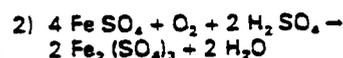
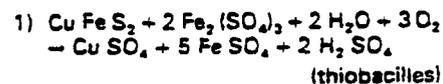


2.2. - Oxydation des sulfures.

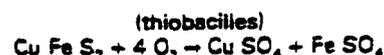
Une application pratique est le fait d'une espèce seule ou associée à une autre, toutes deux du genre *Thiobacillus*, *T. ferrooxidans* et *T. thiooxidans*. Ces bactéries oxydent le fer et le soufre, acidifiant les eaux de mine, solubilisant les minéraux grâce au sulfate ferrique en solution sulfurique. Cette biolixiviation est actuellement utilisée pour des minerais de cuivre à faible teneur (Kennecott Cooper, U.S.A.).

Les minerais broyés sont lixiviés en tas, en aménageant des zones où les bactéries se développent dans l'eau, et en recyclant la solution acide de sulfate ferrique (Bertin, 1980).

Dans le cas de la chalcopirite (Cu Fe S_2), on a les réactions suivantes :



globalement. La réaction est la suivante :

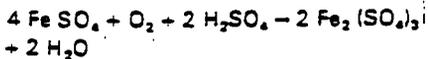


Ainsi, grâce aux thiobacilles qui produisent du sulfate ferrique, la chalcopyrite réduite et insoluble, est oxydée, avec solubilisation du cuivre que l'on récupère ensuite.

On peut envisager d'utiliser ces bactéries pour l'extraction des minerais pauvres d'uranium. Le mécanisme indirect des réactions en cause est le suivant :

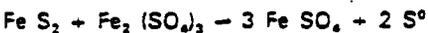


Les thiobacilles interviennent pour produire du sulfate ferrique :

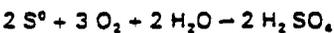


L'acide sulfurique est également produit par les thiobacilles à partir des pyrites.

Il y a d'abord un mécanisme indirect qui produit du soufre lorsque les pyrites sont en présence de sulfate ferrique :



Les thiobacilles sont alors responsables de l'oxydation du soufre élémentaire en acide sulfurique.



2.3. - Recherche et dénombrement des souches.

Un certain nombre de milieux sont utilisés.

Les milieux liquides (tableau II) permettent une bonne croissance mise en évidence par abaissement du pH, examen microscopique ou production d'acide sulfurique après 21 jours d'incubation à 30 °C. Dans ce dernier cas, on prélève dans chaque tube 1 ml de liquide dans lequel on ajoute 2 gouttes d'acide chlorhydrique et 5 gouttes d'une solution aqueuse de chlorure de baryum à 5 p. cent. La présence de sulfate se traduit par un précipité blanc. Ces milieux donnent la possibilité de calculer le nombre le plus probable (NPP) par une méthode statistique.

L'isolement des souches est difficile et peut se faire à l'aide de milieux gélosés (tableau III).

TABLEAU III
Milieux solides utilisés pour l'isolement des thiobacilles

20 ml de gélose à 15 % par boîte de Petri	
milieux liquides répandus à la surface de la gélose	sources d'énergie
2 ml de milieu 9 K de Silverman et Lundgren	Fe ²⁺
2 ml de milieu de Bounds et Colmer	S ₂ O ₃ ²⁻
5 ml de milieu de Bounds et Colmer acidifié (50 µl de H ₂ SO ₄ pour 100 ml)	S ₂ O ₃ ²⁻
2 ml de milieu de Bounds et Colmer	S ₄ O ₆ ²⁻

Les milieux sont laissés en contact 12 h. L'excès est éliminé.

TABLEAU I
Diverses espèces du genre *Thiobacillus* (Bertin, 1980)

Organismes-habitat	Caractéristiques générales
<i>T. thioferus</i> eau de canal- boue sol	pH de croissance 7,8 à 4,5 avec un optimum près de pH 7 généralement aérobic et mobile quelques souches ont une croissance en anaérobiose en présence de nitrate
<i>T. neapolitanus</i> eau de mer constructions en béton corrodées	aérobic strict avec des propriétés très similaires à celles de <i>T. thioferus</i>
<i>T. denitrificans</i> eau de canal et de rivière eau salée, tourbe, engrais, boue	optimum de croissance près de pH 7 oxyde les composés du soufre en anaérobiose en présence de nitrates capacité dénitrifiante perdue par culture à l'air mobile
<i>T. thiooxidans</i> sol	optimum de croissance à pH voisin de 2 aérobic strict mobile
<i>T. concretivorus</i> constructions en béton corrodées	très similaire à <i>T. thiooxidans</i>
<i>T. ferrooxidans</i> eau de mine et de sol acide contenant du sulfure d'hydrogène	aérobic strict optimum de croissance pH 2,5 à 2,8 utilise aussi l'oxydation du fer ferreux comme source d'énergie mobile
<i>T. novellus</i> sol	autotrophe facultatif, non mobile optimum de croissance voisin de pH 7
<i>T. intermedius</i> boue d'eau douce	autotrophe facultatif, croissance de pH 2 à pH 7 mobile croissance en autotrophie stimulée en présence de matière organique
<i>T. thiocyanoxidans</i> eaux d'égouts	très semblable à <i>T. thioferus</i> oxydation du thiocyanate sert de source d'énergie oxyde le formate

T. thiooxidans, *T. concretivorus*, *T. ferrooxidans* sont responsables de corrosion.

3. - RÉDUCTION DES SULFATES.

Les sulfates de la biosphère qui servent à la nutrition des plantes et des microorganismes subissent une réduction assimilatrice dont les mécanismes sont bien connus. Les bactéries sulfatoréductrices, au contraire, réalisent une réduction dissimilatrice, les sulfates jouant le rôle d'accepteurs terminaux d'électrons dans les processus d'oxydo-réduction fournissant l'énergie à ces bactéries. Dans ce cas, on utilise parfois l'expression respiration sulfate.

Les quantités mises en jeu sont très différentes.

Avec la réduction assimilatrice, on obtient environ 200 mg de cellules (en poids sec) par mg de soufre, tandis que la réduction dissimilatrice fournit 0,5 à 1 mg de cellules par mg de soufre.

3.1. - Bactéries sulfatoréductrices (Postgate, 1979).

Ce sont des bactéries anaérobies stric-

tes très ubiquistes, largement répandues dans la nature, réduisant les sulfates en sulfures à l'aide des électrons fournis par la source de carbone et d'énergie qu'elles utilisent.

Avec l'acide lactique, la réaction globale est la suivante :



On connaît les mécanismes enzymatiques de la réduction des sulfates en sulfites qui font intervenir de l'ATP sulfurylase, de la pyrophosphatase et de l'APS réductase.

(ATP sulfurylase)

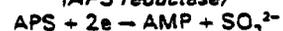


(adéncine 5 phosphosulfate)

(Pyrophosphatase)



(APS réductase)



Les sulfates peuvent donc être remplacés par les sulfites, mais également par

les thiosulfates, les tri et les tétrathionates, la dithionite et, peut-être le soufre élémentaire.

Il y a classiquement deux genres et douze espèces que l'on distingue d'après un certain nombre de caractères (tableaux IV et V).

La sporulation qui caractérise le genre *Desulfotomaculum* est mise en évidence par la résistance à la chaleur (1 ml de culture chauffée 5 mn à 80 °C) et une subculture.

Du point de vue nutritionnel, ces bactéries sont prototrophes, mais l'extrait de levure stimule leur croissance. De nombreuses souches fixent l'azote de l'air, les autres utilisent les sels ammoniacaux.

Les substrats qui peuvent servir de source de carbone et de donneurs d'électrons sont limités et varient suivant les souches (tableau VI). Ils sont oxydés en acétate, à part les composés à un carbone (méthanol, acide formique) qui donnent du gaz carbonique. Les hydrocarbures ne sont pas utilisés.

Mais la découverte récente de nouveaux genres par Pfennig et ses collaborateurs met en évidence que la respiration des sulfates est un processus métabolique permettant la dégradation d'un grand nombre de composés carbonés jusqu'au stade final du gaz carbonique. Une espèce est même capable d'oxyder anaérobiquement un composé aromatique tel que le benzoate.

Des cytochromes, caractéristiques du métabolisme respiratoire, ont été extraits de ces bactéries anaérobies strictes. Ils transportent les électrons du donneur organique à l'accepteur terminal justifiant l'emploi du terme « respiration sulfate ». Du fait de la présence de ces transporteurs hémisés, les besoins en fer de ces bactéries sont élevés. L'ensemble des réactions impliquées dans leur métabolisme est résumé dans la figure 3.

Beaucoup de souches possèdent une hydrogénase qui joue un rôle dans la dé-polarisation cathodique (fig. 4). Mais ces souches ne peuvent croître en présence d'hydrogène et de sulfates dans un milieu minéral où le carbone est sous forme de carbonates. Ce sont donc des chimio-organotrophes proches de l'autotrophie.

Ces bactéries sulfatoréductrices sont résistantes (métaux toxiques, antibiotiques, désinfectants), croissent entre pH 5 et 9,5, à des températures comprises entre - 5 °C et + 75 °C, peuvent supporter des pressions élevées. Certaines sont barotolérantes, alors que d'autres sont barophiles, une souche pouvant même se développer à 104 °C à une pression de 1×10^5 kPa.

3.2. — Recherche et dénombrement des souches.

Ces bactéries ne se développent que dans des milieux à bas potentiel d'oxydo-réduction ($E_h \leq 100$ mV), ce qui signifie que l'élimination de l'air par simple ébullition est insuffisante. Il est indispensable d'ajouter des substances réductrices. On utilise quatre milieux principaux (tableau VII).

TABLEAU II
Principaux milieux de culture pour les thiobacilles acidifiants

	T. ferrooxidans			T. thiooxidans	
	Silverman et Lundgren (1959)	Leathen (1951)	Bounds et Colmer (1972)	Starkey (1925)	Pochon et Tardieux (1962)
<i>Éléments nutritifs (g/l)</i>					
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	0.15	3	2	...
NH ₄ NO ₃	2
NH ₄ Cl
KCl	0.1	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
MgCl ₂	0.10
K ₂ HPO ₄	0.5	0.05
KH ₂ PO ₄	3	3	...
Ca(NO ₃) ₂	0.01	0.01
CaCl ₂ ·8H ₂ O	0.25	0,25	...
CaCO ₃	5
<i>Éléments énergétiques (g/l)</i>					
Fe ²⁺ (milieu K) (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	2.9	0.2	...	traces	...
S ⁰ (Soufre en fleur)	10	...
N ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	5 ¹

1 remplacé par 3.2 g de K₂S₄O₆ Tuovinen et Kelly (1974)

TABLEAU IV
Classification des bactéries sulfatoréductrices

Caractères	<i>Desulfotomaculum</i>				
	nigrificans	orientis	ruminis	antarcticum	acetoxidans
Forme de bâtonnet	droit	incurvé	droit	droit	droit
Flagelles	péritriches	péritriches	péritriches	péritriches	polaire
Présence d'un spore	+	+	+	+	+
Possibilité de thermophilie	+	-	-	-	-
Halophilie	-	-	-	-	-
Croissance dans un milieu contenant : pyruvate sans sulfate	+	-	+	non essayé	-
Formiate et sulfate	-	-	+	-	-
acétate et sulfate	-	-	-	-	+
glucose et sulfate	-	-	-	+	-
gélatinase	-	-	-	+	-

Le milieu liquide B permet de faire des dénombrements après détermination du Nombre le Plus Probable (utilisation de tables statistiques).

Les échantillons doivent être prélevés dans des récipients stériles, remplis au maximum, hermétiquement bouchés pour éviter l'accès de l'air, conservés au frais

TABLEAU V
Classification des bactéries sulfatoréductrices

Caractères	Desulfovibrio						
	desulfuricans	vulgaris	saxilegens	africanus	baculatus	gigas	thermophilus
Forme en bâtonnet	incurvé	incurvé	incurvé	incurvé	droit	spirale	droit
Flagelles	polaires	polaires	polaires	lophotriches	polaires	lophotriches	polaires
Présence d'une spore	-	-	-	-	-	-	-
Possibilité de thermophilie	-	-	-	-	-	-	+
Halophilie	-	-	+ 2.5 %	-	-	-	-
Croissance dans un milieu contenant pyruvate sans sulfate	+	-	-	-	-	-	-
cholesterol sans sulfate	+	-	-	-	-	-	-
malate et sulfate	+	-	+	+	+	-	-
formiate et sulfate	+	-	+	+	+	+	+
glucose et sulfate	+	-	-	-	-	-	-
gélatinase	-	-	-	-	-	-	-

et inoculés dans les 24 heures. Dans le cas de prélèvements en profondeur, il faut maintenir une pression élevée pour la culture des souches qui peuvent être barophiles strictes.

4. - ÉTUDE DE QUELQUES CAS PRÉCIS.

Une étude a été faite au laboratoire. La présence de bactéries viables du cycle du soufre a été mise en évidence, démontrant leur rôle dans des processus de corrosion. Une microflore associée peut métaboliser des sources de carbone organique inutilisables par les bactéries sulfatoréductrices, rendant leur croissance possible. On a eu l'occasion de déterminer les doses actives d'agents bactériostatiques et bactéricides, bien que la méthode la plus efficace soit d'éviter le développement de ces bactéries plutôt que de les détruire. Des revêtements protecteurs peuvent être éprouvés au laboratoire.

4.1. - Mise en évidence des bactéries du cycle du soufre responsable de corrosion.

4.1.1. - Corrosion d'une jetée portuaire.

Il s'agissait d'un port artificiel dont les éléments étaient constitués d'une armature en aluminium, grâce à des traverses régulièrement espacées, formant un cadre rempli de sable.

Avant cette réalisation particulière, le procédé breveté était utilisé uniquement pour faire des remblais.

Au bout de 6 mois, l'armature a présenté une importante corrosion dans les

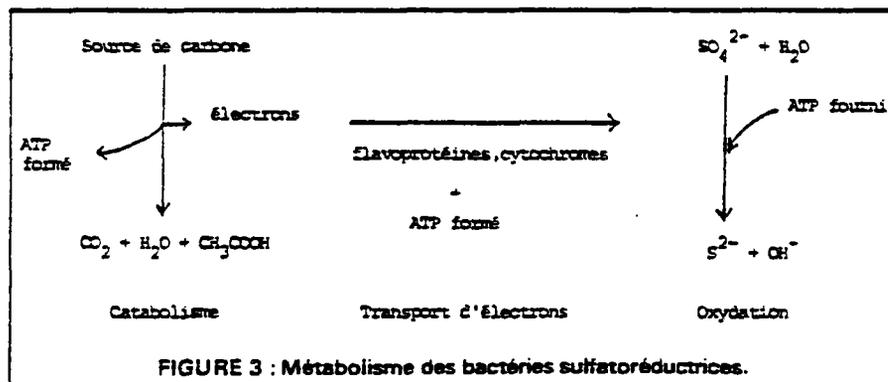


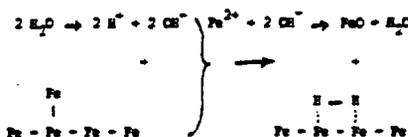
FIGURE 3 : Métabolisme des bactéries sulfatoréductrices.

parties submergées, et la jetée est devenue inutilisable. Les résultats de la recherche des bactéries sulfatoréductrices et des bactéries oxydant le soufre dans un certain nombre de prélèvements sont résumés dans le tableau VIII. Il faut noter que les milieux décrits ont été préparés avec et sans chlorure de sodium (35 g par litre).

On note que tous les échantillons contiennent des bactéries sulfatoréductrices, mais pas de bactéries oxydant le soufre. Un échantillon prélevé au voisinage d'une zone très corrodée avec odeur sulfureuse est très riche en bactéries sulfatoréductrices responsables de la corrosion de l'aluminium (Hédrick, 1970).

On a pu noter que le sable utilisé pour remplir le cadre en aluminium contenait une proportion notable de vase dont la matière organique a servi de donneur d'hydrogène pour la réduction des sulfates. Par contre un prélèvement de sable normal ne contenait pas de bactéries

1) Réduction de l'eau et polarisation de la cathode



2) Réduction des sulfates et dépolarisation cathodique



FIGURE 4 : Dépolarisation cathodique par des bactéries sulfatoréductrices hydrogénase + dans le cas du fer.

sulfatoréductrices. On peut donc penser que l'utilisation d'un sable propre eut évité une corrosion aussi rapide.

4.1.2. - Circuit de climatisation d'un immeuble d'une vingtaine d'étages.

Des prélèvements ont été effectués à divers niveaux du circuit qui présentait des traces de corrosion, en particulier

TABLEAU VII
Milieux de culture pour les bactéries sulfatoréductrices (concentrations exprimées en g/litre)

Milieu B : mise en évidence et dénombrement des souches		Milieu D : étude de la croissance sans sulfate		Milieu E : isolement et dénombrement des souches		Milieu F : isolement et dénombrement de <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	
KH ₂ PO ₄	0.5	KH ₂ PO ₄	0.5	KH ₂ PO ₄	0.5	Tryptone	10
NH ₄ Cl	1	NH ₄ Cl	1	NH ₄ Cl	1	Sulfate de sodium	0.5
CaSO ₄	1	CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1	Na ₂ SO ₄	1	Citrate de fer	0.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2	MgCl ₂ . 6H ₂ O	1.6	CaCl ₂ . 6H ₂ O	1	Lactate de sodium	3.5
Lactate de sodium	3.5	Extrait de levure	1	MgCl ₂ . 6H ₂ O	2	MgSO ₄ . 7H ₂ O	2
Extrait de levure	1	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.004	Lactate de sodium	3.5	Gélose	12
Acide ascorbique	0.1	Pyruvate de sodium	3.5	Extrait de levure	1		
		ou					
Acide thioglycolique	0.1	Chlorhydrate de choline	1	Acide ascorbique	0.1		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.5	pH 7.5		Acide thioglycolique	0.1		
pH 7.0 - 7.5				FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.5		
				Gélose	15		
				pH 7.6			

dans les inducteurs, et dans la boue d'un échangeur de température.

Un traitement anti-corrosion à base de sulfite de sodium, d'amines et de polyphosphates alcalins était régulièrement appliqué depuis la mise en œuvre du circuit. On a donc recherché et dénombré les bactéries sulfato et sulfitoréductrices, et les résultats des analyses bactériologiques sont résumés dans le tableau IX. La croissance de ces bactéries, présentes à l'origine en très petites quantités dans l'eau de distribution de la ville, s'explique par les substances nutritives apportées par un traitement anti-corrosion dépourvu d'agent bactéricide. En effet, ce traitement apporte des sulfites (accepteurs d'électrons), des amines (sources d'azote), des polyphosphates (source de phosphore). Pour supprimer le risque de corrosion, il a été préconisé d'ajouter un ammonium quaternaire à dose convenable, précaution élémentaire que la société responsable du traitement des eaux avait négligé de prendre.

4.1.3. — Bactéries productrices d'acide : cas de piquets de fer d'un vignoble en espalier.

Après cinq ans, les piquets de fer d'un vignoble en espalier de la région de Tricastin (Vaucluse), étaient corrodés à la base, avec une épaisse couche de rouille. Les résultats des dénombrements des bactéries du cycle du soufre sont donnés dans le tableau X.

Il y a un grand nombre de bactéries oxydant le soufre (*Thiobacillus sp.*) dans la rouille et dans le sol au voisinage des piquets. Il s'agit donc d'une corrosion acide provoquée par la formation d'acide sulfurique d'origine bactérienne à partir du soufre utilisé lors des traitements anti-cryptogamiques appliqués à la vigne, traitements fréquents lors des années humides. Il est recommandé de protéger les piquets de fer à la base par un revêtement convenable ou d'utiliser des piquets de bois. Des asphaltes ou du bitume donnent de bons résultats.

TABLEAU VI
Sources de carbone et donneurs d'électrons utilisables par les bactéries sulfatoréductrices

Utilisables par la plupart des souches		spécifiques pour :	
		D. acetoxidans	D. antarcticum
Acides organiques	formique pyruvique fumarique malique lactique	acide acétique acide butyrique	glucose
	Alcools		
Composés azotés	cystéine choline		

TABLEAU VIII
Dénombrement des bactéries sulfatoréductrices et des bactéries oxydant le soufre (résultats exprimés par g d'échantillons frais)

Échantillons de sable	Bactéries sulfatoréductrices		Bactéries oxydant le soufre	
	milieu salé	milieu normal	milieu salé	milieu normal
Sable vaseux de la jetée niveau hors d'eau	50	50	0	0
Sable vaseux de la jetée niveau de l'eau	130	0	0	0
Sable vaseux de la jetée niveau sondage avec odeur sulfureuse	25000	25	0	0
Sable témoin sans vase	0	0	0	0

TABLEAU X
Dénombrement des bactéries du cycle du soufre (nombre de cellules revivifiables par g poids sec)

Prélèvement	Bactéries sulfatoréductrices	Bactéries oxydant le soufre
Rouille	60	150000
Sol	50	10000

4.2. - Rôle de la microflore associée dans la croissance des bactéries sulfatoréductrices.

C'est un cas qui peut se produire lorsqu'il y a une microflore complexe dans un milieu naturel, tel qu'un sol. Un isolant est utilisé pour protéger de la corrosion des tuyaux métalliques enfouis dans la terre. On peut se demander s'il ne contient pas des constituants métabolisables par des bactéries sulfatoréductrices, ce qui favoriserait la corrosion.

Pour répondre à la question, on inocule deux souches d'espèces différentes dans deux milieux de base minéraux liquides de même composition, le premier contenant du lactate de sodium, source de carbone et d'énergie utilisable par toutes les bactéries sulfatoréductrices, le second l'isolant éprouvé. Les résultats de l'expérience résumés dans le tableau XI démontrent qu'il n'y a pas d'utilisation directe.

Pour mettre en évidence une utilisation indirecte de cet isolant, on réalise quatre colonnes de terre dans des éprouvettes en verre d'un litre de capacité. La première colonne de terre représente le témoin, les trois autres sont additionnées respectivement de lactate de sodium (3,6 g), ou de l'isolant éprouvé (100 et 200 g). Ces quatre colonnes sont recouvertes d'une solution de sulfate de sodium à 1 p. mille, réalisant des conditions favorables à la réduction des sulfates. Après incubation à 30 °C, on dénombre les bactéries sulfatoréductrices. Les résultats sont résumés dans le tableau XII.

On note qu'il y a un grand nombre de bactéries sulfatoréductrices dans les trois échantillons de terre additionnée d'un substrat (lactate de sodium ou isolant). En outre, on observe une réduction des sulfates se traduisant par une coloration noire due au sulfure de fer produit. On peut en déduire qu'il y a une utilisation indirecte de l'isolant. En effet, les bactéries sulfatoréductrices doivent se développer à partir des métabolites résultant de la biodégradation anaérobie de l'isolant par la microflore de la terre éprouvée.

4.3. - Lutte contre les bactéries sulfatoréductrices.

4.3.1. - Étude du pouvoir bactéricide d'inhibiteurs de corrosion vis-à-vis d'une microflore complexe.

Il s'agissait d'éprouver l'efficacité de divers produits bactéricides vis-à-vis de

TABLEAU IX Dénombrement des groupes bactériens producteurs de sulfures dans divers prélèvements d'un circuit de chauffage (les résultats sont exprimés par litre d'eau)

Organe de prélèvement	Bactéries sulfatoréductrices	Bactéries sulfitoréductrices
Inducteurs HAUT	9000	9000
Inducteurs BAS	45000	10000
Boue de l'échangeur	95000	100000

TABLEAU XI Recherche d'une éventuelle utilisation d'un isolant par des bactéries sulfatoréductrices (la composition est donnée en g/litre d'eau)

Souches éprouvées 15 jours d'incubation à 30 °C	milieu de base : chlorure d'ammonium, 1 ; sulfate de magnésium, 2 ; sulfate de sodium, 1 ; phosphate bipotassique, 0,5			
	lactate de sodium : 3,6	isolant éprouvée		
		40	200	400
Desulfovibrio desulfuricans	+	0	0	0
Desulfovibrio africanus	+	0	0	0

+ = croissance. 0 = pas de croissance.

TABLEAU XII Dénombrement des bactéries sulfatoréductrices dans quatre colonnes de terre recouvertes d'une solution de sulfate de sodium à 1 p. mille et incubées à 30 °C (les résultats sont exprimés en nombre de cellules revivifiables par g de terre en poids sec)

Durée d'incubation en jours	Terre témoin	Terre témoin additionnée de		
		lactate de sodium 3,6 g	isolant 100 g	isolant 200 g
0	1000	1000	1000	1000
15	1000	2000	1000	1000
21	1000	20000	10000	10000
45	1000	1000000	15000	25000

TABLEAU XIII Épreuve de produits bactéricides (concentration minimale active en p.p.m.) après 60 minutes de contact

Produits	Bactiram		D 40 68	D 30 36
	443 24 19	V 80 27 43		
Enterobacter aerogenes	200	00	+	200
Aeromonas sp.	200	200	+	500
Pseudomonas sp.	200	200	+	500
Desulfovibrio desulfuricans	200	+	+	200
Desulfovibrio africanus	200	200	+	200

+ = culture positive (pas d'activité bactérienne).

bactéries présentes dans une eau destinée à être réinjectée dans un puits de pétrole. Ces produits devaient être bactéricides après 60 mn de contact dans des conditions expérimentales définies par une Commission AFNOR (Eaux-Toxicité-Bactéries).

Des échantillons d'eau avant et après filtration à la sortie des séparateurs ont été fournis au laboratoire. Un certain nombre de souches utilisant les hydrocarbures et de souches réduisant les sulfates ont été isolées, purifiées, identifiées et éprouvées avec douze produits bactéricides commerciaux. Quatre résultats sont résumés dans le tableau XIII. On en déduit que des produits bactéricides de constitution chimique voisine (ammoniums quaternaires) sont loin d'avoir la même efficacité, même d'une marque identique, et que le pouvoir bactéricide d'un produit varie suivant les souches.

