

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE D'HYDROBIOLOGIE ET ENVIRONNEMENT
LABORATORY OF HYDROBIOLOGY AND ENVIRONMENT

Bactéries sporulantes dans quelques biotopes aquatiques à Yaoundé (Région du centre, Cameroun) : diversité, impact des facteurs abiotiques et susceptibilité à des antibiotiques/extraits de *Moringa oleifera*

THESE

Présentée et soutenue le 09 Mai 2025 en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux

Option : Hydrobiologie et Environnement

Par :

DJIALA TAGNE Morelle Raisa
Matricule 13R2474
(Master ès-Sciences)

Devant le jury composé de :

Président : NTSAMA MBALLA Claudine, *Professeur*

Rapporteur : NOLA Moïse, *Professeur*

Membres : ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert, *Professeur*

MOUSSA DJAOUA, *Maître de Conférences*

NOAH EWOTI Olive Vivien, *Maître de Conférences*



Université de Yaoundé I ;

Université de Yaoundé I ;

Université de Yaoundé I ;

Université de Maroua ;

Université de Yaoundé I.

Année 2025

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE D'HYDROBIOLOGIE ET ENVIRONNEMENT
LABORATORY OF HYDROBIOLOGY AND ENVIRONMENT

Bactéries sporulantes dans quelques biotopes aquatiques à Yaoundé (Région du centre, Cameroun) : diversité, impact des facteurs abiotiques et susceptibilité à des antibiotiques/extraits de *Moringa oleifera*

Présentée et soutenue le 09 Mai 2025 en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux

Option : Hydrobiologie et Environnement

Par :

DJIALA TAGNE Morelle Raïsa

Matricule 13R2474

(Master ès-Sciences)

Devant le jury composé de :

Président : **NTSAMA MBALLA Claudine**, *Professeur*

Université de Yaoundé I ;

Rapporteur : **NOLA Moïse**, *Professeur*

Université de Yaoundé I ;

Membres : **ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert**, *Professeur*

Université de Yaoundé I ;


MOUSSA DJAOUA, *Maître de Conférences*

Université de Maroua ;

NOAH EWOTI Olive Vivien, *Maître de Conférences*

Université de Yaoundé I.

Année 2025

| | | |
|--|--|---|
| UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques |  | THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs |
| LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS | | LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF |

LISTE PROTOCOLAIRE DE LA FACULTE DES SCIENCES

ANNÉE ACADEMIQUE 2024/2025

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 16 Janvier 2025

ADMINISTRATION

1. **DOYEN** : OWONO OWONO Luc Calvin, *Professeur*
2. **VICE-DOYEN / DPSAA**: NDJIGUI Paul-Désiré, *Professeur*
3. **VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*
4. **VICE-DOYEN / DRC** : NOUNDJEU Pierre, *Maître de Conférences*
5. **Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine Marie Chantal, *Maître de Conférences*
6. **Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la Sclarité DAARS** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

| N° | NOMS ET PRÉNOMS | GRADE | OBSERVATIONS |
|-----|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1. | BIGOGA DAIGA Jude | Professeur | En poste |
| 2. | FEKAM BOYOM Fabrice | Professeur | En poste |
| 3. | KANSCI Germain | Professeur | En poste |
| 4. | MBACHAM FON Wilfred | Professeur | En poste |
| 5. | MOUNDIPA FEWOU Paul | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 6. | NGUEFACK Julienne | Professeur | En poste |
| 7. | NJAYOU Frédéric Nico | Professeur | En poste |
| 8. | OBEN Julius ENYONG | Professeur | En poste |
| 9. | ACHU Merci BIH | Maître de Conférences | En poste |
| 10. | AKINDEH MBUH NJI | Maître de Conférences | En poste |
| 11. | BEBEE Fadimatou | Maître de Conférences | En poste |
| 12. | BEBOY EDJENGUELE Sara N. | Maître de Conférences | En poste |
| 13. | FONKOUA Martin | Maître de Conférences | En poste |
| 14. | ATOGHO Barbara MMA | Maître de Conférences | En poste |
| 15. | AZANTSA KINGUE GABIN BORIS | Maître de Conférences | En poste |
| 16. | BELINGA née NDOYE FOE F. M. C. | Maître de Conférences | <i>Chef DAF / FS</i> |
| 17. | DAKOLE DABOY Charles | Maître de Conférences | En poste |
| 18. | DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise | Maître de Conférences | En poste |

| | | | |
|-----|----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 19. | DJUIDJE NGOUNOU Marceline | Maître de Conférences | En poste |
| 20. | DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane | Maître de Conférences | En poste |
| 21. | EFFA ONOMO Pierre | Maître de Conférences | <i>VD/FS/Univ Ebwa</i> |
| 22. | EWANE Cécile Annie | Maître de Conférences | En poste |
| 23. | KOTUE TAPTUE Charles | Maître de Conférences | En poste |
| 24. | LUNGA Paul KEILAH | Maître de Conférences | En poste |
| 25. | MANANGA Marlyse Joséphine | Maître de Conférences | En poste |
| 26. | MBONG ANGIE M. Mary Anne | Maître de Conférences | En poste |
| 27. | MOFOR née TEUGWA Clotilde | Maître de Conférences | <i>Doyen FS / UDs</i> |
| 28. | NANA Louise épouse WAKAM | Maître de Conférences | En poste |
| 29. | NGONDI Judith Laure | Maître de Conférences | En poste |
| 30. | TCHANA KOUATCHOUA Angèle | Maître de Conférences | En poste |
| 31. | FOUPOUAPOUOGNIGNI Yacouba | Chargé de Cours | En poste |
| 32. | KOUOH ELOMBO Ferdinand | Chargé de Cours | En poste |
| 33. | OWONA AYISSI Vincent Brice | Chargé de Cours | En poste |
| 34. | Palmer MASUMBE NETONGO | Chargé de Cours | En poste |
| 35. | PECHANGOU NSANGOU Sylvain | Chargé de Cours | En poste |
| 36. | WILFRED ANGIE ABIA | Chargé de Cours | En poste |
| 37. | BAKWU BASSOGOG Christian Bernard | Chargé de Cours | En Poste |
| 38. | ELLA Fils Armand | Chargé de Cours | En Poste |
| 39. | EYENGA Eliane Flore | Chargé de Cours | En Poste |
| 40. | MADIESSE KEMGNE Eugénie Aimée | Chargé de Cours | En Poste |
| 41. | MANJIA NJIKAM Jacqueline | Chargé de Cours | En Poste |
| 42. | MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle | Chargé de Cours | En poste |
| 43. | OWONA AYISSI Vincent Brice | Chargé de Cours | En poste |
| 44. | WOGUIA Alice Louise | Chargé de Cours | En Poste |

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (49)

| | | | |
|----|------------------------------|------------|-----------------------------------|
| 1. | AJEAGAH Gideon AGHAINDUM | Professeur | <i>DAARS/FS</i> |
| 2. | DIMO Théophile | Professeur | En Poste |
| 3. | DJIETO LORDON Champlain | Professeur | En Poste |
| 4. | DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré | Professeur | En Poste |
| 5. | ESSOMBA née NTSAMA MBALA | Professeur | <i>CD et Vice Doyen/FMSB/UIYI</i> |
| 6. | KEKEUNOU Sévilor | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 7. | NJAMEN Dieudonné | Professeur | En poste |

| | | | |
|-----|--|-----------------------|--|
| 8. | NOLA Moïse | Professeur | En poste |
| 9. | TAN Paul VERNYUY | Professeur | En poste |
| 10. | TCHUEM TCHUENTE Louis Albert | Professeur | <i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i> |
| 11. | ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert | Professeur | En poste |
| 12. | ALENE Désirée Chantal | Maître de Conférences | <i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i> |
| 13. | ATSAMO Albert Donatien | Maître de Conférences | En poste |
| 14. | BILANDA Danielle Claude | Maître de Conférences | En poste |
| 15. | DJIOGUE Séfirin | Maître de Conférences | En poste |
| 16. | GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING | Maître de Conférences | En poste |
| 17. | KANDEDA KAVAYE Antoine | Maître de Conférences | En poste |
| 18. | JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE | Maître de Conférences | En Poste |
| 19. | LEKEUFACK FOLEFACK Guy B. | Maître de Conférences | En poste |
| 20. | MAHOB Raymond Joseph | Maître de Conférences | En poste |
| 21. | MBENOUN MASSE Paul Serge | Maître de Conférences | En poste |
| 22. | MEGNEKOU Rosette | Maître de Conférences | En poste |
| 23. | MOUNGANG Luciane Marlyse | Maître de Conférences | En poste |
| 24. | MVEYO NDANKEU Yves Patrick | Maître de Conférences | En poste |
| 25. | MONY Ruth épouse NTONE | Maître de Conférences | En Poste |
| 26. | NGUEGUIM TSOFAK Florence | Maître de Conférences | En poste |
| 27. | NGUEMBOCK | Maître de Conférences | En poste |
| 28. | NOAH EWOTI Olive Vivien | Maître de Conférences | En poste |
| 29. | TADU Zephyrin | Maître de Conférences | En poste |
| 30. | TAMSA ARFAO Antoine | Maître de Conférences | En poste |
| 31. | TOMBI Jeannette | Maître de Conférences | En poste |
| 32. | YEDE | Maître de Conférences | En poste |
| 33. | AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA | Chargé de Cours | En poste |
| 34. | BASSOCK BAYIHA Etienne Didier | Chargé de Cours | En poste |
| 35. | ETEME ENAMA Serge | Chargé de Cours | En poste |
| 36. | FEUGANG YOUMSSI François | Chargé de Cours | En poste |
| 37. | FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE | Chargé de Cours | En poste |
| 38. | GONWOUO NONO Legrand | Chargé de Cours | En poste |
| 39. | KOGA MANG DOBARA | Chargé de Cours | En poste |
| 40. | LEME BANOCK Lucie | Chargé de Cours | En poste |
| 41. | MAPON NSANGO Indou | Chargé de Cours | En poste |
| 42. | METCHI DONFACK MIREILLE FLAURE EPSE | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|-----|----------------------------|------------------|------------------------------|
| 43. | NGOUATEU KENFACK Omer Bébé | Chargé de Cours | En poste |
| 44. | NJUA Clarisse YAFI | Chargée de Cours | <i>Chef Div. Uté Bamenda</i> |
| 45. | NWANE Philippe Bienvenu | Chargé de Cours | En poste |
| 46. | YOUNOUSSA LAME | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|-----|----------------------------|-----------------|----------|
| 47. | NDENGUE Jean De Matha | Chargé de Cours | En poste |
| 48. | ZEMO GAMO Franklin | Chargé de Cours | En poste |
| 49. | KODJOM WANCHE Jacguy Joyce | Assistante | En poste |

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (36)

| | | | |
|-----|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 1. | AMBANG Zachée | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 2. | DJOCGOUE Pierre François | Professeur | En poste |
| 3. | BIYE Elvire Hortense | Professeur | En poste |
| 4. | MBOLO Marie | Professeur | En poste |
| 5. | MOSSEBO Dominique Claude | Professeur | En poste |
| 6. | NDONGO BEKOLO | Professeur | En poste |
| 7. | ZAPFACK Louis | Professeur | En poste |
| 8. | ANGONI Hyacinthe | Maître de Conférences | En poste |
| 9. | DJEUANI Astride Carole | Maître de Conférences | En poste |
| 10. | MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel | Maître de Conférences | En poste |
| 11. | MALA Armand William | Maître de Conférences | En poste |
| 12. | NGALLE Hermine BILLE | Maître de Conférences | En poste |
| 13. | NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L. | Maître de Conférences | <i>CT / MINRESI</i> |
| 14. | TONFACK Libert Brice | Maître de Conférences | En poste |
| 15. | TSOATA Esaïe | Maître de Conférences | En poste |
| 16. | ONANA JEAN MICHEL | Maître de Conférences | En poste |
| 17. | DIDA LONTSI Sylvere Landry | Chargé de Cours | En poste |
| 18. | GONMADGE CHRISTELLE | Chargée de Cours | En poste |
| 19. | MAFFO MAFFO Nicole Liliane | Chargé de Cours | En poste |
| 20. | MANGA NDJAGA JUDE | Chargé de Cours | En poste |
| 21. | NNANGA MEBENGA Ruth Laure | Chargé de Cours | En poste |
| 22. | NOUKEU KOUAKAM Armelle | Chargé de Cours | En poste |
| 23. | NSOM ZAMBO EPSE PIAL ANNIE CLAUDE | Chargé de Cours | <i>En détachement/UNESCO MALI</i> |
| 24. | GODSWILL NTSOMBOH | Chargé de Cours | En poste |
| 25. | KABELONG BANAHOU Louis- | Chargé de Cours | En poste |
| 26. | KONO Léon Dieudonné | Chargé de Cours | En poste |
| 27. | LIBALAH Moses BAKONCK | Chargé de Cours | En poste |
| 28. | LIKENG-LI-NGUE Benoit C | Chargé de Cours | En poste |
| 29. | TAEDOUNG Evariste Hermann | Chargé de Cours | En poste |
| 30. | TEMEGNE NONO Carine | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|-----|-------------------------|------------|----------|
| 31. | BOLIE Hubert | Assistant | En poste |
| 32. | MACHE NKOUANDEU Pasma | Assistante | En poste |
| 33. | MAFFO FOKOU Adèle | Assistante | En poste |
| 34. | METSEBING Blondo-Pascal | Assistant | En poste |
| 35. | NTONMEN YPNKEU Amandine | Assistante | En poste |
| 36. | ONANA EBODE Clotaire | Assistant | En poste |

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

| | | | |
|-----|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1. | GHO GOMU Paul MINGO | Professeur | <i>Ministre Chargé de Mission PR</i> |
| 2. | NANSEU NJIKI Charles Péguy | Professeur | En poste |
| 3. | NDIFON Peter TEKE | Professeur | <i>CT MINRESI</i> |
| 4. | NENWA Justin | Professeur | En poste |
| 5. | NGOMO Horace MANGA | Professeur | <i>Vice Chancellor/UB</i> |
| 6. | NJOYA Dayirou | Professeur | En poste |
| 7. | ACAYANKA Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 8. | EMADAK Alphonse | Maître de Conférences | En poste |
| 9. | KAMGANG YOUBI Georges | Maître de Conférences | En poste |
| 10. | KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C. | Maître de Conférences | En poste |
| 11. | KENNE DEDZO GUSTAVE | Maître de Conférences | En poste |
| 12. | MBEY Jean Aime | Maître de Conférences | En poste |
| 13. | NDI NSAMI Julius | Maître de Conférences | <i>Chef de Département</i> |
| 14. | NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE | Maître de Conférences | <i>Sénatrice/SENAT</i> |
| 15. | NYAMEN Linda Dyorisse | Maître de Conférences | En poste |
| 16. | PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU | Maître de Conférences | En poste |
| 17. | TCHAKOUTE KOUAMO Hervé | Maître de Conférences | En poste |
| 18. | BELIBI BELIBI Placide Désiré | Maître de Conférences | <i>Chef Service/ ENS Bertoua</i> |
| 19. | CHEUMANI YONA Arnaud M. | Maître de Conférences | En poste |
| 20. | KOUOTOU DAOUDA | Maître de Conférences | En poste |

| | | | |
|-----|-------------------------------|------------------|----------|
| 21. | MAKON Thomas Beauregard | Chargé de Cours | En poste |
| 22. | NCHIMI NONO KATIA | Chargée de Cours | En poste |
| 23. | NJANKWA NJABONG N. Eric | Chargé de Cours | En poste |
| 24. | PATOUOSSA ISSOFA | Chargé de Cours | En poste |
| 25. | SIEWE Jean Mermoz | Chargé de Cours | En Poste |
| 26. | BOYOM TATCHEMO Franck W. | Assistant | En Poste |
| 27. | DANTIO NGUELA Christian Brice | Assistant | En poste |
| 28. | LEKENE NGOUATEU Reine | Assistant | En poste |

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

| | | | |
|----|--------------------------|------------|----------------------------|
| 1. | Alex de Théodore ATCHADE | Professeur | <i>DEPE/Univ. Bertoua</i> |
| 2. | DONGO Etienne | Professeur | <i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i> |

| | | | |
|-----|------------------------------|-----------------------|--|
| 3. | NGOUELA Silvère Augustin | Professeur | <i>Chef de Département UDS</i> |
| 4. | PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel | Professeur | <i>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i> |
| 5. | MBAZOA née DJAMA Céline | Professeur | En poste |
| 6. | MKOUNGA Pierre | Professeur | En poste |
| 7. | AMBASSA Pantaléon | Maître de Conférences | En poste |
| 8. | EYONG Kenneth OBEN | Maître de Conférences | En poste |
| 9. | FOTSO WABO Ghislain | Maître de Conférences | En poste |
| 10. | KAMTO Eutrophe Le Doux | Maître de Conférences | En poste |
| 11. | KENMOGNE Marguerite | Maître de Conférences | En poste |
| 12. | KEUMEDJIO Félix | Maître de Conférences | En poste |
| 13. | KOUAM Jacques | Maître de Conférences | En poste |
| 14. | MVOT AKAK CARINE | Maître de Conférences | En poste |
| 15. | NGOMO Orléans | Maître de conférences | En poste |
| 16. | NGO MBING Joséphine | Maître de Conférences | <i>Chef de Cellule MINRESI</i> |
| 17. | NGONO BIKOBO Dominique Serge | Maître de Conférences | <i>C.E.A/ MINESUP</i> |
| 18. | NOTE LOUGBOT Olivier Placide | Maître de Conférences | <i>DAAC/Uté Bertoua</i> |
| 19. | NOUNGOUE TCHAMO Diderot | Maître de Conférences | En poste |
| 20. | TABOPDA KUATE Turibio | Maître de Conférences | En poste |
| 21. | TAGATSING FOTSING Maurice | Maître de Conférences | En poste |
| 22. | YANKEP Emmanuel | Maître de Conférences | En poste |
| 23. | ZONDEGOUNBA Ernestine | Maître de Conférences | En poste |

| | | | |
|----|--------------------------------|------------------|----------|
| 24 | MESSI Angélique Nicolas | Chargé de Cours | En poste |
| 25 | NGNINTEDO Dominique | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | NONO NONO Éric Carly | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | OUAHOUE WACHE Blandine M. | Chargée de Cours | En poste |
| 28 | OUETE NANTCHOUANG Judith Laure | Chargée de Cours | En poste |
| 29 | SIELINOU TEDJON Valérie | Chargé de Cours | En poste |
| 30 | TCHAMGOUE Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 31 | TSAFFACK Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 32 | TSAMO TONTSA Armelle | Chargé de Cours | En poste |
| 33 | TSEMEUGNE Joseph | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|----------------------------------|-----------|----------|
| 34 | NDOGO ETEME Olivier | Assistant | En poste |
| 35 | NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried | Assistant | En poste |

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

| | | | |
|----|-----------------------------|------------|------------------------------------|
| 1. | ATSA ETOUNDI Roger | Professeur | <i>Chef de Division MINESUP</i> |
| 2. | FOUDA NDJODO Marcel Laurent | Professeur | <i>Inspecteur Général/ MINESUP</i> |

| | | | |
|-----|--|-----------------------|-------------------------------------|
| 3. | NDOUNDAM René | Maître de Conférences | En poste |
| 4. | TSOPZE Norbert | Maître de Conférences | En poste |
| 5. | ABESSOLO ALO'O Gislain | Chargé de Cours | <i>Chef de Cellule MINFOPRA</i> |
| 6. | AMINOU HALIDOU | Chargé de Cours | <i>Chef de Département</i> |
| 7. | DJAM Xaviera YOUH - KIMBI | Chargé de Cours | En Poste |
| 8. | DOMGA KOMGUEM Rodrigue | Chargé de Cours | En poste |
| 9. | EBELE Serge Alain | Chargé de Cours | En poste |
| 10. | HAMZA Adamou | Chargé de Cours | En poste |
| 11. | JIOMEKONG AZANZI Fidel | Chargé de Cours | En poste |
| 12. | KOUOKAM KOUOKAM E. A. | Chargé de Cours | En poste |
| 13. | MELATAGIA YONTA Paulin | Chargé de Cours | En poste |
| 14. | MESSI NGUELE Thomas | Chargé de Cours | En poste |
| 15. | MONTHÉ DJIADEU Valéry M. | Chargé de Cours | En poste |
| 16. | NZEKON NZEKO'O ARMEL JACQUES | Chargé de Cours | En poste |
| 17. | OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort | Chargé de Cours | <i>Sous-Directeur ENSET Ebolowa</i> |
| 18. | TAPAMO Hyppolite | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|-------------------------------|-----------|-----------------------|
| 19 | BAYEM Jacques Narcisse | Assistant | En poste |
| 20 | EKODECK Stéphane Gaël Raymond | Assistant | En poste |
| 21 | MAKEMBE. S . Oswald | Assistant | <i>Directeur CUTI</i> |
| 22 | NKONDOCK. MI. BAHANACK.N. | Assistant | En poste |

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (33)

| | | | |
|----|-------------------------------|-----------------------|---|
| 1. | AYISSI Raoult Domingo | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 2. | KIANPI Maurice | Maître de Conférences | En poste |
| 3. | MBANG Joseph | Maître de Conférences | En poste |
| 4. | MBEHOU Mohamed | Maître de Conférences | En poste |
| 5. | MBELE BIDIMA Martin Ledoux | Maître de Conférences | En poste |
| 6. | NOUNDJEU Pierre | Maître de Conférences | <i>Chef Service des Programmes & Diplômes/FS/UIYI</i> |
| 7. | TAKAM SOH Patrice | Maître de Conférences | En poste |
| 8. | TCHAPNDA NJABO Sophonie B. | Maître de Conférences | <i>Directeur/AIMS Rwanda</i> |
| 9. | TCHOUNDJA Edgar Landry | Maître de Conférences | En poste |
| 10 | AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard | Chargé de Cours | <i>Chef Cellule MINEPAT</i> |
| 11 | BOGSO ANTOINE Marie | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | CHENDJOU Gilbert | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | DJIADEU NGAHA Michel | Chargé de Cours | En poste |
| 14 | DOUANLA YONTA Herman | Chargé de Cours | En poste |
| 15 | KIKI Maxime Armand | Chargé de Cours | En poste |
| 16 | LOUMNGAM KAMGA Victor | Chargé de Cours | En poste |

| | | | |
|----|-------------------------------|------------------|---|
| 17 | MBAKOP Guy Merlin | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | MBATAKOU Salomon Joseph | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | MENGUE MENGUE David Joël | Chargé de Cours | <i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i> |
| 20 | MBIAKOP Hilaire George | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | NGUEFACK Bernard | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | NIMPA PEFOUKEU Romain | Chargée de Cours | En poste |
| 23 | OGADOA AMASSAYOGA | Chargée de Cours | En poste |
| 24 | POLA DOUNDOU Emmanuel | Chargé de Cours | <i>En stage</i> |
| 25 | TCHEUTIA Daniel Duviol | Chargé de Cours | En poste |
| 26 | TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric. | Chargé de Cours | En poste |
| 27 | BITYE MVONDO Esther Claudine | Assistante | En poste |
| 28 | FOKAM Jean Marcel | Assistant | En poste |
| 29 | GUIDZAVAI KOUCHERE Albert | Assistant | En poste |
| 30 | MANN MANYOMBE Martin Luther | Assistant | En poste |
| 31 | MEFENZA NOUNTU Thiery | Assistant | En poste |
| 32 | NYOUMBI DLEUNA Christelle | Assistant | En poste |
| 33 | TENKEU JEUFACK Yannick Léa | Assistant | En poste |

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

| | | | |
|----|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 1. | ESSIA NGANG Jean Justin | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| | KOUITCHEU MABEKU Epse | Professeure | En poste |
| 2. | KOUAM Laure Brigitte | | |
| 3. | MUNE MUNE Martin Alain | Professeur | En poste |
| 4. | NYEGUE Maximilienne Ascension | Professeur | <i>VICE-DOYEN / DSSE</i> |
| 5. | RIWOM Sara Honorine | Professeure | En poste |
| 6. | SADO KAMDEM Sylvain Leroy | Professeur | En poste |
| 7. | ASSAM ASSAM Jean Paul | Maître de Conférences | <i>Doyen/FASA/Uds</i> |
| 8. | BOUGNOM Blaise Pascal | Maître de Conférences | En poste |
| 9. | NJIKI BIKOÏ Jacky | Maître de Conférences | En poste |
| 10 | TCHIKOUA Roger | Maître de Conférences | <i>Chef Service de la Scolarité</i> |
| 11 | EHETH Jean Samuel | Chargé de Cours | En poste |
| 12 | ESSONO Damien Marie | Chargé de Cours | En poste |
| 13 | LAMYE Glory MOH | Chargé de Cours | En poste |
| 14 | MEYIN A EBONG Solange | Chargé de Cours | En poste |
| 15 | MONI NDEDI Esther Del Florence | Chargé de Cours | <i>Cheffe de service/DAAC/UIYI</i> |

| | | | |
|----|--|-----------------|----------|
| 16 | NKOUDOU ZE Nardis | Chargé de Cours | En poste |
| 17 | NKOUÉ TONG Abraham | Chargé de Cours | En poste |
| 18 | NGOUE NAM Romial Joël | Chargé de Cours | En poste |
| 19 | NJAPNDOUNKE Bilkissou | Chargé de Cours | En poste |
| 20 | TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie | Chargé de Cours | En poste |
| 21 | TOBOLBAÏ Richard | Chargé de Cours | En poste |
| 22 | SAKE NGANE Carole Stéphanie | Chargé de Cours | En poste |
| 23 | MAYI Marie Paule Audrey | Assistante | En poste |
| 24 | ZO'O EZO'O Fabrice Télesfor | Assistant | En poste |

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (45)

| | | | |
|-----|----------------------------------|-----------------------|--|
| 1. | BEN- BOLIE Germain Hubert | Professeur | En poste |
| 2. | DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM | Professeur | En poste |
| 3. | EKOBENA FOU DA Henri Paul | Professeur | <i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i> |
| 4. | ESSIMBI ZOBO Bernard | Professeur | En poste |
| 5. | HONA Jacques | Professeur | En poste |
| 6. | NANA ENGO Serge Guy | Professeur | En poste |
| 7. | NANA NBENDJO Blaise | Professeur | En poste |
| 8. | NDJAKA Jean Marie Bienvenu | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 9. | NJANDJOCK NOUCK Philippe | Professeur | En poste |
| 10. | NOUAYOU Robert | Professeur | En poste |
| 11. | SAIDOU | Professeur | <i>Chef de centre/IRGM/MINRESI</i> |
| 12. | TABOD Charles TABOD | Professeur | <i>Doyen FSUniv/Bda</i> |
| 13. | TCHAWOUA Clément | Professeur | En poste |
| 14. | WOAFO Paul | Professeur | En poste |
| 15. | ZEKENG Serge Sylvain | Professeur | En poste |
| 16. | BIYA MOTTO Frédéric | Maître de Conférences | <i>DG/HYDRO Mekin</i> |
| 17. | BODO Bertrand | Maître de Conférences | En poste |
| 18. | ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA | Maître de Conférences | En poste |
| 19. | EYEBE FOU DA Jean sire | Maître de Conférences | En poste |
| 20. | FEWO Serge Ibraïd | Maître de Conférences | En poste |
| 21. | MBINACK Clément | Maître de Conférences | En poste |
| 22. | MBONO SAMBA Yves Christian U. | Maître de Conférences | En poste |
| 23. | MELI'I Joelle Larissa | Maître de Conférences | En poste |
| 24. | MVOGO ALAIN | Maître de Conférences | En poste |
| 25. | NDOP Joseph | Maître de Conférences | En poste |
| 26. | SIEWE SIEWE Martin | Maître de Conférences | En poste |

| | | | |
|-----|-----------------------------------|-----------------------|---|
| 27. | SIMO Elie | Maître de Conférences | En poste |
| 28. | VONDOU Derbetini Appolinaire | Maître de Conférences | En poste |
| 29. | WAKATA née BEYA Annie Sylvie | Maître de Conférences | <i>Directeur/ENS/UJI</i> |
| 30. | WOULACHE Rosalie Laure | Maître de Conférence | <i>En stage depuis février 2023</i> |
| 31. | ABDOURAHIMI | Chargé de Cours | En poste |
| 32. | AYISSI EYEBE Guy François Valérie | Chargé de Cours | En poste |
| 33. | CHAMANI Roméo | Chargé de Cours | En poste |
| 34. | DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes | Chargée de Cours | En poste |
| 35. | EDONGUE HERVAIS | Chargé de Cours | En poste |
| 36. | FOUEJIO David | Chargé de Cours | <i>Chef Cell. MINADER</i> |
| 37. | KAMENI NEMATCHOUA Modeste | Chargé de Cours | En poste |
| 38. | LAMARA Maurice | Chargé de Cours | En poste |
| 39. | OTTOU ABE Martin Thierry | Chargé de Cours | Directeur Unité de production des réactifs/IMPM |
| 40. | TEYOU NGOUPO Ariel | Chargé de Cours | En poste |
| 41. | WANDJI NYAMSI William | Chargé de Cours | En poste |
| 42. | NGA ONGODO Dieudonné | Assistant | En poste |
| 43. | MAYI Marie Paule Audrey | Assistante | En poste |
| 44. | TCHODIMOU Carole | Assistant | En poste |
| 45. | SOUFFO TAGUEU Merimé | Assistant | En poste |

| |
|--|
| 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42) |
|--|

| | | | |
|-----|-------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 1. | BISSO Dieudonné | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 2. | EKOMANE Emile | Professeur | <i>Chef Div./Uté Ebolowa</i> |
| 3. | GANNO Sylvestre | Professeur | En poste |
| 4. | NDJIGUI Paul-Désiré | Professeur | <i>Chef de Département</i> |
| 5. | NGUEUTCHOUA Gabriel | Professeur | <i>CEA/MINRESI</i> |
| 6. | NGOS III Simon | Professeur | En poste |
| 7. | NKOUMBOU Charles | Professeur | En poste |
| 8. | ONANA Vincent Laurent | Professeur | <i>Chef de Département/Uté. Eb.</i> |
| 9. | YENE ATANGANA Joseph Q. | Professeur | <i>Chef Div. /MINTP</i> |
| 10. | TCHOUANKOUE Jean Pierre | Professeur | En poste |
| 11. | Elisé SABABA | Maitre de Conférences | En poste |
| 12. | EYONG John TAKEM | Maître de Conférences | En poste |
| 13. | FUH Calistus Gentry | Maître de Conférences | <i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i> |
| 14. | GANNO Sylvestre | Maître de Conférences | En poste |
| 15. | GHOGOMU Richard TANWI | Maître de Conférences | <i>Chef de Div. /Uté Bertoua</i> |
| 16. | MBIDA YEM | Maitre de Conférences | En poste |

| | | | |
|-----|--|-----------------------|------------------------------|
| 17. | MOUNDI Amidou | Maître de Conférences | <i>CT/MINIMDT</i> |
| 18. | NGO BIDJECK Louise Marie | Maître de Conférences | En poste |
| 19. | NGUEUTCHOUA Gabriel | Maître de Conférences | <i>CEA/MINRESI</i> |
| 20. | NJILAH Isaac KONFOR | Maître de Conférences | En poste |
| 21. | NYECK Bruno | Maître de Conférences | En poste |
| 22. | TCHAKOUNTE Jacqueline épouse NUMBEM | Maître de Conférences | <i>Chef. Cell /MINRESI</i> |
| 23. | TCHOUANKOUE Jean-Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 24. | TEMGA Jean Pierre | Maître de Conférences | En poste |
| 25. | ZO'O ZAME Philémon | Maître de Conférences | <i>DG/ART</i> |
| 26. | ANABA ONANA Achille Basile | Chargé de Cours | En poste |
| 27. | BEKOA Etienne | Chargé de Cours | En poste |
| 28. | ESSONO Jean | Chargé de Cours | En poste |
| 29. | EYONG John TAKEM | Chargé de Cours | En poste |
| 30. | MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM | Chargée de Cours | En poste |
| 31. | MBESSE Cécile Olive | Chargée de Cours | En poste |
| 32. | METANG Victor | Chargé de Cours | En poste |
| 33. | MINYEM Dieudonné | Chargé de Cours | <i>Chef Serv./Uté Maroua</i> |
| 34. | NGO BELNOUN Rose Noël | Chargée de Cours | En poste |
| 35. | NOMO NEGUE Emmanuel | Chargé de Cours | En poste |
| 36. | NTSAMA ATANGANA Jacqueline | Chargée de Cours | En poste |
| 37. | TCHAPTCHET TCHATO De P. | Chargé de Cours | En poste |
| 38. | TEHNA Nathanaël | Chargé de Cours | En poste |
| 39. | FEUMBA Roger | Chargé de Cours | En poste |
| 40. | MBANGA NYOBE Jules | Chargé de Cours | En poste |
| 41. | KOAH NA LEBOGO Serge Parfait | Chargé de Cours | En poste |
| 42. | NGO'O ZE ARNAUD | Chargé de Cours | En poste |
| 43. | TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO | Chargé de Cours | En poste |

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

| NOMBRE D'ENSEIGNANTS | | | | | |
|----------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| DÉPARTEMENT | Professeurs | Maîtres de Conférences | Chargés de Cours | Assistants | Total |
| BCH | 8 (01) | 15 (11) | 13 (03) | 7 (05) | 43 (20) |
| BPA | 14 (01) | 16 (09) | 18 (04) | 4 (02) | 52 (16) |
| BPV | 6 (01) | 12 (02) | 13 (07) | 3 (00) | 34 (10) |
| CI | 7 (01) | 15 (04) | 5 (01) | 1 (00) | 28 (06) |
| CO | 6 (01) | 18 (04) | 11 (04) | 2 (00) | 37 (09) |
| IN | 2 (00) | 2 (00) | 14 (01) | 4 (00) | 22 (01) |
| MAT | 1 (00) | 8 (00) | 17 (01) | 7 (02) | 33 (03) |
| MIB | 2 (01) | 7 (03) | 8 (04) | 7 (02) | 24 (10) |
| PHY | 15 (01) | 15 (04) | 11 (01) | 2 (00) | 43 (06) |
| ST | 8 (00) | 17 (03) | 15 (04) | 3 (01) | 43 (08) |
| Total | 69 (07) | 125 (40) | 125 (30) | 40 (12) | 359 (89) |

Soit un total de **359 (89)** dont :

- Professeurs **67 (11)**
- Maîtres de Conférences **122 (41)**
- Chargés de Cours **128 (32)**
- Assistants **30 (09)**

() = Nombre de Femmes **94**

DEDICACE

A mes parents

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu de m'avoir permis de réaliser ce travail. Merci au Professeur **NOLA Moïse**. C'est avec beaucoup de considération que je lui adresse mes remerciements et lui exprime ma reconnaissance pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, sa patience et son sens de l'écoute. Qu'il soit assuré de mon grand attachement et veuille bien trouver dans ce mémoire, le témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier :

- Tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales, de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I ;

- Les enseignants d'Hydrobiologie et Environnement, en particulier les Professeurs **Gideon AJEAGAH AGHAINDUM, Serge Hubert ZEBAZE TOGOUET, Samuel FOTO MENBOHAN, Marlyse MOUNGANG, Olive Vivien NOAH** et **Antoine TAMSA ARFAO,**

- Les Docteurs **Jean Samuel EHETH, Claire Stéphane METSOPKENG, Pierette NGO BAYEBEK, Awawou MANOURE NJOYA** et **Edith MOUAFO TAMNOU** pour leurs orientations lors de la réalisation de ces travaux ;

- L'équipe de recherche du Laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement, notamment **Christiane Wilfreid BETSI, Junior AHANDA MASSANGO, Ornel KADJI TCHANTCHA** pour leur assistance ;

- Tous mes camarades de promotion en particulier **Samuel Davy BALENG** et **Arthur NGANGOUE DEUTCHOUA** ;

- Mon fiancé **Thierry KOUDOUH** pour son soutien et ses encouragements ;

- Mon fils **Kaïss Evan KAMGOUM KOUDOUH**, que ce travail soit pour toi un exemple à suivre.

Mes frères et sœurs **Willy YONGA, Cédrick KAHO TAGNE, Aristin Stéphane TCHAPTCHET TAGNE** et **Virginia NGOUMGNIA TAGNE** pour leurs encouragements ;

Mes sincères remerciements à ma tante **Marie Rosine NGOUMGNIA KINGUI** et à ma grand-mère **Julienne ZARMO** ;

Enfin, toutes les personnes qui m'ont accordé leur soutien de près ou de loin tout au long de cette thèse et dont les noms ne figurent pas ici.

SOMMAIRE

| | |
|---|--------------|
| LISTE PROTOCOLAIRE DE LA FACULTE DES SCIENCES | i |
| DEDICACE | xiii |
| REMERCIEMENTS | xiv |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES | xviii |
| LISTE DES FIGURES | xix. |
| LISTE DES TABLEAUX | xxii |
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE | 1 |
| I.1. Généralités sur la spore bactérienne | 5 |
| I.1.1. Définition et historique | 5 |
| I.1.2. Structure et composition chimique de la spore bactérienne | 5 |
| I.1.3. Phénomènes de sporulation et germination | 7 |
| I.1.4. Propriétés de la spore bactérienne | 11 |
| I.1.5. Présentation de quelques genres de bactéries sporulantes | 13 |
| I.1.6. Impact de quelques bactéries sporulantes pour l'alimentation humaine et la santé | 16 |
| I.1.7. Utilisations possibles des spores..... | 17 |
| I.2. Généralités sur les antibiotiques | 18 |
| I.2.1. Définition..... | 18 |
| I.2.2. Classification et mode d'action des antibiotiques | 18 |
| I.2.3. Résistance des microorganismes aux antibiotiques | 23 |
| I.3. Généralités sur la plante du genre <i>Moringa</i> | 25 |
| I.3.1. Histoire, aire de répartition et conditions de croissance de <i>Moringa</i> | 26 |
| I.3.2. Classification taxonomique et écologie de <i>Moringa</i> | 26 |
| I.3.3. Description botanique de <i>Moringa oleifera</i> | 27 |
| I.3.4. Potentiel antimicrobien du genre <i>Moringa</i> | 29 |
| I.3.5. Potentialités nutritionnelles de <i>Moringa</i> | 35 |
| I.4. Généralités sur les milieux aquatiques | 39 |

| | |
|---|-----------|
| I.4.1. Eaux souterraines..... | 39 |
| I.4.2. Eaux superficielles..... | 40 |
| I.4.3. Eaux de pluie | 41 |
| CHAPITRE II : ZONE D'ETUDE, MATERIEL ET METHODES..... | 43 |
| II.1. Zone d'étude..... | 43 |
| II.1.1. Situation géographique et démographique | 43 |
| II.1.2. Relief et sol..... | 43 |
| II.1.3. Climat et végétation..... | 43 |
| II.1.4. Hydrographie..... | 44 |
| II.1.5. Moyens d'approvisionnement en eau pour les populations | 44 |
| II.2. Matériel | 44 |
| II.2.1. Sites d'échantillonnage..... | 44 |
| II.2.2. Description des sites d'échantillonnage | 45 |
| II.3. Méthodes | 50 |
| II.3.1. Récolte des échantillons d'eau | 50 |
| II.3.2. Evaluation de la diversité et la dynamique d'abondance des bactéries sporulantes dans les différents biotopes aquatiques | 51 |
| II.3.3. Evaluation des paramètres abiotiques susceptibles d'influencer la dynamique d'abondance des bactéries sporulantes..... | 55 |
| II.3.4. Analyse des paramètres physicochimiques des échantillons d'eau..... | 55 |
| II.3.5. Susceptibilité des bactéries sporulantes à quelques antibiotiques usuels..... | 57 |
| II.3.6. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> | 59 |
| II.3.7. Détermination des composés chimiques majeurs dans les extraits de <i>M. oleifera</i> | 61 |
| II.3.8. Analyse des données | 63 |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 64 |
| III.1. Résultats | 64 |
| III.1.1. Diversité des bactéries sporulantes dans les eaux étudiées..... | 64 |
| III.1.2. Variation des abondances des bactéries dans les eaux étudiées..... | 65 |
| III.1.3. Paramètres abiotiques des différents biotopes étudiés | 74 |

| | |
|--|------------|
| III.1.4. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux antibiotiques..... | 91 |
| III.1.5. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux extraits de <i>M. oleifera</i> | 98 |
| III.1.6. Profil chimique des extraits de <i>M. oleifera</i> utilisés..... | 117 |
| III.1.7. Comparaisons des données biotiques et abiotiques entre les milieux aquatiques étudiés | 118 |
| III.1.8. Corrélations entre les abondances des espèces bactériennes et les facteurs abiotiques..... | 118 |
| III.1.9. Comparaison en présence des antibiotiques, des diamètres d’inhibition des espèces bactériennes isolées de l’ensemble des biotopes aquatiques considérés..... | 132 |
| III.1.10. Comparaison dans chaque condition expérimentale, des abondances des microorganismes cultivables en présence d’extraits de <i>M. oleifera</i> | 135 |
| III.2. Discussion | 139 |
| III.2.1. Abondances des germes bactériens dans différents biotopes aquatiques | 139 |
| III.2.2. Impact des paramètres abiotiques des eaux sur l’abondance des bactéries sporulantes isolées..... | 141 |
| III.2.3. Susceptibilité des bactéries sporulantes identifiées aux antibiotiques | 144 |
| III.2.4. Activité des extraits de <i>M. oleifera</i> sur les bactéries identifiées..... | 147 |
| CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES..... | 158 |
| CONCLUSION..... | 150 |
| RECOMMANDATIONS..... | 152 |
| PERSPECTIVES | 153 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 154 |
| ANNEXE..... | 178 |
| PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE..... | 179 |

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

| | |
|--------|--|
| OMS | : Organisation Mondiale de la Santé |
| UV | : Ultraviolet |
| ADN | : Acide Désoxyribonucléique |
| ARNt | : Acide Ribonucléique de transfert |
| NAM | : N-acétyl Muramique |
| NAG | : N-acétyl Glucosamine |
| OPA | : Ortho-phtalaldéhyde |
| GPS | : <i>Global Positioning System</i> |
| MES | : Matières En Suspension |
| UC | : Unité Conventiennelle |
| UFC | : Unité Formant Colonie |
| TDS | : <i>Total Dissolved Solid</i> |
| FAO | : <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| NC | : Norme Camerounaise |
| API | : Appareils et Procédés d'Identification |
| APHA | : <i>American Public Health Association</i> |
| CA-SFM | : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie |
| EUCAST | : <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| NASA | : <i>National Aeronautics and Space Administration</i> |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Schéma général de la structure de la spore bactérienne | 7 |
| Figure 2 : Schéma des sept étapes du processus de sporulation et du cycle végétatif..... | 9 |
| Figure 3 : Les différentes étapes de germination des spores bactériennes | 10 |
| Figure 4 : Bactérie du genre <i>Bacillus</i> observée au microscope électronique | 14 |
| Figure 5 : <i>Clostridium perfringens</i> vu au microscope électronique à balayage | 15 |
| Figure 6 : Structure d'une bêta lactamine | 19 |
| Figure 7 : Structure des aminoglycosides | 20 |
| Figure 8 : Structure de l'Erythromycine, chef de file des macrolides | 20 |
| Figure 9 : Structures chimiques de l'acide nalidixique..... | 21 |
| Figure 10 : Structure de base des cyclines | 21 |
| Figure 11 : Sites cibles des antibiotiques sur les bactéries | 22 |
| Figure 12 : Structure des Terpénoïdes | 30 |
| Figure 13 : Structure générale de quelques alcaloïdes..... | 31 |
| Figure 14 : Squelette de base des flavonoïdes | 32 |
| Figure 15 : Structure de tanins hydrolysables et condensés | 33 |
| Figure 16 : Structure de base des coumarines..... | 34 |
| Figure 17 : Quelques utilisations de <i>Moringa</i> | 38 |
| Figure 18 : Localisations des sites d'échantillonnage..... | 45 |
| Figure 19 : tubes à essai contenant les différentes concentrations d'extrait et des parties de <i>M. oleifera</i> | 61 |
| Figure 20 : Noms présumptifs des bactéries isolées sur les différents milieux | 65 |
| Figure 21 : Variation des abondances cellulaires moyennes des BHAM dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 67 |
| Figure 22 : Variation des abondances cellulaires moyennes des <i>Bacillus thuringiensis</i> dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 69 |
| Figure 23 : Variation des abondances cellulaires moyennes des <i>Bacillus cereus</i> dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 70 |
| Figure 24 : Variation des abondances cellulaires moyennes des <i>Bacillus subtilis</i> dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 72 |
| Figure 25 : Variation des abondances cellulaires moyennes des <i>Clostridium perfringens</i> dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 73 |

| | |
|--|-----|
| Figure 26 : Variations mensuelles des paramètres météorologiques mesurées dans la ville de Yaoundé | 75 |
| Figure 27 : Variation des valeurs moyennes de la température dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 77 |
| Figure 28 : Variation des valeurs moyennes de l'oxygène dissous dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 78 |
| Figure 29 : Variation des valeurs moyennes des TDS dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 80 |
| Figure 30 : Variation des valeurs moyennes du pH dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 81 |
| Figure 31 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en nitrates dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 83 |
| Figure 32 : Variation des valeurs moyennes des MES dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 84 |
| Figure 33 : Variation des valeurs moyennes de la conductivité électrique dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 86 |
| Figure 34 : Variation des valeurs moyennes des teneurs du CO ₂ dissous dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 87 |
| Figure 35 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en azote ammoniacal dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 89 |
| Figure 36 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en orthophosphates dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 90 |
| Figure 37 : Variation des valeurs moyennes de la couleur dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie | 92 |
| Figure 38 : Susceptibilité aux antibiotiques de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Clostridium perfringens</i> isolés des eaux de surface | 93 |
| Figure 39 : Susceptibilité aux antibiotiques de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> et <i>Clostridium perfringens</i> isolés des eaux souterraines | 95 |
| Figure 40 : Susceptibilité aux antibiotiques de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Clostridium perfringens</i> isolés des eaux de pluies | 97 |
| Figure 41 : Susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> à 23 °C et 37 °C , et de <i>B. cereus</i> à 23 °C et 37 °C , isolés des eaux de surface | 102 |

| | |
|---|-----|
| Figure 42 : susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus subtilis</i> à 23 °C et 37 °C, et de <i>Clostridium perfringens</i> à 23 °C et 37 °C, isolés des eaux de surface | 103 |
| Figure 43 : Susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> à 23 °C et 37 °C, <i>B. cereus</i> à 23 °C et 37 °C, et <i>B. subtilis</i> à 23 °C et 37 °C, isolés des eaux souterraines | 109 |
| Figure 44 : susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> à 23 °C et 37 °C, <i>B. lentus</i> à 23 °C et 37 °C, et <i>Clostridium perfringens</i> à 23 °C et 37 °C isolés des eaux souterraines | 110 |
| Figure 45 : Susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> à 23 °C et 37 °C, et <i>B. cereus</i> à 23 °C et 37 °C, isolés des eaux de pluies | 115 |
| Figure 46 : susceptibilité aux extraits de <i>Moringa oleifera</i> de <i>Bacillus subtilis</i> à 23 °C et 37 °C, et <i>Clostridium perfringens</i> à 23 °C et 37 °C, isolées des eaux de pluies | 116 |
| Figure 47 : Profil LC/MS de l'extrait brut au méthanol du spectre (-) des feuilles de <i>Moringa oleifera</i> | 117 |
| Figure 48 : Analyse en Composantes Principales et Hiérarchisation, des stations d'échantillonnage à partir des valeurs des paramètres physico-chimiques et bactériologiques | 131 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau I : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre <i>Bacillus</i> . Error! Bookmark not defined. | |
| Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre <i>Clostridium</i> | 16 |
| Tableau III : Classification taxonomique du genre <i>Moringa</i> | 28 |
| Tableau IV : Composition moyenne des feuilles de <i>Moringa</i> | 36 |
| Tableau V : Composition chimique en sels minéraux des feuilles de <i>Moringa</i> | 37 |
| Tableau VI : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des eaux de surface | 47 |
| Tableau VII : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des eaux souterraines | 48 |
| Tableau VIII : Caractéristiques des stations de récolte des échantillons d'eau de pluie..... | 49 |
| Tableau IX : Grille d'interprétation du test biochimique classique..... | 54 |
| Tableau X : Liste des antibiotiques testés..... | 58 |
| Tableau XI : Caractères biochimiques des espèces identifiées | 66 |
| Tableau XII : Abondances relatives des différents microorganismes identifiés dans les différents biotopes aquatiques | 74 |
| Tableau XIII : Profil phytochimique des extraits de feuilles MeOH de <i>M. oleifera</i> | 117 |
| Tableau XIV : Comparaison à partir du test « U » de Mann-Whitney entre les différents biotopes aquatiques | 119 |
| Tableau XV : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico- chimiques et les abondances cellulaires des espèces isolées des eaux de surface | 121 |
| Tableau XVI : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico- chimiques et les abondances bactériennes des espèces isolées dans les eaux souterraines | 122 |
| Tableau XVII : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico- chimiques et les abondances bactériennes des espèces isolées dans les eaux de pluie..... | 124 |
| Tableau XVIII : corrélation entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface | 125 |
| Tableau XIX : corrélation entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface | 127 |
| Tableau XX : corrélation retard d'un mois entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface | 128 |
| Tableau XXI : corrélation retard d'un mois entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines | 130 |

| | |
|--|-----|
| Tableau XXII : test de kruskal wallis entre les diamètres d'inhibition des espèces isolées des différents biotopes..... | 132 |
| Tableau XXIII : Comparaison à partir du test « U » de Mann-Whitney entre les différents biotopes aquatiques..... | 134 |
| Tableau XXIV : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait | 135 |
| Tableau XXV : Comparaison des abondances bactériennes entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration..... | 136 |
| Tableau XXVI : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait | 136 |
| Tableau XXVII : Comparaison des abondances entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration | 137 |
| Tableau XXVIII : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait | 138 |
| Tableau XXIX : Comparaison des abondances entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration | 138 |

RESUME

La présente étude a visé à évaluer la diversité, la dynamique d'abondance, l'impact des facteurs abiotiques et la susceptibilité à quelques antimicrobiens, des bactéries sporulantes isolées dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie à Yaoundé (Cameroun, Afrique Centrale). Les échantillonnages d'eau ont été collectés à la fréquence mensuelle pendant 13 mois, de Mars 2021 à Mars 2022. Au total 15 points de prélèvement ont été choisis et répartis comme suit : 6 points d'eaux de surface, 6 points d'eaux souterraines (eaux de puits) et 3 stations de récolte d'eau de pluie. Les analyses ont porté sur l'isolement des bactéries sporulantes par la méthode classique d'étalement en surface sur milieux de culture spécifiques, suivi de leur identification par les tests biochimiques classiques et sur galerie API 20NE. Les paramètres abiotiques des eaux analysées ont été la température, le pH, la conductivité électrique, les teneurs en nitrate et orthophosphate et les solides totaux dissous (TDS) entre autres. Les tests d'antibiogramme (Amoxicilline, Ampicilline, Imipenème, Gentamicine, Amikacine, Ciprofloxacine, Ofloxacine, Sulfaméthoxazole, Tétracycline) ont ensuite été effectués par les méthodes de diffusion de disque sur la gélose Müller-Hinton, ainsi que la susceptibilité de ces bactéries sporulantes aux extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *Moringa oleifera*. Les concentrations d'extraits ont été de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L. Les températures d'incubation ont été de 23°C et 37°C, et les durées d'incubation 3h, 6h, 9h et 24h. Des analyses chimiques de ces feuilles de *M. oleifera* ont été faites au HPLC et par spectrométrie de masse. Les composés chimiques majeurs révélés par un profil du spectre de masse ont été déterminés. Il ressort des analyses bactériologiques que ces eaux hébergent une microflore bactérienne sporulante constituée des espèces des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Les espèces *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. lentus* ont été retrouvées dans les différents biotopes. Concernant le genre *Clostridium*, seule l'espèce *Clostridium perfringens* a été identifiée dans les trois biotopes aquatiques étudiés. Les abondances moyennes calculées dans les eaux de surface des germes identifiés ont été de 4260, 3450, 130 et 130 UFC/100mL respectivement pour *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *Clostridium perfringens*. Dans les eaux souterraines elles ont été de 930, 320, 690, 20, 50 et 10 UFC/100mL pour *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus* et *C. perfringens* respectivement. Dans les eaux de pluie, ces abondances moyennes calculées ont été de 2640, 3080, 90 et 20 UFC/100mL respectivement pour *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *C. perfringens*. Les analyses physico-chimiques ont indiqué que la température, le pH, la conductivité électrique, les TDS, l'oxygène dissous, la couleur, les MES, les teneurs en nitrate, phosphate et azote ammoniacal dans les trois milieux aquatiques ont subi une variation spatio-temporelle. Les corrélations entre ces paramètres abiotiques et la dynamique d'abondance bactérienne ont varié d'une part d'un site d'échantillonnage à l'autre, et d'autre part en fonction du paramètre abiotique donné et de l'espèce bactérienne considérée. Il est de même des corrélations retard d'un mois entre les

propriétés des eaux de pluies du mois précédent et la dynamique d'abondance de la microflore dans les eaux de surface et les eaux de puits échantillonnés du mois en cours, parfois appelées impact différé. La variabilité de ces degrés de liaison suggère que les propriétés des eaux de surface et souterraine échantillonnées ne dépendraient pas seulement de celles des eaux des pluies de la région, mais résulteraient des interactions des facteurs de confusion. Le test de comparaison « H » de Kruskal-Wallis a montré qu'il existe des différences significatives ($P < 0,05$) entre les abondances des espèces de germes dans les 3 types de biotopes aquatiques. Les antibiogrammes ont montré que les souches des différentes espèces bactériennes expriment des résistances à la majorité des antibiotiques testés. Les diamètres d'inhibition de la plupart des antibiotiques vis-à-vis de chacune des espèces bactériennes ont significativement varié ($P < 0,05$) entre les différents biotopes aquatiques. En présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *M. oleifera*, l'abondance de bactéries sporulantes cultivables isolées des 3 types de biotopes a diminué. Les bactéries du genre *Bacillus* ont subi de relatives inhibitions aux différentes concentrations des deux types d'extraits après toutes les périodes d'incubation et aux températures 23 °C et 37°C. L'espèce *Clostridium perfringens* a semblé sensible uniquement aux extraits hydroéthanoliques de concentrations 1,5 et 2g/L après 6h et 24h d'incubation. Dans l'ensemble, les diminutions des abondances des bactéries sporulantes identifiées a semblé s'accroître avec l'augmentation de la concentration des extraits. Les analyses chimiques des extraits des feuilles de *M. oleifera* ont montré la présence de nombreux composés chimiques parmi lesquels le saccharose (hétéroside), la glucomoringinine (glucosinolate), l'acide néochlorogénique (acide phénolique), l'ester méthylique du 0-acétylshanzhiside (iridoïde), l'isoquercétine (flavonoïde), le Kaempférol-3-O-glucoside et le Kaempférol acétylglucoside (hétéroside flavonoïde). Certains de ces composés ont des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Ces résultats montrent l'exploitation potentielle des extraits de *M. oleifera* dans le traitement microbiologique de l'eau destinée à la consommation humaine, notamment le traitement de ces eaux contre *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *C. perfringens*.

Mots clés : Bactéries sporulantes, diversité et dynamique d'abondance, eau de pluie, eau souterraine, eau de surface, susceptibilité aux antimicrobiens, facteur abiotique.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the diversity, abundance dynamics, impact of abiotic factors and susceptibility to some antimicrobials of spore-forming bacteria isolated from surface water, groundwater and rainwater in Yaoundé (Cameroon, Central Africa). Water samples were collected at a monthly frequency for 13 months, from March 2021 to March 2022. A total of 15 sampling points were selected and distributed as follows: 6 surface water points, 6 groundwater points (well water) and 3 rainwater harvesting stations. The analyses focused on the isolation of spore-forming bacteria by the classic method of surface spreading on specific culture media, followed by their identification by conventional biochemical tests and on API 20^E galleries. The abiotic parameters of the water analysed were temperature, pH, electrical conductivity, nitrate and orthophosphate contents and TDS, among others. Antibiotic susceptibility testing (Amoxicillin, Ampicillin, Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Sulfamethoxazole, Tetracycline) was then performed by the disc diffusion methods on Müller-Hinton agar, as well as the susceptibility of these spore-forming bacteria to aqueous and hydroethanolic extracts of *Moringa oleifera* leaves. The concentrations of extracts were 0.5; 1; 1.5 and 2g/L. Incubation temperatures were 23°C and 37°C, and incubation times were 3 hours, 6 hours, 9 hours and 24 hours. Chemical analyses of these *M. oleifera* leaves were carried out by HPLC and mass spectrometry. The major chemical compounds revealed by the mass spectrum profile have been determined. Bacteriological analyses show that these waters host a spore-forming bacterial microflora consisting of species of the genera *Bacillus* and *Clostridium*. The species *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. lentus* have been found in the different biotopes. Concerning the genus *Clostridium*, only the species *Clostridium perfringens* has been identified in the three aquatic biotopes studied. The calculated average surface water abundances of the identified sprouts were 4260, 3450, 130 and 130 CFU/100mL respectively for *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *Clostridium perfringens*. In groundwater they were 930, 320, 690, 20, 50 and 10 CFU/100mL for *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus* and *C. perfringens* respectively. In the rainy waters, these calculated mean abundances were 2640, 3080, 90 and 20 CFU/100mL for *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* and *C. perfringens*, respectively. Physicochemical analyses indicated that temperature, pH, electrical conductivity, TDS, dissolved oxygen, colour, suspended solids, nitrate, phosphate and ammoniacal nitrogen concentrations in the three aquatic environments were subject to spatio-temporal variation. The correlations between these abiotic parameters and the dynamics of bacterial abundance varied between sampling sites, and according to the given abiotic parameter and the bacterial species considered. Similarly, there are one-month lag correlations between the properties of the previous month's rainwater and the microflora abundance dynamics in the surface water and well water sampled in the current month, sometimes referred to as the delayed

impact. The variability of these degrees of binding suggests that the properties of the sampled surface and groundwater would not depend only on those of the region's rainwater, but would result from the interactions of confounding factors. The Kruskal-Wallis "H" comparison test showed that there are significant differences ($P < 0.05$) between the abundances of the germ species in the 3 types of aquatic biotopes. The antibiograms showed that the strains of the different bacterial species express resistance to the majority of the antibiotics tested. The inhibition diameters of most antibiotics with respect to each of the bacterial species varied significantly ($P < 0.05$) between the different aquatic biotopes. In the presence of aqueous and hydroethanolic extracts of *M. oleifera* leaves, the abundance of culturable spore-forming bacteria isolated from the 3 types of biotopes decreased. Bacteria of the genus *Bacillus* were subject to relative inhibitions at different concentrations of the two types of extracts after all incubation periods and at temperatures 23°C and 37°C. The species *Clostridium perfringens* appeared to be sensitive only to hydroethanolic extracts with concentrations of 1.5 and 2 g/L after 6 and 24 hours of incubation. Overall, the decreases in the abundances of the spore-forming bacteria identified appeared to increase with increasing concentrations of the extracts. Chemical analyses of extracts from *M. oleifera* leaves showed the presence of numerous chemical compounds including sucrose (heteroside), glucomoringinin (glucosinolate), neochlorogenic acid (phenolic acid), 0-acetylshanzhiside methyl ester (iridoid), isoquercetin (flavonoid), Kaempferol-3-O-glucoside and Kaempferol acetylglucoside (flavonoid heteroside). Some of these compounds have bactericidal or bacteriostatic properties. These results show the potential use of *M. oleifera* extracts in the microbiological treatment of water intended for human consumption, in particular the treatment of these waters against *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *C. perfringens*.

Keywords: Spore-raising bacteria, diversity and dynamics of abundance, rainwater, groundwater, surface water, antimicrobial susceptibility, abiotic factor.



INTRODUCTION

Les systèmes d'approvisionnement en eau dans le monde varient considérablement d'un pays à l'autre, et dépendraient entre autres du niveau de développement du pays, de l'effectif de sa population (Baechler, 2012). Lorsqu'elle est polluée, l'eau peut être l'un des principaux vecteurs de transmission de nombreuses maladies à l'origine d'épidémies humaines ou animales majeures. Cette pollution peut concerner les rivières, les eaux saumâtres, les eaux de pluies ainsi que la rosée, la neige et les glaces polaires. L'eau présente dans chaque type d'environnement peut être polluée par des produits chimiques ou par des micro-organismes, notamment des protozoaires, des champignons, des virus ou des bactéries (Thierry *et al.*, 2004).

Différentes familles de bactéries peuvent être trouvées dans les milieux aquatiques. Ces micro-organismes ont des propriétés diverses. Certaines méthodes couramment utilisées pour les identifier sont basées sur la coloration de Gram et le caractère sporulé des cellules (Higgins & Dworkin 2012 ; Cho & Chung 2020).

De nombreux microorganismes procaryotes et eucaryotes peuvent produire des spores, pouvant servir pour leur reproduction ou pour leur protection face à des conditions environnementales drastiques. Les bactéries du genre *Bacillus* et *Clostridium* sont connues sous le nom de bactéries Gram positives et sporulées. On les retrouve dans l'air, dans l'eau ou dans le sol (Brillard *et al.*, 2014). Le cycle de vie des bactéries sporulées comprend trois processus physiologiques différents : la croissance végétative, la sporulation et la germination. La transition d'un mode de développement à un autre est régie par la disponibilité des nutriments, qui est détectée par le micro-organisme (Rosenberg *et al.*, 2012 ; Sella *et al.*, 2014).

Les spores se forment généralement lorsque l'organisme végétatif est stressé par la limitation des conditions favorables telle la disponibilité des nutriments, ou les facteurs physiques ou chimiques de l'environnement devenus défavorables. Elles résistent à la chaleur (résistance à la chaleur humide et résistance à la chaleur sèche), au dessèchement, aux produits chimiques, aux rayons UV, aux rayonnements gamma et à la pression hydrostatique ultra élevée. Elles représentent donc une préoccupation majeure en raison de leur haute résistance aux procédés de traitement physique et chimique des eaux (Nicholson *et al.*, 2005 ; Higgins & Dworkin 2012 ; Cho & Chung 2020). Leur formation a évolué comme un mécanisme d'évasion à la fois spatiale et temporelle des conditions locales défavorables à une croissance rapide (Nicholson 2002 ; Nicholson *et al.*, 2005). Selon une étude sur les spores alimentaires et environnementales, la spore bactérienne est l'un des ingrédients les plus compétitifs à utiliser comme compléments alimentaires chez les adultes qui en ont besoin (Etoa, 2018).

L'élimination des microorganismes de l'eau de boisson procède par diverses méthodes faisant parfois appel à une panoplie de réactifs chimiques tels le javel, le chlore, le dioxyde de chlore, la chloramine et l'ozone, ainsi que de matériels dont les coûts d'acquisition sont parfois élevés (Bull, 2012). Plusieurs des produits ci-dessus actuellement utilisés dans le traitement bactériologique de l'eau par les municipalités ou les pouvoirs publics et destinée à la consommation laissent parfois des sous-produits de désinfection tels les acides haloacétiques, les trihalométhanes, et qui présentent des risques sanitaires à long terme pour les consommateurs d'eau (Bull, 2012). Ces sous-produits proviennent des interactions entre les produits ajoutés à l'eau pour le traitement et divers composés chimiques présents dans l'eau naturelle. Si le traitement s'avère inefficace, l'éradication des germes en cas d'infection des consommateurs par les bactéries par exemple nécessite généralement le recours à des antibiotiques.

Les bactéries sont devenues plus résistantes aux antibiotiques, ce qui pose un problème de santé publique important (Chen *et al.*, 2022 ; Wang *et al.*, 2022). Cette résistance microbienne varie d'un antibiotique à l'autre, et d'un individu à l'autre. La résistance aux antibiotiques pourrait résulter d'une modification génétique au cours de laquelle des mutations aléatoires des gènes codant pour les enzymes peuvent donner naissance à des catalyseurs modifiés avec des spectres de résistance de plus en plus étendus. Certaines bactéries peuvent donc être naturellement résistantes à certains antibiotiques. D'autres, en revanche, développent une résistance par des mutations génétiques induites par l'exposition aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques a la possibilité de se propager, étant donné la facilité d'échange du matériel génétique entre les espèces bactériennes (Roberts & Zembower, 2021).

Le recours à la phytothérapie apparaît depuis quelques années comme une alternative aux antibiotiques classiques. Dans certains pays asiatiques et africains, environ 80 % de la population utilise des plantes médicinales pour traiter divers problèmes de santé (Salmeron-Manzano *et al.*, 2020). Selon Metsopkeng *et al.* (2020), les plantes médicinales sont consommées sous forme d'infusion, de décoction ou de macération, et les solvants sont souvent de l'eau ou de l'alcool. Ces plantes médicinales sont de diverses espèces, genres et familles. Les espèces du genre *Moringa* sont largement utilisées à travers le monde sous forme de décoctions et de macérations (aqueuses et alcooliques) des différentes parties de la plante (Sen & Samanta, 2015).

Plusieurs études ont été réalisées sur les bactéries non sporulantes dans les eaux souterraines de la région équatoriale du Cameroun (Afrique Centrale). Il apparaît que ces eaux abritent une microflore bactérienne variée composée entre autres de Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae (Tallent *et al.*, 2012 ; Pauline, 2013, Eheth *et al.*, 2019 ; Manouoré Njoya *et al.*, 2021). L'abondance de ces germes est influencée par facteurs

météorologiques, et des facteurs liés aux espèces bactériennes (Holt *et al.*, 2000 ; Amin *et al.*, 2015). Leur sensibilité aux antibiotiques varie selon l'espèce ou la souche concernée (Abuulhamd, 2010 ; FMS-Eucast, 2022). Leurs transferts de la surface du sol jusqu'au toit de nappe phréatique est influencé par divers facteurs dont certains sont liés à la bactérie elle-même (tels sa forme, son état physiologique, la présence ou absence des appendices superficielles) (Nola *et al.*, 2010). D'autres sont liés aux propriétés physico-chimiques et hydrologiques des eaux d'infiltration (Nola *et al* 2006), ou encore aux propriétés structurales et pétrographique des sols (Nola *et al.*, 2005, 2011, 2012).