4.3.2. — Réalisation d'un modèle expérimental pour étudier la tenue des revêtements protecteurs de corrosion.

Il s'agissait d'échantillons d'eau, de vase, et de zones corrodées à la surface de tambours servant à la prise d'eau à partir d'un canal latéral du Rhône en vue d'approvisionner des circuits de refroidissement. L'eau et la vase sont riches en bactéries sulfatoréductrices que l'on retrouve dans les points de corrosion (tableau XIV).

TABLEAU XIV
Dénombrements bactériens
(cellules viables par g ou ml)

Prélèvements	Bactéries sulfatoréductrices	Bactéries oxydant les sulfures
Eau	1000	0
Vase	10000	0
Rouille	45	4

Pour étudier la tenue des revêtements protecteurs, on a réalisé l'expérimentation suivante : des plaques métalliques en acier doux de 180 mm sur 30 mm ont été découpées à l'abrasif SA3, rugosité 17 grossier angulaire. Ensuite elles ont été recouvertes des trois systèmes de revêtement utilisés.

1 plaque de chacun des systèmes a été rayée jusqu'au métal dans le sens de la longueur.

Ces plaques ont été introduites dans des tubes contenant le milieu de culture favorable aux bactéries sulfatoréductrices que l'on a inoculé avec un mélange des souches isolées lors des prélèvements. Les plaques ont été examinées après 30 jours d'incubation à 30 °C. Les résultats sont résumés dans les tableaux XIV et XV, et font ressortir des conclusions précises.

TABLEAU XV
Recherche de la corrosion
de plaques métalliques
revêtues d'enduits protecteurs et
soumises à l'action de bactéries
sulfatoréductrices

Types de revêtement	Présence de points de corrosion sur	
	Plaques intactes	Plaques rayées
1	-	+
2	-	+
3	-	-

+ = début de corrosion.
- = pas de corrosion.

L'eau du Rhône est très polluée et contient, à la fois, une microflore totale très abondante et de nombreuses bactéries sulfatoréductrices du genre *Desulfovibrio*. Ces dernières se retrouvent dans les prélèvements de corrosion (piqûre de rouille) accompagnées de bactéries oxydant les sulfures du genre *Thiobacillus*.

Étant donné que les tambours sont successivement en aérobiose et en anaérobiose, il est compréhensible de retrouver ces deux types bactériens intervenant dans le cycle du soufre. Les bactéries sulfatoréductrices présentes à la fois dans l'eau, la vase et les points de corrosion sont donc responsables de cette dernière.

Leur croissance est favorisée par la pollution de l'eau du Rhône apportant des sulfates et de la matière organique, et par les conditions d'anaérobiose où se trouvent les tambours plongés dans une eau sans oxygène.

Les essais de tenue des revêtements protecteurs mettent en évidence la bonne qualité des revêtements éprouvés, puisqu'un début de corrosion n'apparaît qu'au niveau des rayures.

Le revêtement n° 3 étant plus épais que les deux autres protège mieux contre des rayures de même profondeur.

5. — CONCLUSION.

Les bactéries du cycle du soufre jouent un rôle considérable dans des phénomènes de corrosion dont nous avons cité quelques exemples après les avoir étudiés au laboratoire.

Dans le cas des bactéries oxydantes, on peut tirer profit de leur pouvoir de produire de l'acide sulfurique et du sulfate ferrique pour l'extraction des minerais

pauvres. Une mine de la Kennecott Cooper, aux U.S.A., a une production de cuivre que l'on pourrait qualifier de biologique de près de 100 tonnes par jour. Les bactéries sulfatoréductrices ont été rendues responsables de la formation de gisements de soufre d'origine biologique. Mais leur principale fonction pour le métallurgiste semble être de favoriser la corrosion des métaux.

Il est souvent difficile au bactériologiste de les étudier au laboratoire. Certaines souches préfèrent les milieux gélosés où elles donnent de belles colonies noires, d'autres ne se développent qu'en milieux liquides. Il n'existe donc pas un milieu unique pour toutes les souches, et l'on doit retenir que leur rôle éventuel dans un processus de corrosion n'est déterminé que si l'on décèle des cellules viables après subcultures, ou des sulfures provenant de leur métabolisme.

Les conditions de culture ne sont pas toujours réalisables sans un équipement coûteux dans le cas des souches barophiles strictes.

L'obtention de cultures pures identifiées est donc difficile, quoique nécessaire pour quantifier le pouvoir bactéricide ou bactériostatique des produits mis sur le marché dont on ne sait s'ils ont été convenablement éprouvés par les fabricants. La méthode la plus simple pour stopper la croissance de ces bactéries ubiquistes est l'aération du milieu, car la présence de sulfates dans de l'eau contenant des traces de matières organiques se traduit toujours par une production de sulfures en anaérobiose. ■

6. — BIBLIOGRAPHIE.

- BERTIN A. (1980). — Rôle des thiobacilles dans la biolixiviation des sulfures. Thèse. Université de Rouen.
- BOUNDS H. C., COLMER A. R. (1972). — Comparison of the kinetics of thiosulfate oxidation by three iron oxidizers. *Can. J. Microbiol.* 18, 735-740.
- HEDRICK H. S. (1979). — Microbial corrosion of aluminium. *Materials Protection*, 7, 27-31.
- PFFENING N., BIEBL H. (1976). — *Arch. Microbiol.* 110, 3-12.
- POCHON J., TARDIEUX P. (1962). — Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Éd. de la Tourelle, Saint-Mandé.
- POSTGATE J. R. (1979). — The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press, London.
- SILVERMAN M. P., LUNGREN D. G. (1959). — Studies of the chemolithotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 77, 642-647.
- STARKEY R. L. (1925). — Concerning the carbon and nitrogen nutrition of *Thiobacillus thiooxidans* an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions. *J. Bacteriol.* 10, 165-195.

QUELQUES CAS DE CORROSION PAR DES THIOBACTÉRIES

L.P. MAZOIT

On trouvera ci-après un article extrait du "Bulletin de liaison du Groupe Cortambert" n° 11, février 1963 (bulletin interne de la Société Lyonnaise des Eaux).

Les deux cas relatés sont relativement anciens. Ils ont toutefois un mérite incontestable, celui d'avoir été étudiés en laboratoire.

A l'époque, on croyait, en raison de leur résistance que les bactéries sulfato-réductrices incriminées étaient sporulées, aussi parlait-on de *Sporovibrio desulfuricans*. Depuis, on s'est beaucoup intéressé à elles et on a donné le nom de *Desulfovibrio* à 7 ou 8 germes qui semblent englober tous ceux qu'on avait classé sous un seul nom. Aucun n'est sporulé. Mais, en l'absence de plus amples renseignements, il serait hasardeux d'affirmer qu'il s'agissait de *Desulfovibrio* plutôt que de *Desulfotomaculum*, bien que ce dernier - qui peut se reproduire dans des eaux froides - préfère généralement des eaux plus chaudes que celles en question.

Le même processus (sulfato-réducteurs, puis germes oxydant le soufre jusqu'au stade SO_4^{--} en milieu acide) a été observé au Moyen-Orient où un viaduc de chemin de fer aurait eu ses piles rongées. Bien entendu, la chose est relatée, sans qu'aucune étude sérieuse ne soit citée.

Autre cas où la corrosion par des thiobactéries a été mis en évidence.

MONTMORENCY - Val d'Oise - vers 1967

Un grand ensemble d'habitations a été construit depuis peu. Pour lutter contre la corrosion des canalisations, on a installé un dispositif de traitement (silicate à dissolution lente). Malgré cette précaution, de très nombreuses canalisations sont attaquées et, qui plus est, le dispositif anticorrosion n'échappe pas au mal.

Procédant à la recherche de la cause, de nombreuses analyses ont été effectuées et en particulier (bien que n'y croyant pas), nous recherchons les sulfato-réducteurs (*Desulfovibrio*) et nous en trouvons en grande quantité, ce qui paraît aberrant. En effet, Montmorency était (et est encore) alimenté en eau par l'usine de Méry-sur-Oise (Syndicat de la banlieue de Paris). Une des caractéristiques de cette eau est d'avoir subi un traitement à l'ozone tel qu'au départ de l'usine il reste dans l'eau au moins 0,4 mg/l d'ozone. On peut donc affirmer qu'il s'agit là d'une eau très oxygénée au départ et qui, sauf fait anormal, ne devrait pas être privée d'oxygène avant longtemps (les *Desulfovibrio* sont anaérobies stricts).

Force était de reconnaître que les sulfato-réducteurs vivaient et se reproduisaient dans cette eau et qu'elle était pratiquement privée d'oxygène. Une étude du réseau de distribution, suivie de prélèvements et analyses en des points judicieusement choisis montre que le phénomène était très circonscrit et ne s'éloignait que très peu d'une conduite un peu importante, venant d'Enghien-Les-Bains. Des recherches effectuées dans les archives de La Compagnie Générale des Eaux - régisseur du Syndicat - par M. BUSTARRET nous apprirent que cette conduite avait près d'un siècle d'existence et que, à son origine, elle distribuait à Montmorency de l'eau du lac d'Enghien. Le mystère était éclairci : les eaux sulfureuses d'Enghien doivent leur H₂S à une réduction des sulfates par des thiobactéries (renseignement confirmé par le docteur NINARD). La conduite incriminée (qui, curieusement, était en tôle et non en fonte) avait, pendant très longtemps, très peu servi et on peut admettre que les boues apportées par le pompage direct dans le lac avaient décanté, entraînant avec elles les thiobactéries qui avaient sagement attendu dans ce dépôt privé d'oxygène. Le développement de l'urbanisme avait, récemment, entraîné une mise en activité de cette conduite, en sens inverse (faits confirmés par M. BUSTARRET). Le dépôt et ses bactéries avaient été remis en suspension.

* * *

DEUX CAS DE CORROSIONS PAR LES BACTÉRIES DU SOUFRE

par Henri MESTAYER

Directeur du Laboratoire du Service des Eaux

Dans ses « Propos sur la Corrosion » (1) notre collègue et ami René Leroux a fait un exposé très complet et très intéressant sur la corrosion des métaux ferreux et leurs différentes causes : courants vagabonds, piles par aération différentielle, acidité ionique, action biochimique. Comme on le pense, le Laboratoire du Service des Eaux a eu à connaître, au cours d'une carrière déjà assez longue, de nombreuses « affaires » de corrosions; dernièrement, deux cas assez spectaculaires : l'un concernant des conduites en fonte, l'autre des enduits de ciment, mettant tous les deux en cause un processus biochimique dû aux bactéries du soufre, sont venus, sur un point particulier, illustrer l'article de René Leroux.

I. — UN CAS SIMPLE : nuisances constatées dans le réseau de distribution de Mennecy (Seine-et-Oise).

Au cours de l'été 1962, des plaintes d'abonnés pour odeur d'hydrogène sulfuré et eau rouillée ont attiré notre attention sur l'eau fournie à la ville de Mennecy par un nouveau forage, remplaçant un forage âgé d'une quarantaine d'années dont le débit était insuffisant.

Dès le début de notre enquête, un fait curieux a été observé : l'eau prélevée à la sortie du forage sur la conduite de refoulement ne contenait qu'une quantité minime de fer, inférieure à 0,25 mg/litre, et pas du tout d' H_2S ; par contre, l'eau de retour de la conduite de refoulement y ayant séjourné quelques heures, possédait une teneur en fer nettement accrue (1 mg/litre) et une très forte odeur d'hydrogène sulfuré : un travail localisé dans la conduite était donc à l'origine

des nuisances constatées. Or, d'après l'analyse, l'eau est en équilibre carbonique, elle n'est donc pas ioniquement agressive; d'autre part, une appréciable teneur en sulfate (80 mg/l. de SO_4^{--}) et l'absence d'oxygène dissous étant les conditions nécessaires et suffisantes au développement de bactéries réductrices des sulfates et productrices d'hydrogène sulfuré, nous avons recherché qualitativement ces organismes : la présence de *Sporovibrio** desulfuricans était en effet décelée par culture sur milieu de Starkey. Ainsi les *Sporovibrio* desulfuricans se développant au contact des canalisations en métal ferreux, produisent directement de l'hydrogène sulfuré par réduction du sulfate dissous dans l'eau et indirectement une attaque du fer par voie chimique grâce à leur action dépolarisante; le fer dissous à l'état de sel ferreux ne précipite qu'ultérieurement à l'état d'hydrate ferrique lorsque l'eau arrive au contact de l'oxygène de l'air soit dans un réservoir, soit chez l'abonné.

Ces bactéries étant très peu sensibles à l'action des stérilisants usuels, un seul remède pratique est possible : modifier le milieu privé d'oxygène par une aération convenable, soit par injection d'air sous pression, soit par ruisselage de l'eau sur des matériaux de contact.

II. — UN CAS PLUS COMPLEXE : la corrosion des enduits de ciment de l'usine d'épuration d'eau de Seine de la Compagnie des Eaux de la banlieue à Suresnes (Installation Degrémont de filtration rapide).

Nous pensons intéresser le lecteur en donnant ici intégralement le rapport de Gérard Devillers qui a étudié au Laboratoire le problème sous toutes ses faces, et après un travail long et minutieux, a abouti à des conclusions précises et indiscutables.

(1) Bulletin de Liaison d'octobre 1961.

* Pendant longtemps on a cru que cette bactérie était sporulée, en raison de sa grande résistance. Il n'en est rien et, maintenant, on parle de *Desulfovibrio desulfuricans*.

RAPPORT DE G. DEVILLERS

EXPOSÉ DES FAITS

L'installation Degrémont de l'usine d'épuration d'eau de Seine de la Compagnie des Eaux de la Banlieue de Paris a été mise en service en juin 1959.

Jusqu'en avril 1961, aucune corrosion ne s'était produite, comme il a été constaté à l'occasion de réparations de fissures des parois des filtres.

En août 1961, à la suite d'une période où l'encrassement des pulsators et la compacité du lit de boue avaient provoqué de sérieuses difficultés d'exploitation, le nettoyage des pulsators a révélé l'attaque des enduits en ciment. La même constatation a été faite en septembre et octobre 1961 dans les réservoirs de contact : les enduits étaient corrodés superficiellement et d'abondants résidus de l'attaque étaient recueillis sur les radiers.

Cependant, les enduits des ouvrages de l'installation Chabal, recevant la même eau, en service depuis plus de cinquante ans, étaient absolument intacts.

Dès ce moment, des enduits de protection étaient expérimentés et la recherche de la cause de ce phénomène était entreprise par le laboratoire de la S.L.E.E. C'est le résultat de ces recherches qui est exposé ici.

ÉTUDE DES CAUSES DE LA CORROSION

Les causes possibles de corrosion du ciment ont été passées en revue, sachant que :

1°) Le ciment corrodé est constitué par du ciment Portland artificiel, mis en œuvre selon les règles de l'art.

2°) L'eau en contact avec les enduits de ciment est de l'eau de Seine traitée par préchloration-coagulation au sulfate d'alumine et Nalcolyte 110 en présence de charbon actif, décantation, filtration et stérilisation au peroxyde de chlore. Ses caractéristiques physiques, chimiques et biologiques sont bien connues et contrôlées régulièrement.

Les causes classiques de corrosion du ciment sont :

1°) Action des sulfates :

Les eaux riches en sulfates désagrègent les ciments et bétons par formation d'un sulfo-aluminate

tricalcique (sel de Candlot) d'un grand pouvoir expansif.

Or, l'eau de Seine, moyennement minéralisée est pauvre en sulfates : 20 à 25 mg/l. de SO_4 . Cette teneur augmente de 10 mg/l. pour un traitement de 25 g/m³ de sulfate d'alumine.

La teneur en sulfates reste donc très faible en comparaison des eaux dites séléniteuses contenant plusieurs grammes par litre de sulfate de calcium.

Il en est naturellement de même des autres sels capables de réagir avec les ciments, tels que les chlorures.

2°) Agressivité carbonique :

Le pH de l'eau aux différents stades de traitement a été surveillé par de nombreuses mesures électrométriques, pendant une période correspondant à diverses qualités d'eau brute et à divers taux de traitement.

On peut supposer en effet que le traitement au sulfate d'alumine libérant par hydrolyse des ions SO_4^{--} , le pH risque d'être abaissé à un niveau où l'eau deviendrait agressive : par exemple, un traitement à 30 g/m³ de sulfate d'alumine doit théoriquement abaisser le pH de l'eau de Seine d'environ 0,6 (calcul effectué d'après le graphique d'Hallopeau).

L'abaissement du pH dû à l'action du chlore introduit en préchloration doit être négligeable.

On a obtenu expérimentalement les résultats suivants :

en hiver : eau brute pH moyen	8,20
eau décantée et filtrée	7,80
pH _s à 5°C	7,70
en été : eau brute pH moyen	7,80
eau décantée et filtrée	7,40
pH _s à 20°C	7,40

Les variations autour de ces chiffres sont de faible amplitude, ce qui exclut l'éventualité de déversements industriels acides capables de rendre l'eau agressive temporairement.

On voit donc que, dans tous les cas, l'eau reste à tendance légèrement incrustante; la notion de pH de saturation (pH_s) étant applicable au ciment Portland, on peut conclure que l'agressivité carbonique de l'eau ne saurait être en cause.

On peut remarquer que l'abaissement du pH dû au traitement au sulfate d'alumine variant de 30 à

Un certain nombre de prélèvements ont été choisis :

- a) Eau de Seine brute.
- b) Installation Chabal : boues de lavage des préfiltres.
- c) Installation Degrémont : boue du pulsator.
- d) Installation Degrémont : boue de lavages des filtres.
- e) Installation Degrémont : dépôt recueilli sur les parois de la vasque d'eau filtrée.

Ces prélèvements ont servi à ensemercer les milieux de recherche des germes spécifiques indiqués plus haut :

Sporovibrio Desulfuricans
Thiobacillus Thioparus
Thiobacillus Thiooxydans.

La comparaison du nombre des germes a été effectuée par la méthode des dilutions : chaque ensemencement étant effectué à raison de 1 cc. de boue pour 50 ml de milieu

une dilution au $1/10^e$

une dilution au $1/100^e$

et en observant pour chaque taux de dilution le délai de développement de la culture microbienne (de quelques jours à plusieurs semaines).

En outre, les prélèvements effectués sur l'installation Degrémont ont été répétés dans deux circonstances différentes :

a) Fonctionnement normal de la préchloration conduisant à un taux de chlore résiduel dans l'eau décantée (prélèvements du 25 mai 1962).

b) En période où l'encrassement des pulsators augmente l'absorption du chlore et empêche l'efficacité de la préchloration — il n'y a alors plus de chlore résiduel dans l'eau décantée (prélèvements du 15 mai 1962).

Ceci afin de déterminer la résistance aux agents stérilisants des germes étudiés.

Pour ne pas entrer dans le détail de laborieuses recherches bactériologiques, les résultats d'ensemble peuvent être résumés ainsi :

1°) Présence dans l'eau de Seine brute de tous les germes recherchés à un taux faible, mais régulier.

2°) Les différents prélèvements effectués sur l'installation Degrémont révèlent, par rapport à l'installation Chabal des quantités très différentes de germes réducteurs de sulfates et oxydants du soufre, surtout quand les prélèvements sont effectués en cas de carence de la préchloration : les milieux de culture donnent des réactions positives en quelques jours à toutes les dilutions effectuées.

3°) La présence de chlore libre dans les pulsators réduit particulièrement le nombre et l'activité de *Thiobacillus Thiooxydans*.

On peut donc admettre que les bactéries étudiées trouvent dans l'installation Degrémont des conditions particulièrement favorables à leur prolifération :

Le lit de boue des pulsators devenant extrêmement compact à certaines périodes, ainsi que les dépôts muqueux qui ont été observés sur les parois d'ouvrages (réservoirs de contact) formés soit par développement « in situ » soit par suite de défauts de filtration, sont susceptibles de former un milieu réducteur favorable à la prolifération de *Sporovibrio Desulfuricans*, réputé anaérobie et qui y trouve la matière organique nécessaire à sa croissance hétérotrophe. Ce germe est en outre considéré comme fort résistant aux antiseptiques usuels, ce qui explique la faible influence du chlore sur son activité. Les sulfates réduits sont soit empruntés à l'eau, soit peut-être au ciment lui-même qui en contient une quantité notable.

Une phase d'aérobiose permet ensuite le deuxième temps de la réaction par intervention de *Thiobacillus Thiooxydans* soit à la faveur d'une carence de la préchloration soit grâce à la protection réalisée par un dépôt organique; en effet sa sensibilité aux agents stérilisants le rend plus vulnérable que *Sporovibrio Desulfuricans* et son activité dépend notamment de l'efficacité de la préchloration.

Nous devons signaler avec gratitude que ces recherches nous ont été facilitées par le Professeur J. Pochon, chef du Service de microbiologie du sol de l'Institut Pasteur qui nous a apporté une aide précieuse par ses conseils, notamment en matière de technique microbiologique des bactéries du soufre.

Recherche bibliographique faite, un cas semblable de corrosion bactérienne du ciment ne semble pas avoir déjà été observé, du moins dans le cas d'une installation d'eau potable.

Les bactéries du soufre sont cependant bien connues pour être responsables de nombreux phénomènes biochimiques d'une grande importance dans la nature : Au point de vue corrosion des matériaux, *Sporovibrio Desulfuricans* est responsable de nombreux cas d'attaque de métaux ferreux en jouant un rôle de dépolarisant.

Thiobacillus Desulfuricans a déjà été reconnu responsable de cas de corrosion de ciments et bétons dans un milieu contenant déjà des dérivés du soufre tels que l'hydrogène sulfuré : eaux d'égout, eaux de mines de charbon, tours de refroidissement de gaz contenant de l'hydrogène sulfuré... etc.

L'association *Thiobacillus Thiooxydans* et *Spo-*

40 g/m³ est de l'ordre de 0,3 à 0,4, donc nettement inférieur à la théorie. Ce fait est probablement dû à l'effet du charbon actif qui a la propriété de favoriser le dégazage du CO₂ libre en excès, ce qui rétablit l'équilibre carbonique.

3°) *Lixiviation du ciment par hydrolyse des silicates et des aluminates et dissolution de la chaux.*

Cette réaction se produit quand le ciment est en contact avec de l'eau très douce : or l'eau de Seine possède un titre hydrotimétrique sensiblement constant et voisin de 25 degrés, ce qui exclut toute possibilité d'attaque par cette réaction. Au contraire, les bicarbonates de l'eau ont tendance à réagir avec la chaux libre du ciment, en formant du carbonate de calcium insoluble, ce qui augmente sa compacité (en cas de fissuration par exemple).

L'attaque par cause physique ou chimique semblant donc exclue, il fallait rechercher une origine bactérienne aux corrosions constatées.

1°) *Possibilité d'action des bactéries nitrifiantes.*

L'eau de Seine brute contient de l'ammoniaque (de 0,20 à 4 mg/l. de NH₄) et l'eau traitée (Chabal et Degrémont) des teneurs notablement moindres. Les parois des ouvrages de l'usine Degrémont étant recouvertes de dépôts muqueux, on pouvait envisager que ces dépôts étaient formés de bactéries nitrifiantes; or, les réactions de nitrification consistant dans la transformation d'un cation (ammonium) en un anion (nitrique), on pouvait supposer une acidification locale du milieu.

Des échantillons de dépôts recueillis sur les parois en ciment ont donc été soumis à la détermination du pouvoir nitrifiant par ensemencement d'un milieu liquide spécifique.

On n'a pu mettre en évidence ni activité nitrifiante, ni activité nitratante.

Ce fait peut s'expliquer par la présence de l'agent stérilisant : le peroxyde de chlore auquel les bactéries nitrifiantes sont particulièrement sensibles.

Donc, si l'intervention de bactéries nitrifiantes peut parfaitement être envisagée dans le traitement Chabal, au cours de la filtration lente, par contre, l'oxydation de l'ammoniaque dans le traitement Degrémont doit plutôt être expliquée par l'action du chlore introduit en préchloration et réalisant, plus ou moins complètement une réaction de « Break-Point ».

2°) *La dernière hypothèse envisagée était celle de l'intervention des bactéries du soufre ou thiobactéries : c'est celle-ci qui devait se révéler fructueuse en dépit du milieu pauvre*

en sulfates et apparemment peu propice au développement de cette catégorie de bactéries.

Le premier indice qui pouvait faire supposer l'intervention des thiobactéries est la présence de sulfures.

1°) Dans les dépôts organiques recueillis sur les parois des ouvrages de l'usine Degrémont.

2°) Dans le résidu de l'attaque des enduits en ciment, recueillis dans les réservoirs.

On a vérifié évidemment que ces sulfures, mis en évidence par un dégagement d'hydrogène sulfuré au cours d'un traitement acide n'existent pas dans le ciment Portland et les bétons.

On a alors pratiqué la recherche systématique des micro-organismes spécifiques :

1°) Du groupe des réducteurs de sulfates, du type *Sporovibrio Desulfuricans* — organisme anaérobie, autotrophe facultatif réduisant les sulfates à l'état d'hydrogène sulfuré — facile à mettre en évidence par la méthode de Starkey.

2°) Du groupe des oxydants du soufre et de ses dérivés : du type *Thiobacillus Thioparus*, aérobie, autotrophe strict, oxyde le soufre en sulfate — et surtout : *Thiobacillus Thiooxydans*, autotrophe et aérobie, oxyde le soufre en produisant de l'acide sulfurique jusqu'à une acidité qui peut atteindre un pH de 0 à 1.

On peut donc logiquement envisager une cause d'agressivité par formation locale d'un milieu acide au contact des enduits en ciment grâce à un cycle biologique au cours duquel les sulfates seraient réduits en hydrogène sulfuré qui serait ensuite oxydé à l'état d'acide sulfurique libre.