Certains auteurs ont étudié le profil de résistance des familles d'antibiotiques sur les germes bactériens comme *Aeromonas* et *Pseudomonas* isolés dans les eaux souterraines et superficielles de certaines régions du Cameroun, et ont montré que la susceptibilité aux antibiotiques pourrait être influencée par de nombreux facteurs abiotiques (Signe *et al.*, 2015 ; Chelkia & Gueriani, 2019 ; Eheth *et al.*, 2019 ; Eheth, 2021). D'autres études ont montré que les extraits de la plante *Moringa oleifera* Lam., 1785 sont parfois utilisés pour lutter contre certains micro-organismes d'importance sanitaire, notamment certaines espèces des genres *Escherichia*, *Aspergillus* et *Candida* (Abd El-Hack *et al* 2022 ; Metsopkeng *et al* 2020, 2022).

Si quelques données sont ainsi disponibles sur la diversité et la dynamique d'abondance des bactéries non sporulantes et les mécanismes de leur transfert dans les eaux souterraines dans la région équatoriale du Cameroun, l'on a peu d'informations concernant les bactéries sporulantes, tant dans les biotopes aquatiques surfaciels et souterrains que dans les eaux de pluies. Aussi, les informations relatives à l'activité de quelques agents antimicrobiens vis-à-vis de ce groupe de bactéries sont relativement rares.

Il s'en suit les questions de recherche suivantes :

- Quelle serait la diversité des bactéries sporulantes dans divers biotopes aquatiques à Yaoundé ?
- Quel serait l'impact des propriétés abiotiques de ces biotopes sur la diversité et les abondances de ces bactéries ?
- Quel serait le comportement de ces bactéries vis-à-vis des agents antimicrobiens ?

Le travail s'appuie sur des hypothèses de recherche suivantes :

- Les bactéries sporulantes des eaux souterraines, superficielles et météoriques de la ville de Yaoundé subiraient des variations spatio-temporelles ;
- Cette variable microbiologique serait impactée par des propriétés abiotiques des biotopes ;

- Les profils de sensibilité/résistance de ces bactéries aux antimicrobiens seraient variés.

La présente étude a visé à étudier la dynamique d'abondance de quelques bactéries sporulantes dans les eaux à Yaoundé, l'impact des facteurs abiotiques et la susceptibilité de ces bactéries vis-à-vis de quelques agents antimicrobiens.

Spécifiquement il s'est agi :

- de déterminer la diversité et la dynamique d'abondance des bactéries sporulantes dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux météoriques de Yaoundé ;
- de mesurer les paramètres physicochimiques de ces différents biotopes et leur influence sur la dynamique d'abondance bactérienne ;
- d'évaluer la susceptibilité de ces bactéries à quelques antibiotiques et extraits de la plante médicinale *Moringa oleifera*.

Le présent document s'articule autour de trois chapitres. Le premier est consacré à la revue de la littérature. Le second présente l'aspect physique de la région d'étude, le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième et dernier chapitre expose les résultats obtenus, leur interprétation et la discussion qui en découle. Le document se termine par une conclusion, quelques recommandations et des perspectives.



CHAPITRE I :
REVUE DE LITTERATURE

I.1. Généralités sur la spore bactérienne

I.1.1. Définition et historique

Les spores bactériennes sont un type de cellules différenciées, métaboliquement inactives et très résistantes aux traitements par la chaleur, la pression, les UV et les produits chimiques (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Les spores de bactéries ont été étudiées pour la première fois par Cohn et Koch en 1876 (Logan, 2012). Elles font partie des formes les plus résistantes des organismes vivants (Carlin, 2011). La formation des spores permet à la bactérie de survivre et résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques (Nicholson *et al.*, 2002 ; Setlow, 2006). De plus, les spores peuvent survivre pendant de très longues périodes dans des environnements pauvres en nutriments. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les spores du genre *Bacillus* pouvaient survivre plusieurs millions d'années dans des niches écologiques spécifiques telles divers types de sols (Cano et Borucki, 1995 ; Vreeland *et al.*, 2000). La capacité à sporuler est potentiellement retrouvée chez six classes (Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichia, Negativicutes, Tissierellia et Limnochordia) (Galperin *et al.*, 2022). Quelques bactéries lactiques du genre *Sporolactobacillus* mais aussi certaines bactéries à Gram négatif (G-), du genre *Acetonema*, sont aussi connues pour leur capacité à sporuler (Tocheva *et al.*, 2016).

Chez ces bactéries, le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation, la dormance et la germination (Stephens, 1998). Les spores de *Clostridium* et *Bacillus* sont incapables de germer à un pH inférieur à 4,5. Ce n'est que pour des produits moins acides que des précautions particulières doivent être prises (Couvert, 2002). Les mécanismes de sporulation, germination et résistance sont beaucoup étudiés chez *Bacillus* avec comme modèle *B. subtilis*. En revanche, ces mécanismes le sont moins chez les bactéries anaérobies comme *Clostridium* et quasiment pas chez les thermophiles. Des auteurs ont cependant mis en évidence des différences dans les signaux de sporulation entre les *Bacilli* et les *Clostridia* avec notamment l'absence de quatre gènes impliqués dans la sporulation chez les *Clostridia* et une batterie de gènes codant les protéines de la tunique des spore retrouvées uniquement dans la famille des Bacillaceae (Galperin *et al.*, 2012).

I.1.2. Structure et composition chimique de la spore bactérienne

La spore se compose de l'extérieur vers l'intérieur d'un exosporium, des tuniques externes et internes, d'une membrane externe, d'un cortex, d'une membrane interne et d'un core.

- L'exosporium : La structure et l'organisation de l'exosporium ont été mise en évidence par microscopie électronique (Rodenburg *et al.*, 2014). On le trouve chez de nombreuses bactéries, en

particulier chez les *Bacillus* (Leggett *et al.*, 2012). Au sein du genre *Bacillus*, l'exosporium est constitué d'une enveloppe protéique, la couche basale, qui est recouverte d'appendices. Il est séparé des tuniques par un inter espace et il est ancré à la tunique externe par des interactions protéines-protéines (Stewart, 2015). Ces interactions impliquent notamment la protéine CotE et des protéines de l'exosporium telles que ExsY et CotY (Lablaine *et al.*, 2021). Il a plusieurs rôles : il peut fournir une résistance à des traitements chimiques et enzymatiques. Il améliore les propriétés d'adhésion des spores aux différentes surfaces et joue également un rôle dans la germination (Faille *et al.*, 2007).

- Les tuniques : Elles sont constituées de trois couches : la couche basale, la tunique interne et la tunique externe et principalement constituées de protéines, et jouent un rôle majeur dans la protection des spores. La formation de chacune des trois couches nécessite des protéines morphogénétiques qui sont produites précocement pendant la sporulation. Lors d'études de génétique inverse, l'observation de spores en microscopie électronique a permis d'identifier cinq protéines morphogénétiques des tuniques : SpoIVA, SpoVM, SpoVID, SafA et CotE (Driks & Eichenberger, 2016 ; Krajčíková *et al.*, 2021). Plus de 80 protéines ont été identifiées comme constitutives des tuniques, ce qui représente près de 30% du nombre total de protéines de la spore (Driks & Eichenberger, 2016). En microscopie électronique, la tunique interne a une apparence lamellaire tandis que la tunique externe est plus épaisse et plus dense aux électrons (Driks & Eichenberger, 2016). Elles confèrent à la spore une résistance contre les enzymes qui peuvent dégrader le cortex et le core (Setlow, 2014b).

- La membrane externe : elle se trouve sous le manteau de la spore. Sa fonction exacte demeure incertaine. Cependant c'est une structure essentielle dans la formation de la spore (Leggett *et al.*, 2012). La suppression de cette membrane chez les spores n'affecterait pas leurs résistances à la chaleur, aux radiations et à certains agents chimiques (Setlow, 2006).

- Le cortex : il est principalement constitué d'un peptidoglycane qui a une structure spécifique. Comme le peptidoglycane primordial, il présente une répétition de résidus GlcNAc et MurNAc. En revanche, dans le peptidoglycane du cortex, 50% des résidus MurNAc sont sous la forme δ -lactame (Angeles & Scheffers, 2020). Les résidus δ -lactame n'ont pas de rôle dans la dormance et la déshydratation des spores mais ils sont la cible d'enzymes corticolytiques lors de la germination. Les résidus δ -lactame ne possèdent pas de groupement carboxyles. Il en résulte que le nombre de liaisons peptidiques entre les chaînes de glycanes est fortement réduit (Angeles & Scheffers, 2020). Le cortex constitue une structure de résistance mécanique des spores face à la forte pression osmotique générée par la concentration importante des solutés dans le cœur. Le cortex pourrait jouer un rôle dans la création et le maintien de l'état comprimé de la membrane interne pendant la sporulation et ce, jusqu'à la germination (Angeles & Scheffers, 2020 ; Christie & Setlow, 2020).

- La membrane interne : c'est une membrane phospholipidique qui deviendra la membrane plasmique de la cellule végétative après sa germination. Elle apparaît très compressée dans la spore en dormance. Sa composition en lipides est très similaire à celle de la membrane plasmique des cellules végétatives (Leggett *et al.*, 2012). Elle est connue comme étant le site où sont localisés les récepteurs de la germination. Elle constitue donc une structure importante pour le processus de germination (Setlow, 2003).

- Le core : au centre de la spore se trouve le core, l'analogue du protoplaste chez les cellules végétatives. Il contient les enzymes de la spore ainsi que des acides ribonucléiques (ARNr, ARNt, ARNm) et des ribosomes sont également retrouvés au sein du cœur (Christie & Setlow, 2020). Dans la plupart des cas, les enzymes et les acides nucléiques de la spore sont identiques à ceux de la cellule végétative (Setlow, 2006). Ces acides ribonucléiques seraient des « vestiges » du processus de sporulation. En effet, l'activité ATPase dans le cœur de la spore est trop basse pour témoigner de la synthèse de protéines et les ARN présents se dégradent au cours du temps. La faible teneur en eau du cœur ainsi que la présence de minéraux jouent un rôle clé dans la résistance des spores à la chaleur humide (Setlow, 2014b). La figure 1 ci-dessous présente la structure interne de la spore.

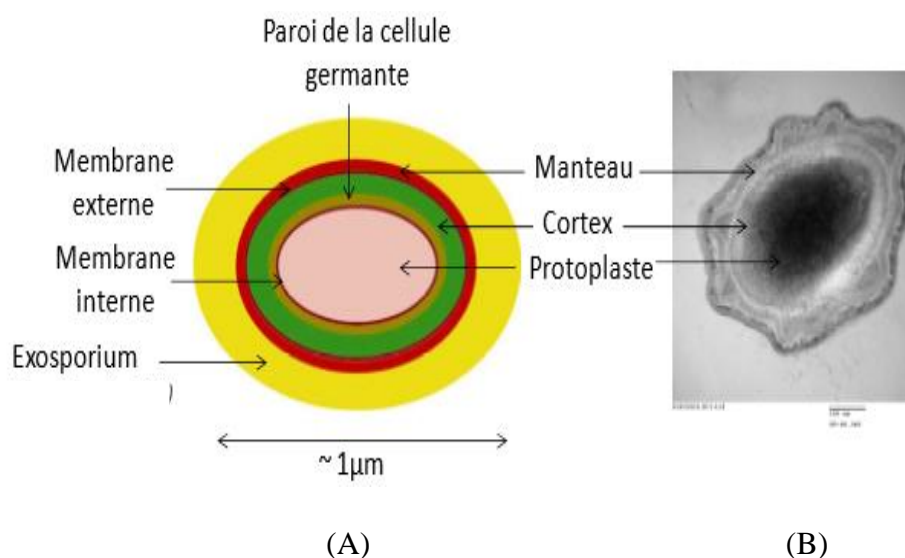


Figure 1 : Schéma général de la structure de la spore bactérienne (A) et d'une spore de *Bacillus Subtilis* (B) observé au microscope électronique (Eichenberger, 2007)

I.1.3. Phénomènes de sporulation et germination

La formation de spores est l'un des modes d'adaptation ultime des micro-organismes en réponse aux rigueurs de l'environnement. Ce processus est déclenché chez les bactéries pouvant former des spores par la diminution voire l'absence de nutriments ou bien par les stress subis par la cellule végétative dans l'environnement dans lequel elle se trouve (Burkholder & Grossman, 2000).

I.1.3.1. Sporulation

Les étapes morphologiques de la formation des spores sont similaires chez toutes les bactéries sporulantes (Talukdar *et al.*, 2015). La sporulation bactérienne est un processus complexe divisé en huit grandes étapes (Riley *et al.*, 2020) (Figure 2).

La première étape, numérotée 0, correspond à la multiplication normale des cellules par fission binaire. Lorsque les conditions environnementales ne sont plus favorables à la croissance, les bactéries s'engagent dans le processus de sporulation et elles entrent dans l'étape I. Le premier stade se caractérise par la présence d'un filament axial de matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond au génome dupliqué. Dans la deuxième étape, les deux génomes se séparent par fragmentation du filament axial, en même temps que la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum. Ce septum partage la cellule en deux compartiments de taille inégale. Le septum de sporulation va envelopper le cytoplasme du petit compartiment pour former une pré-spore caractéristique du stade trois. Le grand compartiment correspond à la cellule mère. A cette étape, le processus de la sporulation est irréversible et les stades suivants correspondent à la maturation de la spore à l'intérieur de la cellule mère (Higgins & Dworkin, 2012).

La sporulation se traduit d'abord par la division asymétrique du sporange en deux compartiments : la cellule mère et la pré-spore, séparées par le septum. L'internalisation de la pré-spore par la cellule mère est suivie de la fission membranaire située au pôle opposé du sporange. Une double membrane liée à la pré spore est formée. L'assemblage des couches de la spore commence aussitôt après l'initiation de l'internalisation et se poursuit jusqu'à la fin de la sporulation. Le cortex, peptidoglycane entre les membranes interne et externe de la pré spore, est formé à la fin de la sporulation. Dans la dernière étape, la cellule mère est lysée pour libérer les spores matures dans l'environnement.

Au stade quatre, la cellule mère produit des molécules chimiquement proches du peptidoglycane qui viennent s'accumuler entre les deux membranes pour former le cortex. Chez certaines espèces, une autre couche protéique plus externe est synthétisée, c'est l'exosporium. La formation du cortex et de l'exosporium se poursuit au stade 5. On observe également une accumulation d'acide dipicolinique (DPA) et de calcium dans le cytoplasme. Cette accumulation s'accompagne d'une déshydratation de la spore, et de la production de SASPs (Small Acide Soluble spore Proteins). Au stade six, la maturation de la spore s'achève par la synthèse de nouvelles enveloppes protéiques : les tuniques, composées de protéines riches en cystéines, s'insèrent entre le cortex et l'exosporium. La cellule mère (ou sporange) est lysée au stade sept sous l'effet d'enzymes lytiques. La spore mature est libérée dans l'environnement. Le processus de sporulation dure

généralement 7 à 10 heures (Al-Hinai *et al.*, 2015 ; Fimlaid & Shen, 2015). La sporulation permet la survie de la bactérie grâce à ses propriétés uniques et aux différentes couches qui la composent lui permettant ainsi de résister aux différents stress environnementaux.

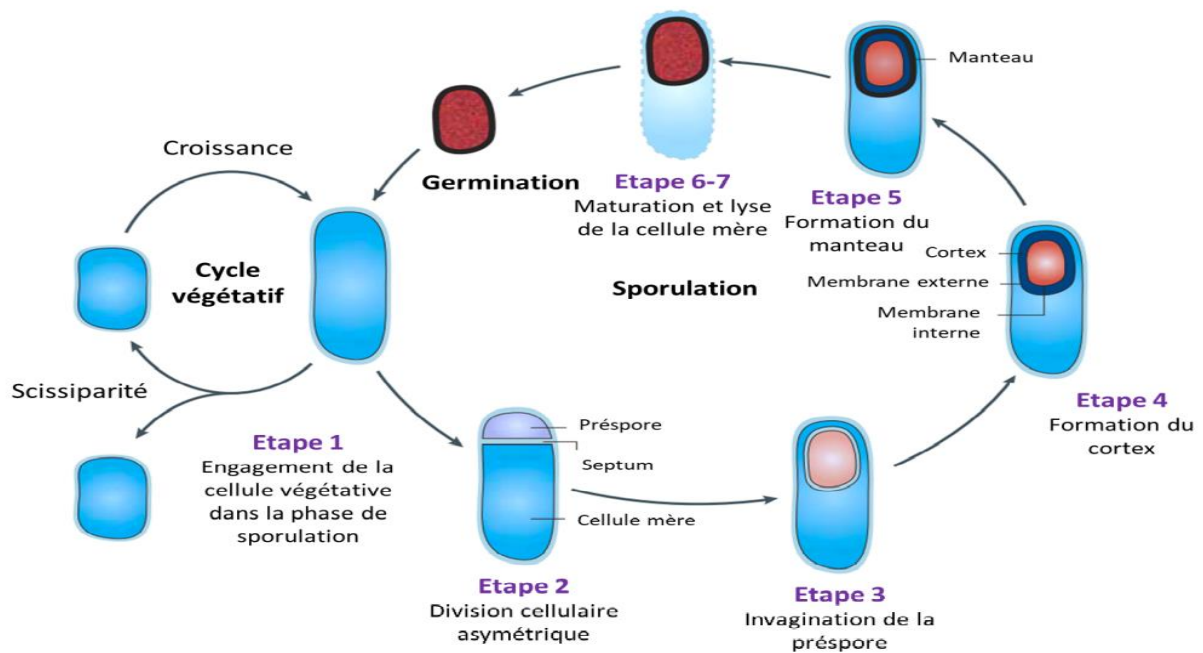


Figure 2 : Schéma des sept étapes du processus de sporulation et du cycle végétatif. (Higgins et Dworkin, 2012 ; Gauvry *et al.*, 2017).

I.1.3.2. Germination

Dans son environnement naturel, la germination d'une spore a lieu lorsque de l'eau et quelques nutriments sont présent autour de la spore, ces conditions traduisant que les conditions environnementales permettent potentiellement le développement du cycle végétatif de l'organisme. De nombreux stimuli différents peuvent induire la germination tels que la présence de nucléosides, de sucres ou encore d'acides aminés. Cette sortie de l'état de dormance peut également être induite par des éléments non métabolisables, appelés parfois inducteurs de germination, comme des surfactants cationiques, des ions et également le DPA. Certains traitements physiques utilisés dans des processus de décontamination peuvent également forcer mécaniquement la germination des spores, comme l'utilisation de hautes pressions par exemple (Setlow, 2014a ; Fekraoui *et al.*, 2021). Certains germinants comme le DPA sont universels dans le sens où le DPA est connu pour activer le processus de germination des spores peu importe l'espèce. On estime cependant que dans l'environnement naturel, les éléments métabolisables jouent un rôle prédominant par rapport à d'autres germinants non métabolisables, comme le DPA (Setlow, 2014a). Le processus de germination induit par des éléments nutritifs commence par la reconnaissance des nutriments par des récepteurs de germination (GRs) situés sur la membrane interne des spores. Il a récemment été montré

que ces GRs ne sont pas répartis sur toute la membrane interne mais sont groupés au sein d'ensembles appelés « germinosomes » (Wen *et al.*, 2019). Pour *B. subtilis*, ces GRs sont composés de trois sous-unités appelées GerA, GerB et GerK. La sous-unité GerA est activée par la L-alanine tandis que GerB et GerK sont activés par la L-asparagine, le D-glucose, le D-fructose ou encore le potassium. Lorsque les GRs sont activés, une période de transition variant de quelques minutes à 24h est observée avant la première étape de germination. Ce qui se passe durant cette période n'est cependant pas encore bien compris (Setlow, 2014a). Après l'activation de GRs, on segmente généralement le processus de germination en deux étapes (Figure 3).

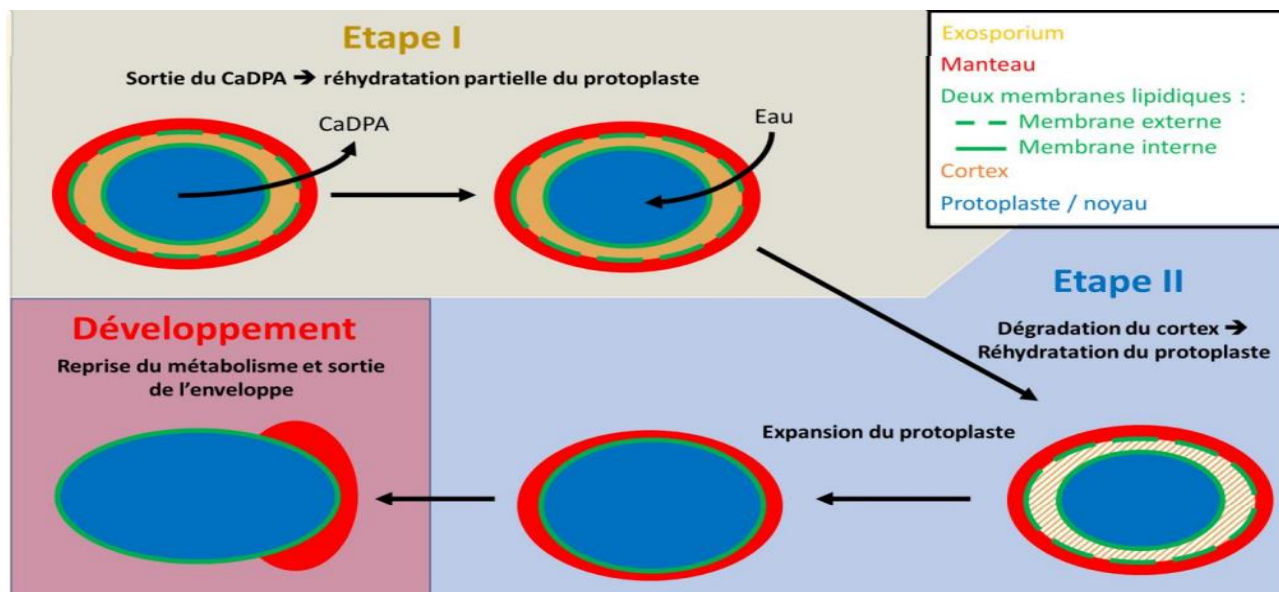


Figure 3 : Les différentes étapes de germination des spores bactériennes (Setlow, 2003).

Au cours de la première étape de germination, une sortie de cations H^+ , Na^+ et K^+ , suivie peu de temps après d'une ouverture des canaux SpoVA, situés sur la membrane interne, entraîne la sortie du CaDPA. Ces mouvements de molécules à travers la membrane interne ont deux conséquences. La première est une réhydratation partielle du protoplaste de la spore. La seconde est une activation des enzymes de lyse du cortex - Cortex Lytic Enzymes (CLE). Les deux CLE majoritaires sont les enzymes CwIJ et SleB. CwIJ est localisée dans le manteau et est activée par la sortie de CaDPA. SleB quant à elle encadre le cortex en étant localisée dans la membrane interne et dans le manteau de la spore. L'activation de cette enzyme n'est cependant encore pas entièrement comprise (Setlow, 2014a ; Xing & Harper, 2020). Cette activation des enzymes CLE initie la seconde étape de la germination avec la dégradation du cortex par ces enzymes. Ces deux enzymes hydrolysent les résidus δ -lactam muramiques (MAL) des peptidoglycanes du cortex. C'est pour cette raison que la future paroi de peptidoglycanes de la cellule végétative, juxtaposée à la membrane interne, n'est pas dégradée lors de cette étape car elle ne contient pas de résidus MAL. C'est lors de cette seconde étape que le protoplaste se réhydrate complètement. La spore perd sa biréfringence observée lors de

son état de dormance en microscopie à contraste de phase, apparaissant alors noire avec cette technique. A ce stade la spore a perdu la plupart de ses propriétés de résistance. La dégradation du cortex de la spore ainsi que sa réhydratation entraînent une expansion du protoplaste de 2 à 3 fois son volume initial. Toutes ces étapes sont purement mécaniques et aucune activité métabolique n'est détectable à ce niveau. L'hydratation va permettre l'hydrolyse des protéines SASPs saturant l'ADN de la spore, ainsi qu'une reprise progressive de l'activité métabolique. Finalement, la nouvelle cellule ayant fini sa germination, elle va reprendre sa croissance. Cela se traduit en premier lieu par une phase d'élongation et de dégradation du manteau protéique de la spore, pour sortir de son enveloppe.

I.1.4. Propriétés de la spore bactérienne

La spore est caractérisée par des propriétés de haute résistance à la chaleur, aux agents chimiques et aux rayonnements, des propriétés de germination et d'adhérence. Ces propriétés remarquables sont dues à la structure unique des spores.

I.1.4.1. La dormance

Les spores sont capables de rester dans un état de dormance pendant de nombreuses, voire des milliers d'années (Setlow & Johnson, 2007 ; Wei *et al.*, 2010). La raison majeure de cet état de dormance est la faible teneur en eau du cœur de la spore qui prévient toute réaction enzymatique (Setlow, 1993). De plus, le peptidoglycane du cortex jouerait également un rôle dans l'état de dormance (Ellar, 1978). Deux hypothèses sur le rôle du cortex dans ce maintien de cet état de dormance ont été proposées : La première est que dès sa formation, le cortex subirait un clivage enzymatique ; ce qui lui permet de s'accroître, engendrant ainsi une augmentation de la pression à l'intérieur du cœur de la spore interdisant toute entrée d'eau. La seconde hypothèse est que la complexité de la structure du cortex pourrait jouer un rôle dans la déshydratation du cœur de la spore (Etoa, 2018).

I.1.4.2. La résistance

La forme sporulée confère aux bactéries des propriétés de résistance à différents facteurs auxquels les cellules végétatives sont habituellement sensibles. Les spores bactériennes sont ainsi plus résistantes aux UV, aux enzymes lytiques, aux hautes températures, à la pression ou encore aux agents antimicrobiens (Leggett *et al.*, 2012 ; Setlow, 2014 ; Talukdar *et al.*, 2015).

I.1.4.2.1. Résistance aux agents chimiques

Les spores sont généralement plus résistantes que les cellules végétatives à une variété de produits chimiques tels que les acides, les bases, les phénols, les aldéhydes, les agents alkylants et les agents d'oxydation (Clavel *et al.*, 2004 ; Setlow, 2006).

Le traitement des spores à l'acide tue probablement les spores par la rupture de la barrière de perméabilité de la membrane interne, alors que les bases fortes dénaturent les spores en inactivant les enzymes lytiques présentes au niveau du cortex (Setlow *et al.*, 2002).

Dans le cas du formaldéhyde, de l'acide nitreux, et des agents alkylants, l'inactivation des spores se fait par des lésions de l'ADN, et les spores survivantes possèdent des mutations au niveau de leurs gènes, ce qui les rend plus sensibles à ces agents (Setlow, 2006).

En ce qui concerne les aldéhydes tels que le glutaraldéhyde et l'ortho-phthalaldéhyde (OPA), le mécanisme de dénaturation des spores par ces deux agents reste incertain, même si ces deux derniers agents chimiques ne dénaturent pas les spores en endommageant leurs ADNs (Cabrera-Martinez *et al.*, 2002).

Les agents oxydants quant à eux, semblent dénaturer les spores en provoquant des dommages au niveau de leurs couches extérieures, principalement au niveau des membranes internes, une membrane dont l'intégrité est essentielle pour la viabilité des spores (Cortezzo *et al.*, 2004). Si l'oxydation des acides gras insaturés ne semble pas être en cause dans ce mécanisme, la nature exacte des dommages causés au niveau de la membrane interne par ces agents oxydants n'est pas connue (Setlow, 2006).

Ainsi, de nombreux mécanismes sont impliqués dans la protection des spores contre ces différents agents chimiques :

- Les tuniques protéiques protégeraient les spores contre certains agents chimiques, en particulier les agents oxydants comme le dioxyde de chlore, l'hypochlorite, l'ozone et le peroxydure d'hydrogène (Genest *et al.*, 2002 ; Young & Setlow, 2003).
- La perméabilité de la membrane interne. Celle-ci présente une faible perméabilité aux petites molécules hydrophiles et hydrophobes.

I.1.4.2.2. Résistance aux agents physiques (rayonnements UV)

Les spores de diverses espèces de *Bacillus* sont parmi les plus résistantes aux rayonnements UV. Cette résistance aux UV varie significativement entre les spores suivant les espèces et les souches ; cependant, les raisons de cette différence de résistance aux UV des spores ne sont pas encore connues (Nicholson *et al.*, 2005).

De plus, les spores sont 10 à 100 fois plus résistantes aux rayonnements UV à 254 nm que ne le sont leurs cellules végétatives. Cependant, l'amplitude de la différence dans la résistance aux UV entre les spores et les cellules en croissance peuvent être différentes selon les longueurs d'onde appliquées (Nicholson *et al.*, 2005). L'absorption des UV par les acides nucléiques cause des ruptures

au niveau de l'ADN, ainsi que des dimères de thymine. Ces lésions bloquent la progression de la synthèse d'ADN, ce qui peut entraîner la mort de la cellule (Coohill & Sagripanti, 2009).

I.1.4.2.3. Résistance thermique

La température est un des processus de stérilisation des plus utilisés dans divers domaines, dont l'agroalimentaire. Etant donné que certaines bactéries sporulantes peuvent être pathogènes pour l'humain, la résistance au stress thermique des spores a été très étudiée. Les spores bactériennes sont en effet très résistantes face à des hautes températures, en comparaison des cellules végétatives. Une étude a par exemple montré que des spores de *Bacillus amyloliquefaciens* peuvent survivre environ une heure à plus de 300°C, avec un pic à 420°C dans des conditions sèches (Beladjal *et al.*, 2018). En comparaison les spores de *Bacillus subtilis* ne résiste qu'environ 30 min à une température de 140 °C, ce qui reste tout de même conséquent en comparaison des cellules végétatives (He, Chen, *et al.*, 2018). La résistance des spores à la chaleur est donc très variable d'une espèce à une autre. Cette grande résistance provient de plusieurs facteurs. Pour la chaleur humide, les principaux facteurs de résistance sont le protoplaste de la spore très peu hydraté, et certains éléments génétiques comme le transposon spoVA2mob, ainsi que les SASPs (Berendsen *et al.*, 2016 ; Setlow & Christie, 2021).

I.1.5. Présentation de quelques genres de bactéries sporulantes

I.1.5.1. Genre *Bacillus*

I.1.5.1.1. Taxonomie et morphologie du genre *Bacillus*

Bacillus (pluriel : *Bacilli*) est un genre qui regroupe les bactéries qui produisent des endospores (Medjeber, 2015). La taxonomie du genre *Bacillus* est la suivante (Lawson *et al.*, 2016) :

Règne : Bacteria,

Embranchement : Firmicutes,

Classe : Bacilli,

Ordre : Bacillales,

Famille : Bacillaceae,

Genre : *Bacillus*.

Il s'agit des bactéries en forme de bâtonnets (1,2 à 10 µm de long), chimio-hétérotrophes, généralement mobiles (présence de flagelles péritriches à contrôler à partir d'un bouillon). Les spores du genre *Bacillus* sont généralement isolées du sol, de l'eau ou de l'air (Brillard *et al.*, 2015 ; Seong *et al.*, 2018). La figure 4 montre une photographie d'une bactérie du genre *Bacillus* observée au microscope électronique.

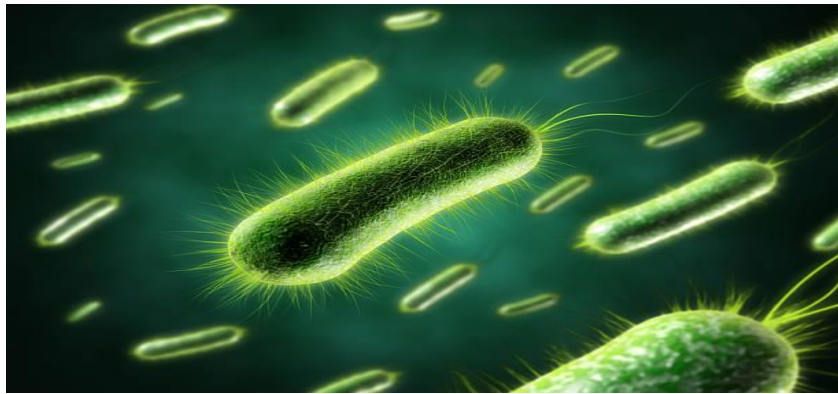


Figure 4 : Bactérie du genre *Bacillus* observée au microscope électronique (Bressuire-Isoard, 2015).

I.1.5.1.2. Caractères cultureux

La plupart des espèces se développent mieux entre 28-33°C, mais beaucoup d'espèces tolèrent des différences thermiques marquées. Les déterminations des températures seuil de croissance sont réalisées sur gélose inclinée incubée au bain marie (Todar's, 2003). Les milieux de culture usuels permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus*. Les espèces ont chacune leurs exigences propres et souvent relativement homogènes : utilisation d'azote ammoniacale pour les uns, des acides aminés pour les autres. Ces bactéries peuvent être mobile, aero-anaérobie facultatif, produire ou non des gaz et hydrolyser l'amidon.

I.1.5.1.3. Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Bacillus*

Le tableau I présente les caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Bacillus*.

Tableau I : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Bacillus* (Cisse *et al.*, 2016).

| Caractères | <i>B. cereus</i> | <i>B. licheniformis</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. thuringiensis</i> |
|-----------------------|------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| Mobilité | V | + | + | + |
| Anaérobiose | + | + | - | + |
| Gaz en glucose | - | + | - | - |
| Hydrolyse de l'amidon | + | + | + | + |
| VP | + | + | + | + |
| H ₂ S | + | + | - | - |
| Indole | - | - | - | - |
| Oxydase | - | + | + | - |
| Lécithinase | + | - | - | - |

Légende : (V) : variable ; (+) : Positif ; (-) : Négatif

I.1.5.2. Genre *Clostridium*

I.1.5.2.1. Taxonomie et morphologie du genre *Clostridium*

Le genre *Clostridium* est considéré comme l'un des plus riches dans le monde bactérien (Allen, 2003). La taxonomie du genre *Clostridium* est la suivante (Lawson *et al.*, 2016) :

Règne : Bacteria,

Embranchement : Firmicutes,

Classe : Clostridia,

Ordre : Clostridiales,

Famille : Clostridiaceae,

Genre : *Clostridium*.

Il s'agit des bacilles à gram positif anaérobies stricts, aérotolestants et formant des endospores qui font environ 1,5 à 20 µm de long et sont largement répandues dans l'environnement où elles survivent grâce à leurs spores (Lawson & Rainey., 2016). On les retrouve dans le sol, les eaux ainsi que dans le microbiote intestinal du tractus digestif (Cossart *et al.*, 2004 ; Prescott *et al.*, 2010). Ce genre regroupe près de 110 espèces pathogènes et non pathogènes identifiées sur la base des critères biochimiques et enzymatiques (Kalia *et al.*, 2011 ; Prescott *et al.*, 2016).

Le plus caractéristique, *Clostridium perfringens*, est normalement présent dans les fèces, mais en bien moins grand nombre qu'*E. coli*. Toutefois, ils ne sont pas d'origine exclusivement fécale et leur présence dans l'environnement peut avoir d'autres raisons. Les spores peuvent survivre dans l'eau beaucoup plus longtemps que les coliformes et ils résistent à la désinfection (OMS, 2000). La figure 5 montre une photographie d'une bactérie du genre *Clostridium* observée au microscope électronique.



Figure 5 : *Clostridium perfringens* vu au microscope électronique à balayage (www.phil.cdc.gov consulté le 15 octobre 2021).

I.1.5.2.1. Caractères cultureux

La plupart des espèces se développent mieux entre 45 et 46°C. Les milieux de culture usuels ou anaérobies avec l'ajout d'agents réducteurs permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Clostridium*. Cette croissance est également accentuée à une température de 46°C.

I.1.5.2.2. Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Clostridium*

Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes habituellement dépourvues de catalase et capables de produire des acides organiques et des alcools à partir des hydrates de carbone et des peptones. Les espèces diffèrent entre elles par les caractères métaboliques suivants : la protéolyse, la production d'indole, la possession d'une uréase, la fermentation des sucres (glucose, lactose, fructose, esculine, saccharose...), la production d'acides, des lipides et des phospholipides (Du *et al.*, 2020)

Tableau II.

Tableau II : Caractères biochimiques de quelques espèces du genre *Clostridium* (Du *et al.*, 2020)

| Caractères | <i>C. tetani</i> | <i>C. botulinum</i> | <i>C. chauvoei</i> | <i>C. perfringens</i> |
|--------------------|------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| H ₂ S | V | + | + | + |
| Indole | + | - | - | - |
| Glucose | - | + | + | + |
| Production d'acide | + | + | + | + |
| Lécithinase | + | + | + | - |
| Uréase | - | - | + | - |

Légende : (V) : variable ; (+) : Positif ; (-) : Négatif

I.1.6. Impact de quelques bactéries sporulantes pour l'alimentation humaine et la santé

I.1.6.1. Impact pour l'alimentation

En raison de leur caractère ubiquitaire, les spores sont fréquemment isolées à partir de matières premières de l'industrie agroalimentaire comme les céréales, les légumes, le riz, les œufs, le lait ou encore la viande (Soni *et al.*, 2016). Dans l'industrie laitière, le lait est généralement contaminé dans les exploitations agricoles que ce soit à partir des litières, des pis ou encore des équipements de traite (Islam *et al.*, 2018 ; Odeyemi *et al.*, 2020). Les aliments crus sont souvent protégés des attaques des micro-organismes par des structures difficilement dégradables, comme la peau des fruits, les coquilles de noix, le son, le collagène du tissu musculaire, ou les coquilles d'œufs (Petruzzi *et al.*, 2017). Ainsi, leur dégradation nécessite l'utilisation d'enzymes particulières telles que des pectinases ou des protéases. De ce fait, les aliments crus avant la récolte ne sont souvent contaminés qu'en surface. Cependant, au cours des étapes de transformation, cette protection disparaît et les aliments

deviennent alors plus vulnérables à la propagation des microorganismes. Ces spores peuvent contaminer des aliments comme le riz, les pommes de terre ou la viande et peuvent alors résister à la cuisson ou au réchauffage. La forme végétative peut produire dans l'aliment ou dans l'intestin de l'homme des entérotoxines qui sont responsables de forts vomissements et diarrhées.

Ces contaminations microbiologiques représentent également les risques majeurs sur le plan sanitaire.

I.1.6.2. Impact en santé publique

Les infections par les spores bactériennes sont tracées depuis des milliers d'années ; cependant, la découverte des spores en tant qu'agents infectieux n'a eu lieu qu'à la fin du 19^e siècle (Torred *et al.*, 2012). Les spores bactériennes sont connues pour être des agents infectieux animaux et humains ; et sont responsables de nombreuses pathologies (Mock & Fouet, 2001 ; Logan, 2012). Les bactéries du genre *Clostridium* peuvent provoquer des intoxications aiguës. Ainsi, la forme végétative de *Clostridium botulinum* produit une toxine thermolabile responsable du botulisme, *Clostridium perfringens* peut quant à elle provoquer des intoxications via la contamination d'aliments et est également responsable de gangrènes gazeuses post-traumatique, suite à une contamination de tissus blessés par des spores. *Bacillus anthracis* (ou anthrax), une bactérie du sol, est l'agent pathogène de la maladie du charbon, qui est une maladie animale hautement infectieuse pouvant être transmise aux humains par contact avec des animaux infectés. La bactérie produit en effet des toxines « charbonneuses ». La contamination chez l'homme se fait principalement de manière directe via des coupures ou plus rarement de manière indirecte par inhalation de spores. Chez les animaux, les spores sont ingérées par les herbivores et les bactéries prolifèrent dans les vaisseaux lymphatiques exprimant alors les exotoxines, ce qui conduit finalement à la mort de l'animal.

I.1.7. Utilisations possibles des spores

La formation et la structure de la spore présentent également des intérêts pour l'alimentation ou la santé. Ainsi, les spores bactériennes sont utilisées comme agents microbiens de lutte contre les insectes pathogènes, armes bactériologiques (Etoa, 2018). Elles sont également utilisées comme probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique à l'hôte (WHO/FAO, 2001). Ces probiotiques sont donc des microorganismes ingérés vivants, présents soit dans des aliments, soit dans des médicaments ou dans des compléments alimentaires (Etoa, 2018). Les toxines de certaines spores de *Clostridium* sont utilisées en oncologie pour le traitement des tumeurs, en urologie pour le traitement des troubles urologiques, en neurologie pour le traitement de certaines myopathies et en cosmétologie pour le traitement anti-âge (Etoa, 2018).

L'intérêt d'utiliser les spores comme probiotique provient également de la possibilité de conserver le produit à température ambiante sous une forme déshydratée, sans aucun effet délétère sur la viabilité (Cutting, 2011). Plusieurs études ont cherché à savoir comment fonctionnait l'effet probiotique obtenu par les spores et/ou les cellules végétatives. Ainsi, des spores de *B. subtilis* affichant l'antigène du fragment C de la toxine tétanique ont été utilisées pour la vaccination orale et nasale et ont montré la génération de réponses muqueuses et systémiques chez un modèle murin (Duc *et al.*, 2003). Un autre mécanisme considéré comme important est la production de molécules antimicrobiennes par ces bactéries (Hong *et al.*, 2005). Plus récemment, l'utilisation des spores bactériennes, notamment de *B. subtilis*, a été envisagée comme « véhicule » de vaccins. Du fait de leur extrême résistance, notamment à la déshydratation, ces spores sont des armes biologiques potentielles. Elles peuvent en effet être disséminées rapidement à travers le monde. Ainsi, en 2001, des spores de *B. anthracis* ont été utilisées comme arme biologique (Prescott *et al.*, 2010).

I.2. Généralités sur les antibiotiques

I.2.1. Définition

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique, capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Le tout premier d'entre eux fut la pénicilline, découverte en 1928, par Alexander Fleming, médecin, biologiste et pharmacologue britannique qui a découvert, par hasard, qu'une ou des substances produites par un champignon, *Penicillium notatum*, avaient la faculté d'inhiber la croissance bactérienne (Veyssiere, 2019).

I.2.2. Classification et mode d'action des antibiotiques

I.2.2.1. Classification des antibiotiques

On distingue cinq classes principales d'antibiotiques utilisés en milieu clinique, les bêtalactamines, les aminoglycosides ou aminosides, les macrolides et apparentés, les quinolones et les cyclines (Veyssiere, 2019).

I.2.2.1.1. Bêta-lactamines

Dans la famille des bêta-lactamines, on retrouve des sous-familles, elles-mêmes subdivisées pour certaines en sous-groupe. Toutes les molécules de cette famille possèdent un noyau bêta-lactame (en rouge sur la figure 6) qui est la partie efficace de la molécule. Des variations au niveau de la

chaîne latérale naturelle ou greffée permettent de modifier les propriétés de la molécule antibiotique (Veyssiere, 2019).

Le groupe principal et le plus ancien est celui des pénicillines qui comprend le groupe des pénicillines G et V et les formes retard (benzathine benzylpénicilline), les pénicillines du groupe A (amoxicilline), celles du groupe M (cloxacilline, oxacilline), les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), les aminidopénicillines (pivmécillinam), la témocilline (dérivé de la ticarcilline) (Veyssiere, 2019). Le second sous-groupe principal derrière les pénicillines, est celui des céphalosporines avec les céphalosporines de 1ère génération ou C1G (céfalexine, céfalotine, céfazoline...), les céphalosporines de 2ème génération ou C2G (céfuroximes, céfoxitine...), les céphalosporines de 3ème génération ou C3G divisées en forme orale (céfixime, cefpodoxime, céfotiam) et les formes injectables (céfépime, céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone). Des nouvelles céphalosporines anti-SARM rentrent dans ce groupe, il s'agit de ceftaroline et ceftobiprole (Veyssiere, 2019).

Dans les bêta-lactamines, on a ensuite les carbapénèmes avec l'ertapénem, l'imipénem et le méropénem ainsi qu'un monobactam, l'aztréonam. Certains inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) possèdent également un noyau bêta-lactame. Ces inhibiteurs sont toujours utilisés en association. L'avibactam est également un inhibiteur des bêta-lactamases mais ne possède pas de noyau bêta lactame comme les précédents (Bevan *et al.*, 2017).

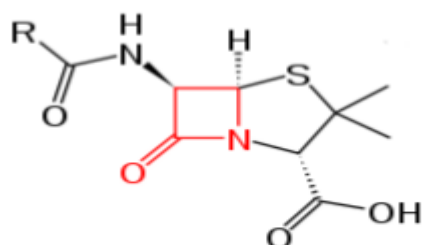


Figure 6 : Structure d'une bêta lactamine (Veyssiere, 2019)

I.2.2.1.2. Aminoglycosides ou aminosides

Les aminoglycosides sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides aminés. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et semi-synthétiques. Les plus importants sont la tobramycine, la gentamicine, et l'amikacine (Persico, 2021). La figure 7 montre la structure chimique d'un exemple d'aminoglycoside, la tobramycine.

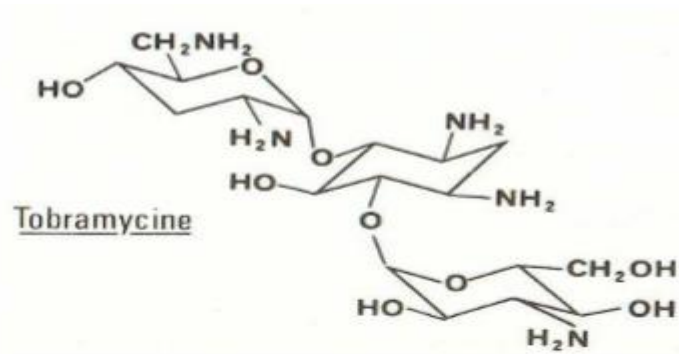


Figure 7 : Structure des aminoglycosides (la tobramycine) (Persico, 2021).

I.2.2.1.3. Macrolides et apparentés

On va distinguer les macrolides vrais ou macrolides à 14 chaînons ou C14 (clarithromycine, érythromycine qui est le chef de file, roxithromycine, diritromycine), les macrolides particuliers avec les azalides à 15 chaînons (azithromycine) et les kétolides à 15 chaînons également (téolithromycine dont la commercialisation a cessé récemment) ainsi que les macrolides à 16 chaînons (spiramycine et ses dérivés : josamycine, midécamycine) (Buxeraud & Faure, 2016). La figure 8 représente la structure chimique de l'érythromycine, chef de file des macrolides.

Dans la catégorie des apparentés, on retrouve des molécules de structures chimiques différentes, mais dont l'activité anti-bactérienne est proche, que sont les lincosamides (clindamycine, lincomycine) et les synergistines (dalfopristine, quinupristine et pristinamycine étant la seule disponible actuellement) (Buxeraud & Faure, 2016).

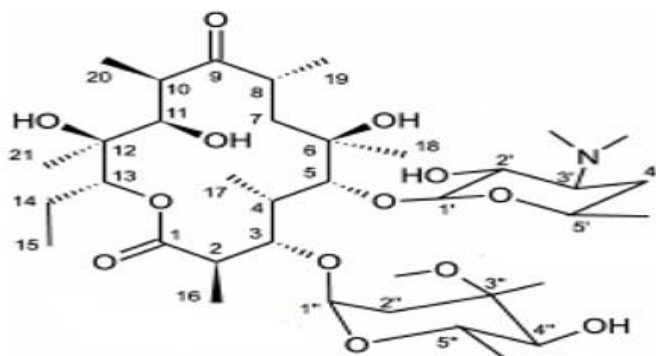


Figure 8 : Structure de l'Erythromycine, chef de file des macrolides (Buxeraud & Faure, 2016)

I.2.2.1.4. Quinolones

Les quinolones sont des agents antibactériens obtenus par synthèse chimiques, dérivant de l'acide nalidixique. Toutes les quinolones actuelles présentent une structure bicyclique, avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4. Actuellement de nouveaux composés de cette même famille d'antibiotiques ont été mis au point, dont certains additionnés d'un

atome de fluor (norfloxacine, péfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine...) possèdent une activité plus étendue et sont indiqués dans le traitement des infections systémiques et tissulaires à bacilles à Gram négatif et à Cocci à Gram positif (LeJeune, 2021). La figure 9 présente la structure chimique de l'acide nalidixique.

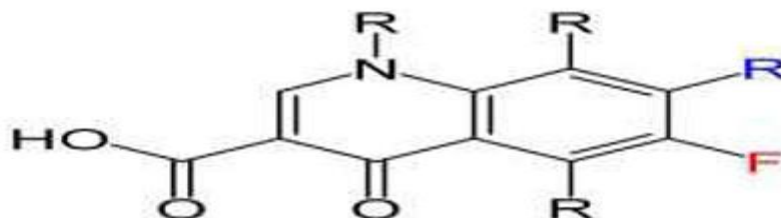


Figure 9 : Structures chimiques de l'acide nalidixique (LeJeune, 2021).

I.2.2.1.5. Cyclines

Les cyclines ou tétracyclines ont quatre cycles accolés (Figure 10). Dans cette famille on retrouve la doxycycline, lymécycline, minocycline et tigécycline (Buxeraud & Faure, 2016).

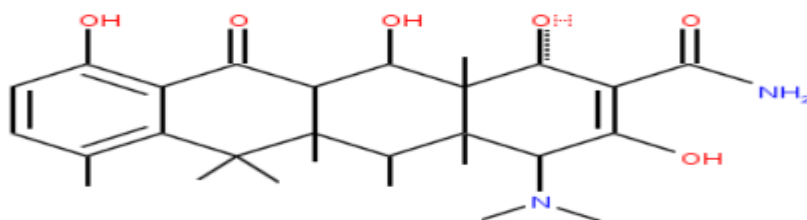


Figure 10 : Structure de base des cyclines (Buxeraud & Faure, 2016)

I.2.2.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une ou des étapes essentielles de leur développement. Ils bloquent de manière spécifique les processus métaboliques vitaux des bactéries sensibles et arrêtent ainsi leur multiplication, le plus souvent seulement temporairement (effet bactériostatique) mais parfois définitivement (effet bactéricide).

Il existe différents types d'antibiotiques capables d'agir sur les bactéries selon différents mécanismes (Gaudy, 2005). La figure 11 présente les cibles bactériennes des antibiotiques.

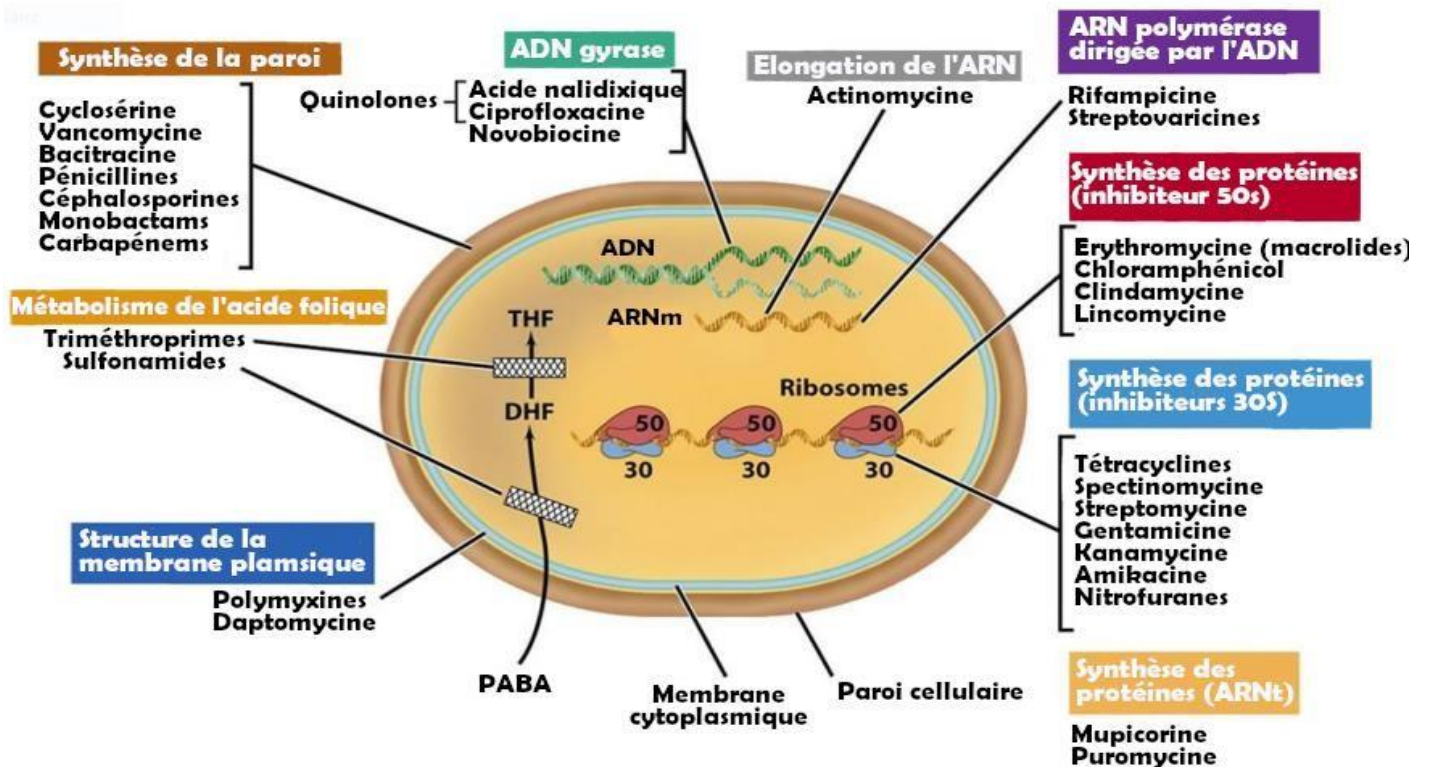


Figure 11 : Sites cibles des antibiotiques sur les bactéries (Madigan & Martinko, 2006)

I.2.2.3. Antibiotiques agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Les principales familles d'antibiotiques agissant sur la paroi des bactéries sont les suivantes (Nauciel & Vildé, 2005) :

- les **β -lactamines** : qui agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les Protéines Liant la Pénicilline (PLP) ;
- les **Glycopeptides** : qui bloquent la polymérisation du peptidoglycane en se fixant sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la phase de polymérisation du peptidoglycane ;
- **non classé** : ici on retrouve la Fosfomycine qui se fixe sur une enzyme impliquée dans la formation de l'acide N acétylmuramique qui est l'un des précurseurs du peptidoglycane.

I.2.2.3.1. Antibiotiques agissant la synthèse des protéines

- Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent inhiber par différents mécanismes, l'élongation de la chaîne polypeptidique chez les bactéries, notamment les Aminosides, les Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS), les Tétracyclines et les Phénicolés et les Oxazolidinones. Qui se fixent sur la sous unité 30S du ribosome où ils s'interfèrent avec la synthèse des protéines (Singleton, 2005), ou encore inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation (Yala *et al.* 2001).

I.2.2.3.2. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

On distinguera les antibiotiques actifs, d'une part, sur la synthèse des ARN et, d'autre part, sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs (Nauciel & Vildé, 2005). Il s'agit des Quinolones et Fluoroquinolones, les Rifamycines, les Nitrofuranes. Qui agissent sur deux enzymes impliquées dans cette synthèse : ADN gyrase (cible principale des bactéries Gram négatives) qui forme un complexe, et ADN gyrase-Quinolones qui va bloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication ADN topo- isomérase IV.

I.2.2.3.3. Antibiotiques agissant sur les membranes

On retrouve les antibiotiques tels que, les Polymyxines qui se fixent sur les phospholipides, et perturbent ainsi les transferts transmembranaires de nutriments et inhibent les phosphorylations oxydatives du métabolisme énergétique (Fauchère & Avril, 2002).

I.2.2.3.4. Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'acide folique

Plusieurs familles d'antibiotiques inhibent la synthèse des folates. Il s'agit des Sulfamides et des Diaminopyridines qui inhibent la synthèse des folates, agissent en compétition avec le Para-Amino-Benzoïque-Acide (PABA) pour le site actif, la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse une réaction essentielle à la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (DHF) nécessaire à la production des purines et pyrimidines pour la synthèse de l'acide nucléique (Agrége *et al.*, 2015).

I.2.3. Résistance des microorganismes aux antibiotiques

La résistance aux agents antimicrobiens est définie comme la capacité d'un micro-organisme à résister à l'action inhibitrice d'antibiotiques auxquels ils étaient jusque-là sensibles (OMS 2014). La résistance bactérienne à un antibiotique peut être soit naturelle, soit acquise (Mandell *et al.*, 2009).

I.2.3.1. Résistance naturelle aux antibiotiques

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Il s'agit en fait de bactéries qui sont insensibles au mode d'action de l'antibiotique. La résistance naturelle est stable et transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas transmissible sur un mode horizontal c'est-à-dire d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes (Bouyahya *et al.*, 2017). La résistance naturelle peut être due à la faible affinité de l'antibiotique pour sa cible chez la bactérie, à la production naturelle d'enzymes qui inactivent les molécules, ou encore, à l'éviction des molécules par exporteurs actifs codés par le chromosome bactérien (Hollenbeck & Rice, 2012).

I.2.3.2. Résistance acquise aux antibiotiques

On parle de résistance acquise lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes. La résistance acquise se caractérise donc par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui étaient auparavant sensibles. La résistance acquise résulte de mécanismes qui sont liés à l'ADN de la bactérie et sont donc caractérisés par des mutations ou des transferts de gènes résistant d'une bactérie résistante vers une bactérie sensible, via un plasmide par exemple (Bouyahya *et al.*, 2017).

Les mutations peuvent survenir au niveau du chromosome bactérien. Ce sont des événements ponctuels qui permettent de contourner l'effet délétère de l'antibiotique cependant ce phénomène ne concerne qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques à la fois. L'acquisition de gènes de résistance peut résulter du transfert de matériel génétique porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance venant d'une bactérie résistante. Ce deuxième mécanisme est le plus répandu et le plus préoccupant car il peut simultanément concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques. Une même souche bactérienne peut accumuler les mécanismes de résistance, mutation ou acquisition de gènes, on parle alors de multi résistance. Les bactéries multi résistantes (BMR), résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques et les bactéries pan-résistantes sont celles qui conduisent à des impasses thérapeutiques (Silva *et al.*, 2019).

I.2.3.3. Bases génétiques de la résistance

Quelle que soit la nature de la résistance, innée ou acquise, elle s'établit via des allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. L'origine de la diversité génétique est due essentiellement des phénomènes tels que les mutations chromosomiques, des hypermutations et le transfert horizontal de gènes entre les espèces de nature différente (Bouyahya *et al.*, 2017).

I.2.3.3.1. Mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques peuvent se produire spontanément lors de la réplication de l'ADN (en absence d'un vrai système de réparation). Cette marque génétique donne lieu à des protéines biochimiquement modifiées. Ce type de mutation est plus étudié chez *Escherichia coli* dont la mutation du gène *gyrA* lui confère une forte résistance. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une mutation dans le gène *mexR* cause la répression de l'opéron *mexAB-oprM* et confère la multirésistance à cette souche pathogène (Adewoye *et al.*, 2002).

I.2.3.3.2. Hypermutation

L'hypermutation est un phénomène génétique qui désigne un état transitoire durant lequel une souche bactérienne subit un taux de mutation très élevé, permettant ainsi l'acquisition de la résistance aux antibiotiques. Cet état a été montré chez certaines souches pathogènes telles que *Escherichia coli*,

Salmonella enterica, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.*, 2009). D'autres souches bactériennes utilisent cette stratégie pour lutter contre d'autres agents pathogènes (Blazquez, 2003).

I.2.3.3.3. Transfert des gènes

Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels. La transduction qui est le transfert des gènes via les bactériophages, la transformation qui est l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries et la conjugaison qui est le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs (Wellington *et al.*, 2013).

Le transfert des gènes peut se produire entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram- (Schwarz *et al.*, 2017). Le transfert horizontal des gènes a donné lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides, les céphalosporines et les fluoroquinolones. Dans certains cas, les éléments transposables (éléments mobiles qui se transposent d'une manière intra- ou interchromosomique) portent avec eux des copies des gènes via les trois mécanismes de transfert possibles : la conjugaison, la transformation et la transduction (Bouyahya *et al.*, 2017).

D'autres éléments responsables du transfert des gènes entre les bactéries sont appelés les intégrons. Ce sont des fragments d'ADN connus sous le nom des cassettes des gènes que les bactéries s'intègrent dans certaines régions d'ADN chromosomique via un mécanisme de recombinaison d'une manière site-spécifique (Davies & Davies, 2010). Ces éléments transfèrent des gènes impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles, mais leurs associations avec d'autres facteurs de transfert et d'insertion les rendent mobiles. Les mécanismes d'acquisition des intégrons ont commencé à être connus, et certaines cassettes de gènes responsables sont décrites aujourd'hui tels que les intégrons codant pour les lactamases de type métalloenzyme qui confèrent la résistance au carbapénème (Chaudhary, 2016).

I.3. Généralités sur la plante du genre *Moringa*

Moringa est le seul genre des Moringacées, famille apparentée aux Brassicacées, néverdier en français. Il comprend environ 13 espèces (*Moringa oleifera*, *Moringa Stenopetala*, *Moringa arborea*, *Moringa borziana*, *Moringa concanensis*, *Moringa drouhardi*, *Moringa hildebrandtii*, *Moringa longituba*, *Moringa ovalifolia*, *Moringa peregrina*, *Moringa pygmaea*, *Moringa rivaie*, *Moringa Ruspoliana*), dont 8 sont endémiques de la Corne de l'Afrique (Olson, 2002).

En plus d'être comestibles, toutes les parties de *Moringa oleifera* ont été déployées pour soigner d'innombrables maladies, c'est pour cette raison, qu'elle fut appelée "Miracle Tree" (Mbikay, 2012). Au Cameroun deux espèces majeurs sont cultivées : *oleifera* et *stenopetala*.

I.3.1. Histoire, aire de répartition et conditions de croissance de *Moringa*

Les *Moringa* sont des arbres polyvalents largement répandus qui auraient des propriétés nutritionnelles, thérapeutiques et prophylactiques avec plusieurs applications industrielles. Ils sont bien connus du monde antique, mais ce n'est que récemment qu'ils ont été redécouverts en raison de leurs grandes variétés et utilisations potentielles. Ce sont des arbres à croissance rapide, vivaces qui peuvent atteindre une hauteur maximale de 7 à 12 m jusqu'à la couronne (Makkar & Becker, 1997) et qui poussent naturellement à des altitudes allant jusqu'à 1000 m au-dessus du niveau de la mer. Ils sont maintenant cultivés dans tout le Moyen-Orient, presque toute la ceinture tropicale et ils ont été introduits en Afrique de l'Est depuis l'Inde au début du 20^e siècle. Environ 33 espèces ont été signalées dans la famille des Moringacées (Arora *et al.*, 2013).

La production et la gestion des *Moringa* sont faciles en raison de leur croissance rapide, de leur faible demande en éléments nutritifs du sol et en eau après la plantation, en particulier aux stades ultérieurs, leur capacité élevée à repousser après la récolte leur permet de mieux fonctionner dans des conditions marginales avec une qualité nutritionnelle suffisante (Odee, 1998). Leurs racines pénètrent profondément dans le sol pour rechercher de l'eau et des nutriments, ce qui permet aux arbres de *Moringa* de tolérer des conditions difficiles. Les *Moringa* peuvent être cultivés dans divers sols, y compris les régions tropicales et subtropicales chaudes, humides, sèches, sauf dans des conditions saturées d'eau. Les *Moringa* prolifèrent dans les sols d'argile alcaline et de limon sableux qui sont considérés comme les meilleurs milieux pour cette espèce en raison de leur bon drainage (Ramachandran *et al.*, 1980). Les *Moringa* peuvent être multipliées par plantation directe de graines, repiquage de semis et boutures de tiges matures. Le semis direct est préférable lorsque le taux de germination est élevé. Les graines doivent être semées à une profondeur maximale de 2 cm car un semis plus profond pourrait réduire le taux de germination. Il y a environ 4000 graines de *Moringa* (avec leur coquille) dans un kilo avec un pourcentage de germination de 78 à 94%. Les graines de *Moringa* germent 5 à 12 jours après le semis (Choudhary *et al.*, 2006). Les jeunes plants de *Moringa* doivent être nourris pendant 4 semaines avant le repiquage pour un meilleur taux de survie lorsqu'ils atteignent environ 30 cm de hauteur.

I.3.2. Classification taxonomique et écologie de *Moringa*

Les peuplements naturels de *Moringa stenopetala* se situent entre 400 et 1000 m d'altitude, dans des régions où les températures moyennes annuelles sont de 24–30°C. Le *Moringa stenopetala* cultivé se trouve quant à lui à 500–1800 m d'altitude, mais la limite supérieure va jusqu'à 2100 m si

les arbres sont abrités du vent et des fortes pluies. La pluviométrie annuelle de la région où il est présent en Ethiopie est de 500–2400 mm. Un léger gel est toléré, mais un gel sévère peut faire mourir les arbres jusqu’au niveau du sol. A l’état sauvage, *Moringa stenopetala* se rencontre généralement en terrain rocailleux près de points d’eau permanents. Il a une préférence pour les sols bien drainés où la nappe phréatique est élevée, ce qui ne l’empêche pas de supporter aussi des conditions de sécheresse. Par conséquent, on le trouve autant dans les zones inondées que dans les régions sèches (Olson & Carlquist, 2001). Le Tableau III représente la systématique de *Moringa* (Arora *et al.*, 2013 ; Laleye *et al.*, 2015).