Les premières recherches qualitatives ont montré tout d'abord la présence généralisée des germes mentionnés plus haut, pratiquement en tous points de l'installation Degrémont, ainsi que dans l'installation Chabal; en effet, ces germes sont présents dans l'eau de Seine, milieu biologique extrêmement riche et complexe et on peut donc les retrouver logiquement à tous les stades du traitement.

La présence seule de thiobactéries ne permet donc pas de conclure qu'elles interviennent dans un processus de corrosion.

Il s'agit donc de déterminer, par une estimation quantitative du nombre de ces germes ou de leur activité biochimique, si des conditions favorables ne seraient pas susceptibles de provoquer leur développement intensif, notamment dans les ouvrages de l'installation Degrémont.

rovibrio *Desulfuricans* a également été impliquée dans des cas de corrosion tels que : corrosion dans le sol à la faveur de successions de phases aérobies et anaérobies — corrosion de monuments en pierre par ascension capillaire de sulfures formés dans le sol (d'après J. Pochon et ses collaborateurs).

Le processus biologique ainsi mis en évidence a été réalisé artificiellement en laboratoire, sans prétendre à une preuve scientifique, mais pour illustrer le mécanisme de la réaction : en supposant déjà réalisée la première réaction biochimique (c'est-à-dire la réduction des sulfates) deux éprouvettes de mortier de ciment Portland artificiel ont été immergées dans deux échantillons du milieu de culture sélectif de *Thiobacillus Thiooxydans*, l'un ayant été maintenu stérile, l'autre ensemencé avec une culture ayant déjà fourni une réaction positive — le tout maintenu à l'étuve à 30°C. afin d'activer le développement bactérien.

On observe la variation du pH dans les deux cas : le pH à l'origine est 6,10.

Dans le premier milieu, le pH remonte à 7,5 à cause de la basicité du ciment.

Dans le deuxième, on observe au bout de quelques jours une diminution du pH grâce au développement bactérien, jusqu'à 5,0 environ où le pH reste fixe pendant plusieurs semaines à cause de l'effet tampon de l'éprouvette de ciment. Puis, le pH recommence à diminuer, probablement une fois réalisée la neutralisation de la chaux libre : le ciment commence alors à se désagréger.

REMÈDES

La connaissance des conditions favorables au développement des germes bactériens ainsi mis en évidence peut permettre d'éviter leur action néfaste.

Sporovibrio Desulfuricans est, on le sait, peu sensible aux antiseptiques usuels; on lui connaît des inhibiteurs tels que les selenates et les chromates, mais dont la toxicité en interdit l'emploi dans le domaine de l'alimentation humaine. Par contre, il exige pour son développement des conditions d'anaérobiose; donc, le nettoyage régulier des parois d'ouvrages doit permettre d'éviter sa prolifération; les pulsators resteront cependant une source abondante de ce germe : on le retrouve abondant même après un nettoyage (le 25 mai 1962), probablement par un effet de concentration par le sulfate d'alumine à partir des germes de l'eau brute. On peut remarquer que l'aération de l'eau décantée pratiquée quand le taux d'oxygène dissous devient insuffisant a l'avantage de créer des conditions défavorables à *Sporovibrio Desulfuricans*.

Thiobacillus Thiooxydans est plus vulnérable et, comme il suffit de supprimer un élément du cycle

biologique indésirable, on a vu que la présence constante d'un élément antiseptique doit permettre d'éviter sa prolifération; autrement dit, le processus biologique mis en évidence doit être supprimé par une préchloration régulière assurant un taux de chlore résiduel convenable dans l'eau décantée.

De fait, depuis les premières observations de l'attaque des enduits, le nettoyage des parois des installations et des pulsators a été assuré régulièrement et la préchloration a été pratiquement assurée sans défaillance : la visite du réservoir de contact de l'installation effectuée le 30 juillet 1962 a permis de constater que l'attaque des parois ne s'était pas poursuivie depuis les précédentes observations.

RÉSUMÉ

1°) Il semble qu'aucune cause physique ou chimique ne permette d'expliquer la corrosion des enduits de ciment des ouvrages de l'installation Degremont constatée en août 1961.

2°) Cette corrosion peut être attribuée à un cycle biologique où *Sporovibrio Desulfuricans* réduit les sulfates à l'état de sulfure et *Thiobacillus Thiooxydans* oxyde ces sulfures à l'état d'acide sulfurique libre produit localement au contact des parois des ouvrages sans que le pH de l'eau qui y circule soit modifié.

3°) Cette association biologique est favorisée par la succession d'un milieu anaérobie créé par le lit de boue des pulsators et les dépôts organiques qui recouvrent certaines parois d'ouvrages — et d'un milieu aérobie, l'eau traitée étant normalement chargée d'oxygène dissous à un taux qui varie de 20 à 100 % de saturation.

4°) Ce phénomène de corrosion n'a pu se produire qu'à l'occasion d'une insuffisance de la préchloration ou de la postchloration causée par la présence excessive de matières organiques, tant dans l'eau elle-même que sous forme de dépôts enduisant les parois des ouvrages.

5°) La corrosion doit être évitée :

a) Par le nettoyage périodique suffisamment fréquent des pulsators et des parois des ouvrages.

b) Par le maintien permanent d'une quantité de chlore résiduel tout au cours du traitement.

Ainsi les processus biologiques mis en évidence par Gérard Devillers sont classiques; ils font partie du cycle du soufre et ont été étudiés par les agronomes (travail des bactéries dans le sol), par les techniciens

des eaux usées et plus récemment par les spécialistes des corrosions (altération des pierres de certains monuments et désagrégation de bétons d'ouvrage d'art dans des terrains marécageux). Mais un des grands mérites de ce travail est de montrer, ce qui n'avait jamais été fait auparavant, qu'un milieu comme une eau d'alimentation, contenant très peu d'ion SO_4^{--} était cependant capable de provoquer des corrosions importantes et relativement rapides sur de larges surfaces, les conditions locales d'anaérobiose étant par ailleurs bien réalisées.

* * *

De ces études, nous pouvons dégager, particulièrement à l'usage des chefs d'exploitation et des constructeurs d'appareils de traitement d'eau, deux recommandations importantes :

1^o) Du fait du travail microbien, le sol constitue très généralement un milieu réducteur; aussi, à la sortie d'un forage, l'eau est-elle fréquemment très pauvre en oxygène, souvent même, elle en est complète-

ment privée; en conséquence, il est toujours très intéressant et souvent nécessaire de l'aérer; on évite ainsi de nombreux ennuis : non seulement les corrosions quelquefois sournoises, mais aussi les mauvais goûts, les eaux troublées soit par de l'hydrate ferrique, soit par des zooglyphes ou des algues, toutes choses dues aux proliférations d'organismes anaérobies qui ne manqueront jamais de s'établir au bout d'un temps plus ou moins long d'exploitation.

2^o) Que ce soit dans des conduites, des réservoirs ou des appareils de traitement, il est nécessaire d'éviter les zones de stagnation relative qui peuvent devenir des lieux de sédimentation presque toujours inaccessibles, d'un nettoyage difficile, quelquefois impossible, comme les dessous de fond de filtre, certaines parties de décanteur, certaines portions de conduites non maillées etc.; en effet, lorsque les zooglyphes ou les sédiments sont suffisamment épais et compacts, la partie profonde qui n'est plus directement en contact avec l'eau aérée sera immanquablement le siège de proliférations locales de bactéries anaérobies.

En résumé, si l'on tient à la bonne conservation des ouvrages et à la qualité des eaux distribuées, un mot d'ordre : l'anaérobiose, voilà l'ennemi!

f

LES BACTÉRIES DU FER - CORROSION

* * *

P. KAISER

Chef du Laboratoire à l'Institut Pasteur

LES BACTERIES DU FER

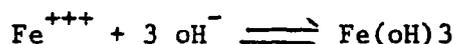
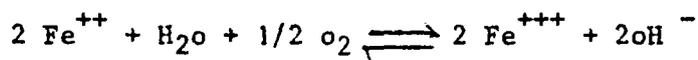
Dans la nature, le fer et le manganèse se trouvent soit sous forme organique complexée, soit sous forme minérale, oxydée (insoluble) ou réduite (soluble).

Le fer et le manganèse peuvent passer d'une forme à l'autre sous l'influence de facteurs physico-chimiques et de facteurs biologiques.

Considérations physico-chimiques

Stabilité du fer ferreux en solution

Le fer ferreux est stable en solution au dessous de pH 5 en présence d'oxygène. Au dessus de pH 5 le fer ferreux s'oxyde spontanément en fer ferrique en présence d'oxygène. Mais, dans une solution de pH neutre riche en CO_2 et pauvre en oxygène le fer ferreux reste stable sous forme d'hydrocarbonate ferreux. Dans les sources d'eau ferrugineuses riches en gaz carbonique ce dernier dissout le carbonate ferreux (FeCO_3) pour donner l'hydrocarbonate (ou bicarbonate) ferreux $\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2$. Tant que la concentration en oxygène est faible ce produit reste stable. Dès que la concentration augmente, il y a précipitation d'hydroxyde ferrique :



Stabilité du manganèse réduit en solution

Le manganèse réduit est stable en solution oxygénée au dessous de pH 7,5. Au dessus de ce pH, en présence d'acides hydrocarboxyliques se produit une oxydation non biologique lente. Au dessus de pH 9, une oxydation non biologique rapide a lieu.

L'oxydation biologique du fer ferreux

De nombreuses bactéries sont impliquées dans l'oxydation biologique du fer ferreux. Elles ont une morphologie et une physiologie très variées ; aussi, les classe-t-on dans des groupes très différents. Nous les trouverons classées dans les

parties suivantes du manuel de systématique bactérienne de Bergey :

Partie 2 : bactéries glissantes.

Genre avec affiliation incertaine : Toxothrix
cellules cylindriques filamenteuses en forme de U.

Partie 3 : bactéries engainées

Genre Leptothrix, bâtonnets en chaînettes entourés d'une gaine mucilagineuse imprégnée d'hydroxyde ferrique.

Genre Lieskella : bâtonnets en chaînettes ; deux chaînettes s'enroulent en spirale, la double spirale est entourée d'une gaine jaune parfois fortement chargée en hydroxyde ferrique, mouvement similaire à celui des cyanophycées.

Genre Crenothrix cellules rondes ou cylindriques formant de larges filaments (jusqu'à 1 cm) entourés d'une gaine très fine le tout attaché à un substrat solide. La base de la gaine peut être incrustée d'hydroxyde ferrique et est parfois renflée.

Genre Clonothrix, bâtonnets en chaînettes formant de longs filaments engainés, incrustés d'hydroxyde ferrique et branchés.

Partie 4 : bactéries bourgeonnantes ou pédonculées.

Genre Gallionella, petites cellules en chaînettes implantées sur de longs filaments torsadés imprégnés d'hydroxyde ferrique.

Genre avec affiliation incertaine : Metallogenium, cellules coccoïdes implantées sur des filaments groupés en rosette.

Partie 12 : bactéries chimiolithotrophes gram-négatives.

Genre Thiobacillus avec Thiobacillus ferroxidans, bâtonnets mobiles.

Famille des Siderocapsaceae, cellules entourées d'une capsule imprégnée d'hydroxyde ferrique.

Genres : Siderocapsa
Naumaniella
Ochrobium
Siderococcus

Genres avec insertion incertaine :

Ferribacterium, Siderobacter, Sideromonas,
Sideronema Siderosphaera

Description détaillée :

Genre Toxothrix, Molisch 1925.

Il s'agit de cellules cylindriques filamenteuses de 0,5 à 6 μm de large sur 400 μm de long, souvent en forme de U, glissant avec un mouvement lent en excréant du mucus. De l'oxyde de fer peut se déposer sur le mucus et le colorer en brun rouge. Bactérie non cultivée en culture pure, psychrophile, attachée à des surfaces ; se développe à des tensions d'oxygène réduite, pH neutre. Largement distribué dans les eaux ferrugineuses, le fer ne semble toutefois pas nécessaire pour sa croissance. Une seule espèce a été décrite : *Toxothrix trichogenes* (Cholodny).

Genre Leptothrix

Découvert dès 1843 par Kützing. Dans la nature, ces bactéries et de nombreuses bactéries du fer forment dans les eaux des dépôts importants d'hydroxyde ferrique de couleur ocre ; c'est la raison pour laquelle les biologistes les ont très tôt découvertes et décrites.

Ecologie : Ces bactéries se développent massivement dans les eaux non polluées avec un faible courant et, parfois, à la limite des eaux oxygénées et non oxygénées des lacs. Charlet et Schwartz, 1953, ont analysé les eaux où elles se multiplient : elles sont riches en CO_2 et contiennent relativement peu d'oxygène et de fer : 1,6 mg Fe (II)/litre, il n'y a pas de croissance au dessus de 12 mg Fe II/litre. Le pH des eaux est neutre ou voisin de la neutralité. Jones en 1975 les a comptées dans l'hypolimnion d'un lac. Les bactéries se multiplient de fin juin à début juillet : leur nombre passe de 5/ml en mai-juin à 10^2 et 10^3 /ml à la mi-juillet, puis reste stable pendant les mois d'août, septembre et octobre. Ce nombre est inversement proportionnel à la concentration en oxygène, mais il est souvent impossible d'expliquer de larges proportions de variance du nombre de *Leptothrix* par rapport au fer et à l'oxygène.

Morphologie : Il s'agit de bâtonnets en chaînettes qui s'entourent d'une gaine mucilagineuse imprégnée d'hydroxyde ferrique. Les bâtonnets quittent la gaine en glissant et forment aussitôt une

nouvelle gaine ou nagent librement grâce à un ou plusieurs cils polaires ou parapolaires. La plupart des espèces constituent une masse importante de gaines vides d'où les dépôts massifs ocreux gélatineux dans les eaux ferrugineuses ou les conduites d'eau.

Taxonomie : Van Veen, Mulder et Deinema, 1978 ont distingué 5 espèces dont 5 cultivées en culture pure :

Leptothrix lopholea : les gaines peuvent être attachées entre elles et former une rosette, les cellules nagent grâce à une touffe de cils subpolaire.

Leptothrix ochracea : espèce la plus répandue, forme une masse importante de gaines vides contenant très peu de cellules. Le dépôt d'hydroxyde ferrique s'effectue après que les cellules ont quitté leur gaine.

Leptothrix pseudo-ochracea : voisine de la précédente, mais les cellules ont moins tendance à quitter leur gaine, cellules mobiles avec 1 cil polaire.

Leptothrix cholodnii : gaines plus épaisses, incrustées irrégulièrement d'hydroxyde ferrique, se trouve également dans les eaux polluées.

Leptothrix discophora : cellules plus petites, gaines très épaisses brun-foncé augmentant 10 à 25 fois le diamètre des gaines nues. Le pourcentage guanine-cytosine (GC%) est voisin de 70 pour toutes les espèces.

Nutrition : Quelques microbiologistes ont réussi la culture pure des espèces ci-dessus au laboratoire. Präve, 1957, isole *L. ochracea* sur un milieu à base de glucose, d'asparagine et de fer, à pH 6, où le fer ferreux est encore relativement stable en présence d'oxygène. La bactérie croît seulement en milieu liquide mais nécessite de petites quantités de gélose. Le fer réduit est indispensable pour la croissance ; cependant, la bactérie ne tolère que de faibles concentrations de sels ferreux : l'optimum est de 10 mg/l ; il n'y a pas de croissance au-dessous de 2 mg/l. Le fer est oxydé pendant la croissance. En plus du fer, la bactérie a besoin de substances organiques à faible concentration, par exemple le glucose et l'asparagine : environ 0,2 g/l de chaque produit. Il s'agit donc d'un mode de vie mixotrophe. La température optimum de multiplication se situe entre 13 et 20°. Van Veen et Mulder ont réussi à isoler les espèces décrites ci-dessus sur des milieux organiques, après un enrichissement en

fontaine artificielle sur un liquide à base d'extrait de terre et de fer réduit. Les bactéries utilisent de nombreux sucres et acides organiques comme source de carbone et comme source d'azote, des acides aminés ou des sels azotés minéraux. En l'absence de méthionine, la vitamine B12 est indispensable pour la croissance durant laquelle les cellules accumulent des granules d'acides poly-B-hydroxybutyrique. Ces espèces, excepté *L. Cholodnii*, nécessitent de petites quantités de matière organique et répondent peu à l'accroissement de la quantité de matière organique. Les 5 espèces oxydent le manganèse réduit et de petites doses de ce corps stimulent la croissance. Le fer réduit ne semble pas indispensable au développement des 5 espèces. De ce fait, les auteurs nient l'oxydation du fer réduit par ces bactéries qui ne seraient donc pas capables de tirer de l'énergie de l'oxydation du fer réduit ; mais ils reconnaissent que les gaines sont étroitement associées avec l'accumulation du fer et de l'oxydation du manganèse réduit. Comment expliquer l'imprégnation des gaines par l'hydroxyde ferrique. Winogradsky a clairement prouvé que les gaines s'imprègnent d'hydroxyde ferrique uniquement dans une solution de sel ferreux et non dans une solution où l'hydroxyde ferrique est déjà précipité. Pour Van Veen et Mulder, les cellules engainées plongées dans une solution de chlorure ferrique de 4 mM/l précipitent 10 à 100 fois plus de fer que les cellules mutantes sans gaines. Les bactéries utiliseraient des chélates de fer comme le citrate, le quinate ou l'humate de fer. En utilisant la partie organique du chélate, le fer serait libéré et s'oxyderait alors spontanément. La nature chimolithotrophe et l'oxydation du fer ferreux par les *Leptothrix* restent donc encore à démontrer.

Genre Gallionella

Gallionella ferruginea a été découvert dès 1836 par Ehrenberg car cet organisme forme aussi des masses ocreuses dans les cours d'eau. On trouve cette bactérie souvent en même temps que les *Leptothrix*.

Ecologie : Comme les *Leptothrix*, c'est une bactérie aquatique qui se multiplie dans les eaux non polluées, ferrugineuses, avec peu d'oxygène et beaucoup de gaz carbonique. Hanert donne la composition suivante d'une eau souterraine où se développent massivement les *Galionella* : température 12,6 °C.

Ph	7,5	Co ₂ libre total	17 mg/l
Fe	1,3 mg/l	Co ₂ lié total	9 "
Mn	0,2 "		
Cl	40 "	Co ₂ lié	73 "
No ₂	3 "	Co ₂ lié à Ca ⁺⁺	5 "
No ₃	- "	O ₂	3 "
NH ₄	5 "	utilisation du KMnO ₄	5 mg/l

On remarquera la température basse de l'eau. Selon Lieske, les Gallionella sont surtout abondantes dans la saison froide, juste après la fonte des neiges :

température	croissance
0-0,5°C	bonne
6°	excellente
15°	bonne
22°	faible
27-32°	pas de croissance

Taxonomie : Plusieurs espèces ont été décrites sur des bases morphologiques.

Morphologie : Sous le microscope optique, on voit des filaments spirales, enroulés en double hélice, de couleur ocre mais jamais de cellules. Sous le microscope électronique, les filaments apparaissent composés de fines fibrilles. Sur ces fibrilles sont fixés des micro-cellules en chaînettes ; chaque cellule en forme de bâtonnet a un diamètre de 0,1 µ de large (Hanert). (Les grosses cellules observées parfois fixées sur les filaments provenant de cultures impures, sont en réalité des cellules de Pseudomonas qui vivent souvent en association avec les Gallionella.)

Nutrition : La culture pure de cet organisme a été réussie par Wolfe et par Hanert (1968) sur un milieu minéral liquide contenant du sulfure de fer (pH 6-6,4 ; température 18°). L'oxygène est le facteur déterminant pour la croissance ; elle est stimulée par de faibles concentrations d'oxygène (0,1 - 0,2 mg O₂/l) mais inhibée par des teneurs plus élevées (au dessus de 2,75 mg O₂/l). La culture réussit le mieux si le milieu liquide est insufflé avec un mélange gazeux contenant 1 % d'O₂, 5 % de Co₂ et 94 % d'N₂. Lorsque l'oxygène est abondant, il y a sans

doute concurrence entre l'autooxydation du fer et l'oxydation par Gallionella. Dans ce milieu liquide, les Gallionella se développent sous forme de microcolonies, d'abord blanches puis jaunes. Chaque microcolonie renferme entre 60.000 et 80.000 microcellules. Hanert a démontré que les colonies incorporaient le Co₂ radioactif :

Radioactivité
Impulsions /minute x 10²

effet de base		témoin	Nombre de colonies (Ø 0,6-0,8 mm)			
		(50-100 colonies tuées)	1	2	10	50-10
1ère expérience	30	34	40	49	95	568
2ème expérience	35	35	35	38	49	161

L'incorporation du gaz carbonique et la croissance sur un milieu minéral à base de fer réduit prouvent la nature chimolithotrophe de cet organisme. Pour Hanert, l'addition d'extrait de levure ou de vitamines n'a aucune influence sur la croissance mais les Gallionella se multiplient beaucoup mieux en association avec un Pseudomonas, ce dernier utiliserait l'oxygène en excès permettant ainsi une meilleure croissance de la bactérie du fer. Van Veen et Mulder ont réalisé des enrichissements de cette bactérie avec des solutions nutritives à base de sels minéraux, d'azote ammoniacal, de fer ferreux et de bicarbonate de soude, le tout incubé à 15° sous atmosphère d'azote avec des traces d'oxygène. Dans ces conditions les Gallionella se multiplient modérément. Avec de l'extrait de terre, les auteurs améliorent beaucoup la croissance.

Genre et espèce incertae sedis

Siderophacus corneolus

Genre Metallogenium

Bactéries découvertes par Perfilev et Gabe en 1961.

Morphologie : Ce sont des cellules coccoïdes de 0,5 à 1,5 μm sans parois rigides, attachées à des surfaces. Elles germent et donnent lieu à des filaments flexibles à pointe effilée, s'arrangeant en forme de rosette ; des cocci peuvent apparaître au bout des filaments qui s'imprègnent d'hydroxyde de fer et de manganèse et deviennent brun foncés.

Ecologie : On trouve ces espèces à la surface des vases des eaux douces, dans le plancton d'eaux douces et dans certains sols.

Taxonomie : La position de ces bactéries est incertaine. Comme les cellules bourgeonnent et émettent des filaments, elles ont été placées avec les bactéries bourgeonnantes à appendice mais l'absence d'une paroi rigide les situe plutôt à côté des mycoplasmatales : deux espèces dont l'une vit en symbiose avec les champignons.

Nutrition : Cultivées uniquement sur des milieux organiques, les bactéries ont une croissance lente mais activée en présence de champignons. Celle-ci se remarque après 4-6 semaines, dans un milieu à base de citrate de fer et d'ammonium à pH 6-7,8 et non sur extrait de viande ; le manganèse n'est pas nécessaire ; par contre le carbonate de manganèse et un taux d'oxygène bas stimulent la croissance. Les bactéries ont été cultivées en culture pure dans des milieux contenant du sérum. Chez *Metallogenium symbiotium*, l'oxydation de sels de manganèse réduit est proportionnelle à la croissance.

Genre Thiobacillus

Thiobacillus ferrooxidans

Dès 1945, trois microbiologistes (Colmer, Hinckle, Temple) isolaient dans les eaux acides, chargées d'hydroxide ferrique, provenant des mines de charbon bitumineux aux USA, des bactéries en forme de bâtonnets, à morphologie banale, capables de se multiplier sur des milieux minéraux en tirant leur énergie de l'oxydation du fer ou du soufre réduit.

Ecologie : La bactérie existe dans les roches, les sols et les eaux acides chargés de sulfure métalliques ou de sels ferreux ; eaux acides de drainage des mines de lignite, d'antracite bitumineux, de pyrite, de sulfure de zinc, de cuivre, de plomb, ect. Ces eaux, issues de l'infiltration des eaux de pluie et de nappes souterraines, deviennent extrêmement acides par surcharge en acide

sulfurique. Ce dernier entraîne une corrosion du matériel de la mine et une pollution des fleuves. Avant même d'avoir découvert la bactérie, les ingénieurs pensaient que l'acide sulfurique et l'hydroxyde ferrique ne pouvaient provenir que de l'oxydation des sulfures métalliques souvent très abondants dans les mines de charbon. On sait maintenant que le phénomène est dû à la bactérie. Celle-ci se multiplie également dans les sols contenant de la pyrite ou de la marcasite.

Morphologie : Bâtonnet court de 0,5 μ de large sur 1 μ de long, isolé ou par deux, gram négatif, mobile par cils polaires, parfois immobile.

Taxonomie : La bactérie est classée dans le genre Thiobacillus puisqu'il s'agit d'une bactérie chimiolithotrophe, capable de tirer son énergie de l'oxydation de composés soufrés minéraux réduits. Dans le genre Thiobacillus, l'espèce Thiobacillus ferrooxidans est la seule capable d'oxyder le fer réduit en plus du soufre réduit.

Nutrition : C'est une bactérie aérobie, mésophile, chimiolithotrophe, qui peut croître sur un milieu minéral et de tirer son énergie de l'oxydation du soufre ou du fer réduit. Le milieu doit être acide. L'oxydation du fer ferreux a lieu entre pH 2 et 3,5, celle du soufre entre Ph 4 et 5,5. La meilleure croissance se produit sur un mélange de soufre et de fer réduit. L'oxydation du fer nécessite les ions sulfate, le chlorure de fer n'est pas oxydé. Le milieu de Silverman et Lundgren (1959) renferme 9 g/l de fer ferreux sous forme de sulfate. L'efficience de l'oxydation est de 90 à 95 % de la valeur théorique mais la bactérie ne récupère que 20,5 % de l'énergie de cette oxydation pour l'incorporation du CO_2 . C'est pourquoi cette bactérie exige de grandes quantités de fer réduit pour la synthèse des cellules. L'obtention de 1g de cellule requiert l'oxydation de 200 g de fer réduit. Dans la nature, l'accumulation de grandes quantités de fer ferrique par cette bactérie a conduit à la formation géologique de gisements d'oxyde de fer à haute teneur métallique.

Mc Goran, D.W. Duncan et C.C Walden ont calculé le temps de génération de la bactérie pour divers substrats :

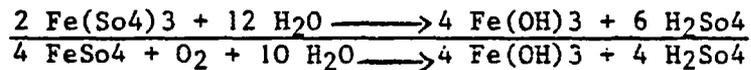
6,5 à 10 heures sur fer ferreux seul

7 à 8 jours sur le soufre

14 à 17 heures sur chalcopyrite.

Les temps de génération sont donc assez longs.

Une croissance rapide demande une aération suffisante de manière à obtenir une fourniture optimale d'oxygène et de gaz carbonique (source de carbone). Un parallélisme existe entre l'oxydation du fer et la croissance. Durant celle-ci, la couleur du milieu devient brun-jaune de plus en plus intense puis apparaît un précipité d'hydroxyde ferrique, le pH s'abaisse de 3 à 2,5. Les équations pour l'oxydation du fer ferreux sont les suivantes :



Malgré la forte acidité du milieu, le pH du cytoplasme se situe entre 4,8 et 5. L'enveloppe cellulaire protège donc le cytoplasme des conditions très acides du milieu. Les enzymes ont un pH optimum compris entre 5 et 9 sauf l'oxydase du fer, complexe comprenant des cytochromes situés dans la paroi, avec un optimum de 2,5 à 3,5. Lors de la croissance la cellule excrète de fortes proportions de lipides. Le système respiratoire oxydant le fer comprend plusieurs cytochromes qui permettent, en plus, d'accumuler l'énergie sous forme d'ATP.

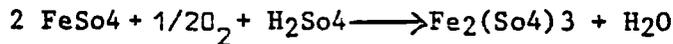
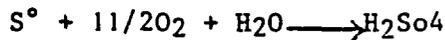
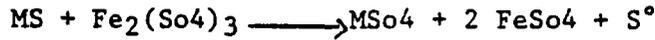
La bactérie a aussi la propriété d'oxyder les sulfures métalliques insolubles tels que pyrite, chalcopyrites etc... Selon l'équation globale :



Pour cette solubilisation et l'oxydation qui suit, la bactérie se fixe solidement sur le substrat. Au microscope électronique, on constate que la solubilisation s'effectue juste autour de la cellule. Cette propriété a été utilisée pour récupérer des métaux à partir de minerais pauvres, ne pouvant plus être exploités par la méthode chimique. Le minerai avec de 0,1 à 0,4 % de métal est disposé en énormes tas tronconiques arrosés par une solution percolante contenant un peu d'azote et de sels minéraux, c'est la technique de lixiviation microbienne. La solution percolante est récoltée en bas du tas, elle possède de 1 à 3 g de métal par litre, sous forme de sulfate. Le métal est récupéré soit par des solvants soit en faisant passer la solution sulfatée sur de la ferraille :

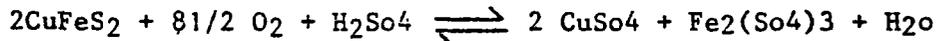


La solution percolée est ensuite réappliquée sur le sommet du tas. La présence d'ions ferriques accélère le processus d'oxydation :



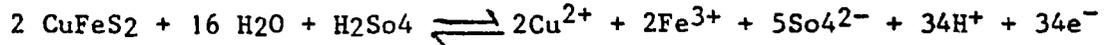
Plusieurs types de sulfures métalliques peuvent être oxydés ; nous donnerons l'exemple de la chalcopirite, un des plus importants minerais de cuivre du monde.

L'équation globale :

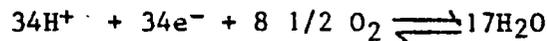


provient des réactions électrochimiques ci-dessous :

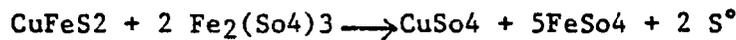
réaction anodique :



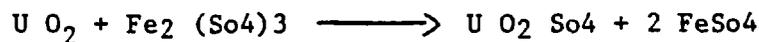
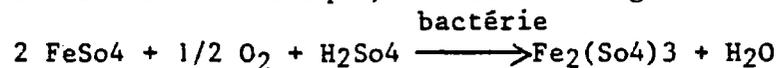
réaction cathodique :



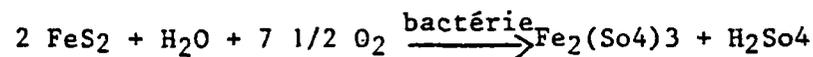
Le sulfate ferrique contribue à l'oxydation de la chalcopirite :



Le soufre élémentaire et le fer ferreux produits au cours de cette réaction sont oxydés en acide sulfurique et en sulfate ferrique par la bactérie. Avec une bonne technique, on obtient un rendement de près de 100 % et 725 mg de cuivre par litre et par heure. Dans l'extraction de l'uranium, le rôle de la bactérie est d'oxyder le fer ferreux en fer ferrique, ce dernier réagissant avec l'uranium.



Le sulfate ferrique et l'acide sulfurique sont produits par l'oxydation bactérienne de sulfures ferreux comme la pyrite, qui sont présents en général dans les minerais d'uranium :



Th. Ferrooxidans se développe dans des solutions à fortes teneurs métalliques, toxiques pour les autres microorganismes. La bactérie tolère 5 % de sulfate ferreux et 5 % de sulfate de cuivre. Les anions sont plus toxiques que les cations. Voici, d'après Tuovinen et Kelly, le taux d'inhibition de l'oxydation du fer en présence de différentes concentrations de cations :

cation	concentration M	% d'inhibition de l'oxydation du Fe ²⁺
Co ²⁺	1	40
	0,1	0
Zn ²⁺	1	34
	0,1	0
Ni ²⁺	1	75
	0,1	0
Cu ²⁺	1	30
	0,5	14
	0,1	7
UO ₂ ²⁺	0,05	14
	0,01	4

Famille des Siderocapsaceae

Cellules entourées d'une capsule imprégnée d'hydroxyde ferrique. Pribram a créé cette famille en 1929. Elle regroupe 4 genres dont les différentes espèces ont été trouvées dans les eaux ferrugineuses ; leur description est surtout morphologique. Seules, quelques-unes ont été cultivées. Elles jouent un rôle dans les dépôts géologiques de fer ou de manganèse.

Genre Siderocapsa, Molish 1910.

Plusieurs cellules sphériques ou ovoïdes se groupent et s'enveloppent d'une capsule commune incrustée partiellement avec des oxydes de fer ou de manganèse. Les cellules individuelles mesurent entre 0,2 et 0,8 μ selon les espèces.

Ecologie : Organisme commun dans les eaux douces, soit librement dans le plancton, soit attaché aux plantes aquatiques. Aérobic, mais croît avec peu d'oxygène, pH de l'eau neutre. Quelques

espèces se multiplient en surface de la vase ou dans l'hypolimnion des lacs.

Taxonomie : La validité du groupe est douteuse car on connaît peu les propriétés des bactéries puisqu'elles n'ont pas été cultivées en culture pure. Huit espèces ont été décrites ; elles se distinguent les unes des autres par leur morphologie : dimension des cellules, assemblage des cellules entre elles, dimension de la capsule. Les microcolonies formées de quelques cellules peuvent s'aggréger entre elles et former des masses zoogléliques importantes.

Nutrition : inconnue, bactérie non cultivée en culture pure.

Genre Naumaniella, Dorff 1934

Bâtonnets individuels entourés d'une capsule délicate, mince jaunie par le dépôt des oxydes de fer ou de manganèse, capsule qui fait ressortir le bord de la cellule et lui donne l'apparence de petites diatomées. Les bâtonnets s'assemblent parfois en chaînettes (*Naumaniella catenata*) et chaque cellule prend alors l'aspect d'un maillon d'une chaînette d'où le nom de "torus" pour ces cellules. Le manganèse colore la capsule en noir.

Ecologie : Les bactéries se développent dans les eaux ferrugineuses ou pour une espèce, dans le sol riche en manganèse. Elles sont répandues et on les trouve parfois dans les mêmes eaux que les *Leptothrix* et les *Gallionella*. Beger, 1941, donne la composition d'une eau où se multiplient ces organismes. Il s'agit d'une eau souterraine qui ressurgit dans une canalisation :

pH 6,9	NH ₄	:	0,5 mg/l
	NO ₃	:	5 "
	Cl	:	332 "
	Fe	:	4,8 "
	Mn	:	0,8 "
	Co ₂ libre	:	81 mg/l
	" lié	:	88 "

L'eau est très dure.

Taxonomie : 6 espèces ont été décrites, elles se distinguent par leur aspect morphologique : forme des cellules (droites, ellipsoïdes, incurvées), dimension des cellules, parfois mobiles, se divisant par scission ou par bourgeonnement.

Nutrition : Quelques espèces ont été cultivées en culture pure, mais on a peu de renseignements. Elles ne poussent pas dans les milieux usuels peptonés ou à l'extrait de viande. La croissance a été obtenue dans des solutions contenant du citrate de fer ferreux, de l'extrait de terre ou des géloses au carbonate ou à l'acétate de manganèse. Dans les solutions avec du citrate de fer ferreux, *Naumaniella neustonica* produit un film brun doré en surface et un dépôt d'hydroxyde ferrique volumineux. Les colonies de *Naumaniella pygmaea* sur extrait de terre sont brunes, celles de *N. polymorpha* sur manganèse : brun foncé ; cette dernière espèce n'oxyde que le manganèse.

Genre Ochrobium, Perfilov in Visloukh, 1921

Cellules ellipsoïdes ou en bâtonnets de 0,5-0,3 μ de large sur 1,5 à 5 μ de long entourées partiellement d'une capsule mince fortement imprégnée de fer. La capsule demeure ouverte à une extrémité, ce qui donne à l'ensemble la forme d'un sabot de cheval. Les cellules sont isolées ou aggrégées les unes aux autres, parfois mobiles, avec deux flagelles polaires inégaux.

Ecologie : Organisme largement répandu dans les eaux ferrugineuses.

Taxonomie : Il est possible que cet organisme soit une algue, par exemple, un *Pteromonas*. Le genre doit donc être considéré comme "incertae sedis". Il comprend une espèce : *Ochrobium tectum*.

Nutrition : inconnue, bactérie non cultivée en culture pure.

Genre Siderococcus, Dorff, 1934

Cellules sphériques de 0,2 à 0,5 μ m de diamètre, isolées ou groupées en petites colonies mobiles de 6 à 15 cellules ressemblant à un grain de Maïs. Les cellules possèdent des appendices filamenteux et se multiplient semble-t-il par bourgeonnement. Elles n'ont pas de capsules et ne sont pas incrustées avec de l'hydroxyde ferrique mais les vieilles colonies s'imprègnent parfois d'hydroxyde ferrique jaune-orange et l'on distingue alors peu les cellules.

Ecologie : Genre largement répandu dans les eaux et sur les vases, avec un pH neutre et une concentration faible en oxygène.

Taxonomie : une espèce : *S. limoniticus*

Nutrition : inconnue, bactérie non cultivée.

La réduction du fer ferrique

On a décrit la réduction biologique du fer ferrique pour de nombreuses bactéries chimioorganotrophes banales. La réduction nécessite de l'énergie et doit donc être couplée avec une réaction qui en produit. La réduction est liée à l'oxydation (deshydrogénation) de substrats organiques. Elle n'a lieu qu'en anaérobiose et le fer ferrique sert alors d'accepteur d'électrons. Les bactéries anaérobies facultatives, cultivées en anaérobiose se développent 5 fois plus en présence d'hydroxyde ferrique. Dans le sol, la réduction du fer ferrique est fonction de la consommation des acides organiques.

Complexation du fer, solubilisation

Les microbes du sol et des eaux peuvent complexer le fer minéral grâce à la production d'acides organiques ou de gaz carbonique.

Minéralisation du fer complexé

De très nombreux microbes minéralisent les complexes organiques du fer en utilisant la partie organique comme source de carbone et en libérant le fer minéral.

Rôle des bactéries du fer dans la corrosion

On trouve très souvent des *Leptothrix* et des *Gallionella* dans les "vésicules gélatineuses" ou "tubercules" des canalisations métalliques corrodées. Ces mêmes bactéries obstruent les drains et autres canalisations où circule de l'eau ferrugineuse par la formation de gaines imprégnées d'hydroxyde ferrique.

RESUME

Les bactéries oxydant le fer ferreux ou précipitant le fer ferrique ont une morphologie et une physiologie très variées ; aussi, sont-elles classées dans des groupes taxonomiques différents. De nombreuses espèces sont mal connues parce qu'elles n'ont jamais été cultivées en culture pure ou que leur métabolisme n'est pas encore clairement élucidé. La plupart sont des bactéries aquatiques qui croissent dans les eaux ferrugineuses (environ 2-5 mg FeII/l), non polluées, peu oxygénées, riches en CO₂, de pH voisin de la neutralité. Les cellules sont entourées de gaines, de capsules ou portées sur des filaments imprégnés d'hydroxyde ferrique. Gaines, capsules et filaments sont étroitement liés à la précipitation de l'hydroxyde ferrique, il y a

peu de cellules formées par rapport à la grande masse de gaines ou de filaments synthétisés.

Une espèce, *Gallionella ferruginea*, croît sur un milieu minéral en tirant son énergie de l'oxydation du fer réduit, elle est donc chimiolithotrophe. Pour les autres bactéries croissant à pH neutre, la nature chimiolithotrophe n'a pu être démontrée et leur aptitude à oxyder le fer ferreux est controversée.

Dans les eaux et sols acides, riches en sulfures métalliques, se multiplie une bactérie : *Thiobacillus ferrooxidans*, très différente des précédentes. C'est un bâtonnet mobile, sans capsule, ni gaine, ne se multipliant qu'en milieu acide (pH3 et au dessous), minéral avec une grande concentration en fer ou en soufre réduit et bien oxygéné. Il s'agit d'un chimiolithotrophe qui tire son énergie de l'oxydation du fer ou du soufre réduit. Comme cette bactérie est capable aussi de solubiliser les sulfures métalliques insolubles ; on l'utilise dans la récupération des minerais pauvres en métal.

En présence de carbone organique et en milieu anaérobie, le fer ferrique peut être réduit par de nombreuses bactéries chimioorganotrophes anaérobies facultatives. D'autre part, ces bactéries complexent le fer ou minéralisent le fer complexé.

On trouve souvent des bactéries du fer (*Leptothrix*, *Gallionella*) dans les "vésicules gélatineuses" ou "tubercules" des canalisations métalliques corrodées. Ces bactéries peuvent obstruer les canalisations où circule de l'eau ferrugineuse.

BIBLIOGRAPHIE

- BRIERLEY J.A. - Bactéries thermophiles oxydant le fer trouvées dans les déblais de lixivation du cuivre. (en anglais)
Appl. Env. Microbiol., 1978, 36(3), 523-525
- BUCHANAN R.E., GIBBONS N.F. - Bergey's Manual of Determinative bacteriology, 8è édition, Williams et Wilkins, Baltimore 1974.
- CHANTEREAU J. - Corrosion bactérienne, bactéries de la corrosion. Technique et Documentation, Paris 1977. , 1980
- HANERT H. - Expériences sur l'isolement, le métabolisme et la morphologie de Gallionella ferruginea Ehrenberg. (en allemand). Arch. F. Mikrobiol. 1968, 60, 348-376.
- JONES J.G. - Quelques observations sur le développement de la bactérie du fer Leptothrix ochracea dans l'eau douce (en anglais). J. Appl. Bact. 1975, 39, 63-72.
- LUNDGREN D.G. et coll. - Les bactéries oxydant le fer (Th. ferrooxidans) (en anglais) dans Microbial Iron Metabolism. Neilands ed. Acad. Press., 1974.
- PRAVE P. - Expériences sur le métabolisme de la bactérie du fer Leptothrix ochracea Kützing (en allemand). Arch. F. Mikrobiol, 1957, 27, 33-62.
- SCHWEISFURTH R. - Mikroorganismen oxydant le manganèse et le fer (en allemand), Landwirtsch. Forschung, 1978, 31, 2-3
- SILVERMAN M.P., LUNDGREN D.G. - Etudes sur la bactérie du fer chimioautotrophe Ferrobacillus ferrooxidans : un milieu éprouvé et un moyen de récolte pour l'obtention d'une grande quantité de cellules (en anglais). J. Bac^t 1959, 77, 642.
- TORMA A.E. - Le rôle de Thiobacillus ferrooxidans dans les procédés hydrométallurgiques (en anglais)
Adv. in Biochem. Eng. 1977, 6, 1-38.

RÔLE DES MICROORGANISMES DANS LE CYCLE DE L'~~AZOTE~~

* * *

Mme FAURIE

Faculté des Sciences de Lyon
Laboratoire de biologie des sols

ROLE DES MICRO-ORGANISMES DANS LE
CYCLE DE L'AZOTE
(très schématique)

I - LE CYCLE DE L'AZOTE

1. Rappel : cf. fig. 1
2. Niveaux d'intervention des micro-organismes
 - fixation biologique de l'azote atmosphérique
 - minéralisation-nitrification
 - réorganisation
 - dénitrification

Le cycle de l'azote est sous l'entière dépendance de l'activité des micro-organismes du sol et des eaux.

3. Flux et Bilans d'azote

Apports d'azote dans le sol et les eaux : fixation .

Pertes d'azote : dénitrification, volatilisation, lixiviation

Transformations de l'azote dans le sol :

minéralisation - nitrification - réorganisation

Estimation des flux et bilans

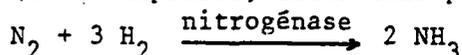
cf. fig. 2 - 3 - 4

II - LES ETAPES DU CYCLE DE L'AZOTE :

Transformations microbiennes , micro-organismes impliqués, facteurs influençant leur activité , méthodes d'étude.

A/ Fixation biologique

(très simplifié, intervient peu dans les eaux et leur traitement)



1. Fixation par des micro-organismes libres

Azotobacter, Clostridium (bactéries)...

Cyanobactéries (ex. algues bleu-vert) réalisent leur synthèses protéiques à partir de NH_3 fixé. → Retour de N org. au sol après leur mort.

2. fixation symbiotique

Ex : coupe Rhizobium/Légumineuse

" Frankia/Aulne

formation des nodules sur les racines des végétaux.

La plante-hôte fournit les substrats carbonés (issus de la photosynthèse aux micro-organismes présents dans le nodule, ceux-ci fournissent à la plante un complément d'azote (NH_3) après fixation de l'azote de l'air.

→ impact considérable au niveau agricole

méthodes d'étude

estimation des quantités d'azote fixé

- par activité réductrice d'acétylène



mesure l'activité enzymatique, méthode surtout qualitative, mais non destructive.

- par méthodes isotopiques

→ marquage direct de l'azote de l'air ($^{15}\text{N}_2$)

→ marquage indirect par apport d'engrais au sol $^{15}\text{NH}_4$ ou $^{15}\text{NO}_3$

→ variations isotopiques naturelles

Calcul basé sur la notion de dilution isotopique qui résulte du changement d'abondance en ^{15}N lors d'un mélange homogène de deux sources d'azote d'abondance isotopique différente (sol et atmosphère dans ce cas)

étude des micro-organismes (simplifiée)

→ comptage : méthodes des suspensions dilutions (cf. POCHON et TARDIEUX 1962)

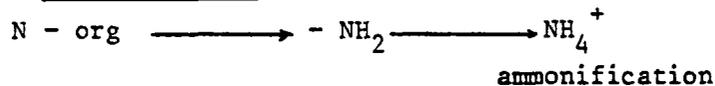
→ visualisation, comptage, identification, sérologie : immunologie cf.

fig. 5. Pour le principe

B/ Cycle interne de l'azote

minéralisation - nitrification - réorganisation

1-minéralisation

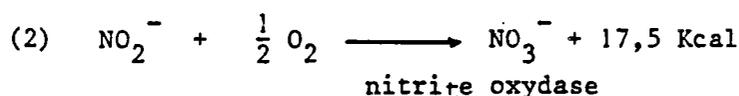
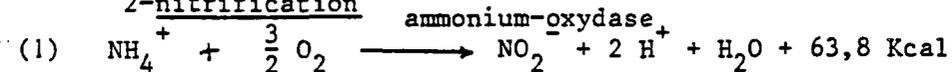


microflore diversifiée : bactéries, actinomycètes, champignons

activité influencée par le type de débris végétaux, la complexité des molécules, le type de sol (pH), le climat (t°, humidité).

Quelque soient les conditions, le stade ammoniacal est toujours atteint dans la mesure où plusieurs types de micro-organismes interviennent, mais les taux de minéralisation sont variables.

2-nitrification



microflore spécifique : (1) Nitrosomonas, (2) Nitrobacter.

Micro-organismes chimiolithotrophes : l'énergie libérée par l'oxydation du substrat minéral est utilisée pour fixer le CO_2

Nitrification : étape limitante de la production végétale

étape qui contrôle les pertes d'azote en amont par volatilisation, en aval par dénitrification et lixiviation cf. fig. 6

Facteurs intervenant

- aération, concentration en O_2 dissous (germes aérobies)
- pH (neutre, alcalin)
- concentration en substrat (cf. fig. 7)
- température (28°C au laboratoire)
- N-serve (2 chloro-6-trichlorométhyl pyridine) inhibiteur de la phase $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$

Méthodes d'études de la minéralisation-nitrification

→ incubation de sol en erlen ou sacs de polyéthylène

mesure de l'N minéral présent, donc de la minéralisation nette prenant en compte l'N minéral réorganisé.

→ percolation de sol (fig. 8)

ex : cinétique (fig. 9 permet de suivre l'évolution et les échanges sol-solution

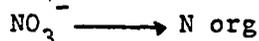
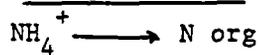
nitrification acidifiante : impact sur la mise en solution du calcium (fig. 10)

Etudes des micro-organismes : (cf. fixation)

Ex ♦ d'un micro-organisme nitrifiant

Nitrobacter : structure en microscopie électronique (cf. fig. 11)

3. Réorganisation

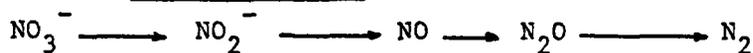


microflore diversifiée qui en présence de substrats carbonés énergétiques (facilement assimilables) utilisent l'N minéral pour réaliser les synthèses protéiques.

Mécanisme de stockage de l'azote dans la biomasse microbienne.

Méthodes d'étude du cycle interne abordée à l'aide du traceur ^{15}N

C/ Dénitrification



micro-organismes : anaérobies facultatifs hétérotrophes pour la plupart Cas des Thiobacillus chimiolithotrophes

Influence de l'aération , du pH, de la matière organique comme source énergétique, de la température

méthodes d'étude : incubation en anaérobiose, dosage de N_2O après blocage par acétylène de la N_2O réductase
perte d'azote pour le sol mais processus d'élimination des nitrates dans les eaux.

D/ Processus non microbiens

liés cependant à l'activité des successions microbiennes

1. Volatilisation de l'ammoniac

importante, si pH élevé et capacité de rétention des ions réduites
fonction de la quantité d'engrais , du mode d'application, du climat (alternance sècheresse - humidité) de la présence de végétaux
cf. fig. 12

2. Lixiviation du nitrate

dépend de l'activité microbienne nitrifiante et dénitrifiante

- du climat (pluviométrie)
- de la nature du sol (texture)
- de la densité du couvert végétal (assimilation des nitrates)
- du taux de fertilisation.