I.3.3. Description botanique de *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lam. [Synonyme : *Moringa pterygosperma* (Gaertner)] est un arbre pérenne, à croissance rapide, qui peut atteindre 7 à 12 mètres de hauteur et dont le tronc généralement droit (20 à 40 cm de diamètre) atteint 1,5 à 2 mètres de haut avant de se ramifier, bien qu’il puisse parfois atteindre les 3 mètres. Les branches poussent de manière désorganisée et la canopée est en forme de parasol. Les feuilles, alternes et bi ou tripennées, se développent principalement dans la partie terminale des branches. Elles mesurent 20 à 70 cm de long et sont recouvertes d’un duvet gris lorsqu’elles sont jeunes de plus, elles ont un long pétiole avec 8 à 10 paires de pennes composées chacune de deux paires de folioles opposées, plus un à l’apex, ovales ou en forme d’ellipse, et mesurant 1 à 2 cm de long. Les fleurs mesurent 2,5 cm de large et se présentent sous forme de panicules axillaires et tombantes. Les fruits forment des gousses à trois lobes, mesurant 20 à 60 cm de long, qui pendent des branches. Lorsqu’ils sont secs, ils s’ouvrent en trois parties. Chaque gousse contient entre 12 et 35 graines. Les graines sont rondes, avec une coque marron semi-perméable (Obafemi *et al.*, 2015).

Tableau III : Classification taxonomique du genre *Moringa*

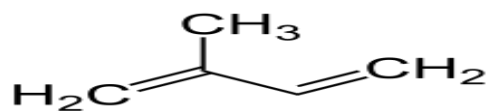
| Classification : | |
|-------------------------|--|
| • | Domaine : Biota Endl.(D.Don) |
| | Règne : Plantae Haeckel, 1866 |
| ▪ | Sous-Règne : Viridaeplantae/ Chlorobionta (Végétaux verts) |
| ▪ | Infra-Règne : Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011 |
| ▪ | Classe : Equisetopsida C.Agardh, 1825, Plantes sans fleurs |
| | Clade : Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998 Plantes vasculaires (vaisseaux conducteurs) |
| ▪ | Clade : Spermatophyta, Graines |
| ▪ | Sous-Classe : Magnoliidae Novák ex Takht., 1967, Plantes à fleurs |
| ▪ | Super-Ordre : Rosanae Takht., 1967, Dicotyledons |
| • | Ordre : Brassicales Bromhead, 1838 |
| ○ | Famille : Moringaceae Martinov, 1820 |
| ▪ | Genre : <i>Moringa</i> Adans., 1763 |
| ▪ | Espèce 1 : <i>Moringa oleifera</i> Lam., 1785 |
| ▪ | Espèce 2 : <i>Moringa stenopetala</i> Lam., 1785 |

I.3.4. Potentiel antimicrobien du genre *Moringa*

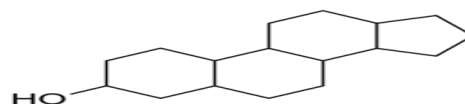
Les plantes du genre *Moringa* produisent les métabolites secondaires comme toutes les autres plantes, ce sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak & Joël., 2007). Ces métabolites n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (Peeking A *et al.*, 1987). Ces constituants chimiques sont primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement. Ils présentent une énorme valeur économique en particulier pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique (Verpoorte & Alfermann, 2000).

I.3.4.1. Terpénoïdes

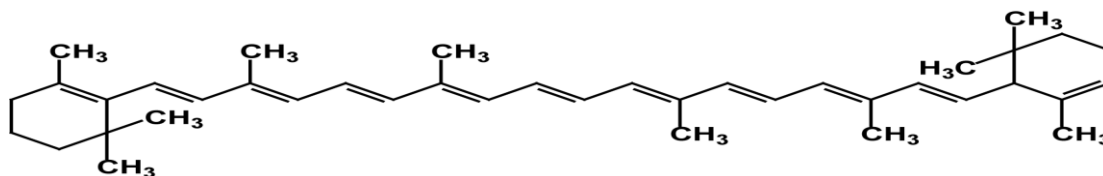
Ils constituent un vaste groupe de métabolites secondaires ; ce sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. En effet les plantes synthétisent plus de vingt-deux mille dérivés isopréniques qui possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques et activités biologiques très diverses. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (Bruneton., 2009). Ils constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatils et unis par une origine commune. En raison de leurs nombreuses structures, les terpénoïdes constituent un groupe hétérogène de molécules avec différentes propriétés physiques et chimiques. Ils peuvent être volatiles, semi-volatiles ou non-volatiles, saturées et insaturées, à chaîne droite, à chaîne ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou achiraux, portant éventuellement divers groupes fonctionnels oxygénés ou contenant de l'azote ou du soufre, et sont solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann & Keeling, 2008 ; Schwab *et al.*, 2008). La Figure 12 présente la structure de base des terpénoïdes.



A : Noyau isoprène



B : Noyau de base des stérols



C : Formule de base des carotènes

Figure 12 : Structure des Terpénoïdes : A) Noyau isoprène, B) Noyaux stérols et C) carotènes (Malecky, Bohlmann & Keeling, 2008)

I.3.4.2. Stéroïdes

Les stérols ont une structure stéroïdique proche de celle des triterpènes. Les phytostérols sont spécifiques des végétaux. Ils sont sous forme libre, mais nombreux sont sous forme hétérosidique (saponosides et cardiotoniques).

I.3.4.3. Phénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 2009 ; Lugasi *et al.*, 2003). En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le monde des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (Lugasi *et al.*, 2003). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (Boizot & Charpentier, 2006).

I.3.4.4. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures chimiques, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies. Aussi, comme alcaloïdes naturelles, la berbérine par exemple, isolée de *Berberis vulgaris*, a des propriétés antiinflammatoires et antimicrobiennes (Mohammedi, 2013). Les alcaloïdes dérivent de différents acides aminés ou de

l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques. Selon leur structure chimique et surtout moléculaire, on peut diviser les alcaloïdes en plusieurs groupes : les phénylalanines, les alcaloïdes iso-quinoléiques, les alcaloïdes quinoléiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes dérivés du tropane et les alcaloïdes stéroïdes (Stockigt *et al.*, 2002). La Figure 13 montre les différentes structures chimiques des alcaloïdes.

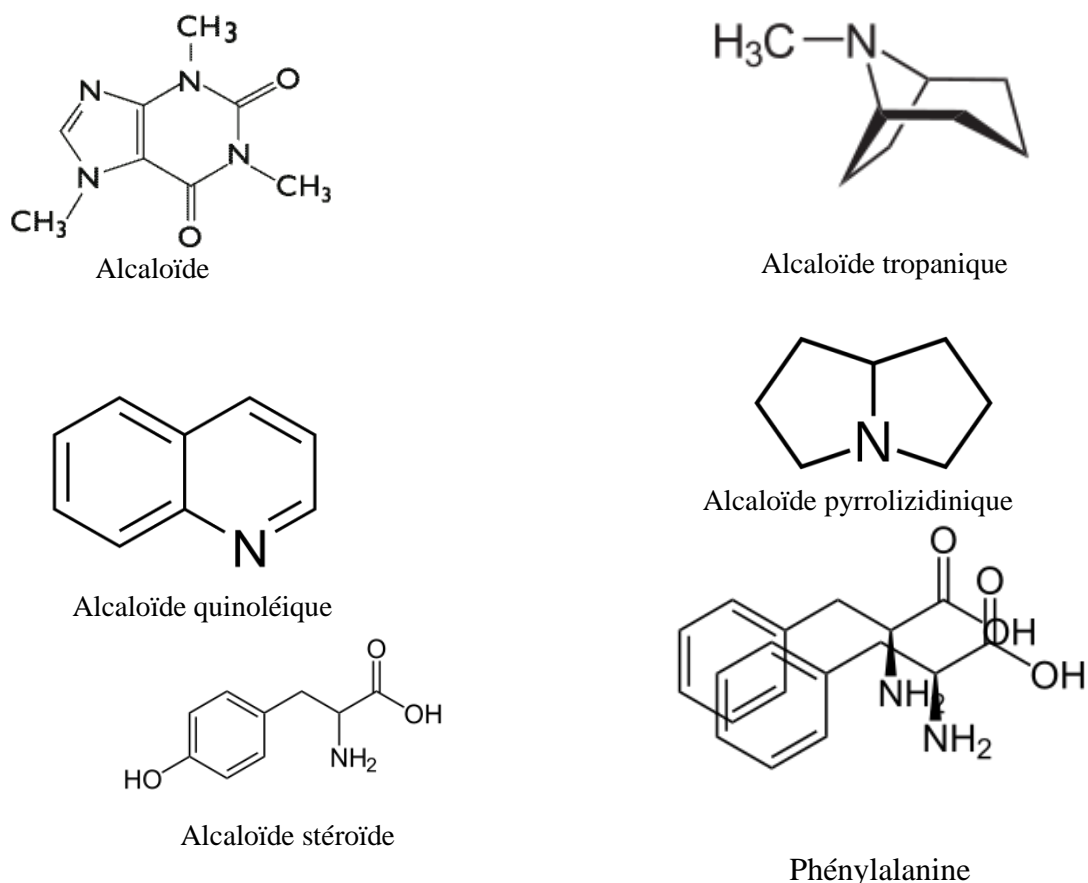


Figure 13 : Structure générale de quelques alcaloïdes (Stockigt *et al.*, 2002)

I.3.4.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Chebil, 2006). La Figure 14 ci-dessous montre le squelette de base des flavonoïdes.

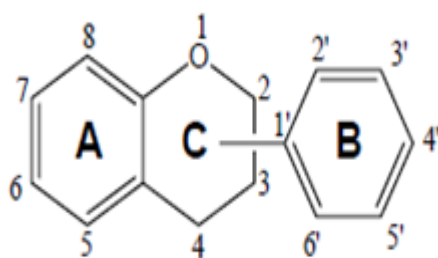


Figure 14 : Squelette de base des flavonoïdes (Chebil, 2006)

I.3.4.6. Saponines

Comme les flavonoïdes et les alcaloïdes, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken *et al.*, 2007). Les propriétés biologiques de ce métabolite secondaire ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle, notamment les racines de *Bupleurum falcatum* L. (Fujioka *et al.*, 2003) et de *Panax ginseng* C. A. Meyer (Park *et al.*, 2005), pour ne citer que quelques exemples.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie. Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique (Bruneton, 2009).

I.3.4.7. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ces composés naturellement produits par les plantes se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines, grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques. On peut les classer en tannins hydrolysables qui donnent après hydrolyse, soit de l'acide gallique, soit de l'acide élлагique, et en tannins condensés (ou cathéchique) non hydrolysables (Leinmüller *et al.*, 1991).

Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les Rosacée. Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Privas, 2013). Les tanins

condensés sont des polymères constitués par des unités de flavan-3-ols, liés entre elles par des liaisons carbone-carbone (Canon, 2010). La Figure 15 présente les structures de tanin hydrosoluble et tanin condensé.

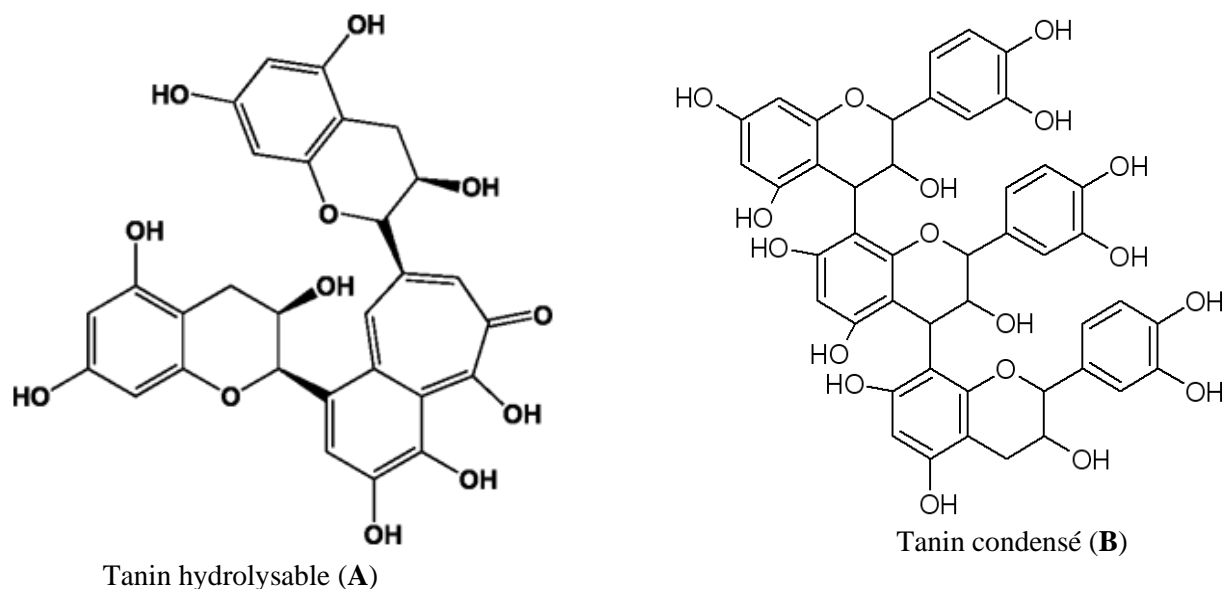


Figure 15 : Structure de tanins hydrosolubles (A) et condensés (B) (Canon, 2010)

Les tanins sont utilisés en cas de catarrhe intestinale, de diarrhée, d'affection de la vésicule, ainsi que comme antidote lors d'empoisonnement par des alcaloïdes végétaux (Hatano *et al.*, 2005). Les tanins ont également une activité antiseptique (Bruneton, 2009), antimicrobienne (Song *et al.*, 2006), antifongique (Kamath *et al.*, 2015), et antivirale (Song *et al.*, 2006).

I.3.4.8. Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant dans leur structure un noyau benzopyrone (Alignan, 2006). Ce sont des composés hétérocycles oxygénés, ayant un squelette de base en C6-C3, généralement hydroxylés en position 7, en 6, 7 et en 6, 7, 8. Ils dérivent de l'acide O-hydroxy-Z-cinnamique, ensuite de l'acide ortho-coumarique (Madiélé *et al.*, 2013). Les coumarines se forment donc par une substitution sur un cycle aromatique. D'après la nature des substitutions, on peut les classer en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, coumarines prénylées, furanocoumarines et pyranocoumarines avec des substituants en position 3 et ou 4 (Hemmer, 2011). La Figure 16 présente la structure de base des couramines.

Les coumarines peuvent également exister sous forme de deux états : coumarines à l'état dimérique (bicoumarines) et coumarines à l'état trimérique (tricoumarines) (Hemmer, 2011). La scopolétine et la scopoline sont les deux coumarines qu'on retrouve dans les feuilles, tiges et graines de *Moringa* ; ce sont des coumarines simples (Sanner, 2008). Les coumarines manifestent diverses activités biologiques qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone (Hemmer, 2011). Les coumarines simples contribuent généralement à fluidifier le sang par leur activité veinotonique et vasculoprotecteur.

L'intérêt des furanocoumarines a été signalé dans le cas du traitement des spasmes néphrétiques, de l'angine de poitrine. Les autres propriétés biologiques attribuées aux coumarines sont les propriétés anti-cancérogènes (Win *et al.*, 2011), anti-inflammatoires (Kalkhambkar *et al.*, 2007 ; Melagraki *et al.*, 2009), analgésiques (Kalkhambkar *et al.*, 2007), antiparasitaires (Iranshahi *et al.*, 2007), antibactérienne (Hemmer, 2011), antithrombotique et anti-allergénique (Wollgast & Anklam, 2000).

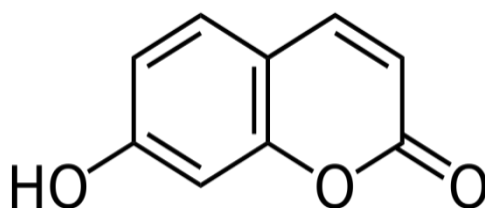


Figure 16 : Structure de base des coumarines (Alignan, 2006 ; Hemmer, 2011)

I.3.4.9. Anthraquinones

L'antraquinone est un dérivé de l'antracène, il appartient à la famille chimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Présent à l'état naturel chez un certain nombre d'animaux et de plantes telles que la rhubarbe, l'aloès, le *Moringa*, les champignons et les lichens. Il est aussi une substance active de produit phytosanitaire (ou produit phytopharmaceutique, ou pesticide), qui présente un effet répulsif à l'égard des oiseaux. En médecine, on l'utilise pour ses effets laxatifs dans le traitement des troubles gastro-intestinaux (constipation, laxophobie, colopathie fonctionnelle). L'antraquinone entre aussi dans la composition de teintures, de pigments et de pâte à papier. C'est également un composé chimique, les autres noms de l'antraquinone sont 9,10-dihydro-9,10-dioxoanthracène, anthradione, 9,10-antraquinone et anthracène-9,10-quinone, et son nom de vulgarisation est entre autres anthranoïde. L'antraquinone est seulement très partiellement soluble dans l'eau, mais est miscible dans l'alcool, le nitrobenzène et l'aniline. Cette substance est chimiquement

stable dans des conditions normales. L'antraquinone et ses dérivés actifs comme les glucosides d'antraquinone stimulent le péristaltisme de l'intestin grêle et augmentent les mouvements péristaltiques du côlon. Les glucosides d'antraquinone se transforment dans le côlon en osides. Ces derniers sont hydrophiles et réduisent l'absorption de l'eau en vue d'avoir un bol fécal fluide. Ils évitent par conséquent, la formation de selles grumeleuses (Narayanan *et al.*, 2016).

Les anthraquinones, telles que l'émodyne et l'endocrocine, proviennent de la cyclisation d'octacétides linéaires, et sont des pigments produits principalement par les hyphes du cortex supérieur. Elles sont également responsables de la couleur (jaune, orange, rouge...) des fructifications (apothécies) et représentent un large groupe parmi les métabolites secondaires biologiquement actifs. La plupart de ces composés sont également présents chez d'autres organismes (Romagni & Dayan, 2002).

I.3.4.10. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des hétérosides oxygénés dont l'aglycone est appelé anthocyanidine. Les anthocyanes sont des sous classes des flavonoïdes au sens large dont la structure de base est l'ion flavylum. Ils sont des pigments naturels des feuilles, fruits et pétales. Ils sont impliqués dans la protection des plantes contre la lumière excessive par l'ombrage des cellules de la mésophyle foliaire et ont également un rôle important dans l'attraction des insectes pollinisateurs (CBD, 2018). Ils constituent un défi pour les biochimistes en raison de leurs importantes variations structurales et de la complexité de leur biosynthèse (Williams *et al.*, 2013).

I.3.5. Potentialités nutritionnelles de *Moringa*

I.3.5.1. Composition chimique des feuilles de *Moringa*

Les qualités nutritionnelles des feuilles de *Moringa* sont importantes (Tableau IV). Elles sont une excellente source de protéines dont les teneurs moyennes varient entre 19 et 35 % MS (Olugbemi *et al.*, 2010). Les feuilles ont une teneur élevée en fibres, notamment en cellulose brute variant de 9,13 à 28,2 % MS (Pamo *et al.*, 2005). Elles possèdent les 10 acides aminés essentiels à l'Homme (Laleye *et al.*, 2015). Ayant une teneur relativement élevée en énergie métabolisable, 2273 et 2978 kcal/kg MS (Makkar & Becker, 1997). Elles contiennent une très grande concentration en vitamines A (6,8 mg), B (423 mg), C (220 mg) etc. Elles sont riches en β -carotène (Fuglie, 2002), en minéraux (fer, calcium, zinc, sélénium, etc.) et occupent

une part modeste de la matière sèche avec des teneurs de 0,6 à 11,42 % MS et la matière grasse varie de 2,3 à 10 % MS (Fuglie, 2002).

Tableau IV : Composition moyenne des feuilles de *Moringa*. Données pour 100 grammes de matière sèche (Broin, 2005)

| Composition globale enTeneurs |
|--------------------------------------|
| Protéines (g) 25 |
| Minéraux (g) 12 |
| Glucides (g) 40 |
| Lipides (g) 8 |
| Fibres (g) 15 |
| Teneur en eau 75% |

I.3.5.2. Valeur nutritionnelle des feuilles de *Moringa*

Moringa se caractérise par une forte teneur en nutriments, en antioxydants, et en composés phytochimiques (Tableau V), et en particulier en β -carotène, le fer et les facteurs antinutritionnels (Yang *et al.*, 2008). Les feuilles de *Moringa* sont un légume de bonne qualité nutritionnelle et sont l'un des meilleurs légumes tropicaux.

Tableau V : Composition chimique en sels minéraux des feuilles de *Moringa*. Données pour 100 grammes de matière sèche (Broin, 2005).

| Minéraux (mg) | | Acides aminés (mg) | |
|---------------|----------|--------------------|----------|
| Types | Quantité | Types | Quantité |
| Calcium | 2100 | Arginines | 1600 |
| Cuivre | 1 | Histidines | 530 |
| Fer | 27 | Leucines | 2050 |
| Potassium | 1300 | Lysines | 1200 |
| Magnésium | 405 | Méthionines | 370 |
| Phosphore | 310 | Phénylalanines | 1400 |
| Manganèse | 8 | Tréonine | 1080 |
| Sélénium | 2,6 | Tryptophanes | 580 |
| Zinc | 2,6 | Valine | 1400 |
| Molybdène | 0,5 | Isoleucine | 1140 |
| Sodium | 100 | / | / |
| Acides gras | | Vitamines | |
| Type | Quantité | Type | Quantité |
| C16 :0 | 530 | Vitamines A (mg) | 14300 |
| C18 :0 | 70 | Vitamines B (mg) | 850 |
| C18 :1 | 60 | Vitamines B1 (mg) | 264 |
| C18 :2 | 170 | Vitamines B2 (mg) | 205 |
| C18 :3 | 11400 | Vitamines C (mg) | 220 |
| / | / | Vitamines E (mg) | 130 |

I.3.5.3. Alimentation humaine et animale

Toutes les parties de la plante rentrent dans la préparation d'aliments pour les humains, et se consomment partout dans le monde (Figure 17). Peuvent être consommées fraîches ou en poudre (Broin, 2005), et même associées aux épices comme le piment, elles peuvent également être préparées en soupe ou en salade (Foidl *et al.*, 2001). Les feuilles de *Moringa* ont également la capacité d'être utilisées pour la prévention et la correction de la malnutrition en raison de leurs qualités nutritionnelles exceptionnelles (Saint-sauveur & Broin, 2010). De ce fait, les populations incluent les feuilles de *Moringa* dans la formulation de la poudre infantile à base de ces feuilles comme complément alimentaire des nourrissons (Madi *et al.*, 2012). Les feuilles de *Moringa* sont utilisées comme fourrage pour le bétail. Les effets positifs sur le taux de

croissance chez les moutons (Ben Salem & Makkar, 2009) et un double rendement de lait chez des vaches ont été rapportés par Reyes *et al.* (2006). Aussi l'incorporation de farine de feuilles de *Moringa* dans les rations des poulets (Paguia *et al.*, 2014) a montré une amélioration significative de la coloration jaune du jaune d'œuf. La Figure 17 présente quelques utilisations de *Moringa*.



Figure 17 : Quelques utilisations de *Moringa* : a) Infusion de thé à partir de la poudre de feuille ; b) Préparation de sauces à partir des gousses immatures ; et c) Ajout de la poudre de feuille comme complément alimentaire (Saint Sauveur & Broin, 2010).

I.3.5.4. Utilisations médicales

Moringa est décrite comme une plante médicinale, thérapeutique et surnommée dans beaucoup de sociétés comme : « arbre miracle », qui soigne plus de 300 maladies. De plus, *Moringa* a également des attributs médicaux surprenants, notamment dans le traitement des maladies inflammatoires et infectieuses (Ferreira *et al.*, 2007).

I.3.5.5. Autres utilisations

Moringa est utilisé pour la conservation des sols, et il est connu comme brise vent, etc. En Inde, sa pulpe a été utilisée pour fabriquer du papier approprié pour le papier journal, (Guha & Negi, 1965). Le « ben-oil » issu des graines conserve sa qualité et peut donc lubrifier des machines de précision (William *et al.*, 2003). Il est également utilisé en cosmétiques-parfums et la coiffure. Les huiles sont particulièrement efficaces dans la fabrication de savon. Le tourteau, considéré comme impropre à l'alimentation animale en raison de la forte teneur en alcaloïdes et saponines, est principalement utilisé comme engrais (Panda *et al.*, 2008). Les résultats des études montrent que la matière (flocs), qui est produite avec la protéine est mieux pour la purification de l'eau, grâce à sa richesse en poly-électrolytes cationiques actifs (Poumaye *et al.*, 2012).

I.4. Généralités sur les milieux aquatiques

Les milieux aquatiques sont des étendues d'eau plus ou moins vastes qui jouent un rôle capital pour la survie des êtres vivants. Ils renferment une diversité d'organismes qui établissent entre eux des relations plus ou moins complexes. On estime à 1360 millions de km³ le volume d'eau accumulée sur la terre dont 99,5 % se trouvent sous la forme salée ou glacée, et 0,5 % seulement (soit environ 7 millions de km³) sert d'eau utile à la vie à la surface de la terre (Nagarajan & Rema, 2022). Le terme eau douce regroupe les eaux courantes (ruisseaux, rivières, fleuves) les eaux calmes ou stagnantes (lacs, mares, étangs) et les eaux souterraines (puits, forages, sources) (Rodier *et al.*, 2016).

I.4.1. Eaux souterraines

I.4.1.1. Définition et origine

Les eaux souterraines sont celles qui sont présentes dans les pores et interstices des roches ou des sédiments dans le sol. Elles résultent du séjour dans le sol des eaux en perpétuel déplacement dans l'environnement et circulent ou stagnent dans les fissures et les pores rocheux, et sont retenues sous les couches imperméables. Elles peuvent apparaître en surface et donner naissance à une source ou encore peuvent être mises en évidence au travers des puits et forages (Vilaginès, 2003).

I.4.1.1.1. Nappes libres ou phréatiques

Les nappes libres sont des nappes d'eaux souterraines dont le niveau piézométrique, peu profond, s'établit uniquement en fonction de la perméabilité du terrain à travers lequel pénètre l'eau d'infiltration. Ce sont les nappes les plus proches de la surface dont les eaux sont tributaires des variations pluviométriques, et sont plus exposées aux pollutions de toute nature (Cherkaoui, *et al.*, 2007).

I.4.1.1.2. Nappes captives ou géologiques

Les nappes captives ou géologiques sont des nappes les plus profondes, emprisonnées entre deux couches de terrain imperméables (Vilaginès, 2003). Ces nappes sont à l'abri de toute pollution d'origine superficielle et dont le volume des eaux présentes varie peu.

I.4.1.2. Pollution des eaux souterraines

La pollution est l'introduction de composants biologiques, physiques, ou chimiques dans le système environnemental à un rythme tel que l'environnement ne puisse s'en accommoder par dispersion, décomposition ou recyclage. Dans le cas des eaux souterraines, la pollution peut

se faire par infiltration des contaminants à la surface des affleurements de l'aquifère. Ces contaminants occasionnent un dégât structurel ou fonctionnel du système environnemental, et peuvent causer aussi un dommage à la santé humaine (Igesobta, 2015). L'agriculture a des effets directs et indirects sur la qualité des eaux souterraines. Les impacts directs incluent le transport vers la nappe de quantités excessives de nitrates (NO_3^-) et de phosphates (PO_4^-) issus d'engrais, de pesticides et d'herbicides conçus pour éliminer les parasites. L'impact direct inclut également le transport de bactéries présentes dans les excréments et le fumier en direction de la nappe, ainsi que les modifications hydrologiques liées à l'irrigation et au drainage (Böhlke, 2002). Mais l'intensité de la pollution et sa vitesse de propagation dépendent essentiellement de la nature de l'aquifère (Schoeller, 2011).

En général les eaux souterraines présentent des avantages de qualité par rapport aux eaux de surface. Les eaux souterraines renferment relativement moins de polluants microbiologiques. A mesure que les eaux de ruissellement polluées s'infiltrant dans les aquifères, le sol et les roches filtrent et retiennent des microorganismes vivants. Ce qui réduit parfois la charge microbiologique parvenant à la nappe (Vincent *et al.*, 2009).

I.4.2. Eaux superficielles

Les eaux superficielles ou eaux de surface sont constituées, par opposition aux eaux souterraines, de l'ensemble des masses d'eaux courantes ou stagnantes, douces, saumâtres ou salées qui sont en contact direct de l'atmosphère. Elles englobent toutes les eaux circulantes ou stockées à la surface de la terre. Elles ont pour origine, soit des nappes souterraines dont l'émergence constitue une source, soit les eaux de ruissellement. Ces eaux se rassemblent en cours d'eau, caractérisés par une vitesse de circulation appréciable. Elles peuvent se trouver stockées en réserves naturelles (lacs) ou artificielles (retenues de barrages) où peut apparaître une grande hétérogénéité de la qualité selon la profondeur (Jacques, 2007).

I.4.2.1. Définition et origine

Les eaux superficielles sont rencontrées à la surface de la terre. On les subdivise en milieux lenticques et milieux lotiques (Koller, 2004).

I.4.2.1.1. Les milieux lotiques

Ils sont ceux alimentés par les eaux de source, les nappes phréatiques et les eaux de ruissellement. Ils présentent des formes diverses, allant des ruisselets dont la largeur du lit est inférieure à 1 mètre, aux fleuves de largeur supérieure à 25 mètres (Kevin, 2012). On y regroupe l'ensemble des eaux continentales s'écoulant à une vitesse plus ou moins grande. Le

point où un cours d'eau a son origine est sa source. De cette source à son confluent ou à son embouchure, il reçoit, de part et d'autre, directement ou par l'intermédiaire d'affluents, toutes les eaux qui découlent des terrains plus élevés.

I.4.2.1.2. Les milieux lentiques

Ils représentent 1,4% de ressources en eau douce disponible sur la Terre. Ils sont caractérisés par un courant presque inexistant. Ce sont des systèmes qui prennent des formes très diverses, allant d'une petite collection d'eau temporaire de quelques centimètres de profondeur à plusieurs mètres de profondeur. Il s'agit des lacs, les étangs, les mares et les marais où les eaux se renouvellent très lentement ou presque pas (Fatima L. & El hassaniY, 2022).

I.4.2.2. Pollution des cours d'eau

Les cours d'eau sont rarement potables sans aucun traitement et sont toujours plus ou moins pollués par divers rejets. Les rejets d'origine urbaine provenant de la collecte des eaux résiduaires urbaines même après leur traitement en station d'épuration. Les rejets d'origine industrielle émanant des polluants et micropolluants organiques (hydrocarbures, solvants, produits de synthèse, phénols) ou inorganiques (métaux lourds, ammoniac, produits toxiques). Les rejets d'origine agricole issus des engrais et produits pesticides entraînés par les eaux de pluie et de ruissellement, dans les zones d'élevage intensif (rejets riches en composés de l'azote et du phosphore ainsi qu'en pollution organique) ; et les rejets d'origine animale et humaine responsable de la pollution bactériologique (Momento, 2021).

I.4.3. Eaux de pluie

I.4.3.1. Définition et origine des eaux de pluie

La pluie est l'ensemble des gouttes d'eau qui, dues à la condensation de la vapeur d'eau de l'atmosphère, tombent du ciel sur la terre (David Quéré, 2003). L'eau qui forme la pluie provient de l'évaporation de l'humidité qui existe dans la nature et plus particulièrement des grandes étendues d'eau (lacs, mers, océans, etc.). Cette vapeur d'eau se mélange à la masse d'air. Lorsque l'air s'élève à cause des mouvements de l'atmosphère, il se refroidit par détente. La vapeur d'eau contenue dans l'air se condense autour des noyaux de condensation (poussières, pollens et aérosols) lorsqu'une légère sursaturation est atteinte. Ces gouttelettes donnent des nuages quand elles sont trop lourdes (environ 0,5 mm de diamètre) pour être

soutenues par le courant ascendant, elles tombent, formant ainsi une pluie (David Quéré, 2003). Lorsque ces pluies tombent sur le sol, elles peuvent contenir des spores bactériennes.

I.4.3.2. Pollution des eaux de pluies

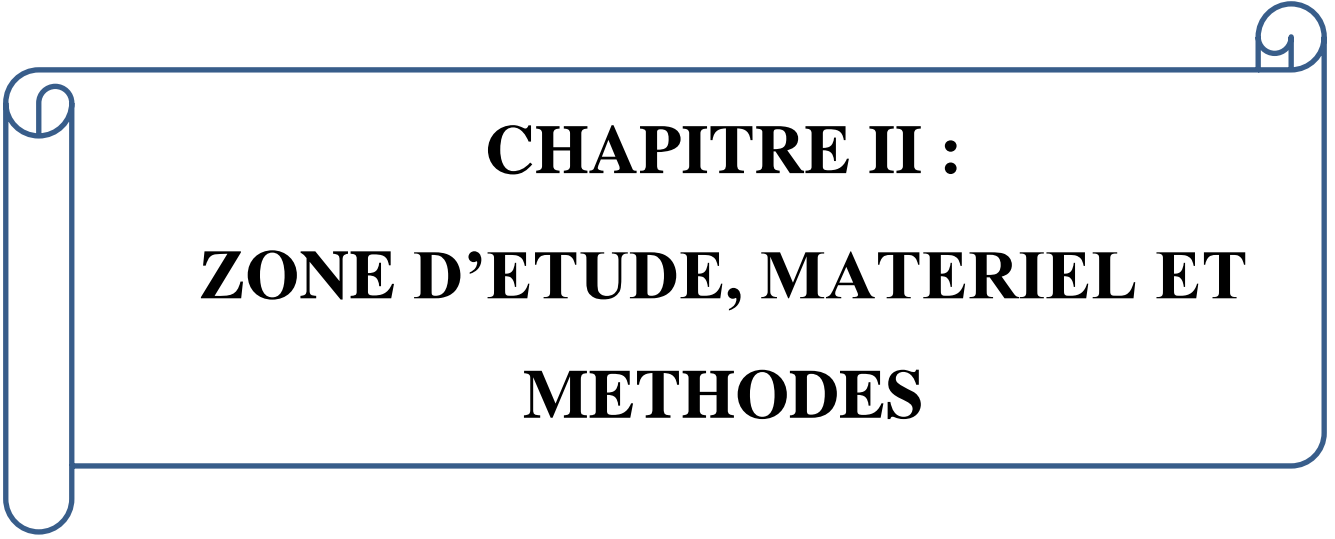
L'eau de pluie, tout au long de son trajet de l'atmosphère se charge en polluants par lessivage des principaux milieux qu'elle traverse. C'est ainsi qu'il existe une diversité dans l'origine des apports contribuant à la pollution des eaux pluviales. Chocat *et al.* (2007) en distinguent, entre autres : les apports atmosphériques, le lessivage des dépôts de temps sec et les retombées sèches et le lessivage des surfaces urbaines (toitures)...