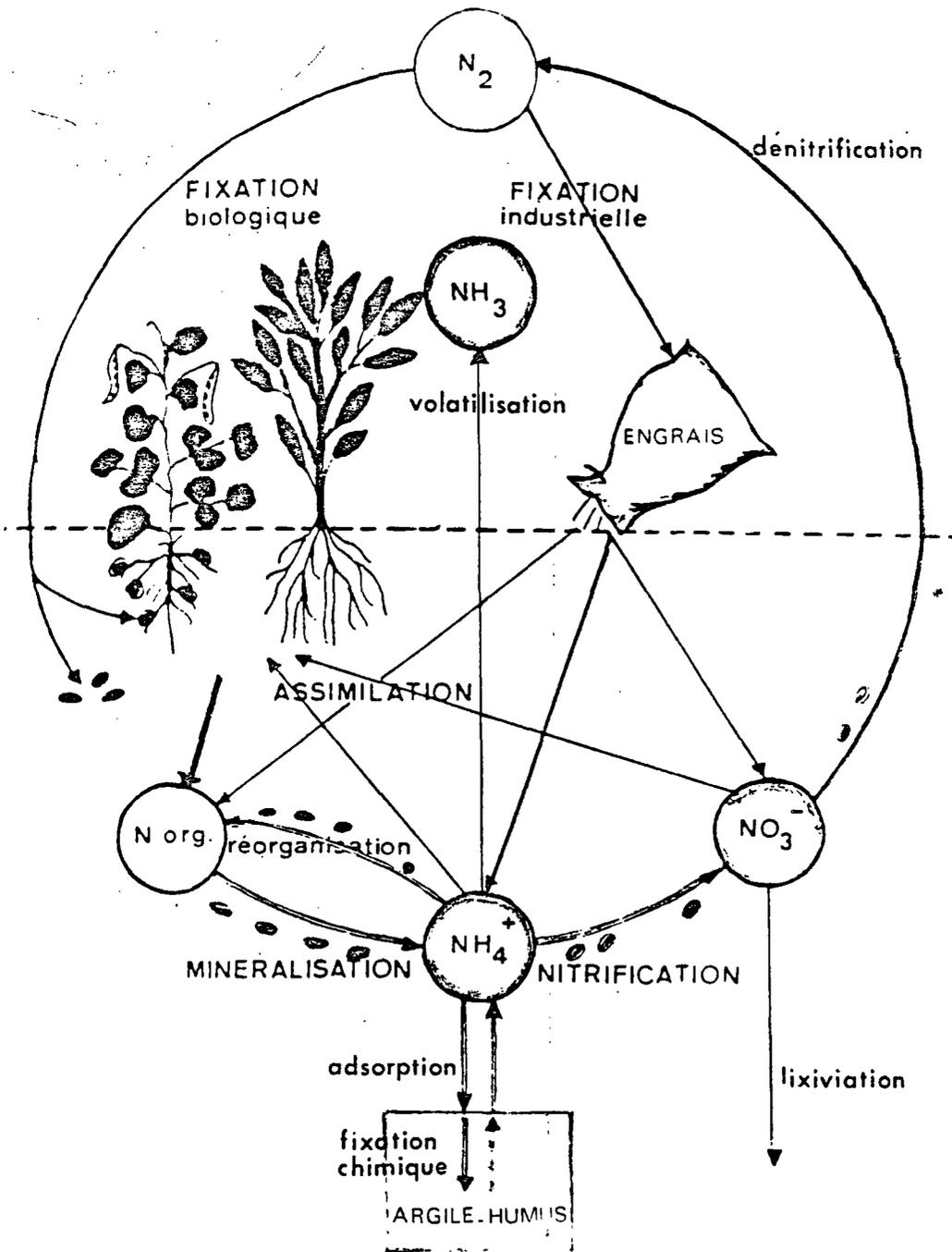
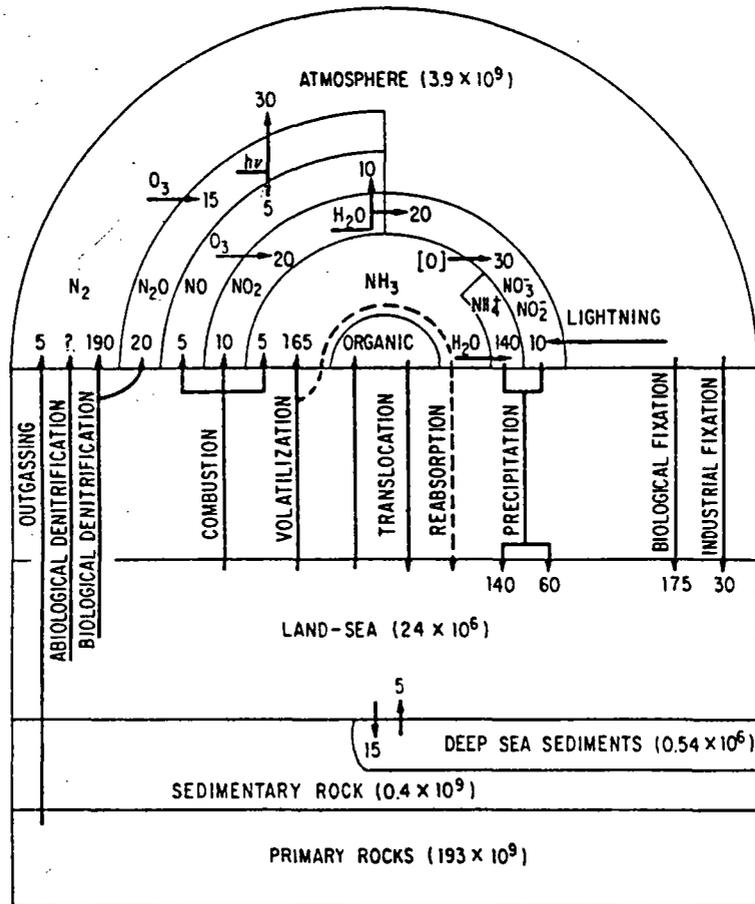
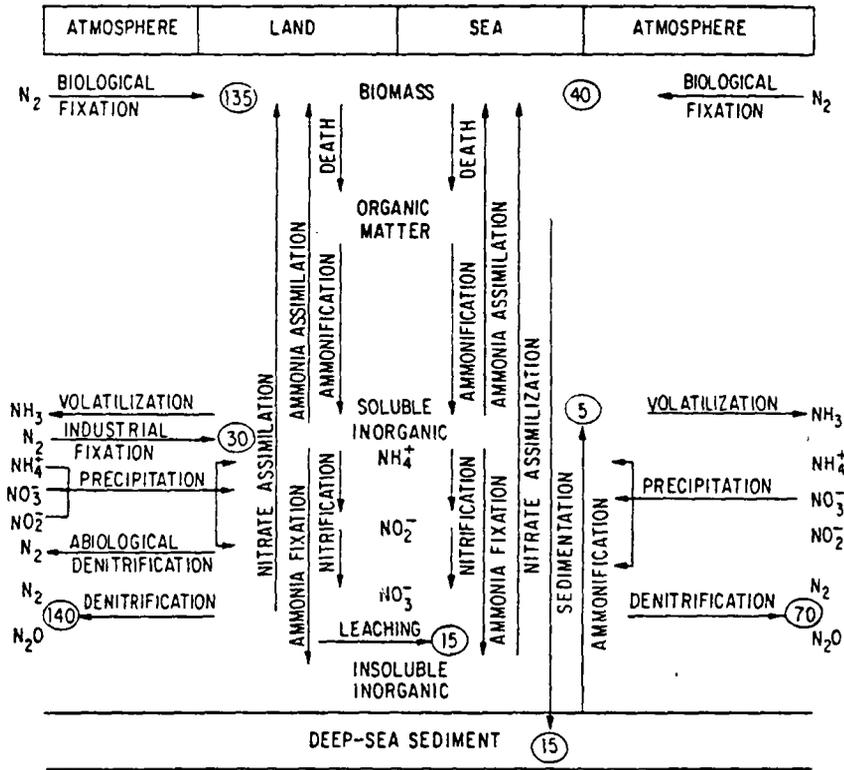


Fig. 1 - Cycle de l'azote au niveau terrestre



in BURNS and HARDY, 1975

Fig. 2 - Cycle de l'azote : flux annuel



valeurs en milliards de tonnes

Fig. 3 : flux et transformation de l'N dans le pool sol-eau

RAPPORT HENIN - 1980

à l'échelle

<u>Entrées d'azote</u>	\bar{m} .tonnes/an
Fixation libre et symbiotique	1,3
Précipitations	0,5
Engrais minéraux	2,0
	<hr/>
	3,8
<u>Pertes d'azote</u>	\bar{m} .tonnes/an
Dénitrification sol et eau	1,4
Combustion, volatilisation NH ₃	1,0
N dans les eaux rivières	0,8
	<hr/>
	3,2
Minéralisation matière organique	3,0
Déjections	2,2

Fig. 4

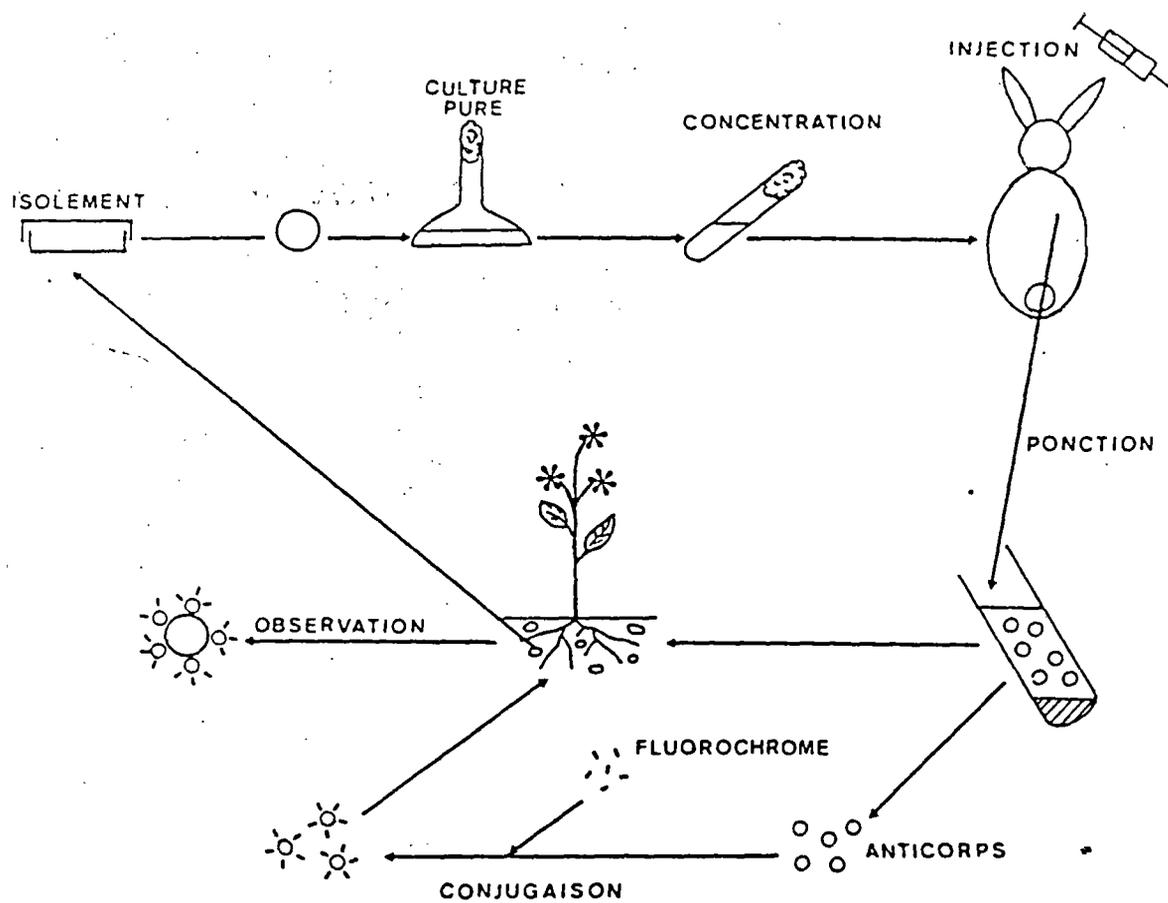


Fig. 5 - Principe de l'immunofluorescence appliquée à la microbiologie du sol

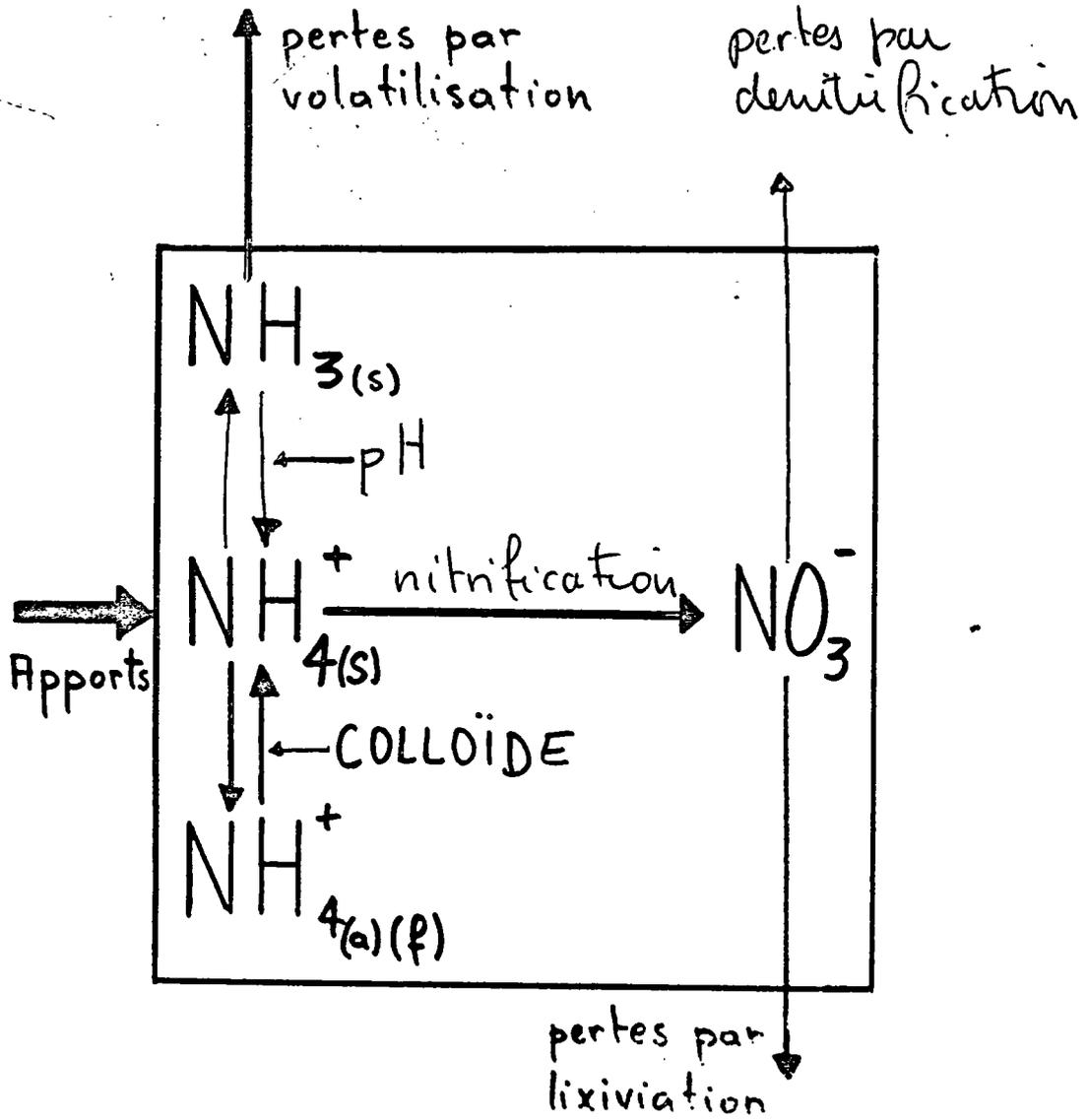


Fig. 6

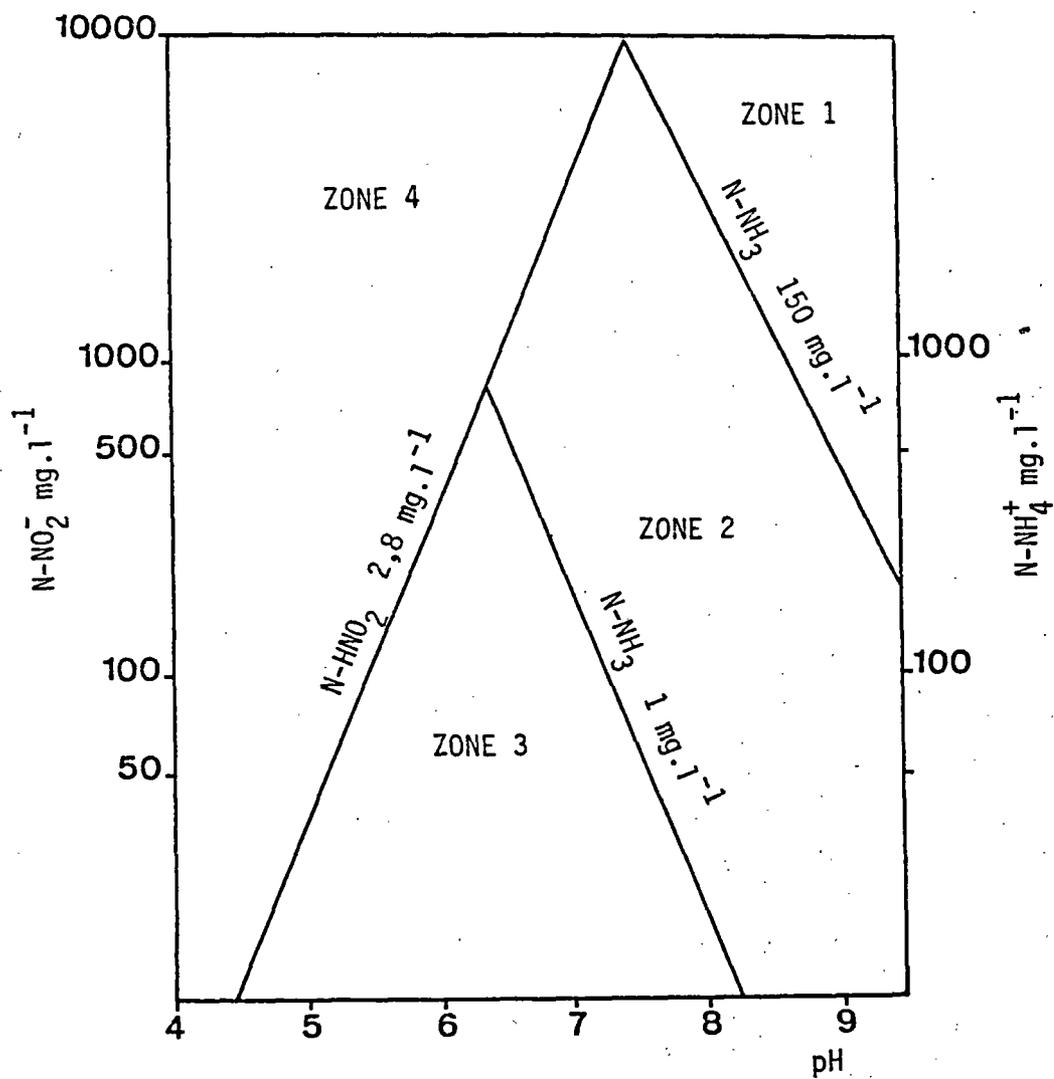


Fig. 7 - Inhibition de la nitrification par l'ammoniac libre et l'acide nitreux (ANTHONISEN et al., 1976)
Modèle en milieu liquide.

- Zone 1 : inhibition de Nitrosomonas et Nitrobacter par NH_3
- Zone 2 : inhibition de Nitrobacter par NH_3
- Zone 3 : pas d'inhibition-nitrification complète
- Zone 4 : inhibition de Nitrobacter par HNO_2

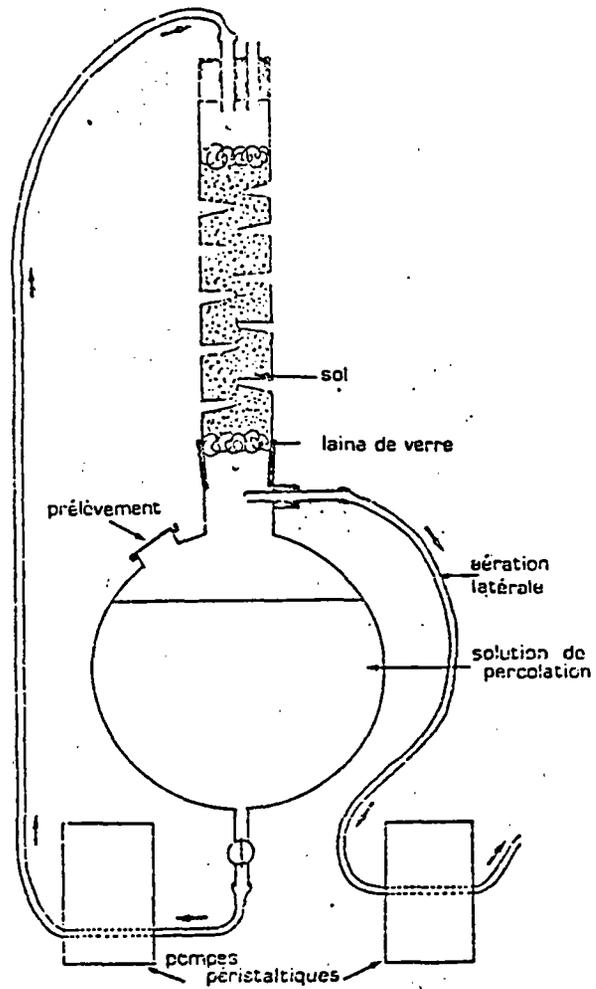


Fig. 8 - Dispositif de percolation

(d'après FAURIE, 1980)

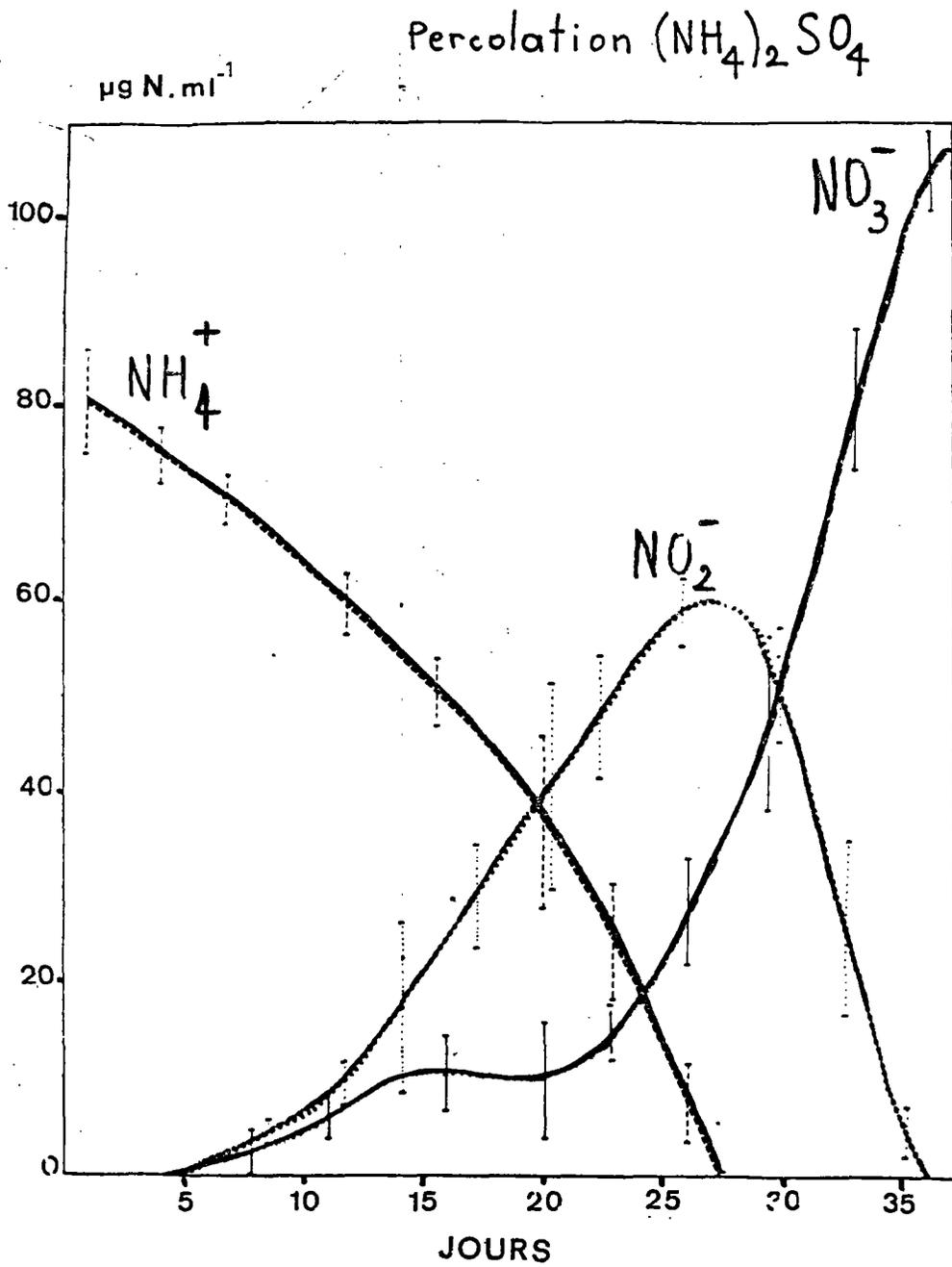


Fig. 9 - Cinétique de nitrification 28°C. Ex.