I.4.3.2.1. Pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique résulte généralement de deux origines principales : naturelle (incendie, volcanisme...) et anthropique (incinération d'ordures ménagères, trafic automobile...). Cette pollution se manifeste par des dépôts humides et secs. Les retombées atmosphériques humides correspondent au lessivage de l'atmosphère par les eaux météoriques tandis que les retombées atmosphériques sèches sont des dépôts qui se produisent en absence de précipitation (Durand, 2003). Les dépôts secs sont caractérisés par des retombées atmosphériques gazeuses et particulaires fines, des hydrocarbures et des micropolluants.

I.4.3.2.2. Lessivage des surfaces

Le ruissellement contribue plus fortement à la pollution des eaux pluviales que les retombées atmosphériques. La pollution des premiers flux du ruissellement est liée à deux sources principales différentes : pollution diffuse résultant des surfaces (toitures) qui est une source ponctuelle (Berreta *et al.*, 2004). Lors d'un événement pluvieux, les effluents engendrés qui ne peuvent plus s'infiltrer, ruissellent sur des distances importantes avant de rejoindre le milieu naturel, augmentant ainsi les volumes d'effluents pluvieux ainsi que la charge polluante collectée sur les toitures (Lassabatère, 2002 ; Durand, 2003 ; Larmet, 2007). Cette charge polluante associée aux premiers flux d'écoulement peut être plus élevée que celle des eaux usées en temps sec (Gnecco *et al.*, 2005) et est liée aux activités spécifiques de l'espace.



CHAPITRE II :
ZONE D'ETUDE, MATERIEL ET
METHODES

II.1. Zone d'étude

II.1.1. Situation géographique et démographique

La ville de Yaoundé est située dans l'interfluve des fleuves Nyong et Sanaga, à 300 km de la côte Atlantique, entre le 3° 52' 12" de latitude Nord et le 11° 31' 12" de longitude Est (Yogo, 2005). Yaoundé est localisée dans la bordure occidentale du plateau Sud-Cameroun et est située en grande partie dans le bassin versant du cours d'eau Mfoundi et s'étend sur 304 km² dont une superficie urbanisée de 183 km² et abrite une population estimée, en 2020, à 4 100 000 habitants, soit une densité moyenne de 13 486 habitants par km² (Bucrep, 2021).

II.1.2. Relief et sol

Le relief de Yaoundé est relativement surélevé à une altitude moyenne de 735 m au-dessus du niveau de la mer. La ville de Yaoundé est entourée de 7 collines qui seraient responsables de son climat particulier et dont les plus élevées sont situées du côté de l'Ouest et Nord-Ouest (Patrice, 2006).

Le sol de Yaoundé est ferro-latéritique, insaturé, acide, avec un pH généralement inférieur à 5. La teneur du sol en sable atteint parfois 73% à la surface, et diminue progressivement avec la profondeur (Hieng, 2003). La porosité du sol varie de 5 à 71% et sa densité oscille entre 2,7 et 3,1. La perméabilité verticale du sol atteint 300 cm/h vers la surface et sa perméabilité horizontale subit des variations spatiales et atteint parfois 40 cm/h dans cette région (Tabué *et al.*, 2009).

II.1.3. Climat et végétation

Le climat qui y règne est de type équatorial (Yaoundéen), caractérisé par l'alternance de deux saisons sèches (la plus petite allant de mi-mai à mi-juillet ; et la plus grande de mi-novembre à mi-mars) et deux saisons de pluies (la plus petite allant de mi-mars à mi-mai et la plus grande de mi-juillet à mi-novembre). La température moyenne est de 23,5°C contrastée entre 16 et 31°C selon les saisons et les précipitations annuelles sont de 1650 mm d'eau. L'hygrométrie moyenne est de 80% et varie dans la journée entre 35 et 98%. Les vents fréquents sont humides et soufflent en direction Sud-Ouest ; les vents violents sont orientés en direction Nord-Ouest. La végétation est du type intertropical avec prédominance de la forêt humide méridionale (Wéthé, 1999 ; Cameroun, 2021).

II.1.4. Hydrographie

Le réseau hydrographique de la ville est très dense et essentiellement composé du cours d'eau Mfoundi et de ses affluents. Ceux-ci assurent le drainage naturel des eaux de ruissellement et des eaux superficielles qui sont rejetées dans le fleuve Mefou, qui à son tour déverse ses eaux dans le fleuve Nyong. C'est en amont de ce dernier point de rejet que se trouve la zone de captage actuel des eaux brutes destinées à la production d'eau potable pour les habitants de la ville Yaoundé et de ses environs. À côté de ces cours d'eaux, la ville compte quelques lacs et étangs naturels ou artificiels dont les eaux sont rendues dangereuses pour la santé publique ; à cause du déversement des eaux des stations d'épuration non fonctionnelles (cas du lac municipal), des ordures ménagères et des eaux des latrines situées dans les zones marécageuses (Patrice, 2006).

II.1.5. Moyens d'approvisionnement en eau pour les populations

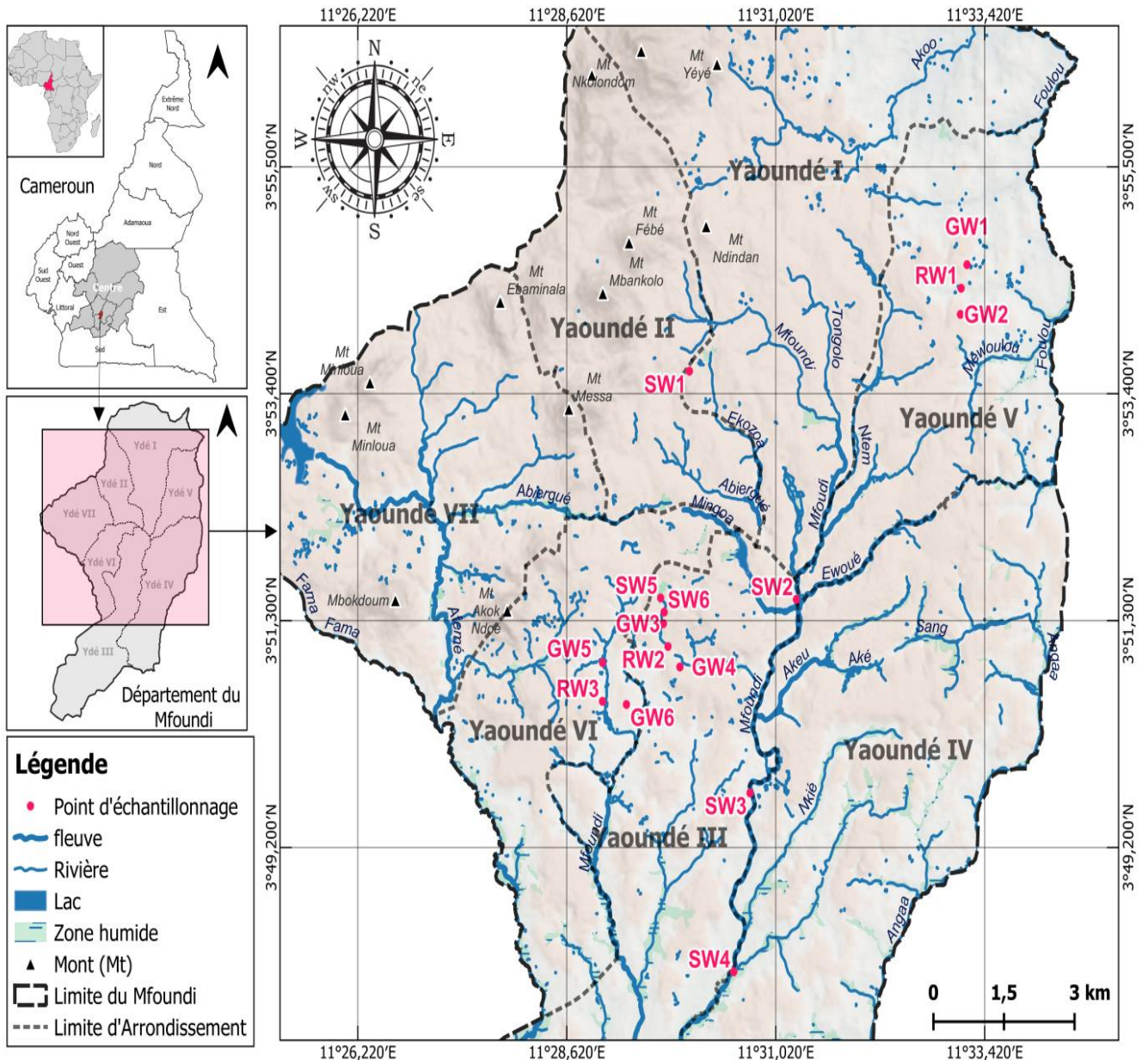
Dans la ville de Yaoundé, l'accès à l'eau potable est une épreuve pour de nombreux habitants particulièrement dans les quartiers où vivent généralement les populations pauvres. Tout le monde n'est pas connecté au réseau d'eau géré par la Camwater et la vétusté des installations entraîne des coupures répétitives (Noubouwo, 2014). En effet, les personnes n'étant pas connectées au réseau urbain d'eau font recours aux puits aménagés et non aménagés, sources dans les bas-fonds (Tekam *et al.*, 2019 ; Nya, 2020).

II.2. Matériel

Les travaux ont été conduits à l'Université de Yaoundé 1 (UY1), Cameroun en collaboration avec l'Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales (IMPM) et de l'Institut de Chimie médicale de Clermont (Université Clermont Auvergne, France).

II.2.1. Sites d'échantillonnage

Dans le cadre de cette étude, 3 types de biotopes aquatiques ont été choisis sur la base de plusieurs critères, à savoir selon leur grande utilisation par les populations environnantes, leur accessibilité et leur vulnérabilité à la pollution. Ces 3 types de biotopes ont ainsi été les eaux souterraines, les eaux superficielles, et les eaux de pluies. Les sites d'étude choisis comprennent 6 points d'eau souterraines, 6 points d'eau de surface, et 3 stations de récoltes d'échantillons d'eau de pluie. Les 15 sites d'échantillonnage choisis ainsi que leurs localisations géographiques sont représentés sur la Figure 18.



SOURCES : OpenStreetMap (OSM) 2023. SCR : EPSG4326 - WGS 84. Logiciel : QGIS 3.28.0. Edition : Stéphane A. NOAH. Fait le : 02-09-2023.

Figure 18 : Localisations des sites d'échantillonnage (SW : stations d'eaux de surface ; GW : points d'eaux souterraines ; RW : stations de récolte des échantillons d'eau de pluie) (INC, 2023)

II.2.2. Description des sites d'échantillonnage

II.2.2.1. Stations d'échantillonnage des eaux de surface

Les points d'eau échantillonnés pour les eaux de surface sont situés sur les milieux lotiques (Mfoundi) et lentiques (Lac d'Obili). Ces plans d'eau ont été choisis parce que le premier représente le principal cours d'eau de la ville de Yaoundé et le second l'un des lacs le

plus accessible pendant la période d'étude et utilisé par le ministère en charge de l'industrie animale pour la production piscicole.

Sur le cours d'eau Mfoundi, l'eau a été échantillonnée à quatre points (derrière hôtel Mont Fébé, poste centrale, marché Nsam et Ahala) qui vont progressivement du crénon vers le potamon.

Sur le lac d'Obili, 2 points d'échantillonnage ont été retenus au niveau de l'émissaire (entrée cours d'eau Olezoa) et de l'embouchure. Le tableau VI donne une brève description des différents points, une mini vue panoramique et les coordonnées géographiques.

II.2.2.2. Sites d'échantillonnage des eaux souterraines

Les points d'eau échantillonnés pour les eaux souterraines sont constitués des puits. Les ouvrages d'approvisionnement choisis sont quotidiennement utilisés par la population environnante et sont situés près des ménages. Au total, six puits ont été choisis dans trois arrondissements de la ville de Yaoundé. Deux puits dans chaque arrondissement (Yaoundé III, Yaoundé V et Yaoundé VI).

Le tableau VII donne une brève description des différents puits, une photo et les coordonnées géographiques.

Tableau VI : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des eaux de surface













| Sites d'échantillonnage (Code) | Description | Photos | Coordonnées géographiques Latitude (N) Longitude (E) |
|--|--|--|--|
| Crénon du cours d'eau Mfoundi (SW1) | Point situé en face du palais des congrès (entrée principale), en contre-bas de la colline Nkol-Nyada (quartier Bastos débit moyen et a récemment été aménagée (présence de tuyauterie en plastique avec trous d'aération et des blocs de gravier). |  | 03°53'36.5''N 11°30'1.7''E |
| Rhitron du cours d'eau Mfoundi point 1 (SW2) | Situé à la poste centrale, en face du jardin public Charles Atangana et derrière le poste de Police. Sur la rive droite, on note une importante végétation. Reçoit de nombreux déchets organiques. |  | 3°51'29.8''N 11°31'15.4''E |
| Rhitron du cours d'eau Mfoundi point 2 (SW3) | Situé en contre-bas du marché Nsam drain bien aménagé et présente du côté droit une petite végétation, des tables de commerce dont les résidus sont charriés par le vent les eaux de ruissellement. |  | 3°49'42.3''N 11°30'43.5''E |
| Potamon du cours d'eau Mfoundi (SW4) | Point du cours d'eau situé à une cinquantaine de mètres du 2 ^{ème} échangeur Ahala. A ce niveau, un ruisseau se mélange aux eaux du Mfoundi. De part et d'autre du cours d'eau, une importante végétation recouvre des tas de boues mêlés aux déchets plastiques. |  | 3°48'03.0''N 11°30'32.3''E |
| Emissaire du lac d'Obili (SW5) | Point situé derrière la cité universitaire en face le canal Olympia, reçoit les eaux usées du campus de l'UY1 et du CHU. Une activité agricole est exercée tout autour de ce point. |  | 3°51'30.6''N 11°29'41.9''E |
| Embouchure du lac d'Obili (SW6) | Point situé derrière le Centre médical hospitalier d'Obili reçoit les eaux usées du campus de l'UY1, du CHU habitations tout autour et des différents étangs piscicoles. |  | 3°51'22.7''N 11°29'44.3''E |

Tableau VII : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des eaux souterraines

| Sites d'échantillonnage (code) | Description | Photos | Coordonnées géographiques Latitude (N) Longitude (E) |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Puits 1 (GW1) | Puits résidentiel individuel avec margelle de 1,5 m de hauteur, couvert, périmètre de protection, situé au quartier Ngouso. |  | 3°54'35.64''N 11°33'12.99''E |
| Puits 2 (GW2) | Puits collectif couvert avec margelle de 1,2 m de hauteur, pas de périmètre de protection, situé au quartier Ngouso. |  | 3°54'08.06''N 11°33'08.46''E |
| Puits 3 (GW3) | Puits collectif non couvert avec margelle de 1,2 m de hauteur, périmètre de protection, situé au quartier Ngoa-Ekele. |  | 3°51'16.31''N 11°29'43.76''E |
| Puits 4 (GW4) | Puits collectif non couvert avec margelle de 0,5 m de hauteur, périmètre de protection, situé au quartier Ngoa-Ekele. |  | 3°50'52.26''N 11°29'55.14''E |
| Puits 5 (GW5) | Puits résidentiel non couvert avec margelle de 1,5 m de hauteur, périmètre de protection, situé au quartier Biyem-Assi. |  | 3°50'54.67''N 11°29'01.89''E |
| Puits 6 (GW6) | Puits collectif non couvert avec margelle de 1,2 m de hauteur, pas de périmètre de protection, situé au quartier Biyem-Assi. |  | 3°50'31.42''N 11°29'18.31''E |

II.2.2.3. Stations de récolte des échantillons d'eau de pluie

Les eaux de pluies ont été récoltées dans les arrondissements de Yaoundé III, V et VI. Les eaux retenues ont été celles qui tombaient directement du ciel. Les eaux de pluies sont utiles aux ménages qui ne possèdent pas d'autres moyens d'approvisionnement en eau à l'instar des puits ou de l'accès à l'eau de distribution. Le tableau VIII présente les caractéristiques de chaque station de collecte ainsi que les coordonnées géographiques.

Tableau VIII : Caractéristiques des stations de récolte des échantillons d'eau de pluie

| Sites d'échantillonnage (Code) | Description | Coordonnées géographiques | |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|---------------|
| | | Latitude (N) | Longitude (E) |
| Station1 (RW1) | Située dans l'arrondissement de Yaoundé V. Présence de trois hôpitaux de référence (Général, Obstétrique et Chracerh), la présence d'un grand transformateur central qui alimente la ville de Yaoundé. | 3°83'85,53''N 11°48'85,19''E | |
| Station 2 (RW2) | Situé dans l'arrondissement de Yaoundé III. Présence des établissements de l'enseignement supérieur, de nombreuses cités et présences des rues non goudronnées avec de l'affluence populaire. | 3°84'64,05''N 11°49'06,73''E | |
| Station 3 (RW3) | Située dans l'arrondissement de Yaoundé VI. Présence de plusieurs marchés et rues non goudronnées. | 3°84'64,05''N 11°49'06,73''E | |

II.2.2.4. Fréquence d'échantillonnage

Les prélèvements des échantillons d'eaux de surface et souterraine ont été réalisés de mars 2021 à mars 2022 à la fréquence mensuelle soit 13 mois d'échantillonnage. Les prélèvements d'eau de pluies ont été réalisés mensuellement pendant 10 mois.

II.3. Méthodes

II.3.1. Récolte des échantillons d'eau

S'agissant des cours d'eau un quadrat 1m x 1m a été délimité à chaque station d'échantillonnage pour effectuer les échantillonnages et mesurer les propriétés physicochimiques des cours d'eau (Bernard & Salle, 2000). Pour ce qui est des eaux souterraines, une corde stérile a été attachée sur un seau préalablement stérilisé ; puis un chalumeau a été utilisé afin de circonscrire un diamètre de sécurité autour des puits avant tout prélèvement d'eau ceci dans le but d'éviter toute contamination due à l'air.

Les échantillonnages pour les analyses bactériologiques ont été effectués dans des flacons en verre stérile de 500 mL. Le flacon en verre contenant l'échantillon d'eau destiné aux analyses microbiologiques était rempli aux 3/4 pour permettre la respiration bactérienne. Les échantillons d'eau pour les analyses physicochimiques, ont été prélevés dans deux lots de flacons en polyéthylène double bouchage :

- Un flacon de 1000mL où l'eau a été introduite sans faire de bulles, destiné à la mesure au laboratoire des paramètres tels que l'oxygène dissous, la turbidité, la couleur entre autres.
- Un autre flacon de 250 mL dans lequel le CO₂ dissous est fixé sur le terrain avant d'être déterminé au laboratoire par la méthode de volumétrie.

L'ensemble placé dans une enceinte réfrigérée (04°C) a été transporté au laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement de l'Université de Yaoundé 1, et les analyses ont été effectuées dans les 4h qui suivaient le prélèvement pour les analyses bactériologiques et dans les 24h pour les analyses physicochimiques (Rodier *et al.*, 2009). Les paramètres physicochimiques considérés dans cette étude ont été mesurés sur le terrain et au laboratoire suivant les techniques préconisées par Rodier *et al.*, (2009).

Quant aux eaux de pluies, un flacon en verre stérile de 30 cm de haut et 15 cm de large a été utilisé pendant la tombée de pluie pour les analyses bactériologiques. Ce flacon a été posé sur une table d'un mètre de haut et n'a été ouvert qu'au moment de recueillir de l'eau qui tombait directement du ciel. La hauteur de la bouteille a permis à ce que l'eau qui était en contact avec la table ne remonte pas dans la bouteille. L'eau de pluie pour l'analyse physicochimique a été recueillie dans un flacon en polyéthylène. L'ensemble placé dans une enceinte réfrigérée (04°C) a été transporté au laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement de l'Université de Yaoundé 1, et les analyses ont été effectuées dans les 4h qui suivaient le

prélèvement pour les analyses bactériologiques et dans les 24h pour les analyses physicochimiques (Rodier *et al.*, 2009).

II.3.2. Evaluation de la diversité et la dynamique d'abondance des bactéries sporulantes dans les différents biotopes aquatiques

Après observation macroscopique des échantillons d'eau, les analyses bactériologiques ont ensuite été effectuées.

II.3.2.1. Isolement des bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles (BHAM)

Les BHAM ont été isolés à la surface de la gélose ordinaire coulée en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre par la technique d'étalement en surface. 100µL de l'échantillon ont été prélevés à l'aide d'une pipette teneur stérile puis déposés à la surface de la gélose. L'échantillon a été par la suite étalé à l'aide d'un étaleur en verre stérile. Les manipulations ont été faites dans un diamètre de 30 cm autour de la flamme du bec bunsen (Rodier *et al.*, 2009). Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à la température ambiante de 1 à 5 jours. Les colonies ont été dénombrées par la méthode de comptage direct ceci montre des colonies bactériennes de formes, couleurs, tailles et d'aspect variés. (Holt *et al.*, 2000).

II.3.2.2. Isolement des bactéries sporulantes

Plusieurs échantillons ont été soumis aux analyses (eaux de surface, souterraines et de pluies). Les milieux de culture utilisés pour l'isolement des bactéries sporulantes ont été les milieux Luria Bertani, la gélose de Mossel contenant la polymyxine B et le rouge phénol pour les bactéries du genre *Bacillus*, et le milieu tryptone sulfite cyclosérine (TSC) contenant la D-cyclosérine pour les bactéries appartenant au genre *Clostridium*. Après avoir autoclavé les milieux de Mossel et TSC, l'on introduit le jaune d'œuf qui est un supplément. L'isolement des bactéries du genre *Bacillus* s'est fait par la technique d'étalement en surface sur les milieux Luria Bertani et Mossel, et a consisté au prélèvement de 100µL de l'échantillon d'eau à l'aide d'une pipette teneur stérile puis déposés à la surface des différents milieux de culture. L'isolement des bactéries du genre *Clostridium* s'est fait par la méthode d'ensemencement en profondeur qui a consisté au dépôt de 100 µL de l'échantillon dans la boîte de Pétri avant de couler le milieu TSC. La méthode d'ensemencement en profondeur a été utilisé afin de créer un environnement anaérobie. Les manipulations ont été faites dans un diamètre de 30 cm autour de la flamme du bec bunsen (Rodier *et al.*, 2009). Les différentes températures d'incubation des boîtes de Pétri sont les suivantes : 37°C pour les boîtes de Luria Bertani et la gélose de Mossel ; 44°C pour les boîtes de TSC pour une durée d'incubation de 18 à 24 heures.

II.3.2.3. Examen macroscopique des colonies bactériennes

- Aspect qualitatif

Il a consisté à la reconnaissance des germes bactériens en se basant sur les caractères généraux que sont la forme, la couleur et la taille des colonies bactériennes.

- Aspect quantitatif

Il renvoie au dénombrement des colonies dans les différentes boîtes de Pétri suivant l'aspect qualitatif. Le comptage des colonies a été effectué au moyen d'un compteur de colonies et les résultats sont exprimés en Unité Format Colonie (UFC)/100mL de l'eau échantillonnée (Holt *et al.*, 2000).

II.3.2.4. Identification biochimique des bactéries sporulantes isolées

Après isolement des germes et reconnaissance macroscopique des colonies de divers germes de bactéries sporulantes, les souches ont été purifiées sur les différents milieux spécifiques utilisées lors de l'isolement. L'identification a été faite en utilisant 2 types de méthodes à savoir : la méthode classique d'identification (pour identifier les espèces dont les colonies des souches présentaient les caractères généraux spécifiques) et la méthode l'identification par la galerie API 20NE (pour confirmer l'identité des espèces dont les caractères généraux ne renseignaient pas davantage). Ces tests d'identification ont été faits selon les recommandations de Holt *et al.* (2000).

II.3.2.4.1. Méthode d'identification classique

Cette méthode consiste à réaliser des tests biochimiques sur les milieux de culture spécifiques coulés dans les tubes à essai afin d'identifier les espèces. Ces tests biochimiques sont :

- Test sur milieu Kligler Hajna

La gélose Kligler a été utilisée pour différencier les bacilles à Gram négatif. Elle permet la recherche de trois caractères biochimiques : la fermentation du glucose et lactose avec production d'acide (couleur jaune) au niveau de la pente pour le lactose et au niveau du culot pour le glucose. Ce test est basé sur la capacité des bactéries à métaboliser les sucres et les acides aminés présents dans le milieu de culture. La production d'H₂S s'exprime par un noircissement alors que, la production du gaz s'exprime par des bulles d'air. Les tubes contenant le milieu Kligler coulé en pente ont été ensemencés au moyen d'une anse de platine en piquant le culot et en faisant des stries à la surface de la pente. Ensuite, ces tubes ont été

incubés entre 18 à 24 h à une température de 35 ± 2 °C (Becton & Dickinson, 2014). Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries). Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés. Si les bactéries utilisent le lactose en aérobie relative (pente), il y a virage de la pente au jaune. Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d'H₂S. Le milieu peut être entièrement noir. La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose.

- Test de Citrate de Simmons

Le but de ce test repose sur l'aptitude de certains microorganismes à pouvoir se développer avec le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. La surface de la gélose a été ensemencée en strie, puis incubée pendant 48 h à 35°C. L'oxydation du citrate entraîne la libération de CO₂ volatil et la consommation de H⁺ :


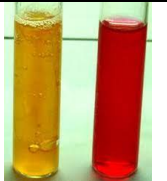


$2 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} + 9 \text{O}_2 \longrightarrow 12 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{OH}^-$. Le CO₂, gaz acide, étant éliminé, on a dans le tube une alcalinisation (apparition des OH⁻) et non une acidification du milieu. La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage du bleu de bromothymol à sa teinte basique. La transformation du triacide (acide citrique) en diacide par décarboxylation oxydative donne un pH élevé qui se traduit par un virage de la couleur initiale du milieu au bleu vif (Mast, 2016).

- Test sur milieu Mannitol-Mobilité

Ce milieu étudie deux caractères qui sont : La fermentation du mannitol et la mobilité des cellules bactériennes. Le test mannitol-mobilité est basé sur la capacité des bactéries à métaboliser le mannitol, un sucre simple, et à se déplacer dans un milieu de culture solide et éventuellement à réduire les nitrates en nitrites. La méthode consiste à ensemencer par piqûre centrale et incubé à 37°C pendant 24 h. La fermentation du mannitol s'exprime par la coloration jaune. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

L'interprétation des résultats des tests est faite selon une grille appropriée ((Holt et al., 2000) (Tableau IX).

Tableau IX : Grille d'interprétation du test biochimique classique (Holt *et al.*, 2000)

| Types de test | Caractères biochimiques | Résultat positif | Résultat négatif | Photos illustratives |
|--------------------------|--------------------------------|---|--|---|
| Kligler-Hajna | Glucose | Virage du culot en jaune | Pas de changement de couleur du milieu |  |
| | Lactose | Virage de la pente en jaune | | |
| | Production du H ₂ S | Noircissement de l'espace entre le culot et la pente | | |
| | Production du gaz | Formation des bulles | Pas de bulles | |
| Mannitol-Mobilité | Mannitol | Virage de la couleur du milieu du rouge au jaune | Pas de virage de couleur |  |
| | Mobilité | Apparition d'un trouble au niveau de la piqûre centrale | Pas de trouble | |
| Uréase-Indole | Uréase | Virage de la couleur du milieu en rose | Pas de virage de couleur |  |
| | Indole | Formation d'un anneau rouge après l'ajout du réactif de Kovac's | Pas de formation d'anneau rouge | |
| Citrate | Citrate | Virage de la couleur du milieu au bleu | Pas de virage de couleur |  |

II.3.2.4.2. Méthode d'identification par la galerie API 20NE

Les tests biochimiques d'identifications ont été complétés en utilisant la galerie API 20NE. Pour réaliser ce test, une suspension bactérienne est préparée à partir des souches récemment isolées (18-24 heures). Une colonie isolée a été délayée dans 3 mL de sérum physiologique (0,9% de NaCl) et la turbidité de la suspension a été ajustée par la spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm, à l'opacité de 0,5 Mac Farland de densité comprise entre 0,08 et 0,1 ; et correspondant à une concentration de 1×10^8 UFC/100 mL. Après dilution de l'inoculum au 1/100 (1×10^6 UFC/100 mL) puis homogénéisation, un volume de 0,2 mL est prélevé et introduit dans chaque cupule de la microplaque, puis, une goutte de l'huile de la vaseline est ajoutée dans les cupules 2- LDC, 3- ODC, 4- ADC, 7- UR et 8- H₂S. La plaque est ensuite recouverte et incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. A la fin de la période d'incubation, 2 gouttes d'alpha naphthol et une goutte de NaOH 40% (réf.80252) sont rajoutées dans la cupule 10- VP et après 15 à 20 minutes, une couleur rose-rouge apparait. Par la suite, 2 à 3 gouttes de réactif d KOVAC'S (ref.80252) sont ajoutées dans la cupule 11- IND et après 1 à 2 minutes, une coloration rouge apparait. Après observation de changement de couleur dans

les différentes cupules, les résultats sont interprétés d'après le catalogue API 20NE (ref.717110) afin d'identifier les différentes espèces selon la matrice d'identification des *Bacillus* de Cavalla michel, (2003).

II.3.3. Evaluation des paramètres abiotiques susceptibles d'influencer la dynamique d'abondance des bactéries sporulantes

II.3.3.1. Données météorologiques de la zone d'étude

Les données météorologiques ont été collectées suivant la fréquence d'échantillonnage des eaux. Les précipitations ont été mesurées à l'aide d'un pluviomètre. Ce paramètre est susceptible d'influer sur les variations des abondances cellulaires dans les puits.

La température de l'air et l'humidité relative ont été évaluées à l'aide d'un thermomètre à colonne de mercure TESTO 925 et d'un hygromètre EXTECH M0210. Ils ont été choisis en raison de leur aptitude à modifier la structure du sol et d'influencer les infiltrations vers la nappe souterraines les eaux de ruissellement d'origine météoritique (Tyler *et al.*, 1993).

L'insolation et la durée du rayonnement solaire ont été obtenues à l'aide d'un pyranomètre automatique LP PYRA et d'un héliographe MEUDON respectivement. Ces paramètres peuvent altérer l'ADN bactérien et influencer sa survie (Pizarro, 1996).

L'ensemble des données météorologiques ont été obtenues à partir de la base de données du service météorologique du Ministère Camerounais des Transports (Mintransport) et de la NASA (Surface Meteorology and Solar Energy) disponibles à l'adresse internet (<https://power.larc.nasa.gov/data.access.viewer/>).

II.3.3.2. Paramètres hydromorphométriques des puits étudiés

Les paramètres hydromorphométriques considérés dans cette étude ont été la profondeur totale des puits et le niveau piézométrique. Ils ont été mesurés à l'aide d'une corde métallique stérile graduée lestée à sa base (Rodier *et al.*, 2009). L'épaisseur de la colonne de l'eau a été mesurée à la fréquence mensuelle. A chaque puits, cette corde était préalablement rincée avec l'eau prélevée de ce puits.

II.3.4. Analyse des paramètres physicochimiques des échantillons d'eau

II.3.4.1. Analyse des paramètres physiques

II.3.4.1.1. Température

La température a été mesurée *in situ*, à l'aide d'un multiparamètre de marque HANNA. Les électrodes du multiparamètre ont été introduites verticalement dans l'échantillon d'eau. Après 1 à 2 minute (s) le chiffre correspondant a été relevé et exprimé en degré Celsius (°C) Rodier *et al.*, (2009).

II.3.4.1.2. Matières en Suspension (MES), couleur

Les teneurs en M.E.S ont été déterminées de façon directe à l'aide d'un spectrophotomètre HACH DR 2800 et la lecture quant à elle, s'est faite à la longueur d'onde 810 nm. Les valeurs ont été données en mg/L. La couleur a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre HACH DR 2800. La lecture s'est faite à la longueur d'onde 455 nm et les valeurs obtenues ont été exprimées en Platinium Cobalt (Pt.Co) Rodier *et al.*, (2009).