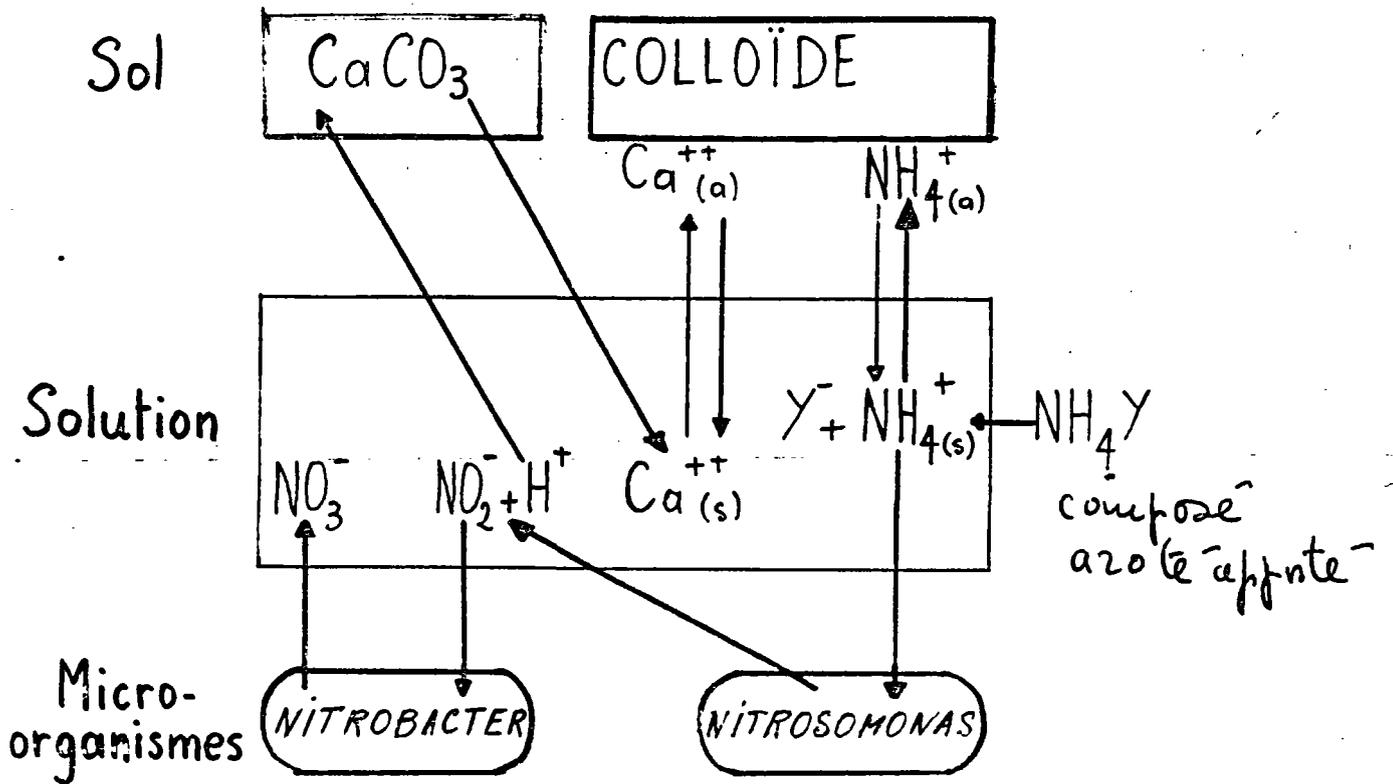


Fig. 10 - Impact de la nitrification sur les propriétés du sol

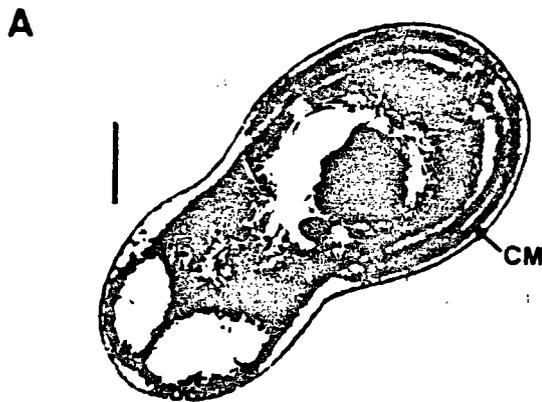


Fig. 11 - Nitrobacter : coupe longitudinale en microscopie électronique

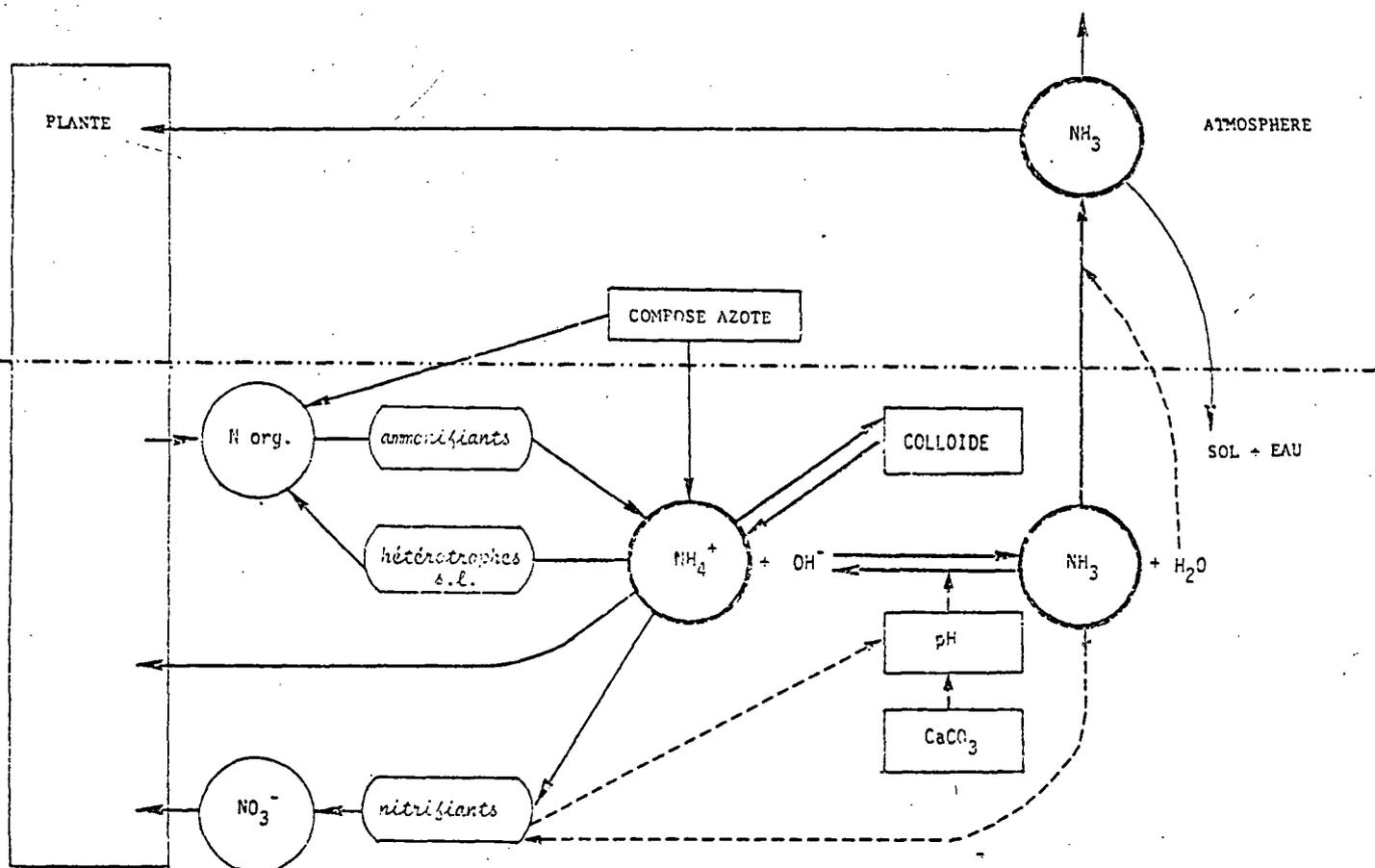


Fig. 12 - SCHEMA (C) : Origine et devenir de l'azote ammoniacal. Transferts entre le sol (milieu physico-chimique et biologique), l'atmosphère et la plante. Principales interactions.

TRANSFERTS DES MICROORGANISMES DANS LE SOL

*
* *

L.P. MAZOIT

Directeur honoraire du Service de Contrôle des
eaux de la Ville de Paris

GENERALITES

Dans ce transfert, les bactéries occupent un rôle prépondérant, mais elles ne sont pas seules en cause, d'autres êtres vivants ont une importance certaine.

A la limite du macro et du microscopique, existent de très nombreux parasites. Exemple, dans les régions karstiques, en particulier dans les régions de craie, les TRICOCEPHALES, sont de petits parasites intestinaux dont les oeufs, microscopiques voyagent avec les eaux souterraines contaminées (fèces).

Microorganismes vrais (infiniment petits des eaux souterraines)

- Règne animal : animaux unicellulaires. En particulier les AMIBES (protozoaires). Rares dans les eaux souterraines métropolitaines bien filtrées, mais souvent présentes dans les eaux karstiques. Il s'agit surtout de *Entamoeba coli*. Mais on peut imaginer que, à conditions que le parcours soit relativement bref, *Negleria fowleri* (méningites amibiennes) peut se trouver dans des eaux souterraines karstiques, en période très chaude.
- Règne végétal : algues, champignons, moisissures, bactéries.
- Non classés : les virus. Ce sont des molécules qui présentent des analogies avec le végétal. N'y ont cependant pas été incorporées. Ce sont avant tout des parasites soit des animaux (poliovirus, herpès-virus...), soit des végétaux supérieurs (mosaïque du tabac, de la pomme de terre...), soit des végétaux inférieurs et, en particulier des bactéries (bactériophages). Comme toujours, hautement spécialisés : phage coli, phage dysentérique, phage pseudomonas...

Règne végétal

1. Levures et autres champignons : très nombreux dans les eaux souterraines, ce qui est normal. Sont des hôtes courants en raison de leur origine. Ont parfois été bien gênants lors d'expériences de traçage.

En effet, les traçages chimiques indiquent une communication mais pas obligatoirement une contamination par microorganismes, puisque ceux-ci peuvent être retenus (filtration à l'échelle des microorganismes) alors que les corps ou composés dissous ne sont pas retenus, n'étant pas arrêtés par les obstacles que l'eau peut franchir.

Pour matérialiser les contaminations, on a dû faire appel à des microorganismes. Les premiers mis en oeuvre furent des levures, faciles à cultiver ensuite au laboratoire. Mais, dans la nature il y a énormément de levures sauvages, susceptibles de cultiver sur les milieux choisis. En cas de réaction positive : s'agissait-il de la levure déversée ou d'une levure sauvage voisine ? Mais il y avait aussi le cas inverse. En effet, les levures sont d'une taille bien supérieure à celle des bactéries. En raison de ses dimensions, une levure (genre levure de bière, la plus employée) pouvait être retenue. Les *Mycoderma* (levures bien particulières) sont nettement plus petits. Mais, eux-aussi, sont fréquents, très fréquents dans la nature. Alors que faire ?

DIENERT, fondateur du Service de surveillance des eaux de la ville de Paris - devenu ensuite Service de contrôle des eaux de la ville de Paris -, trouva une solution élégante : il accoutuma une souche d' *Escheria coli* à l'arsenic et ses bactéries étaient capables de se développer sur des milieux de culture relativement riches en arsenic, ce qu'on ne trouve pas dans la nature. On pouvait ainsi avoir la preuve que les bactéries n'étaient pas retenues par le sol, donc qu'il y avait bien contamination et pas seulement communication.

2. Algues : les algues ne peuvent se nourrir qu'en présence de lumière (photosynthèse), aussi n'en trouve-t-on sous terre que dans des circulations karstiques, où elles ne perdirent d'ailleurs que peu de temps sous leur forme adulte.
3. Bactéries : c'est le gros morceau de la microbiologie des eaux souterraines.

Les bactéries sont des végétaux inférieurs, unicellulaires, dépourvus de chlorophylle.

Certaines sont pigmentées (*Bacillus prodigiosus* rouge sang - *Chromobacterium violaceum*...), mais la plupart sont incolores.

Elles sont présentes dans tous les milieux naturels où la température permet la vie. Elles ont besoin d'eau pour se développer : les unes n'exigent que de l'humidité, mais la plupart se développent dans des liquides.

Pendant très longtemps on a cru que les bactéries ne se reproduisaient que par scissiparité. Depuis 35 ans environ, on connaît un autre mode de reproduction : la conjugaison : deux bactéries de même espèce se rencontrent et, parfois s'accolent. Il y a alors échange de gènes. On a découvert ensuite qu'il y avait des bactéries mâles et des bactéries femelles et même qu'en certains cas la bactérie mâle transformait la femelle en mâle...

C'est certainement à cause des processus de conjugaison que les bactéries ont échappé à la dégénérescence, les échanges permettant une préservation du patrimoine génétique.

Plus récemment on a mis en évidence des conjugaisons de bactéries différentes, par exemple *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce dernier est beaucoup plus résistant qu'*E. coli*. La conjugaison devrait donc permettre d'aboutir à des *E. coli* plus résistants. On peut imaginer d'autres conjugaisons. Or les bactéries se propageront d'autant mieux dans les eaux qu'elles sont plus résistantes.

Heureusement, la conjugaison n'est pas un phénomène courant dans les milieux naturels : pour que deux bactéries se conjugent, il faut, avant tout qu'elles se rencontrent. Dans les liquides, elles sont en mouvement constant (mouvement brownien) ; certaines ont des mouvements propres, mais qui ne semblent pas être dirigés (sauf peut-être par un stimulus telle la fuite devant la lumière). Dans les milieux de culture liquides, les teneurs sont de l'ordre de 10^6 par millilitre, mais dans les milieux extérieurs comme l'eau, on est très loin de ces concentrations et les chances de rencontre sont faibles.

Une autre cause empêche les rencontres fréquentes entre bactéries, donc les conjugaisons : les bactéries sont porteuses de charges électriques, en principe positives (nous verrons plus loin que ces charges positives ont un grand rôle dans les transferts dans le sol et les circulations aquifères). Chargées de même signe, elles vont donc se repousser et, sauf force supérieure à la force de répulsion (agitation par des remous, chute...) elles ne se rencontreront pas.

Ainsi que vous le voyez, le roman d'amour des bactéries n'arrive que difficilement à une heureuse conclusion.

LE TRANSPORT DES BACTERIES

Bien entendu, les bactéries peuvent voyager seules au fil de l'eau. Mais le plus souvent elles empruntent un moyen de locomotion qui, lui, est mu par l'eau. Il s'agit des matières en suspension, présentes, en plus ou moins grande quantité bien entendu, dans toutes les eaux naturelles, même les plus claires. Ces matières en suspension, tout au moins celles qui sont sous forme colloïdale sont comme les bactéries : elles sont porteuses de charges électriques. Mais ici les charges sont négatives. Elles exerceront donc une attraction sur les bactéries. Celles-ci viendront se fixer sur les particules en suspension et, une fois fixées, voyageront sur ces supports, tant qu'une chute, un obstacle créant un remous violent ne viendra pas les obliger à quitter leur "wagon". Le fait est d'ailleurs rare et nous verrons ci-après que même dans des eaux d'une grande limpidité il existe toujours des matières en suspension et qu'elles véhiculent de très nombreuses bactéries.

Mais ces bactéries fixées, ne les imaginez pas uniquement à la périphérie. Les particules en suspension n'ont pas une forme géométrique régulière : elles recèlent des anfractuosités qui constituent de véritables cavernes vis-à-vis des bactéries. (Pensez aux cavités du charbon actif !). Dans ces "grottes", elles se trouvent à l'abri. En particulier elles y sont tout au moins dans une certaine mesure protégées des désinfectants agissant par voie chimique et, bien qu'un peu moins, de ceux agissant par voie physique. C'est une des raisons pour lesquelles les traitements désinfectants (Cl_2 , O_3 et un peu U.V.) sont plus difficiles à appliquer à des eaux dont la limpidité laisse à désirer. (En outre, souvent, les matières en suspension, réductrices, neutralisent une partie du désinfectant chimique).

Persistance des bactéries dans les dépôts

On doit aussi évoquer d'autres phénomènes en liaison avec l'association matières en suspension-bactéries. Les particules constituent des masses bien plus denses que les bactéries seules. Pour peu que le courant soit très lent, elles décanteront plus vite. Mon ami Fernand VILLEMAINE a, par exemple, observé des faits qui paraissent aberrants : les sources du Durteint (captées par la ville de Paris dans la région de Provins) fournissent une eau d'une grande limpidité due, semble-t-il, à une succession de filtrations horizontales. Dans les captages, la circulation est très lente

et les matières en suspension, rares d'ailleurs, décantent dans une très grande proportion. Elles entraînent avec elles les bactéries qui les ont utilisées comme véhicules et aussi toutes celles, non fixées, qu'elles rencontrent et captent au long de leur descente.

Ces matières en suspension ont, en quelque 40 ans, formé une mince couche que VILLEMAINE a prélevée et analysée. Il y a trouvé des bactéries qu'il n'avait jamais observées dans les multiples échantillons d'eau prélevés sur les mêmes captages.

Il n'y a, jusqu'ici, aucune anomalie : prenez une source qui débite 11,5 l/s (ce n'est pas une très grosse source) soit 1000 m³/j. On en prélève 250 ml pour y rechercher les germes témoins de contamination. La proportion est de 0,25.10⁻⁶, à condition qu'on y pratique un prélèvement par jour... ce qui, pratiquement, n'est jamais le cas pour un aussi faible débit.

N'allez pas en déduire qu'il faudrait ensemençer chaque jour de très grandes quantités d'eau pour pouvoir garantir son innocuité. Evidemment, plus grands seront les volumes prélevés, meilleure sera la connaissance de la qualité. Mais il ne suffit pas, heureusement pour nous, d'une bactérie pathogène pour nous infecter : notre organisme a des armes contre ces agressions et ce n'est qu'au-delà d'un certain seuil que nous sommes en danger. Généralement on ne recherche pas les bactéries pathogènes dans les analyses courantes de potabilité, on se contente de commensales : les bactéries témoins de contamination, plus nombreuses, généralement plus résistantes et mises en évidence plus facilement et surtout plus rapidement. L'expérience montre que lorsque ces bactéries témoins ne sont pas mises en évidence dans 100 ml, l'eau a toutes les chances d'être bactériologiquement sans danger.

Mais, revenons à nos bactéries décantées au fond des sources du Durteint. Celles qui ont été décelées sont, d'une part des *Clostridium* sulfito-réducteurs, germes dont les spores peuvent rester très longtemps en vie latente, mais aussi des coliformes fécaux. Non sporulées, ces bactéries sont réputées pour n'avoir, dans l'eau, qu'une vie relativement brève (2 à 4 mois environ). Les boues qui tapissaient le fond des captages dataient, pour les plus anciennes, d'une quarantaine d'années. N'est-on pas, alors, fondé à se poser la question suivante : "Comment se fait-il que des organismes dont le temps de vie est de deux mois, voire du double,

qui ne se reproduisent pratiquement pas dans l'eau, puissent être encore vivants après quelques décennies ?". Ne peut-on pas se demander si ce n'est pas dans la neutralisation des charges électriques que résiderait le phénomène ? J'ai posé la question à des spécialistes de la bactériologie. Jusqu'alors aucune réponse pour ou contre ne m'a été apportée.

Le nombre de bactéries qu'on trouve dans un millilitre de sol moyen est bien supérieur à celui que recèle le même volume d'un milieu de culture. Beaucoup d'entre elles sont mobiles (cils vibratiles pour la plupart). Mais cette mobilité - visible sous le microscope - ne peut pas les amener loin : d'une part elle n'est pas motivée par l'attrait d'une proie (ou tout autre stimulus), d'autre part, en admettant qu'elle s'exerce toujours dans le même sens, elle est à l'échelle des bactéries et ne dépasserait pas quelques millimètres/heure dans les meilleures conditions. Alors, si l'on tient compte des obstacles...! Et, pour voyager dans le sol, elles utilisent (sans le rechercher évidemment) un moyen de transport : l'eau.

On sait, depuis quelques décennies, que la pénétration de l'eau dans le sol, puis son cheminement dans le sous-sol sont des phénomènes bien plus complexes qu'on ne pourrait l'imaginer de prime abord, dans lesquels interviennent de nombreux facteurs. Il en sera donc de même obligatoirement, mais en plus complexe encore, pour les bactéries.

Nous allons donc simplifier et laisser de côté la plupart des détails, en particulier pour les terrains perméables en petit. Nous allons, d'ailleurs, dire déjà quelques mots de l'opposé, le karst, puisqu'ici le cas est nettement plus simple.

Les bactéries dans les circulations karstiques

Il est bien évident que dans le karst, même dans un cas de figure limite, les canaux souterrains sont sans commune mesure avec les bactéries. Malgré tout, nombreuses sont celles qui sont piégées par les obstacles et par les matières en suspension - en principe bien plus nombreuses que dans un terrain perméable en petit -. Mais, dans de très nombreux cas, beaucoup de germes peuvent voyager seul, à condition que la vitesse de circulation soit rapide. Les contaminations seront fréquentes et l'on connaît de nombreuses exurgences, résurgences qui sont responsables de beaucoup de morts.

Je citerai seulement la source d'Erigny à Rueil-la-Gadelière (E. et L.) et celle du Miroir à Theil-sur-Vanne (Yonne) parmi la quarantaine de cas que je connais personnellement. Ces cas sont, pour la plupart, anciens. Mais, deci delà, on relève des épidémies sans gravité quant aux suites, mais qui impliquent la présence de germes ayant voyagé rapidement.

Les bactéries dans les nappes (stricto sensu)

Comment les bactéries arrivent-elles à suivre l'eau dans les terrains perméables en petit ? Prenons le cas d'un des meilleurs filtres naturels, celui qui est constitué par un sable alluvionnaire moyen (c'est-à-dire composé d'un mélange d'éléments de granulométrie différente, mais riche en éléments fins). Les intervalles entre les grains sont très petits et constituent un réseau de très fins canalicules, ou tout au moins nous paraissent-ils ainsi. Mais, déjà à la loupe on distingue les interstices, qui sont donc sans commune mesure avec les bactéries. Celles-ci peuvent circuler entre les grains sans entrer en contact avec eux... si la distance à parcourir est relativement courte. Mais au-delà de 2 à 3 mètres, la probabilité des rencontres est telle qu'on doit admettre qu'aucune bactérie ne peut passer sans rencontrer sans heurter un ou plusieurs obstacles et s'y fixer (qu'elle soit libre ou "piégée" par des matières en suspension, le résultat est le même). Mais elle ne restera pas fixée indéfiniment sur le même obstacle, car la mince pellicule d'eau qui imbibe les grains voyage, elle aussi, moins vite que celle qui circule entre les grains, mais elle voyage quand même, finissant par quitter, au bout d'un temps plus ou moins long, le grain qu'elle enrobait. Deux voies s'offrent alors à notre bactérie : soit rejoindre l'eau intergranulaire et voyager alors à vitesse normale (quelques mètres/jour si le filtre est loin) jusqu'à la prochaine rencontre avec un obstacle, soit se faire à nouveau piéger dès le départ. On peut, bien entendu, imaginer tous les cas de figures, du plus simple au plus compliqué. Les expériences de traçage réalisées avec deux traceurs, l'un chimique, l'autre bactériologique, montrent que le premier va plus vite que le second, car il n'est pas retenu en cours de route par fixation sur les grains (tout au moins en majeure partie). Evidemment, si l'on tient compte de l'existence des matières en suspension, le temps de transit est encore plus long et les phénomènes plus nombreux et plus compliqués.

Les analyses bactériologiques effectuées sur des eaux alluviales montrent que le sable alluvial décrit ci-dessus est un filtre excellent : pendant 18 ans, j'ai régulièrement analysé au moins une fois par semaine les eaux des 11 puits (25 000 m³/j) des captages alluviaux de la ville de Paris entre Sens et Pont-sur-Yonne. Sauf une fois, je n'ai jamais trouvé de bactéries témoins de contamination dans les eaux (un peu plus de 1000 litres au total) analysées. La contamination observée a, bien entendu, donné lieu à une enquête. C'était en 1956, lors de la grande crue. Le champ captant était submergé par plus de 1 mètre d'eau limoneuse. Dix puits ont continué à fournir de l'eau irréprochable malgré la crue. Une très légère défektivité du joint d'étanchéité du couvercle du 11ème puits a permis une infiltration directe de l'eau de la rivière. Ces puits n'avaient pas été prévus pour fonctionner avec 1 mètre d'eau de crue au-dessus de leur capot. La mince couche de sable (2 m environ) en-dessous de la terre arable jusqu'aux premières lumières d'alimentation avait suffi à arrêter *Clostridium sulfito-réducteurs*, streptocoques et coliformes fécaux ou non.

Mais il ne faudrait pas croire que ces eaux sont sans bactéries : elles ont été très bien filtrées, mais elles recèlent encore quelques germes banaux. Il n'y a là rien de paradoxal : aucune eau naturelle n'est microbiologiquement pure si sa composition ne la rend pas toxique (et encore ?) ou sa température excessive : les eaux des Pyrénées dont certaines émergent à des températures de l'ordre de 70°C véhiculent des thiobactéries, organismes intermédiaires entre algues et bactéries.

Revenons à nos germes banaux. Beaucoup ont un temps de vie très nettement supérieur à celui des coliformes et autres témoins de contamination. En outre, ils peuvent vivre aux dépens des traces de matières organiques contenues dans l'eau. Eu égard à la lenteur de la circulation des microorganismes dans les nappes alluviales dotées d'un bon pouvoir filtrant, on admet que le plus souvent les bactéries qui en sortent ne sont pas celles qui y sont entrées, mais leurs descendantes.

Par contre, les bactéries pathogènes, les germes témoins de contamination et nombre de bactéries banales sont incapables de se nourrir des matières organiques de l'eau. Elles ne se reproduisent donc pas dans l'eau et y périssent plus ou moins rapidement. Mais, entendons-nous bien, je parle des bactéries qui voyagent dans l'eau claire et non pas dans les eaux usées ou résiduaires.

EXPERIMENTATION DANS DIVERS SOLS

Les notions exprimées ci-dessus résultent de constatations, non pas d'expériences entreprises pour déterminer les modes de propagation. Mais elles ont, semble-t-il guidé les chercheurs qui ont entrepris des études sur ce sujet, car il faut bien le dire "il est bien rare qu'on entreprenne des expériences sans avoir déjà des idées : il s'agit de les vérifier, de les confirmer ou de les infirmer. Comment pourrait-on élaborer un programme si l'on n'avait pas déjà des idées"?

Donc, en fonction de ce que l'expérience et le raisonnement avaient enseigné, on est passé à la phase de vérification. Mais cette étude n'en est qu'à ses débuts et peu d'expériences ont fait l'objet de publications. En France, une étude réalisée à la demande du Ministère de la Santé par le "Groupe d'études et de recherches de microbiologie de l'environnement*" a porté sur la contamination des sols par l'épandage d'eaux usées.

Les sols sont des sols reconstitués à partir de :

- sable de Camargue,
- terre provenant d'un champ cultivé (???),
- alluvions grossières de la Durance (semble mal choisi).

Trois types de bactéries ont été choisies. Elles sont, en principe, toujours présentes dans les effluents non industriels :

- Escherichia coli (parfois on s'est contenté de rechercher les coliformes fécaux, sans pousser plus loin l'identification),
- Pseudomonas aeruginosa,
- Chromobacterium violaceum.