II.3.4.2. Analyse des paramètres chimiques

II.3.4.2.1. pH, Conductivité électrique et TDS

Le pH a été mesuré sur le terrain à l'aide d'un multiparamètre de marque HANNA. En effet, l'électrode de l'appareil a été introduite dans l'échantillon recueilli dans le flacon au 1/3 durant 2 à 3 minutes. Après lecture des valeurs, le résultat a été exprimé en unité conventionnelle (U.C). De même, la conductivité électrique et les solides totaux dissous de l'eau ont été évaluée à l'aide d'un multiparamètre portatif de marque HANNA. Les valeurs ont été données en $\mu\text{S}/\text{cm}$ et mg/L respectivement (Rodier *et al.*, 2009).

II.3.4.2.2. Nitrates, azote ammoniacal, orthophosphates

Les nitrates ont été mesurés par colorimétrie au moyen d'un spectrophotomètre DR/2000 de marque HACH, en utilisant le Nitruver IV comme réactif. La mesure des nitrates a été faite par introduction d'une gélule de Nitruver IV dans 25 ml d'échantillon contenu dans une cellule spectrophotométrique. L'ensemble a été agité durant 30 secondes puis laissé au repos pendant 2 minutes. Ensuite, la cellule a été introduite dans le spectrophotomètre de marque HACH DR/2010. La lecture de la teneur en nitrates a été effectuée à la longueur d'onde de 570 nm et les résultats ont été exprimés en mg/L de NO_3^- . Les teneurs en azote ammoniacal ont été mesurées par colorimétrie en utilisant le réactif de Nessler dont on a ajouté quelques gouttes dans 25 ml d'échantillon contenu dans une cellule spectrophotométrique. L'ensemble a été agité durant 30 secondes puis laissé au repos pendant 2 minutes. Ensuite, la cellule a été

introduite dans le spectrophotomètre de marque HACH DR/2010 et la lecture a été faite à la longueur d'onde 425 nm et au spectrophotomètre de marque HACH DR/2010. Les résultats ont été exprimés en mg/L de NH_4^+ . La mesure des orthophosphates a été faite par introduction d'une gélule de Phosver dans 25 ml d'échantillon contenu dans une cellule spectrophotométrique. L'ensemble a été agité durant 30 secondes puis laissé au repos pendant 2 minutes. Ensuite, la cellule a été introduite dans le spectrophotomètre de marque HACH DR/2010. Les résultats ont été exprimés en mg/L de PO_4^{3-} à la longueur d'onde 880 nm. (Rodier *et al.*, 2009).

II.3.4.2.3. Teneur en Oxygène dissous et en CO_2 dissous

La teneur de l'eau en oxygène dissous a été déterminée sur le terrain au moyen d'un oxymètre de marque HANNA, model HI 9146 en introduisant ses électrodes dans l'échantillon d'eau et le résultat a été exprimé en mg/L. La mesure de la teneur en CO_2 dissous s'est faite en deux temps. Sur le terrain, le CO_2 a été fixé en introduisant dans une fiole jaugée de 200 mL, 20 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) N/20, plus 2 à 3 gouttes de phénophtaléine, ce mélange a été complété avec l'échantillon d'eau brute jusqu'au trait de jauge. Le mélange obtenu de coloration rose a été conservé dans un flacon en polyéthylène à double bouchage de 250 ml puis ramené au laboratoire. Au laboratoire, 50 mL de cet échantillon ont été titrés avec l'acide chlorhydrique (HCl) N/10 jusqu'à décoloration complète. La teneur de l'eau en CO_2 exprimée en mg/L a ensuite été déterminée par la formule : $[\text{CO}_2] \text{ (mg/L)} = (\text{descente de burette du témoin} - \text{descente de burette de l'échantillon}) \times 17,6$ (Rodier *et al.*, 2009).

II.3.5. Susceptibilité des bactéries sporulantes à quelques antibiotiques usuels

L'antibiogramme a été réalisé sur des souches pures des bactéries sporulantes isolées des eaux de surfaces, souterraines et de pluies afin de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques. La méthode utilisée a été celle de la diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu gélosé (Kirby Bauer) conformément aux recommandations du Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et de l'European Commity of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (CA-SFM/EUCAST, 2022).

II.3.5.1. Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques testés sur ces bactéries sporulantes a été fait sur la base de la consommation ces antibiotiques par la population. Le Tableau X présente les familles

d'antibiotiques, les charges de ces antibiotiques sur disques et les catégories d'interprétation en fonction du diamètre d'inhibition potentiellement obtenu.

Tableau X : Liste des antibiotiques testés

| Familles d'antibiotiques | Antibiotiques | Codes | Charge du disque | Catégories d'interprétation et diamètre d'inhibition (mm) | | |
|---|------------------|-------|------------------|---|------|-------|
| | | | | R | S | I |
| Bêta-lactamines | Amoxicilline | AX | 25 µg | ≤ 13 | ≥ 17 | 14-16 |
| | Ampicilline | AM | 10 µg | ≤13 | ≥17 | 14-16 |
| | Imipenème | IMI | 10 µg | ≤18 | ≥23 | 19-22 |
| Aminosides | Gentamicine | GEN | 15µg | ≤12 | ≥15 | 13-15 |
| | Amikacine | AK | 30µg | ≤14 | ≥17 | 14-16 |
| Quinolones | Ciprofloxacine | CIP | 5 µg | ≤ 21 | ≥ 25 | 22-24 |
| | Ofloxacine | OF | 5µg | ≤12 | ≥16 | 13-15 |
| Sulfamides | Sulfaméthoxazole | SXT | 25 µg | ≤ 12 | ≥ 13 | - |
| Cyclines | Tétracycline | TE | 30 µg | ≤10 | ≥14 | 11-13 |
| Légende : R : résistance ; I : sensibilité intermédiaire ; S : sensibilité | | | | | | |

II.3.5.2. Préparation du milieu pour tests d'antibiogrammes

Le milieu utilisé a été la gélose de Mueller Hinton (Biorad) coulée dans les boîtes de Pétri. L'épaisseur de la gélose a été de 4 mm approximativement. La surface de la gélose était séchée avant emploi (CA-SFM/EUCAST, 2022).

II.3.5.3. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif (Plate Count Agar), une suspension bactérienne en solution salée (0,9 % NaCl) de turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland a été réalisée, ce qui correspond à une densité bactérienne d'environ 1×10^8 UFC/100 mL. L'inoculum a ensuite été dilué au 1/10 (1×10^7 UFC/100 mL) avant l'ensemencement (CA-SFM/EUCAST, 2022).

II.3.5.4. Ensemencement, dépôt des disques et incubation

La gélose a été ensemencée avec l'inoculum bactérien par la méthode d'écouvillonnage. La totalité de la surface de la gélose a été écouvillonnée dans trois directions. Ensuite, les disques choisis sont posés soit à la pince flambée, soit à l'aide d'un distributeur automatique périodiquement désinfecté. Les disques sont appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. L'écart entre les disques a été de 3 cm afin

d'éviter le chevauchement des diamètres d'inhibition. Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées dans les 15 min qui suivaient le dépôt des disques, L'ensemble est porté à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37 °C en aérobiose pour les bactéries du genre *Bacillus* et en anaérobiose pour les bactéries du genre *Clostridium* (CA-SFM/EUCAST, 2022). Après incubation on procède à la lecture des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse. Le diamètre des zones d'inhibition est interprété en sensible, intermédiaire ou résistant conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

II.3.5.5. Mesure des diamètres d'inhibition et catégorisation clinique

Les diamètres des zones d'inhibition circulaires ont été mesurés au millimètre le plus proche avec un pied à coulisse. L'interprétation de ces diamètres s'est faite par référence aux diamètres critiques fournis par le CA-SFM (2022). Les souches ont été catégorisées cliniquement en souche résistante (R), sensible (S) ou intermédiaire (I). Les proportions (%) de chaque catégorie clinique ont ensuite été déterminées par rapport au nombre total de souches testées.

- La catégorie sensible signifie que la souche peut être atteinte par le traitement antibiotique appliqué à la dose normale ;
- La catégorie intermédiaire signifie que la souche peut être atteinte ou pas par le traitement antibiotique appliqué à la dose normale ;
- La catégorie résistante signifie que la souche ne peut pas être atteinte par le traitement antibiotique appliqué à la dose normale.

II.3.6. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux extraits de *Moringa oleifera*

II.3.6.1. Choix du matériel végétal et site de récolte

Le matériel végétal utilisé était constitué des feuilles *Moringa oleifera*. Cette plante a été choisie en raison de son usage courant en médecine traditionnelle et en alimentation dans les sociétés africaines, notamment dans le traitement biologique des eaux (Aberra *et al.*, 2011). Les feuilles de *M. oleifera* ont été récoltées à Yaoundé région du Centre Cameroun.

II.3.6.2. Préparation de la poudre de *M. oleifera*

Les feuilles de *Moringa oleifera* ont été découpées et séchées, à l'ombre, à température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant 4 et 7 jours. Après séchage, elles ont été mouluées pour obtenir une poudre fine. Deux types d'extraits ont été préparés à partir de la poudre.

II.3.6.3. Préparation d'extraits aqueux et hydroéthanolique

➤ Préparation de l'extrait aqueux

194g de poudre de feuille ont été mélangés à 1940 mL d'eau distillée pendant 48h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton et du papier Whatman n° 4. Le filtrat obtenu a été séché à l'étuve à une température de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à évaporation totale de l'eau. Après séchage nous avons obtenu 17,05g d'extraits aqueux. L'extrait obtenu sous forme pâteuse a été introduit dans un flacon en verre stérile puis conservé au frais.

➤ Préparation de l'extrait hydroéthanolique

Pour l'extrait hydroéthanolique, 194g de poudre de feuille sèche ont été mélangés respectivement à 1180mL et 760mL du mélange éthanol /eau distillée pendant 48h et remué matin et soir. Le macérât obtenu a été filtré successivement à l'aide du coton et du papier Whatman n° 4. Le filtrat obtenu a été séché à l'étuve à une température de $45 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à évaporation totale du solvant. Après séchage nous avons obtenu 15,95g d'extrait hydroéthanolique. L'extrait obtenu sous forme pâteuse a été introduit dans un flacon en verre stérile puis conservé au frais.

II.3.6.4. Préparation des solutions d'extraits pour activités antimicrobiennes

Pour chaque type d'extraits, les solutions ont été préparées dans un volume de 100 mL aux concentrations de 2 g/L, 1,5g/L, 1 g/L et 0,5 g/L à partir de l'eau physiologique stérile. Les solutions préparées ont tout d'abord été filtrées sur coton hydrophile ensuite sur papier whatman stérile et enfin au travers d'une membrane filtrante de porosité 0,45 μm ceci autour d'un bec Bunsen afin de limiter toute contamination (Tamsa Arfao *et al.*, 2013).

II.3.6.5. Mise en contact des différents extraits avec les microorganismes sous différentes températures

Pour cette expérimentation, toutes les espèces bactériennes (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* et *Clostridium perfringens*). Après l'inoculation des espèces de bactéries dans les tubes à essai de 25 mL (préalablement stérilisés à 121°C à l'autoclave pendant 15min, puis étiquetés) contenant chacun une solution d'extrait de la plante. Ces derniers ont été répartis en différents lots représentant les espèces microbiennes. Chaque lot était constitué par des quadruplets de 4 tubes représentant les périodes de contact et les différentes concentrations des extraits. Une quantité de tubes étaient incubés à la température de 37°C et l'autre à température ambiante. Les

analyses ont été faite après 3h, 6h, 9h, et 24h de séjours des microorganismes dans l'extrait aqueux (Tamsa Arfao *et al.*, 2013, 2017). Le même processus a été appliqué pour l'extrait hydroéthanolique. La Figure 19 montre les solutions de l'extrait de *M. oleifera* dans les tubes à essai.



Figure 19: tubes à essai contenant les différentes concentrations d'extrait et des parties de *M. oleifera*

II.3.6.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *M. oleifera* sur les microorganismes

Les analyses microbiologiques ont porté sur l'aspect quantitatif, réalisées en conditions stériles à côté d'une flamme de bec-bunsen. Elles ont été effectuées après 3 h, 6 h, 9 h, et 24h d'incubation, en prélevant après homogénéisation 100 μ L de l'échantillon à analyser qui a été par la suite étalé à la surface du milieu de culture spécifique (milieu Luria Bertani pour *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. lentus* et *B. subtilis*, gélose de Mossel pour *B. cereus* et la gélose TSC pour *C. perfringens*). Le milieu a été préalablement séché dans une étuve à 44 °C selon la technique d'étalement en surface (Diagnostic Pasteur, 1987). La durée d'incubation a été de 24 h à 37°C. Le dénombrement de germes viables isolés a été effectué par comptage direct sur boîte de pétri à l'aide d'un compteur de colonie de marque OSI. Les abondances microbiennes ont été exprimées en Unités Formants Colonies (UFC/100mL).

II.3.7. Détermination des composés chimiques majeurs dans les extraits de *M. oleifera*

Dans le but de mettre en évidence les différentes classes de substances bioactives (métabolites secondaires) présentes dans les extraits à l'eau et à l'alcool des plantes étudiées, un criblage phyto chimique a été réalisé par des tests colorimétriques suivant le protocole de Harbone (1998).

Les feuilles ont été coupées et séchées à l'ombre, à température de laboratoire ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant 30 jours. Après séchage, ils ont été broyés. Trente grammes (30 g) de poudre, ont

été extraits avec du méthanol à température ambiante pendant 24 heures (1 g de poudre dans 10 mL de méthanol), répétés trois fois. Après filtration, le solvant a été éliminé sous vide pour fournir un extrait brut (Mellon *et al.*, 2002).

À partir de l'extrait méthanolique brut préparé, 5 mg de feuilles ont été dilués dans 5 mL de méthanol (MeOH) HPLC Grade. La solution a ensuite été homogénéisée dans une cuve à ultrasons. À l'aide d'une seringue de 2 ml, la solution a été prélevée et filtrée d'abord à travers une membrane de porosité de 0,45 µm, puis à travers une membrane de porosité de 0,22 µm. Une partie du filtrat a été transférée dans un flacon HPLC.

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un appareil Agilent 1260 Infinity, avec un détecteur DAD équipé d'une colonne Uptisphere C18-3 (250 x 4,6 mm, 5µm) d'Interchim (Montluçon, France). Des analyses LC-MS ont été réalisées sur une chaîne RSLC UHPLC Ultimate 3000 et un Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific, Waltham, USA) avec la colonne mentionnée ci-dessus. Les conditions de fonctionnement de la source étaient les suivantes : tension de pulvérisation de 3 kV ; Température capillaire chauffée de 320 °C ; Température du gaz auxiliaire de 400 °C ; gaine, balayage et auxiliaire g température des gaz auxiliaires ; les débits de gaine, de balayage et de gaz auxiliaire (azote) étaient respectivement de 50, 10 et 2 unités arbitraires ; la cellule de collision a été utilisée en mode nCE étagé avec une tension d'ionisation comprise entre 10 et 50 unités arbitraires. Des données de balayage complètes ont été obtenues à une résolution de 70 000. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, États-Unis). L'identification de tous les composés décrits a été réalisée en utilisant le mode d'ionisation négative.

Pour les deux analyses, la phase mobile était un mélange de 0,1 % (v :v) d'acide formique dans l'eau (phase A) et de 0,1 % (v :v) d'acide formique dans l'acétonitrile (phase B). La pente de la phase A était de 100 % (0 min), 80 % (10 min), 73 % (35 min), 0 % (40-50 min) et 100 % (51-60 min). Le débit était de 0,8 mL/min et le volume d'injection était de 5 µL.

Les données du spectre de masse ont été enregistrées dans un format Excel standard. Ces données comprenaient la masse exacte de chaque composé, la masse M+H, la masse M-H, la masse en M+NH₄, la masse en M-COOH, la masse M+Na et la masse expérimentale (Aubert *et al.*, 2019 ; Gainche *et al.*, 2021). Chaque composé détecté a été caractérisé. Sa formule brute potentielle a ensuite été calculée à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Inc.), qui tient compte de son abondance relative, de ses masses molaires et de son temps de rétention (Aubert *et al.*, 2019 ; Gainche *et al.*, 2021).

Les noms des composés chimiques ont été déterminés par comparaison avec la norme analytique ou selon les données de la littérature (Kashiwada *et al.*, 1984 ; L alas *et al.*, 2003 ; Shakeri *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2019 ; Xiong *et al.*, 2022).

II.3.8. Analyse des données

Le choix des analyses a été fait après vérification de la distribution des données à partir du test de normalité de Kolmogorov-Smirnov. Ce test a montré que les données ne suivent pas la loi de distribution normale.

Le coefficient de corrélation de rang de Spearman a été calculé pour mesurer les degrés de liaison entre les variables dans les différents biotopes aquatiques. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS version 25.0.

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (test H) a été utilisé pour vérifier, sur le plan spatiotemporel, la signification des différences (ou similarités) de variances des paramètres abiotiques et des abondances des bactéries sporulantes relatifs à leur distribution. Chaque fois que le test de Kruskal-Wallis a montré une différence significative entre les variances des échantillons comparés, le test de comparaison multiple de rangs ou le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour une comparaison deux à deux, afin d'isoler les échantillons qui diffèrent significativement.

A decorative border in a dark blue color, resembling a scroll or a frame with rounded corners and small circular motifs at the top and bottom edges.

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Diversité des bactéries sporulantes dans les eaux étudiées

- Aspect qualitatif

Durant la période d'échantillonnage, 2 genres bactériens sporulants à savoir : *Bacillus* et *Clostridium* ont été isolés sur 3 types de milieux de culture que sont les milieux Luria Bertani, Mossel et TSC (Tryptone Sufite Cyclosérine).

Sur le milieu Luria Bertani, 4 types de colonies bactériennes de caractères généraux différents ont été isolées à savoir :

- les colonies de grande taille de diamètre 3 à 10 mm, de couleur blanche à texture circulaire présomptives de *Bacillus thuringiensis*.
- les colonies de taille moyenne de 2 à 3 mm de diamètre à texture mate ou brillante de couleur jaune présomptives de *Bacillus subtilis*.
- les colonies ayant un aspect très muqueux, humide, brillant et collant à la gélose de 2 à 8 mm de diamètre de couleur jaune orange présomptives de *Bacillus licheniformis*.
- Les colonies de petites tailles de diamètre 1 à 2 mm à texture mate de couleur blanche présomptive de *Bacillus lentus*.

Sur le milieu de Mossel, les colonies de grande taille avec un diamètre compris entre 2 à 7 mm, de couleur rose à aspect granuleux présomptives de *Bacillus cereus* ont été observées.

Sur le milieu TSC les colonies de *Clostridium perfringens*, entourées d'un halo noir, dû à la réduction du sulfite en précipité de sulfure de fer (Figure 20).

- Caractères biochimiques des espèces identifiées

Six espèces de bactéries sporulantes ont été identifiées dans les 3 types d'eau durant la période d'échantillonnage. Parmi ces 6 espèces, 2 espèces ont été isolées uniquement dans les eaux souterraines il s'agit de *Bacillus licheniformis* et *Bacillus lentus* aux mois de juin et septembre 2021 aux stations GW3 et GW4. Les caractères biochimiques de ces espèces ont été inscrits dans le Tableau XI.

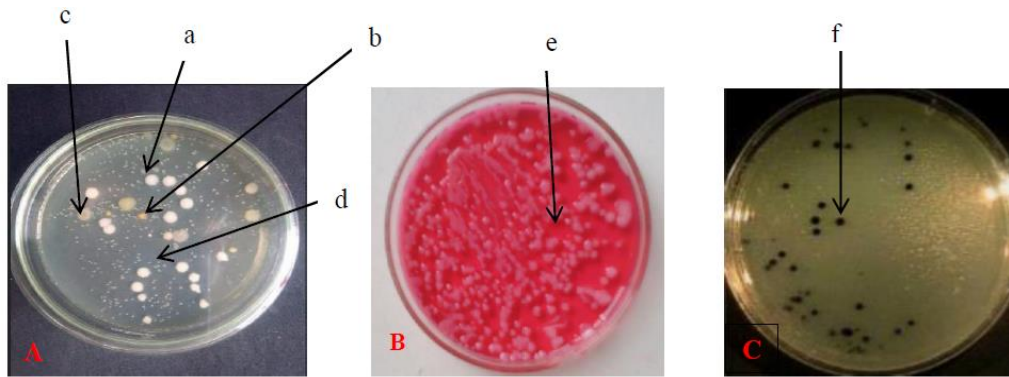


Figure 20 : Noms présumptifs des bactéries isolées sur le milieu Luria-Bertani (A), gélose de Mossel (B) et gélose Sulfitoréducteurs (C) (a : *Bacillus thuringiensis* ; b : *Bacillus subtilis* ; c : *Bacillus licheniformis* ; d : *Bacillus lentus* ; e : *Bacillus cereus* ; f : *Clostridium perfringens*)

III.1.2. Variation des abondances des bactéries dans les eaux étudiées

Les figures 21 à 25 illustrent les variations des densités cellulaires en fonction des sites d'échantillonnage des différents biotopes aquatiques. Elles ont été présentées sous forme de boîtes à moustaches où la valeur du 1er quartile Q1 (25% des effectifs), correspond au trait inférieur de la boîte ; la valeur du 2ème quartile Q2 ou valeur médiane (50% des effectifs), est représentée par un trait horizontal à l'intérieur de la boîte ; la valeur du 3ème quartile Q3 (75% des effectifs), correspond au trait supérieur de la boîte. Les deux barres verticales de part et d'autre de la boîte délimitent les valeurs dites adjacentes et représentent les valeurs minimales et maximales. Le signe + à l'intérieur de la boîte représente la valeur moyenne. Les valeurs extrêmes, atypiques (plus petite que 10% et plus grandes que 90% des effectifs) situées au-delà des valeurs adjacentes sont individualisées. Elles sont représentées par des marqueurs (étoiles et cercles).

III.1.2.1. Abondances des BHAM

Les abondances cellulaires des BHAM isolées dans les différents biotopes analysés ont été sujettes à des fluctuations spatio-temporelles (Figure 21). Elles ont varié de $1,6$ à $151,32 \times 10^4$, de 1×10^4 à 1×10^4 , et de 9 à 196×10^4 UFC/100mL respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les abondances ponctuelles ont atteint $151,32 \times 10^4$ UFC/100mL dans les eaux de surface en Février et $81,6 \times 10^4$ UFC/100mL dans les eaux souterraines en novembre dans les stations SW2 et GW1 respectivement. L'examen des abondances moyennes a montré que dans les eaux de pluies, la station RW1 a présenté la plus faible charge bactérienne soit $58,68 \times 10^4$ UFC/100mL tandis que dans les eaux de surface et de

pluies les charges bactériennes les plus faibles soient $19,2 \times 10^4$ UFC/100mL et $5,8 \times 10^4$ UFC/100mL ont été enregistrées respectivement aux stations SW1 et GW6.

Les moyennes des abondances cellulaires des BHAM dans les différents biotopes ont montré que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux de pluie à la station RW3 que dans les autres biotopes aquatiques.

Tableau XI : Caractères biochimiques des espèces identifiées

| Tests d'identification effectués | Colonies bactériennes | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F |
| Catalase | + | + | + | + | + | - |
| Mannitol | - | + | + | - | - | + |
| Mobilité | + | - | + | + | + | + |
| Citrate | + | + | - | - | + | - |
| H ₂ S | + | + | + | + | - | + |
| Oxydase | - | + | + | - | - | - |
| URE | - | - | - | - | - | - |
| Lactose | - | + | + | + | + | + |
| Glucose | + | + | + | + | + | + |
| Indole | - | - | - | - | - | - |
| Nitrates | + | + | + | - | - | - |
| Esculine | + | + | + | - | + | - |
| VP | + | + | + | +/- | + | + |
| ODC | - | - | - | - | - | - |
| LDC | - | - | - | - | - | - |
| Espèces suspectes | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus lentus</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Clostridium perfringens</i> |

(+) : positif ; (-) : négatif ; (+/-) : variable ; LDC : Lysine-Décarboxylase ; ODC : Ornithine-décarboxylase ; H₂S : Sulfure d'hydrogène ; VP : Voges-Proskau

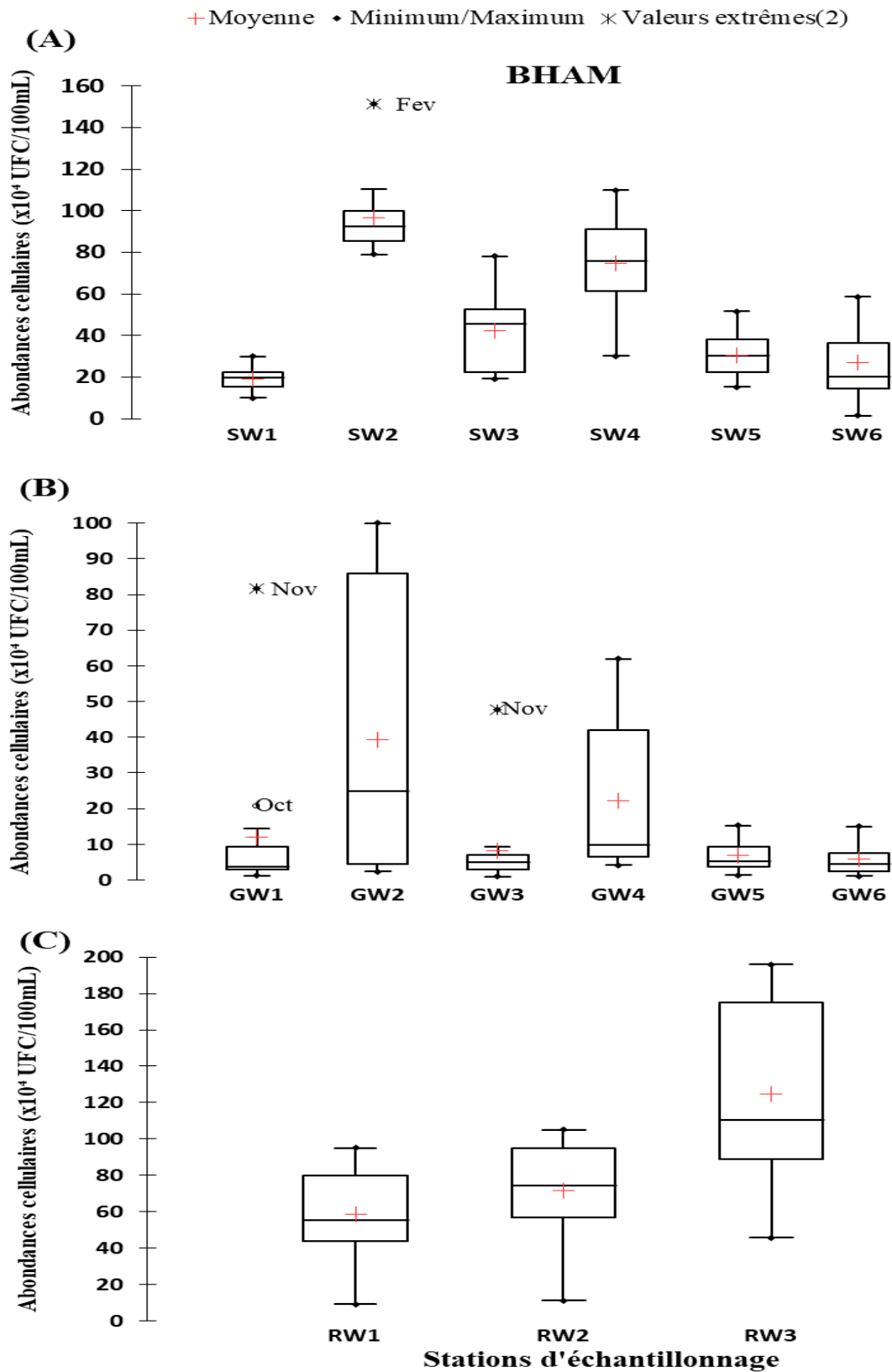


Figure 21 : Variation des abondances cellulaires moyennes des BHAM dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.2.2. Abondances de *Bacillus thuringiensis*

Les abondances cellulaires des *Bacillus thuringiensis* isolés dans les différents biotopes analysés ont été sujettes à des fluctuations spatio-temporelles (Figure 22). Elles ont varié de $0,1 \times 10^2$ à 300×10^2 , de $0,1 \times 10^2$ à $36,2 \times 10^2$, et de 3×10^2 à 73×10^2 UFC/100mL respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. L'abondance cellulaire ponctuelle a atteint 300×10^2 UFC/100mL dans les eaux de surface à la station SW2 au mois d'Avril. L'abondance cellulaire moyenne la plus faible dans les eaux de surface ($17,62 \times 10^2$ UFC/100mL) a été enregistrée à la station SW6. L'examen des valeurs moyennes des abondances a montré que les stations GW5 et RW2 respectivement des eaux souterraines et de pluies ont présenté la plus faible charge bactérienne soit 3×10^2 UFC/100mL.

Les moyennes des abondances cellulaires de *Bacillus thuringiensis* dans les différents biotopes ont montré que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux de surface à la station SW4 que dans les autres biotopes aquatiques.

III.1.2.3. Abondances de *Bacillus cereus*

Les abondances cellulaires des *Bacillus cereus* isolés dans les différents biotopes analysés ont été sujettes à des fluctuations spatio-temporelles (Figure 23). Elles ont varié de 0,1 à 168,8 de 0 à 34 et de 1 à 120×10^2 UFC/100mL respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les abondances cellulaires ponctuelles ont atteint $168,8 \times 10^2$ UFC/100mL dans les eaux de surface en Février et 34×10^2 UFC/100mL dans les eaux souterraines au mois de Novembre. L'examen des abondances cellulaires moyennes a montré que les stations SW1, GW6 et RW3 ont présenté les plus faibles charges bactériennes ($8,8$; $0,7$ et $19,9 \times 10^2$ UFC/100mL) respectivement des eaux de surface, souterraines et de pluie.

Les moyennes des abondances cellulaires de *Bacillus cereus* dans les différents biotopes ont montré que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux de surface à la station SW2 que dans les autres biotopes aquatiques.