Du point de vue résistance dans l'eau, chromobacterium semble assez fragile, E. coli et les autres coliformes fécaux sont moyennement résistants et pseudomonas aeruginosa présente une très grande résistance. On peut donc dire que de ce point de vue les bactéries ont été bien choisies.

* document disponible à la documentation du département EAU.

RESUME (bactéries)

Les bactéries se déplacent dans le sol grâce à la circulation des eaux. Elles cheminent soit seules, soit, bien plus souvent, avec les particules en suspension sur lesquelles elles sont fixées. Certaines bactéries, capables de vivre aux dépens de la matière organique de l'eau peuvent s'y reproduire et par conséquent être présentes quels que soient la maille et le temps de filtration. Au contraire, beaucoup d'autres périssent au bout d'un temps plus ou moins long. En particulier les bactéries témoins de contamination fécale ne peuvent pratiquement pas survivre au-delà de 2 à 4 mois (laps de temps bien souvent nettement inférieur dans la pratique) et les bactéries vectrices des maladies transmissibles par l'eau encore moins longtemps. Ceci explique que, sauf cas d'espèce, les eaux des terrains perméables en petit sont de bonne qualité bactériologique alors que celles du karst sont très souvent très contaminées et doivent être considérées comme dangereuses si elles n'ont pas subi un traitement désinfectant.

4. Les virus

Connus depuis bien moins longtemps que les bactéries, ils sont aussi beaucoup moins bien étudiés en raison des difficultés que présente leur étude : d'une part leur taille bien plus faible rend difficile l'observation (un microscope électronique coûte tellement plus cher que plusieurs microscopes classiques !), mais surtout à cause des difficultés de culture : il n'est pas question de leur "faire la soupe", comme pour les bactéries. Les virus animaux ne se développent que sur les cellules des tissus qu'ils parasitent (rein de singe pour polio-virus), ceux des végétaux supérieurs sur le végétal même qu'ils sont capables d'infecter (mosaïque du tabac), ceux des végétaux inférieurs (bactériophages) sur des cultures des microorganismes qu'ils lysent (phage coli, phage dysentérique...), ce qui est déjà bien plus facile.

Dans ces conditions on comprend qu'il n'y ait guère d'études poussées sur les virus qui nous intéressent ici, les virus animaux, vecteurs de beaucoup d'infections qui nous menacent, tout au moins quant à leur présence et leurs modes de transport dans les eaux souterraines. En ce qui concerne les bactériophages, nous verrons qu'ils sont couramment recherchés dans ces eaux.

Les études sur le comportement des virus dans les eaux de surface, les effluents, les lagunes sont, elles, nombreuses. J'ai pu, néanmoins, trouver une étude anglaise de 1981, se référant à un très grand nombre d'auteurs ayant abordé notre sujet (pas bien loin, puisqu'on ne parle de pénétration qu'à très faibles profondeurs - inférieures à 50 cm - et encore s'agit-il d'épandage). Cependant on peut dire que dans les eaux souterraines les virus voyagent comme les bactéries à la durée du temps de trajet près : on sait maintenant, en effet, que la différence de propagation entre traceur chimique et traceur microbiologique (viral) est bien bien moins grande que pour les bactéries. Mais on doit reconnaître que les traceurs étaient des bactériophages. Vraisemblablement ils se comportent comme des virus animaux, mais il est difficile de l'affirmer.

Les virus sont, eux aussi, porteurs de charges et peuvent se fixer sur des supports minéraux. Cette propriété a été utilisée par R. VILAGINES, mon successeur à la tête du Service de contrôle des eaux de Paris pour l'extraction des virus des eaux.

On conçoit donc que, comme les bactéries, les virus se fixeront sur les matières en suspension, les grains du sol, puis migreront avec les déplacements de l'eau, mais, encore une fois, plus rapidement que les bactéries.

Là aussi, ce qui comportera avant tout, c'est la capacité de survie : un virus du type bactériophage survivra bien plus longtemps qu'un polio-virus. D'autres facteurs ont, cependant, une certaine importance : le type de sol, la minéralisation de l'eau, sa plus ou moins grande pollution. Mais deux facteurs dominant : la température et l'humidité. A 4°C, le nombre de polio-virus qui survivent au bout de 84 jours dans un sable argileux (non défini) est réduit de 90 % par rapport à la teneur initiale et de près de 100 % à 20°C.

Les temps de survie sont très variables d'un virus à un autre. Les entéro-virus peuvent survivre plus longtemps dans les eaux souterraines que dans celles de surface à cause de la température plus constante et surtout plus basse la majeure partie de l'année et aussi à cause de l'absence de lumière (le rayonnement ultra-violet est doué d'un grand pouvoir virucide). Il semble aussi que les temps de survie sont fonction des études des auteurs : l'un indique que les entéro-virus peuvent survivre plus de 28 jours alors qu'un autre parle de survie supérieure à 175 jours.

Une chose est certaine : les virus existent dans les eaux souterraines, ils s'y déplacent plus rapidement que les bactéries. En général leur temps de survie est plus long que celui des bactéries. Une expérience effectuée en Israël montre que dans 12 échantillons sur 100 on a isolé des entérovirus en l'absence de coliformes et streptocoques fécaux. Donc les virus avaient survécu plus longtemps. La proportion (12 %) est toutefois faible et ne peut guère être pris en compte. Par contre il est certain que les bactériophages ont, dans les eaux souterraines, un temps de survie nettement supérieur à celui des bactéries qu'ils lysent, puisque dans de nombreux cas on décèle des phages coli, voire des phages typhiques en l'absence de ces bactéries, ce qui permet de considérer comme suspects de contamination les eaux où ils ont été mis en évidence, puisque leur présence indique que les bactéries existaient.

* * *

En ce qui concerne les virus, on pourra consulter la publication anglaise :

BUREAU OF HYGIENE AND TROPICAL DISEASES
TROPICAL DISEASES BULLETIN, vol. 78, n° 3, 1981
Enterovirus in the Environment, pp; 186 à 230.

RÉGLEMENTATION EN MATIÈRE D'EAUX THERMOMINÉRALES

* * *

Dr. NINARD

Membre du Conseil Supérieur d'Hydroclimatisme

MODIFICATIONS A APPORTER A LA REGLEMENTATION ACTUELLE DES EAUX MINERALES POUR SON ACTUALISATION *(1)

B. NINARD

Ancien Médecin-Directeur du Département des Etudes
Hydrologiques et Thermales du
Laboratoire National de la Santé
. Paris

La réglementation actuellement applicable aux eaux minérales est essentiellement constituée par le Décret n° 57.404 du 28 mars 1957 portant règlement d'administration publique sur la police et la surveillance des eaux minérales (2).

Depuis sa promulgation,

- l'évolution, en ce qui concerne ces eaux :
 - de nos connaissances sur leurs caractéristiques
 - de leurs indications
 - des utilisations qui en sont faites aujourd'hui,
- la publication (le 15 juillet 1980) d'une directive de la C.E.E. en matière d'eau minérale (applicable à brève échéance maintenant) (3)

ont rendu inadaptées ou caduques la plupart des dispositions de ce texte.

Nous examinerons donc en détail, en vue de sa refonte éventuelle, ce qu'il serait nécessaire de lui apporter :

- comme corrections
- comme compléments.

Une longue pratique professionnelle, à un poste où nous pouvions, mieux que quiconque, juger de ces questions, nous a permis d'apprécier le caractère indispensable de cette actualisation. Bien entendu ces conclusions n'engageant que

* Cet article comporte 24 notes infra-paginales de l'auteur, lesquelles sont reportées en fin de texte du n° 1 au n° 24.

leur auteur pourront très bien ne pas être suivies ou être aménagées en raison de considérations d'intérêt général ou d'opportunité.

I - LES CORRECTIONS

Elles s'avèrent nécessaires en ce qui concerne :

- les interventions de l'Académie de Médecine d'une part,
- les diverses autorisations par arrêté du Ministre de la Santé, d'autre part.

I - 1 - EN CE QUI CONCERNE LES INTERVENTIONS DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

I - 1 - 1 - L'avis préalable de cette savante assemblée est actuellement requis pour l'eau minérale de la source faisant l'objet de la demande, en ce qui concerne les autorisations d'exploitation de l'eau :

- comme eau minérale telle qu'elle est à l'émergence.

Cette autorisation de base sine qua non, constitue la reconnaissance administrative de la qualité de l'eau minérale, cet avis de l'Académie de Médecine en constituant la reconnaissance scientifique quand il est favorable (4).

- après transport à distance par canalisation, traitement et mélange.

Ces dernières autorisations résultant uniquement du constat d'un «état de fait», sans interprétation possible (les caractéristiques de l'eau ne devant pas avoir été modifiées par ces diverses opérations), l'opportunité de cette décision pourrait donc à la rigueur fort bien être laissée à l'initiative de l'Administration. La consultation de l'Académie dans ce cas, ne faisant qu'alourdir la procédure.

I - 1 - 2 - En revanche paradoxalement, l'avis de l'Académie n'est pas exigé en ce qui concerne les utilisations de ces eaux, cependant susceptibles d'avoir des répercussions sur la santé du sujet qui en fait usage

- que ce soit pour les «utilisations immédiates» à la station, pour lesquelles aucune autorisation n'a été prévue (5).

- que ce soit pour l'utilisation retardée après conditionnement pour «mise en conserve» exigeant bien une autorisation, mais accordée, sans consultation préalable de l'Académie uniquement sur décision d'autorités administratives (6).

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINÉRALES

I - 2 - 3 - En résumé, il serait donc souhaitable à l'avenir que les avis de l'Académie soient demandés et donnés uniquement en vue des seules autorisations :

- à l'émergence d'une part,
- à l'utilisation d'autre part.

Dans ce dernier cas, l'avis donné devrait obligatoirement pour chaque eau :

- en vue des utilisations immédiates à la station de cure, fixer de façon aussi précise que possible :

- ses indications générales, (affections dans lesquelles elle pourra être utilisée)
- les techniques de cure à utiliser.

Un tel avis qualifié, objectif et impartial, permettrait alors d'échapper au véritable «marchandage de tapis» qui se pratique dans autres instances «paritaires» intervenant dans la fixation des indications et procédés de cure.

- en vue de l'utilisation retardée après conditionnement, apprécier l'opportunité de ce conditionnement, fixer les mentions qui, le cas échéant, seraient exclusivement et obligatoirement portées sur l'étiquette pour ce qui concerne les indications, les contre-indications et la posologie.

A propos des adjonctions à faire à la réglementation nous examinerons plus loin, les modalités qu'il nous semble souhaitable de prévoir pour la réglementation de ces diverses utilisations.

I - 2 - EN CE QUI CONCERNE LES AUTORISATIONS

Deux dispositions seraient à notre avis à modifier :

- la durée de validité des autorisations,
- les conditions de délivrance de l'autorisation de transport à distance.

I - 2 - 1 - Durée de validité des opérations :

La limitation trentenaire de cette validité, qui, depuis le 1er janvier 1900 figure actuellement, uniquement dans chaque arrêté d'autorisation nouvelle,

à la suite d'un voeu de l'Académie de Médecine devrait être :

- mentionnée dans le texte général de réglementation des eaux minérales,
- étendue aux sources bénéficiant encore actuellement d'une «autorisation perpétuelle» (accordée antérieurement au 1er janvier 1900).

A cette fin, il faudrait pour ces dernières sources :

- procéder à une révision de leur situation
- accorder la nouvelle autorisation à révision trentenaire seulement à celles le méritant.

Il devrait donc être promulgué à cet effet un texte général incluant l'obligation pour les exploitants de fournir la preuve de la nature minérale (c'est à dire de l'intérêt médical de leur eau (avant 1900 beaucoup, ayant été classées minérales sans grande justification, avec de nombreuses indications fixées de façon qui peuvent être considérées aujourd'hui comme fantaisistes).

1 - 2 - 2 - Conditions de délivrance de l'autorisation de transport à distance

- En cas de transport à distance, il est particulièrement difficile, pour ne pas dire matériellement impossible, d'appliquer la réglementation dans son état actuel :

Celle-ci prévoit en effet, que pour pouvoir accorder cette autorisation :

- outre un accord de principe préalable d'effectuer les travaux formulé par l'Académie de Médecine (7),
- il doit être procédé à des analyses comparatives aux deux extrémités du système (émergence et point distal d'utilisation) qui doivent donner des résultats similaires.

- Pour ce faire, il faudrait évidemment que tout l'équipement de l'établissement soit achevé.

Or, avant d'engager les frais importants de construire celui-ci, il est bien normal que l'exploitant tienne à être sûr de pouvoir obtenir cette autorisation.

Dans des conditions actuelles de la législation, le problème reste donc la plupart du temps tout à fait insoluble.

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINERALES

Il serait suffisant à mon avis pour ces essais, que les conduites d'adduction définitives ou même simplement provisoires (expérimentales) soient posées jusqu'à ce qui sera ce point distal, réalisant les conditions de ce que sera la réalité (même longueur, même profil en long, mêmes diamètres, même matière), pour vérifier dans des conditions à peu près similaires (tant mieux, si moins idéales, cela rendrait l'épreuve plus sévère) que le résultat final et bien conforme à ce qu'exige la réglementation. C'est d'ailleurs la procédure qui est généralement adoptée dès maintenant, (ce n'est pas quelques mètres de canalisations qui risquent de modifier le résultat lorsque la conduite d'adduction est relativement importante avant l'entrée à l'établissement).

II - COMPLEMENTS

Les compléments qu'il nous paraît indispensable d'apporter à la réglementation actuelle des eaux minérales peuvent être répartis sous deux rubriques :

- Définition officielle des eaux minérales
- Intégration, dans les textes, de clauses qui y ont été omises, celles-ci étant les suivantes :
 - Obligation de fournir à l'appui de toute demande d'autorisation un dossier de pièces justificatives de la correspondance de l'eau en question aux caractéristiques requises de l'eau minérale, et aux propriétés qui lui ont été attribuées.
 - Autorisation de stockage de l'eau minérale.
 - Autorisation de traitements non prévus, qu'il est nécessaire de faire subir à l'eau minérale en vue de certaines utilisations.
 - Limitation de diverses utilisations des eaux minérales qui devront être l'objet d'une autorisation pour celles pour lesquelles elle n'a pas été prévue.

Nous allons examiner successivement ces divers points.

II - 1 - DÉFINITION DES EAUX MINÉRALES

La définition des eaux minérales proposée par la Directive de la CEE (8), à la fois chèvre et chou, (pour permettre à chacun des divers pays membres du

Marché commun de conserver la sienne propre) est tellement extensive qu'elle en est dépourvue de signification. Beaucoup d'eau de robinet pourraient, de par leur origine (eaux de source non traitées) et leur composition, prétendre - si elles étaient conditionnées et classées (arbitrairement) dans cette catégorie - être des eaux minérales, suivant les critères retenus en Allemagne pour cette classification.

Elle ne concerne que des «eaux conditionnées» : permettant en effet d'une part de classer et d'admettre parmi celles-ci, des eaux qui en France ne seraient que des eaux de source, éliminant d'autre part certaines de nos eaux classées minérales dont la majorité ne sont d'ailleurs pas embouteillées (car cette réglementation tend à appliquer à ces eaux les critères des eaux potables.)

Quoi qu'il en soit et aussi paradoxal que cela puisse paraître, en France il n'existe pas de définition officielle des eaux minérales,

- si ce n'est celle contenue dans le Décret du 12 Janvier 1905, portant règlement d'administration publique, pour l'application de la loi du 1er août 1905, sur la Répression des Fraudes, en ce qui concerne le commerce des eaux minérales naturelles et artificielles et des eaux de boisson (dont le ministre de la Santé de l'époque avait d'ailleurs été cosignataire) (9),

- mais qui est :
- d'une part incomplète : n'envisageant qu'un des aspects de la question celui des eaux minérales conditionnées.
 - d'autre part inexacte : une eau minérale n'étant pas forcément, sinon douée, du moins utilisée en raison de propriétés thérapeutiques sensu stricto ; elle peut être utilisée uniquement en raison de la stabilité sur laquelle le consommateur peut compter, en diététique, d'une composition soit fixe (préparation des biberons) soit particulière (totalement désodée par exemple dans un but préventif), quelquefois même dans un but diagnostic (eau fortement carbo-gazeuse pour créer des contrastes radiologiques).

Cette situation est d'autant plus paradoxale, qu'il s'agit certainement en France, du produit le plus réglementé sur le plan de son exploitation et de son contrôle.

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINÉRALES

Parmi celles proposées, la définition qui me parait la meilleure est certainement celle due au Professeur Achard (qui l'avait lancée au cours d'une séance à l'Académie de Médecine) dont nous sommes reconnaissant à notre Maître le Professeur Justin-Besançon de nous l'avoir signalé. En voici l'énoncé :

Les « eaux minérales » sont des eaux « d'intérêt médical »

Ayant l'avantage d'être très simple et très large, elle nous semble aujourd'hui la plus conforme à la situation, correspondant exactement à l'état actuel des eaux minérales en France.

Cette définition aurait d'ailleurs, en plus, l'avantage de permettre d'intégrer dans un même groupe, à la fois :

- les eaux de source dont l'utilisation thérapeutique constitue la crénothérapie,
- l'eau de mer, eau la plus abondante à utilisation thérapeutique dont l'emploi constitue la thalassothérapie.

ce qui serait hautement souhaitable, ne serait-ce que si cela pouvait faciliter que soient imposés à la dernière, des obligations d'exploitation et de contrôle similaires à celles actuellement requises pour les eaux de source, pour être classées minérales par une autorisation accordée à l'échelon central, qui éviterait des différences suivant les régions.

Nous proposerions donc :

- comme article 1 d'une refonte du décret du 28 mars 1957, le texte suivant :

La dénomination d'eaux (de sources) minérales (10) naturelles est réservée aux eaux naturelles

- d'intérêt médical (11)
- issue de sources, naturelles ou forées (12), à chacune desquelles sera attribuée un nom propre...

- dans un arrêté d'application de ce décret, de préciser en outre que les eaux pour pouvoir être qualifiées de minérales doivent remplir les conditions suivantes :

B. MINARD

- être dépourvues de nocivité :
 - exemptes de toxicité dans leurs conditions d'utilisation (qui doivent de ce fait être précisées ainsi que leur indication, comme nous le verrons plus loin).
 - microbiologiquement pures (13) à l'état naturel,

- avoir des caractéristiques :
 - stables (14) à l'émergence (15) (qualitativement et quantitativement)(dans les limites fixées par les résultats des analyses du Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National qui servent de référence).

- ayant fait l'objet :
 - d'une part à l'émergence
 - d'autre part à l'utilisation :
 - soit immédiate : à la station de cure
 - soit retardée : après conditionnement en récipients pour la conserve.

- de deux actes successifs :
 - l'un de reconnaissance scientifique de ses caractéristiques et des propriétés qu'elles conditionnent : par avis favorable de l'Académie de Médecine,
 - l'autre d'Autorisation administrative d'exploitation (attribuant à l'eau de la source le statut juridique d'eau minérale).
 - * conférée par arrêté du Ministre chargé de la Santé Publique
 - * valide pendant une durée de trente ans sauf modification :
 - des caractéristiques de la source
 - des conditions d'exploitation et d'utilisation
 - * renouvelable en cas de péremption ou de modifications après nouvel avis favorable de l'Académie Nationale de Médecine.

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINERALES

Quant aux manipulations nécessitées pour l'exploitation de l'eau

- aucune de celles susceptibles d'entraîner des modifications de ses caractéristiques ne pourra être effectuée si celles-ci doivent se répercuter sur son activité.

- toutes les autres doivent être autorisées par arrêté du Ministre chargé de la Santé (après vérification de l'absence de modifications des caractéristiques, et par suite d'activité de l'eau, par le Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National).

Ces autorisations étant limitées aux manipulations suivantes :

- transport à distance effectué exclusivement par canalisation (excepté bien entendu le conditionnement en récipients précédemment mentionné).

- stockage

- mélange à l'eau d'une autre émergence (vérifiée de même origine géologique et par suite de même composition chimique).

- traitements dont les deux catégories seulement sont tolérées en France (16).

- modifications thermiques :

- seul le réchauffage est susceptible d'autorisation, seulement s'il ne modifie pas la composition chimique de l'eau.

- quant au refroidissement :

- celui à température ambiante étant un phénomène naturel, n'a pas besoin d'être autorisé,

- à plus forte raison, celui à une température d'utilisation supérieure à la précédente, à la seule condition que ces modifications thermiques soient obtenues :

- non par mélange avec une eau différente (réchauffée ou refroidie suivant le cas)

- mais par échangeur thermique (à l'abri de l'air) sur totalité ou partie de l'eau minérale.

- déferrisation :

- obtenue par dégazage préalable, floculation du fer ferreux, décantation, regazéification avec le gaz original de l'eau dont l'exploitation a été autorisée à l'émergence, à la concentration (déterminée pour la source, ou

du total des concentrations du contenu de chaque source en cas de mélange)

- ne pouvant être autorisée que si cette déterrioration n'entraîne pas d'autres composants de l'eau dans des proportions telles que son activité soit modifiée.

III - INTÉGRATION DE CLAUSES OMISES DANS LA RÉGLEMENTATION ACTUELLE

III - 1 - OBLIGATION DE FOURNIR A L'APPUI DE TOUTE DEMANDE D'AUTORISATION UN DOSSIER DE PIÈCES JUSTIFICATIVES DE LA CORRESPONDANCE DE L'EAU AUX CARACTÉRISTIQUES REQUISES DE L'EAU MINÉRALE :

L'Académie de Médecine basant la reconnaissance d'une eau minérale exclusivement sur son intérêt médical, (résultant évidemment de ses caractéristiques traduites par les analyses, physiques, chimique physico-chimiques, biologiques et pharmacodynamiques) s'appuie donc essentiellement sur des résultats qui devraient être, dans la mesure du possible statistiquement significatifs :

- essentiellement d'observations cliniques et des examens complémentaires chez l'homme (sain et malade),
- accessoirement d'expérimentations pharmacodynamiques chez les animaux (car il est souvent bien difficile et hasardeux d'extrapoler de l'animal d'expérience à l'homme).

Or, la fourniture de tels résultats (17),

- n'est nulle part mentionnée dans les textes de réglementation,
- mais en fait le rapporteur de la Commission des eaux minérales de l'Académie de Médecine a toujours la possibilité de les exiger

Il devrait donc être prévu qu'obligatoirement :

- soit joint à chaque demande d'autorisation un dossier de publications sérieuses de ces résultats (17) (et non des assertions ou même des certificats médicaux dont beaucoup trahissent la naïveté ou la complaisance)
- soit effectuée la vérification des assertions de ce dossier par le Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National (mais encore faudrait-il lui en donner les moyens).

III - 2 - AUTORISATION DE STOCKAGE

Il est toujours préférable que l'eau minérale soit amenée directement du griffon à l'utilisation, mais en ce cas de faible débit de la source, il est parfois indispensable de la stocker. Ce stockage devrait être aussi court que possible. Actuellement ce stockage des eaux minérales est souvent réalisé dans des conditions très défectueuses, en particulier dans le cas où, s'agissant d'eaux contenant des composants volatils (surtout si elles sont chaudes), elles sont stockées :

- dans des réservoirs à l'air libre,
- beaucoup trop longtemps

Cela malgré les dispositions de la circulaire du 4 décembre 1894 (du Président du Conseil, Ministre de l'Intérieur et des Cultes aux Préfets, sur l'autorisation d'exploitation des Sources minérales et des justifications à fournir par les intéressés) toujours en vigueur, qui à son paragraphe 3, prévoit que :

- d'une part : «seraient seuls tolérés, les réservoirs d'amenée hermétiquement clos, recueillant directement l'eau et les gaz à la sortie de la colonne ascendante et faisant, en quelque sorte, partie intégrante du captage » (ce qui est une mauvaise rédaction, car on ne voit pas comment un réservoir hermétiquement clos pourrait se remplir et se vider)

- d'autre part : « l'eau ne devra pas séjourner plus de vingt quatre heures dans ces réservoirs »

Dans un tel cas, une autorisation devrait être instituée, garantissant que le stockage est bien effectué en réservoir :

- de volume relativement réduit (au besoin en prévoir plusieurs en parallèles qui seront successivement utilisés, l'un se vidant pendant que l'autre se remplit de façon à limiter au minimum le stockage),

- éventuellement réalisant un «système gazomètre à cloche» ou «à enceinte double, (l'extérieur rigide, l'intérieur souple)», de façon à éviter tout contact avec l'atmosphère, pour ne pas permettre :

- le dégagement de certains composants (volatils)
- l'oxydation de certains autres.

III - 3 - LIMITATION DES UTILISATIONS DES EAUX MINÉRALES QUI DEVRONT ÊTRE AUTORISÉES

Si dans le passé, une certaine surveillance était exercée sur l'usage des eaux minérales,

- en application d'un arrêt du Conseil d'Etat du 5 mai 1781, par les Intendants des eaux
- en application d'un arrêt du Directoire exécutif du 29 floréal an VII, par les Officiers de Santé, Inspecteurs en Chef,

par la suite, d'autres textes modifièrent la situation dans le sens d'une libéralisation qui est unanimement jugée excessive par les spécialistes.

D'une part l'Ordonnance royale du 18 juin 1823 enjoignit aux inspecteurs de ne mettre obstacle à la liberté qu'ont les malades de suivre les prescriptions de leurs propres médecins ou chirurgiens et même d'être accompagnées par eux s'ils le demandait (rédaction qui laisse entendre, remarquons le, que les malades ne feront usage des eaux que sur les conseils de leurs médecins).

D'autre part le Décret du 28 janvier 1860 (dit Décret ROUHER) (18) constitua une innovation par son article 15, édictant que «l'usage des eaux n'est subordonné à aucune permission et aucune ordonnance des médecins».

Actuellement pour les eaux minérales, il n'existe aucun texte de réglementation des usages immédiats à la station thermale. Les seuls textes existants concernent exclusivement l'utilisation retardée après conditionnement pour la conserve (19).

Ce n'est pas pourtant faute de ce que depuis la parution de ces textes, les responsables,

- tant de la Santé, (en raison des dangers, liés à l'abus ou l'utilisation injustifiée des eaux minérales,)
- que des services financiers, (en raison des dépenses budgétaires inutiles résultant de certaines)

ne se soient émus de cette carence et n'aient réclamé la promulgation de textes garantissant le bien fondé de ces utilisations en établissant leur contrôle (au moyen d'autorisations et de mesures de surveillance), contrôle qui se manifestera évidemment dans le sens d'une limitation que nous allons maintenant envisager.

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINÉRALES

Nous examinerons donc successivement :

- la limitation des usages immédiats de l'eau minérale à la station en cure thermale.
- la limitation des usages retardés de l'eau minérale conditionnée pour la boisson.

III - 3 - 1 - Limitation de l'utilisation immédiate des eaux minérales (à la station de cure) :

Ces utilisations se faisant normalement sous le contrôle d'un médecin thermaliste spécialisé qui a pu redresser des erreurs d'aiguillage, ne posent généralement pas de problèmes ; il serait bon toutefois que soient bien précisées pour l'eau de chaque source :

- ses différentes indications médicales qui sont justifiées
- les diverses techniques de cure ;

cela par une autorité scientifique incontestable, en l'occurrence l'Académie Nationale de Médecine.

Si dans certains pays étrangers, généralement parce qu'il n'en existe qu'un seul type, la même eau :

- est appliquée à n'importe quel domaine de la pathologie,
- est utilisée avec n'importe quelle technique d'application,

compte tenu de la diversité, la France avait pu se payer le luxe de spécialiser ses stations dans l'intérêt des malades qui y sont soignés (20).
Quoi qu'il en soit, aujourd'hui encore,

- bien que «de facto» une limitation de l'usage des eaux minérales a été introduite mais uniquement pour le curiste assuré social, du fait de la nécessité d'un accord préalable de la part du médecin conseil,
- «de jure» tout au moins la liberté d'usage des eaux minérales reste absolue.

Il serait donc souhaitable à l'avenir que comme le réclament les médecins thermalistes :

- sinon qu'aucune cure ne puisse se faire sans ordonnance médicale,
- du moins que le curiste soit averti des dangers qu'il peut encourir en l'effectuant si elle lui est contre indiquée.

B. NINARD

III - 3 - 2 - Limitation de l'usage des eaux minérales à utilisation retardée :
eaux conditionnées pour la boisson en conserve.

III - 3 - 2 - 1 - Eaux minérales utilisées telles quelles :

Si l'on admet que les eaux minérales, en raison de leurs caractéristiques, ont une action physiologique, il est évident que dans certains cas, elles peuvent présenter des contre-indications.

La première contre-indication venant à l'esprit, est celle résultant de la température de l'eau qui ne pourra être utilisée si celle-ci est trop chaude, que ce soit d'ailleurs «intus» ou même «extra».

La limitation dans ce cas, se trouve obligatoirement réalisée pour permettre l'utilisation, en laissant ou faisant refroidir l'eau (dans des conditions fixées par l'autorisation d'exploitation au titre du traitement lorsque cela est nécessaire).

Par ailleurs, d'autres contre-indications, peuvent relever de sa composition.

Il est évident que si l'eau, s'avérait dangereuse par présence d'une substance naturelle toxique (arsenic par exemple),

- elle ne pourrait évidemment recevoir d'autorisation de conditionnement pour la vente libre,

- elle pourrait par contre rentrer dans le cadre des produits,

- dont la vente est réservée au commerce pharmaceutique (un vœu de l'Académie de Médecine pouvant être émis en ce sens)

- avec obligation d'une ordonnance médicale pour sa délivrance.

En dehors de ce cas exclusif, une eau minérale peut,

- soit répondre aux critères réglementaires de potabilité en même temps que présenter un intérêt médical résultant de sa composition particulière (absence quasi totale de sodium par exemple, la faisant particulièrement convenir aux régimes désodés).

Dans cette éventualité, une telle eau peut évidemment être consommée par un sujet quelconque. Sain ou malade sans autre limitation que la quantité.

MODIFICATIONS A LA RÉGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINÉRALES

- soit, bien que ne présentant pas les critères réglementaires de potabilité,

- être malgré cela, tolérée par un sujet sain, sans dommage,

- mais présenter des inconvénients exclusivement pour un malade.

Ce cas est représenté par une eau contenant une concentration élevée en sels de sodium pouvant être nuisible à certains malades (par exemple atteints de néphrite ou d'hypertension ou sous traitement cortisonique).

Faut-il de ce fait ?

- Soit prévoir une limitation généralisée autoritaire de la distribution en réservant sa délivrance aux officines pharmaceutiques, en exigeant pour cette délivrance une ordonnance médicale ?

- Soit envisager, comme cela a été proposé, de diviser les eaux minérales en deux catégories :

- eaux minérales ou eaux minérales de cure,

- eaux de table ou eaux minérales de table.

Il ne semble tout de même pas qu'il faille aller jusque là pour des eaux pouvant présenter ces dangers ou ces inconvénients uniquement pour des malades :

- d'abord parce que du fait que le plus souvent (étant donné leur concentration saline élevée et même simplement leur teneur élevée en gaz carbonique pour lesquelles on les recherche surtout) elles ne sont généralement consommées que de façon intermittente.

- ensuite, parce que ces eaux entrent dans le domaine de contreindications formelles, ou de simples restrictions pour ces malades, (au même titre que celles du sel pour les malades soumis au régime déchloruré, ou des hydrates de carbone pour les diabétiques) cela constituerait une faute grave de la part du médecin traitant de ne pas les proscrire dans ses prescriptions.

Aucune tentative de limitation n'a d'ailleurs abouti jusqu'à lors, dans ce cas, en France.

La question a pourtant, été maintes fois posée, en particulier par le Ministère de la Santé au Conseil Supérieur d'Hygiène publique, au Conseil supérieur du

thermalisme et du climatisme et en dernier ressort, à l'Académie nationale de Médecine.

Nous avons relevé dans les publications de cette dernière un grand nombre de références le prouvant.

Le Professeur MERKLEN, Président et Rapporteur de la Commission des Eaux minérales, dans une séance récente de l'Académie, consultée par le Ministre sur les questions posées par la publicité pour les eaux bicarbonatées sodiques, a toutefois proposé de voter (ce qui a été fait) les vœux suivants qui paraissent très sages et amplement suffisants :

« Les eaux bicarbonatées sodiques (21) embouteillées devraient obligatoirement porter parfaitement lisibles sur leur étiquette, les deux mentions :

- «contre-indiquée en cas de restriction d'apport sodé alimentaire».
- «à n'utiliser en quantité élevée et prolongée qu'après avis médical».

En conclusion, les eaux minérales françaises ne devraient voir leur embouteillage ou conditionnement autorisé, que par arrêté du Ministre chargé de la santé publique pris après avis de l'Académie de Médecine.

Cet arrêté pourrait indiquer toute restriction de publicité nécessitée par le souci du maintien de la santé publique et toute nécessité de précaution éventuelle d'utilisation à porter sur l'étiquette.

Toute eau minérale d'origine étrangère devrait bien entendu être assujettie aux mêmes règles pour être autorisée à pénétrer en France ».

III - 3 - 2 - 2 - Eaux minérales utilisées pour la préparation d'eaux gazeuses et de boissons additionnées de divers autres produits (boissons édulcorées, jus de fruits, etc...)

- Question de gazéification : elle s'est posée la première, à l'occasion, d'une pétition faite par le propriétaire de la source d'eau minérale sulfatée calcique ferrugineuse de Passy, non gazeuse, autorisée en 1851, le Ministre de l'hygiène et le Ministre de l'Agriculture ont prié l'Académie de Médecine de statuer sur la question de la gazéification des eaux minérales.

Saisie une nouvelle fois, la Commission des eaux minérales rappelle à l'Académie le 30 avril 1935 que :

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINERALES

« à plusieurs reprises, à la suite d'avis émis par la dite commission, elle a décidé de s'opposer à toutes manipulations tendant à dénaturer la composition d'une eau minérale naturelle, notamment par adjonction d'acide carbonique». «votre commission n'a pas changé d'opinion à ce sujet, et elle vous propose de répondre par un avis défavorable».

Ces conclusions de la Commission ont été adoptées.

La Réglementation (22) interdit en fait la gazéification des eaux minérales qui n'est pas prévue par le décret du 28 mars 1957 comme susceptible d'être réalisée

- Question de l'addition de produits divers : les eaux minérales étant, comme nous l'avons vu, d'intérêt médical, pendant longtemps, il n'a pas été question (à l'exception de leur utilisation pour la préparation de médicaments) de les additionner d'une quelconque substance étrangère : sucre, aromate, jus de fruit.

- La première mention dans un texte officiel de l'emploi des eaux minérales dans la préparation des boissons édulcorées apparaît dans la circulaire 148 du service de la répression des fraudes du 14 décembre 1938 (parue au J.O. du 16 et 18 décembre 1938, et cela par erreur). En effet le 2 juin 1965 répondant à Monsieur le Président de la Chambre syndicale de Commerce des Eaux minérales, le Chef de service de la Répression des Fraudes précisait à propos de cette circulaire :

«Il était fait état, dans cette circulaire, sous la rubrique «Boissons gazeuses» de l'étiquetage des sodas préparés avec des eaux minérales.

Mais à la suite de la position prise par le Ministère de la Santé publique et de l'Académie de Médecine, depuis sa séance du 29 juin 1943 les dispositions de la circulaire du 14 décembre 1938, relatives à la vente des sodas fabriqués avec des eaux minérales, doivent être considérées comme caduques».

- Mais c'est surtout depuis les négociations à la C.E.E. sur les eaux minérales que la question s'est posée.

La plupart de nos partenaires au Marché commun utilisant, en effet, des eaux minérales pour la préparation :

- soit d'eaux carbo-gazeuses (sodas)
- soit de boissons édulcorées (limonades, jus de fruits)

la directive du Conseil du 15 juillet 1950 «relative au rapprochement des législations des états membres concernant l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles», prévoit les dispositions suivantes :

- Lorsqu'il s'agit d'une eau minérale naturelle effervescente, selon le cas, les dénominations de vente sont :

- eau minérale naturellement gazeuse,
- eau minérale naturelle renforcée au gaz de la source,
- eau minérale naturelle avec adjonction de gaz carbonique

(article 7 de la Directive)

- La possibilité d'utiliser une eau minérale naturelle pour la fabrication de boissons rafraîchissante sans alcool.

En tant qu'expert français à la C.E.E., je m'étais toujours opposé à l'adoption de ces pratiques actuellement interdites par la réglementation française, dans le respect des avis formulés à maintes reprises par l'Académie Nationale de Médecine (qui en la circonstance ne semble d'ailleurs pas à ma connaissance avoir été consultée à ce sujet (23).

Je tiens à dire ici, que je ne suis aucunement responsable de l'hérésie hydrologique commise par leur acceptation pour le compte de notre gouvernement.

En dehors des modifications majeures au texte du décret du 28 mars 1957 que nous venons d'évoquer, il en est bien d'autres tout aussi indispensables qui mériteraient de retenir l'attention et d'y être intégrées, bien qu'elles ne concernent que des aspects plus indirects de la question, notamment :

- pour les eaux minérales :

- présentations telles que les eaux minérales conditionnées en brumisateurs pour usage médical ou cosmétique,

- préparations à base d'eaux minérales qui relèvent de la réglementation pharmaceutique :

- eau minérale en ampoule,

- préparations galéniques à base d'eau minérale

- sels extraits d'eaux minérales

- pour les gaz thermaux

- pour les boues thermales

Enfin, il serait également hautement souhaitable comme nous l'avons vu que l'eau de mer utilisée en thalassothérapie, constituant de ce fait une eau d'intérêt médical, soit soumise à la même réglementation que les eaux minérales de source utilisées en crénothérapie, pour son exploitation et son utilisation.

Pour le reste, le texte du décret du 28 mars 1957 nous semble tout à fait satisfaisant, à la seule réserve que les services responsables à l'échelon central, en particulier, Bureau administratif chargé du thermalisme du Ministère de la Santé et Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National, chargé de la tenue à jour du Fichier central des eaux minérales, soient bien (ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas) immédiatement avertis par la Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale prévenue par le Préfet (qui s'est engagé à le faire) en cas de modifications effectuées :

- sous la direction des responsables locaux du service des mines (24), en ce qui concerne les installations,

- à la demande généralement des médecins thermaux en ce qui concerne les techniques de cure ou les indications médicales, et cela,

- avant même que ces modifications n'aient été réalisées d'une part, pour éviter que des hérésies ne soient commises contre lesquelles le Laboratoire National, conseiller technique du Ministre en ce qui concerne le thermalisme pourrait mettre en garde

- après qu'elles auront été réalisées d'autre part et dans ce cas la remise en service après modification (réalisée sauf urgence, seulement en période d'intercure) ne sera pas permise avant que le laboratoire de contrôle (territorialement responsable) n'ait vérifié la pérennité des caractéristiques de l'eau.

En cas de modification (risquant d'agir sur l'activité de l'eau) constatée par ce laboratoire, il devra en être immédiatement rendu compte au Ministère de la Santé, une expertise devant être effectuée à la demande du Bureau chargé du thermalisme par le Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National, (qui fera d'urgence à l'Administration rapport sur la nécessité ou non de soumettre le cas, pour avis, à l'Académie).

NOTES DE L'AUTEUR

(1) Cet article n'est que la conclusion, adaptée, pour en être isolée, de l'exposé fait à l'occasion «Etude critique de la réglementation actuelle des eaux minérales» dont le texte était trop important pour être imprimé in extenso dans cette revue. L'auteur remercie Mlle le Professeur Agrégé Pépin, de la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand, d'avoir bien voulu contribuer à cette adaptation.

(2) Paru au Journal Officiel de la République Française du 30 mars 1957.

(3) L'application étant en principe prévue deux ans après cette publication, est aujourd'hui très proche et personne ne semble s'en soucier.

(4) Bien que cela ne se soit jamais produit encore, il pourrait être passé outre cet avis - quand il est défavorable - par le Ministre utilisant son pouvoir discrétionnaire, car il n'est pas spécifié dans le texte de réglementation qu'il doit être favorable, ce qui constitue une lacune à corriger.

(5) La raison invoquée en général est, qu'il n'est pas possible de porter atteinte à la liberté de prescription du médecin. Nous verrons plus loin que cette liberté de prescription est bien limitée cependant en ce qui concerne le remboursement des cures par la Sécurité sociale, et qu'à tout prendre il vaudrait mieux que cette limitation ne résulte que de raisons exclusivement scientifiques, ce dont l'avis de l'Académie de Médecine serait évidemment le meilleur garant.

(6) Bien que le Département des Etudes Hydrologiques et Thermales du Laboratoire National de la Santé soit chargé d'exécuter les analyses dans cette circonstance, (mais uniquement pour certifier que l'eau est bien telle qu'à l'émergence), en application de l'article 4 de l'arrêté du 11.12.1964, c'est théoriquement de l'avis d'un Directeur de l'Action Sanitaire et Sociale, plus ou moins qualifié, même s'il est médecin (ce qui est devenu rare) que dépend la décision qui sera entérinée par arrêté ministériel.

(7) et pour lequel on est autorisé de se demander sur quelles bases il peut bien l'être (en dehors des projets plus ou moins précis ou réalistes proposés par l'exploitant ou ses conseils).

(8) Au sujet de laquelle, notons-le, l'Académie de Médecine, pourtant gardienne en France de la doctrine en la matière, n'a pas, du moins encore, été consultée.

(9) Publié au Journal Officiel de la République Française du 22 janvier 1922 ; rectificatifs des 27 et 29 janvier 1922. Énonçant (art. 1er modifié par le décret 57.642 du 24 mai 1957 paragraphe 3) :

«Les dénominations «eau minérale», «eau minérale naturelle» ou tout autre contenant ces mots sont réservées aux eaux douces de propriétés thérapeutiques, provenant d'une source dont l'exploitation a été autorisée, par décision ministérielle, dans les conditions prévues par les lois et règlements en vigueur. La déferrisation et le mélange entre eux d'eaux ou de gaz de sources d'eaux minérales autorisées, ne peuvent avoir lieu que dans les conditions fixées par le décret n° 57.404 du 28 mars 1957 sur la police et la surveillance des eaux minérales.

Les dénominations contenant les mots «gazeuses» ou «eau gazeuse» sont réservées aux eaux naturellement gazeuses ou à ces mêmes eaux regazéifiées avec les gaz provenant de la source même ou des mélanges des eaux de sources, dont l'exploitation a été autorisée, par décision ministérielle dans les conditions prévues par les lois et règlements en vigueur.

A noter que ce dernier paragraphe devrait être intégré au précédent, car il s'agit bien d'eaux minérales : de facto en effet il n'existe pas actuellement d'eau «gazeuse» qui ne soit minérale (les eaux potables auxquelles sont incorporées du CO_2 sont dites «gazéifiées», et le fait même qu'elles soient astreintes à une autorisation ministérielle prouve bien qu'elles sont minérales, d'ailleurs ce paragraphe est assez mal rédigé, il devrait plutôt l'être de la façon suivante pour la partie en question : les dénominations à des eaux ou à des mélanges autorisés d'eaux provenant de sources dont l'exploitation a été par les lois et règlements en vigueur.

(10) Le terme «eau minérale» étant consacré par l'usage, il serait difficile sinon impossible aujourd'hui de l'abandonner : on avait proposé de lui substituer celui «d'eau médicinale», mais il n'a pas eu de succès, car en dehors de l'intérêt médical évoqué, il suggérait trop pour cette eau une nature de médicament qu'elle n'est pas. C'est en effet un produit à part (régi par une réglementation spéciale) différent des aliments, des produits diététiques et des médicaments, auquel la dénomination de minérale qui n'est pas, étymologiquement exacte, peut néanmoins être conservé en raison de ce que cette eau est, en partie, placée sous la responsabilité (technique) du service des mines, contrairement aux eaux potables.

(11) Cet intérêt médical est évidemment lié à l'une ou à plusieurs associées des caractéristiques propres de l'eau ou au mélange de plusieurs de celles-ci d'origine et de composition identiques :

- physiques (notamment température)
- chimiques (composition minérale, présence de gaz libre dissous et d'accompagnement $\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{S}$)
- physico-chimiques (y compris la radioactivité éventuelle de certains de ses composants éventuellement gazeux)
- biologiques (flore microbienne particulière)
- pharmacodynamiques le cas échéant

qui font de l'eau de chacune de ces sources une entité particulière.

(12) Puits, forages tubulaires (vertical, oblique ou horizontal), galerie ou drains collecteurs ou combinaison de ces divers modes de captages.

(13) Le terme de microbiologiquement pure signifiant (comme pour l'eau dite potable), non pas amicrobienne ou stérile, mais seulement ne contenant pas de germe pathogène ou stigmaté d'une pollution susceptible d'être dangereuse (pollution fécale par exemple).

(14) à l'exception du débit qui :

naturel : peut être variable, dépendant de la charge de la nappe (pressions hydrostatiques réciproques) ce qui n'a pas une signification péjorative du moment que les autres caractéristiques physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques restent constantes.

artificiel : dépend du pompage (dont le régime sera fixé dans l'arrêté d'autorisation à l'urgence).

(15) Cette stabilité n'est en effet exigible qu'à l'urgence, car il existe dans les eaux minérales deux catégories, constituées :

- l'une d'eaux dont les caractéristiques restent stables après contact avec l'atmosphère, même après conservation prolongée, conservant donc l'intégralité de leurs propriétés.
- l'autre d'eaux dont les caractéristiques varient au contact de l'atmosphère à la suite de divers facteurs :

- diminution de pression provoquant un dégazage
- refroidissement
- oxydation

ces facteurs provoquant une évolution (métaplasie) de l'eau :

- en transformant certains éléments (oxydation)
- en éliminant d'autres
 - solides (après floculation et précipitation)
 - volatils (par dégagement)

Ces phénomènes obligeant parfois à un traitement pour permettre à l'eau d'être utilisable :

- surtout pour l'usage retardé après conditionnement pour la conserve
- mais même (en raison des précipitations) dans certains cas d'usage immédiat :
 - surtout pour la baignation collective en piscine (ou du fait du trouble provoqué, une noyade pourrait passer inaperçue.)
 - mais aussi pour éviter la détérioration par incrustation des appareils et limiter au minimum les opérations de nettoyage.

(16) L'élimination de l' H_2S tolérée dans certains autres pays n'y peut être pratiquée.

(17) Il serait souhaitable, que comme pour les rapports concernant les médicaments, les expertises ayant permis de les obtenir soient confiées à des spécialistes officiellement reconnus pour ce genre de travaux dont une liste pourrait être établie pour chaque spécialité : analyse de l'eau, essais cliniques, pharmacodynamie.

(18) Le décret du 30 avril 1930 tout en modifiant celui de 1860 n'apportera aucune atteinte au libre usage.

(19) Ils sont constitués par :

Le décret n° 64.1 255 du 11 décembre 1964 portant règlement d'administration publique pour l'application de l'article L. 751 du Code de la Santé Publique en ce qui concerne les industries d'embouteillage des eaux minérales (publié au Journal Officiel de la République Française du 19 décembre 1964).

Ses textes d'application :

Arrêté du 21 décembre 1964 relatif aux industries d'embouteillage d'eau minérale (demande d'autorisation) (publié au Journal Officiel de la République Française du 31 décembre 1964).
Arrêté du 21 décembre 1964, relatif au contrôle de la qualité de l'eau (publié au Journal Officiel de la République Française du 31 décembre 1964).

(20) Malheureusement aujourd'hui par appât du gain, les exploitants des stations, et il faut bien le dire un peu avec la complicité tacite sinon l'encouragement des médecins qui y exercent, tendent à imiter ces pratiques justifiées par la nécessité.

(21) Je me permettrai de faire remarquer qu'il aurait peut-être mieux valu dire « toutes les eaux contenant du sodium qui le justifient ».

(22) La circulaire du 4 décembre 1894 du Président du Conseil, Ministre de l'Intérieur et des Cultes aux Préfets, sur l'autorisation d'exploitation des eaux minérales et les justifications à fournir par les intéressés stipule : chaque demande d'autorisation sera accompagnée d'un certificat du Service des Mines attestant que l'eau n'est soumise à aucune opération de décantage et de clarification. Le pétitionnaire dans la demande qu'il formulera au Ministre, prendra

MODIFICATIONS A LA REGLEMENTATION ACTUELLES DES EAUX MINÉRALES

l'engagement de ne faire subir à l'eau aucune de ces manipulations.

(23) Bien entendu, pour cela je m'étais placé exclusivement sur le plan scientifique. Mais, plus qu'un « crime » de ce point de vue, l'acceptation de ces pratiques constitue certainement une « faute » vis à vis des intérêts à l'avenir d'une de nos industries nationales importantes qui en sera certainement pénalisée, et en outre, en France jusqu'ici la gazéification est interdite par la réglementation, quant à l'addition d'un produit quelconque à l'eau minérale, elle rend justiciable la préparation en résultant de la réglementation pharmaceutique.

A ce sujet une circulaire du 27 octobre 1906 du Directeur Général des Douanes, applicable à l'introduction en France, des eaux minérales étrangères indique en effet que

« on doit ranger dans la classe des médicaments composés les eaux minérales auxquelles on a ajouté des drogues ou ingrédients quelconques ».

Le décret du 12 janvier 1922 modifié par le décret n° 57.642 du 27 mai 1957, art 2, stipule :
« Constitue le délit prévu à l'article 1er de la loi du 1er août 1905,

4o) le fait de mettre en vente, en leur attribuant des propriétés thérapeutiques

- soit ...

- soit des eaux minérales ayant subi des traitements ou opérations autres que ceux mentionnés dans l'arrêté d'autorisation.

5o) le fait de mettre en vente sous une dénomination applicable aux eaux naturellement gazeuses :

- soit une eau minérale gazéifiée artificiellement

- soit une eau ou un mélange d'eaux naturellement gazeuses dont la teneur en gaz a été reconstituée, à moins que les gaz employés n'aient été ceux qui se dégagent de la source ou des sources mêmes entrant dans le mélange, dans les conditions permises par l'arrêté d'autorisation et sous réserve que l'opération soit indiquée sur l'étiquette par une mention appropriée.

Le décret n° 57.404 du 28 mars 1957, précisant par ailleurs :

art 4 : la demande est accompagnée ... 4o) d'un engagement de ne faire subir à l'eau aucune opération susceptible d'altérer sa nature ou sa composition telles qu'elles sont constatées à l'émergence.

L'arrêté du 15 mai 1944 relatif aux produits médicamenteux à base d'eaux minérales stipule à son article 1er : toute eau minérale naturelle modifiée dans ses caractéristiques initiales par l'addition d'un produit quelconque autre que le gaz carbonique s'échappant du griffon de la source, présentée comme jouissant de propriétés curatives et préventives est considérée comme un médicament aux termes de l'article 1er de la loi du 11 septembre 1941.

(24) Evidemment, il y aura lieu d'apprécier l'importance des modifications des installations, non pas à la lettre mais dans l'esprit (de façon à ne pas consulter l'Académie chaque fois que l'on changera un robinet). Il y aura donc lieu de laisser aux responsables locaux (Service des Mines et Médecins départementaux de la Santé), une latitude d'initiative suffisante, en particulier pour les modifications des installations ne risquant pas d'influer sur l'activité de l'eau minérale ; mais encore faudrait-il que ceux-ci soient capables d'une telle appréciation (ce qui est malheureusement pas toujours le cas, nous l'avons bien souvent constaté).