+ Moyenne • Minimum/Maximum ◦ Valeurs extrêmes(1) ✕ Valeurs extrêmes(2)

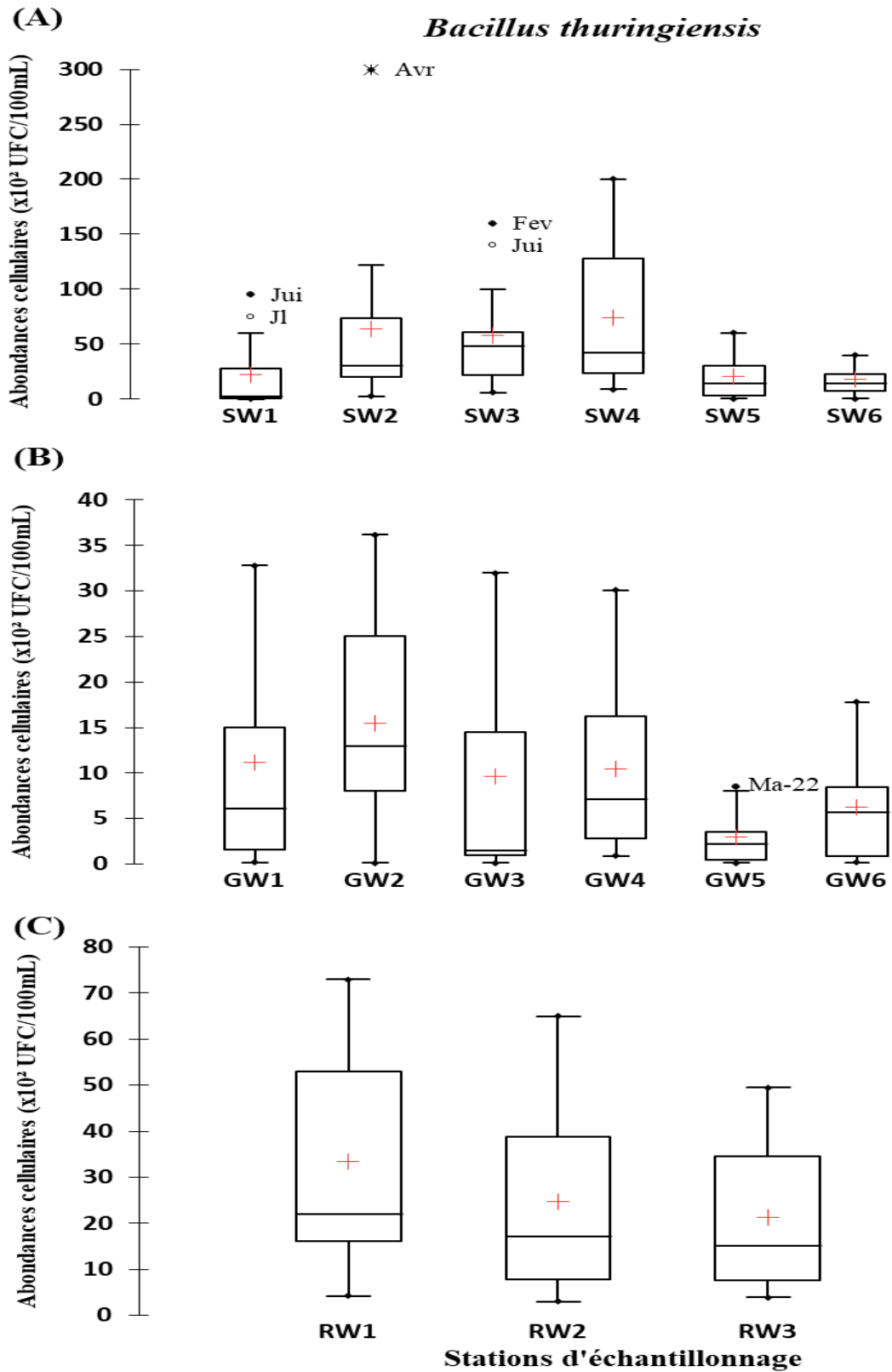


Figure 22 : Variation des abondances cellulaires moyennes des *Bacillus thuringiensis* dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

+ Moyenne • Minimum/Maximum ◦ Valeurs extrêmes(1) ✖ Valeurs extrêmes(2)

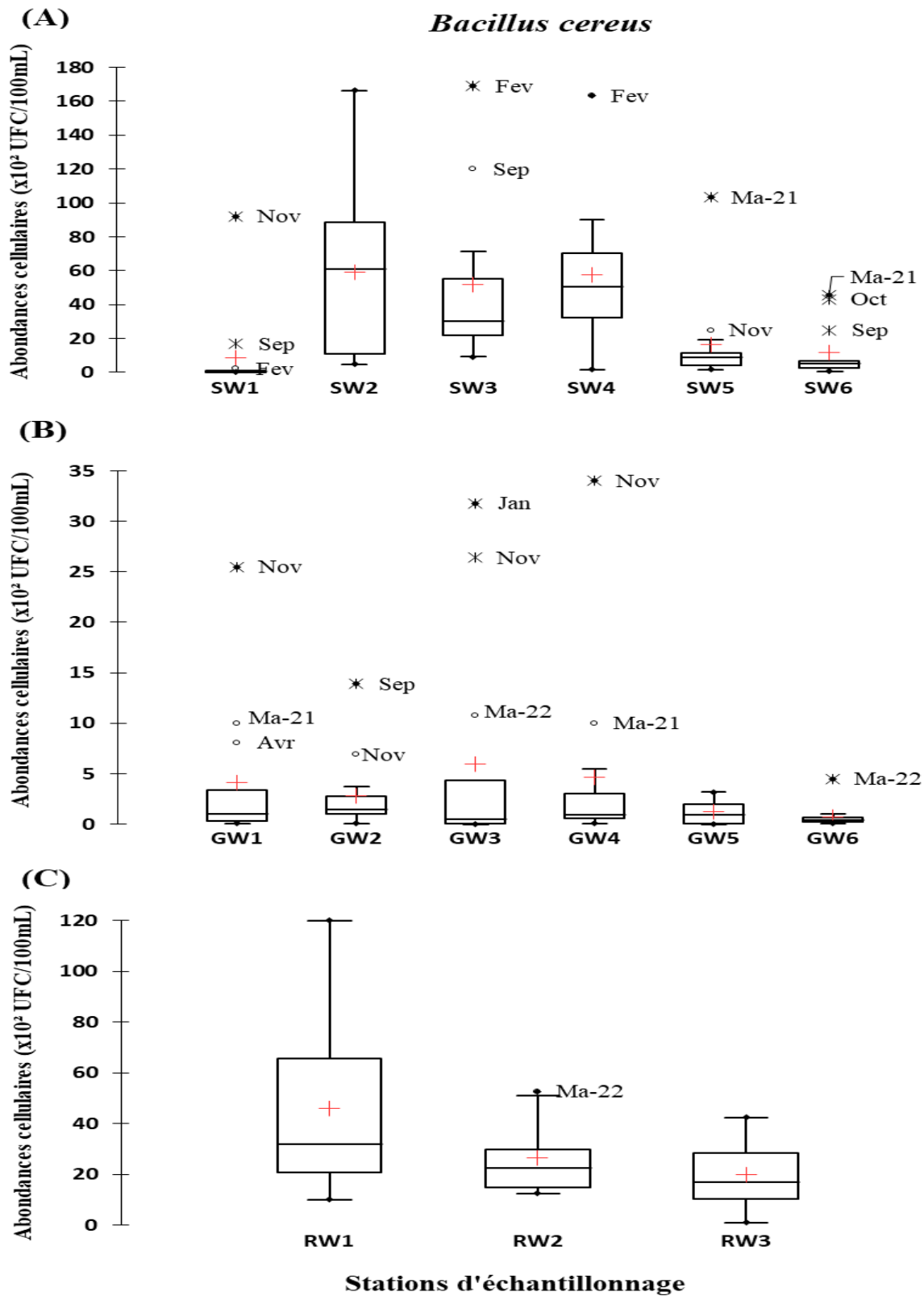


Figure 23 : Variation des abondances cellulaires moyennes des *Bacillus cereus* dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.2.4. Abondances de *Bacillus subtilis*

Les abondances cellulaires des *Bacillus subtilis* isolés dans les différents biotopes analysés ont été sujettes à des fluctuations spatio-temporelles (Figure 24). Elles ont varié de 0 à 13,7 de 0 à 5,9 et de 0 à 7×10^2 UFC/100mL respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les abondances cellulaires ponctuelles ont atteint $5,9 \times 10^2$ UFC/100mL en février et 7×10^2 UFC/100mL en Mars 2021 respectivement dans les eaux souterraines et les eaux de pluie. L'examen des abondances bactériennes a montré que la charge bactérienne la plus faible ($0,1 \times 10^2$ UFC/100mL) a été enregistrée dans les eaux souterraines à la station GW5.

Les moyennes des abondances cellulaires de *Bacillus subtilis* dans les différents biotopes ont montré que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux de surface à la station SW4 que dans les autres biotopes aquatiques.

III.1.2.5. Abondances de *Clostridium perfringens*

Les abondances cellulaires des *Clostridium perfringens* isolés dans les différents biotopes analysés ont été sujettes à des fluctuations spatio-temporelles (Figure 25). Elles ont varié de 0 à 20, de 0 à 1,5 et de 0 à 1×10^2 UFC/100mL respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les abondances cellulaires ont atteint 20×10^2 UFC/100mL en Mars 2021 ; $1,5 \times 10^2$ UFC/100mL en Avril et $1,6 \times 10^2$ UFC/100mL en Mars 2022 aux stations SW1, GW2 et RW1 respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. L'examen des abondances moyennes a montré que la station GW1 a présenté la plus faible charge bactérienne soit ($0,031 \times 10^2$ UFC/100mL).

Les moyennes des abondances cellulaires de *Clostridium perfringens* dans les différents biotopes ont montré que la charge bactérienne est plus élevée dans les eaux de surface à la station SW2 que dans les autres biotopes aquatiques.

+ Moyenne • Minimum/Maximum ◦ Valeurs extrêmes(1) * Valeurs extrêmes(2)

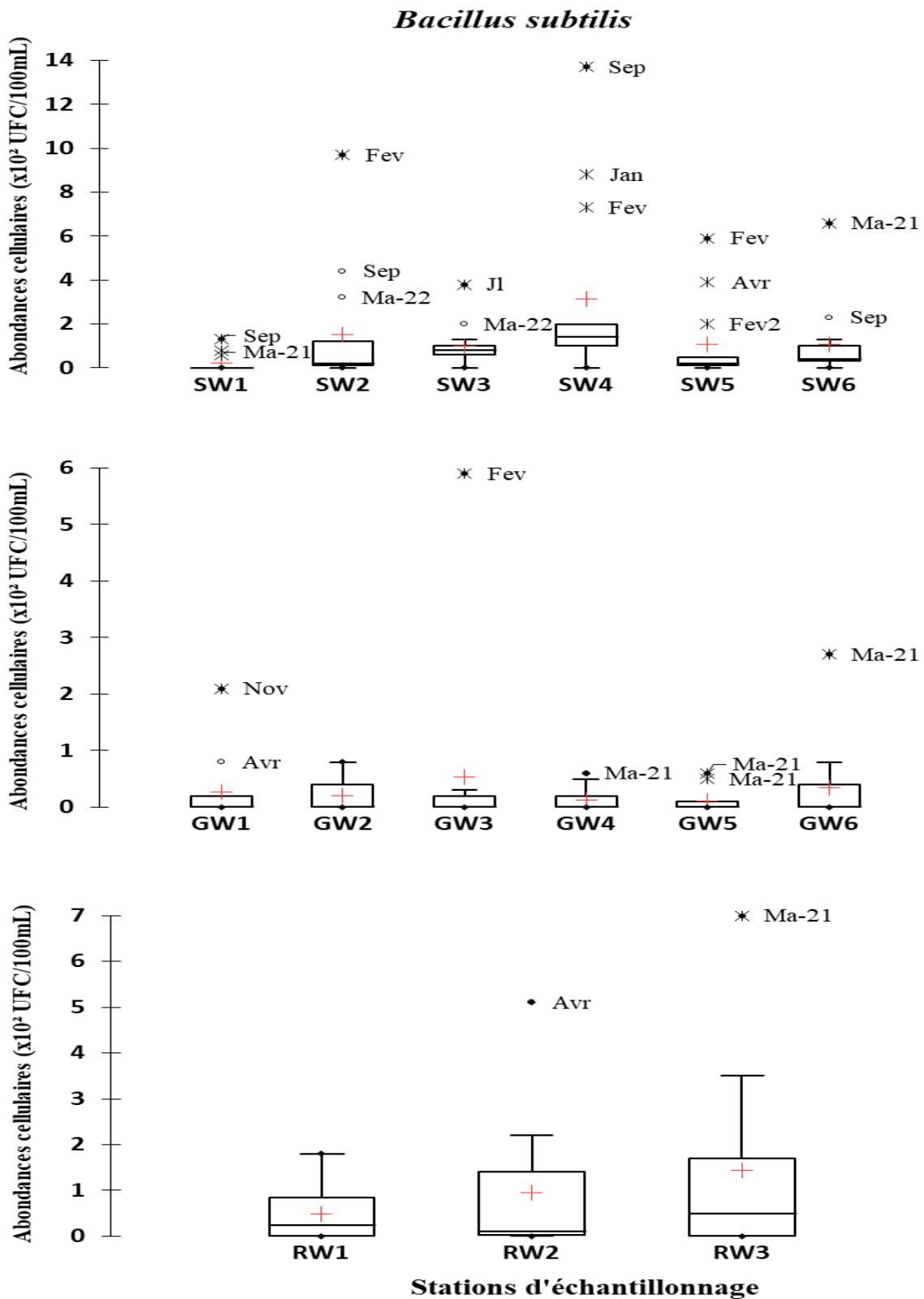


Figure 24 : Variation des abondances cellulaires moyennes des *Bacillus subtilis* dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

+ Moyenne • Minimum/Maximum ◦ Valeurs extrêmes(1) * Valeurs extrêmes(2)

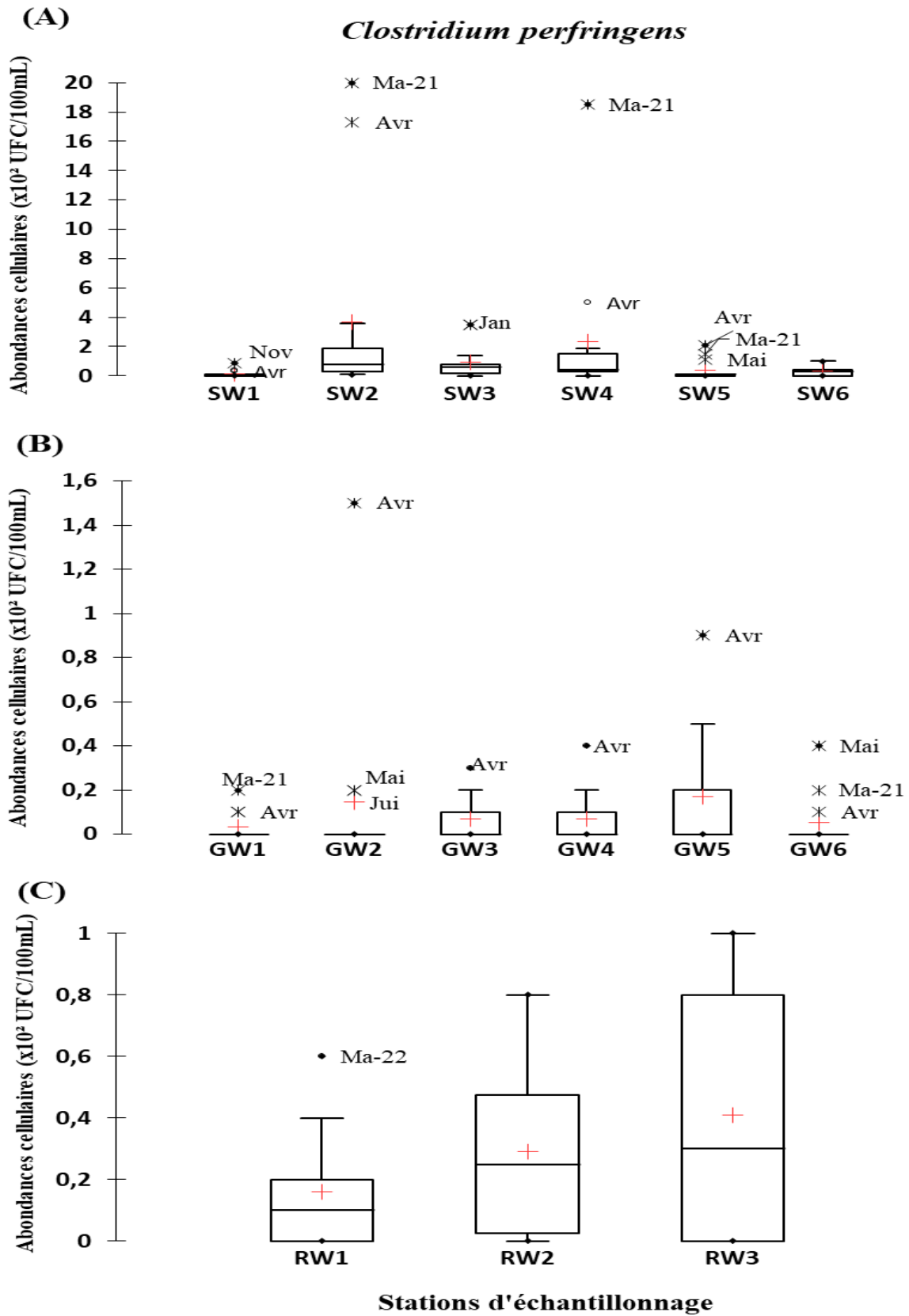


Figure 25 : Variation des abondances cellulaires moyennes des *Clostridium perfringens* dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.2.6. Abondances relatives des bactéries sporulantes identifiées par rapport à l'ensemble des BHAM présentes

L'analyse bactériologique réalisée à partir des échantillons d'eau recueillis au cours de la période d'étude a montré que ces eaux contiennent des bactéries sporulantes. Au cours de l'étude, 2 genres bactériens ont été identifiés. Il s'agit des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Les densités de ces deux groupes de bactéries ont varié d'un point à l'autre et dans le temps. En termes d'abondance, les genres *Bacillus* et *Clostridium* ont eu des proportions de 1,3% et 0,02% respectivement dans les eaux de surface ; 0,81% et 0,01% respectivement dans les eaux souterraines et 0,61% et 0,01% respectivement pour les deux genres dans les eaux de pluies.

Les organismes non identifiés quant à eux ont présenté les plus fortes proportions : 98,68% dans les eaux de surface, 99,18% dans les eaux souterraines et 99,38% dans les eaux de pluies. Le Tableau XII montre les abondances relatives des différentes espèces isolées dans les différents biotopes aquatiques.

Tableau XII : Abondances relatives des différents microorganismes identifiés dans les différents biotopes aquatiques

| Espèces bactériennes | Abondances relatives dans différents biotopes échantillonnés | | |
|--------------------------------|--|-------------------|----------------|
| | Eau de surface | Eaux souterraines | Eaux de pluies |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,7% | 0,59% | 0,28% |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,58% | 0,2% | 0,32% |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0,02% | 0,02% | 0,01% |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 0,02% | 0,01% | 0,01% |
| Autres bactéries | 98,68% | 99,18% | 99,38% |

III.1.3. Paramètres abiotiques des différents biotopes étudiés

III.1.3.1. Paramètres météorologiques

Les données météorologiques mensuelles de la ville de Yaoundé pendant la période d'étude sont illustrées à la Figure 26.

- Précipitations

Les précipitations enregistrées dans la ville de Yaoundé, sur les 13 mois d'étude ont été 57,76 mm de pluies. Les plus faibles précipitations ont été observées au mois de Janvier 2022 (0,34 mm) et les plus grandes au mois de juillet 2021 (11,80 mm) (Figure 26 A).

- Insolation

L'insolation détermine l'intensité du rayonnement solaire mesurée à la surface de la terre après sa traversée atmosphérique. Les valeurs de l'insolation ont été comprises entre 2,59 et 5,54 kWh/m²/jour. La plus faible valeur a été observée au mois de Juillet tandis que la valeur la plus grande a été enregistrée au mois de septembre 2022 (Figure 26 B).

- Température de l'air et humidité relative

Les valeurs mensuelles de la température de l'air mesurées à 10 m au-dessus du sol ont varié d'un mois à l'autre (Figure 26C). Elles ont oscillé entre 20,02 °C au mois de Juillet et 24,28°C au mois de mars 2021. L'humidité relative de l'air a également été sujette à des variations mensuelles. Sa plus faible valeur de 75,26% a été enregistrée en Janvier tandis que sa plus grande valeur soit 91,25% a été observée en Août (Figure 26D).

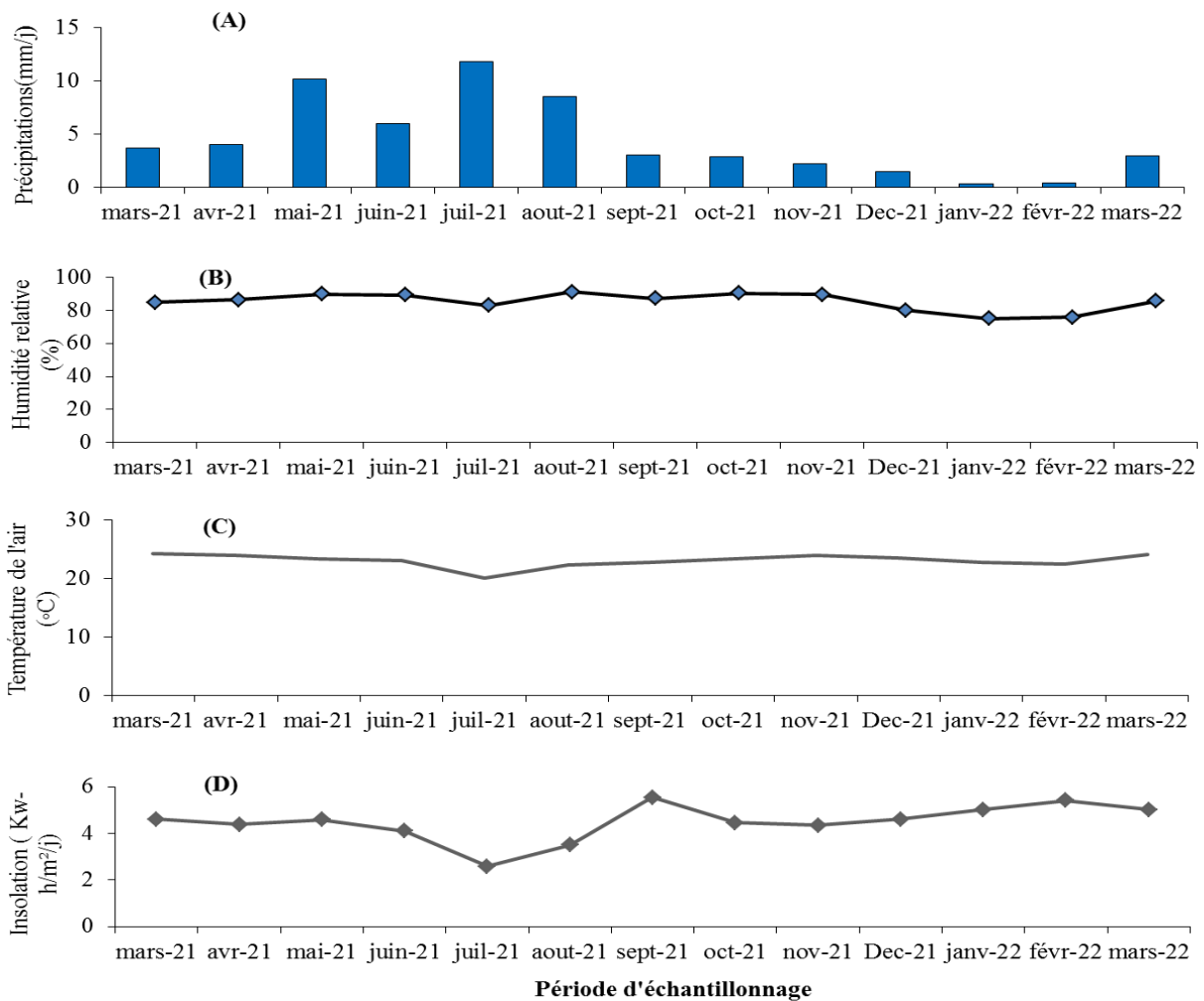


Figure 26 : Variations mensuelles des paramètres météorologiques mesurés dans la ville de Yaoundé de Mars 2021 à Mars 2022 : (A) précipitations, (B) humidité relative, (C) température de l'air, (D) insolation

III.1.3.2. Variation spatio-temporelle des paramètres physico-chimiques dans les biotopes aquatiques analysés

Les paramètres physico-chimiques mesurés durant la période d'échantillonnage ont varié d'un biotope aquatique à l'autre et d'une station à l'autre. Les données physicochimiques enregistrées dans chaque biotope aquatique sont représentées graphiquement aux figures 27 à 37 sous forme de boîtes à moustaches où la valeur du 1er quartile Q1 (25% des effectifs), correspond au trait inférieur de la boîte ; la valeur du 2ème quartile Q2 ou valeur médiane (50% des effectifs), est représentée par un trait horizontal à l'intérieur de la boîte ; la valeur du 3ème quartile Q3 (75% des effectifs), correspond au trait supérieur de la boîte. Les deux barres verticales de part et d'autre de la boîte délimitent les valeurs dites adjacentes et représentent les valeurs minimales et maximales. Le signe + à l'intérieur de la boîte représente la valeur moyenne. Les valeurs extrêmes, atypiques (plus petite que 10% et plus grandes que 90% des effectifs) situées au-delà des valeurs adjacentes sont individualisées. Elles sont représentées par des marqueurs (points noirs, les étoiles ou des cercles).

III.1.3.2.1. Variation spatio-temporelle de la température

Les valeurs de la température ont fluctué entre 21,7 et 32,7°C ; entre 21,1 et 26,8°C ; et entre 22,1 et 29,7°C respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. La valeur moyenne de la température des eaux de surface a été de 24,45°C se trouvant en-dessous de la NC 207 qui est de 27°C, celle des eaux souterraines a été de 24,28°C et était proche de la NC 207 qui est de 25°C tandis que celle des eaux de pluie a été de 25,74 °C (Figure 27). Toutefois, les relevés thermiques ponctuels ont atteint 32,7°C à la station SW4 ; 24,8°C à la station GW1 et 29,7°C à la station RW3 respectivement des eaux de surface, souterraines et de pluies. Toutes ces valeurs ponctuelles ont été enregistrées au mois d'Avril. Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux de pluie ont eu une température plus élevée parmi les 3 biotopes aquatiques.

III.1.3.2.2. Variation spatio-temporelle des teneurs en oxygène dissous

Les concentrations de l'Oxygène dissous ont fluctué entre 0,3 et 5,2 mg/L ; entre 1,11 et 7 mg/L ; et entre 1,5 et 7,18 mg/L respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs moyennes de l'O₂ Dissous (2,34 mg/L, 4,16 mg/L et 3,07 mg/L) respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie sont inférieures à celle de la NC 207 qui se situe à 6mg/L (Figure 28). La valeur moyenne ponctuelle de la concentration en oxygène dissous a atteint 7 mg/L à la station GW4 au mois de Mai. Les concentrations les plus faibles ont été observées dans les eaux de surface. Les différentes

valeurs moyennes ont montré que les eaux de pluie ont eu une teneur en oxygène plus élevée parmi les 3 biotopes aquatiques.

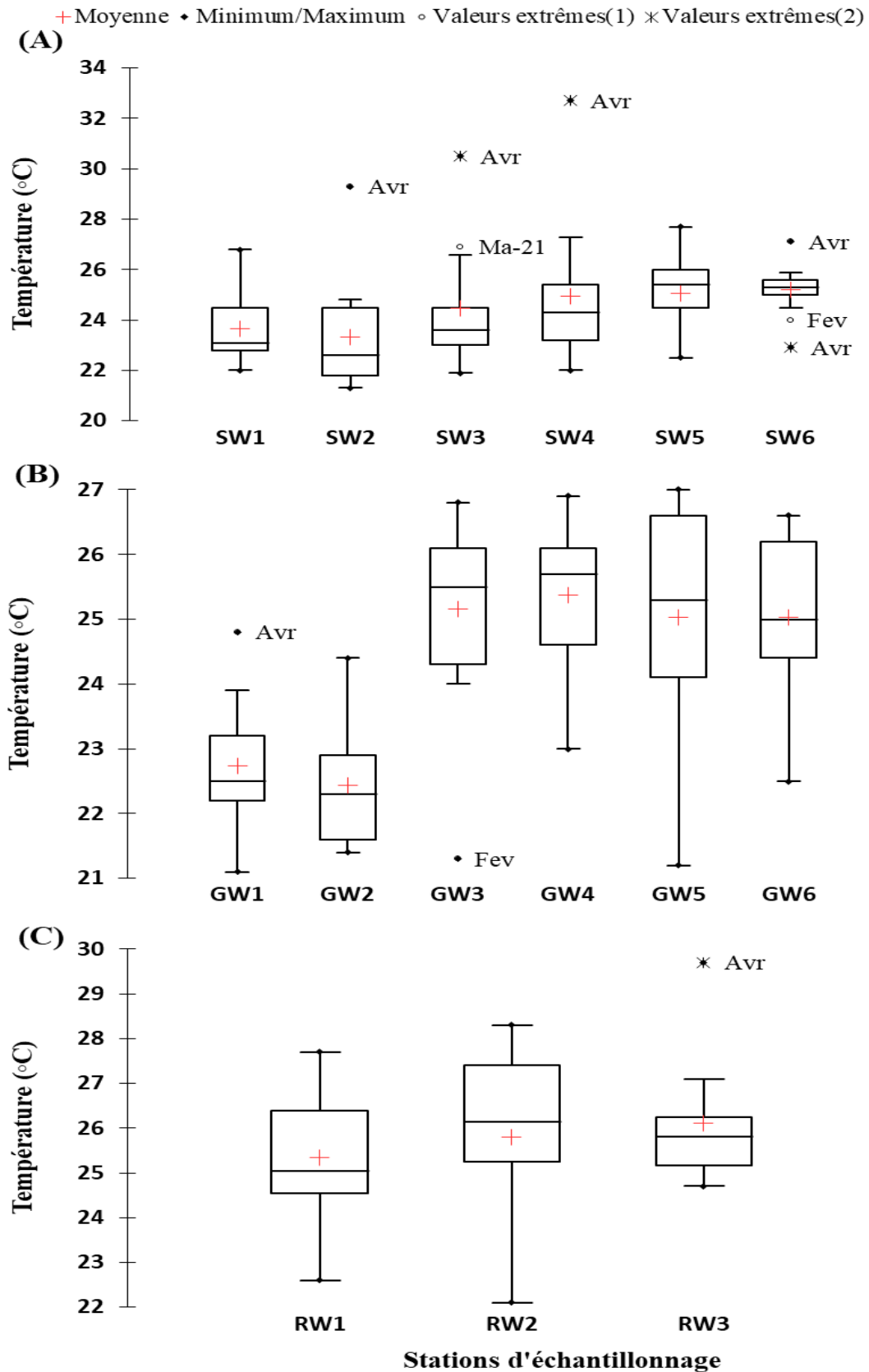


Figure 27 : Variation des valeurs moyennes de la température des eaux de surface (A), des eaux souterraines (B) et des eaux de pluie (C)

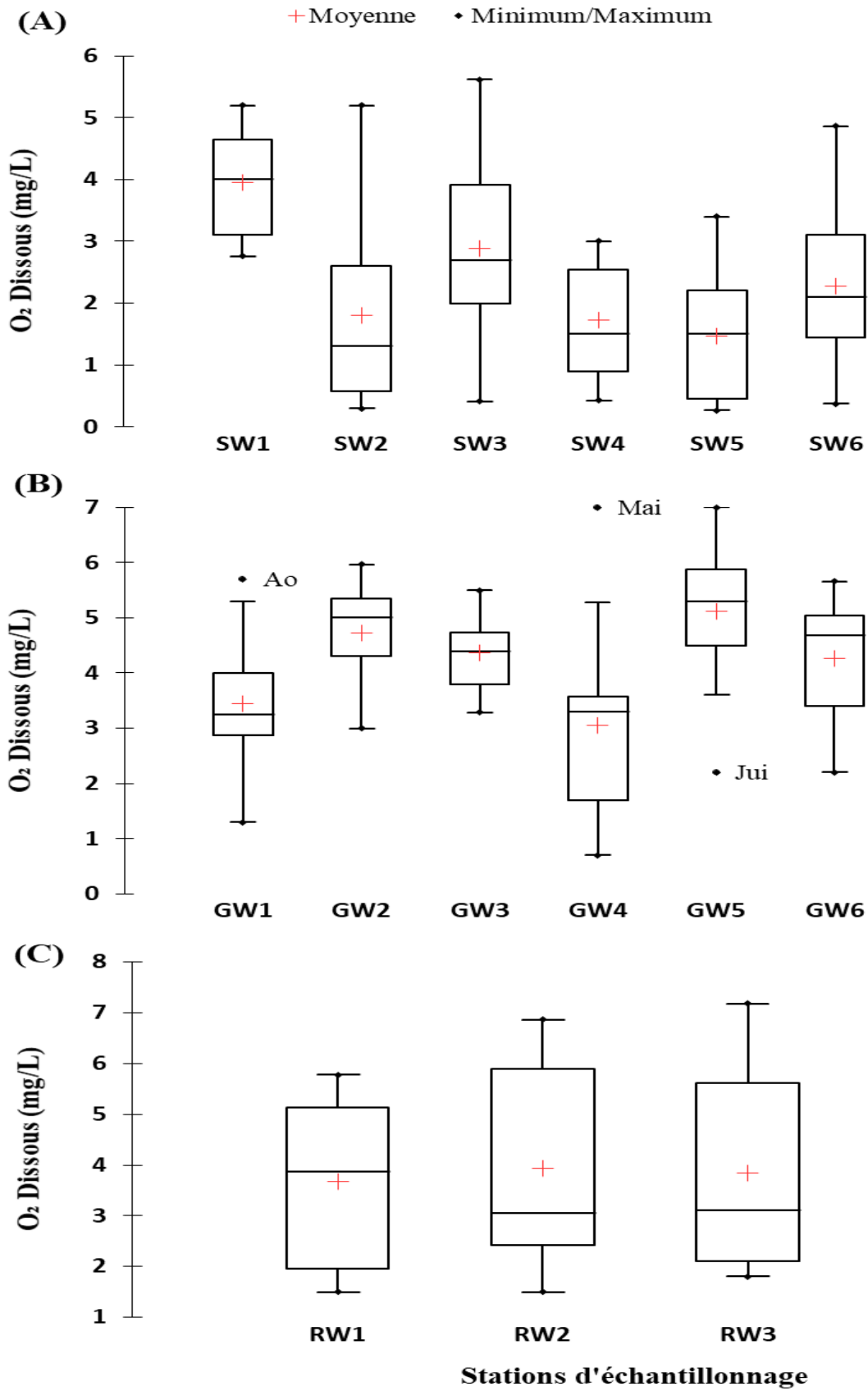


Figure 28 : Variation des valeurs moyennes de l'oxygène dissous dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.3.2.3. Variation spatio-temporelle des TDS

Les concentrations des TDS ont fluctué entre 59 et 170 mg/L ; 52 et 463 mg/L ; et entre 3 et 46 mg/L respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. La valeur moyenne dans les eaux de surface a été de 163 mg/L et était largement au-dessus de la NC 207 qui est de 50 mg/L, celle des eaux souterraines a été de 180 mg/L inférieure de la NC 207 qui doit être inférieure à 300 mg/L tandis que celle des eaux de pluie a été de 13 mg/L (Figure 29). La valeur ponctuelle des solides totaux dissous a atteint 37,46 mg/L à la station RW3 au mois d'Avril. Au vu des différentes valeurs moyennes obtenues, il ressort que les eaux souterraines ont eu une forte valeur de TDS, contrairement aux autres biotopes aquatiques.

III.1.3.2.4. Variation spatio-temporelle du pH

Les valeurs du pH ont fluctué entre 5,22 et 8,67 UC ; entre 5,05 et 7,33 UC ; et entre 6,12 et 6,88 UC respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. La valeur moyenne du pH des eaux de surface a été de 7,09 UC et se trouvant dans l'intervalle de la NC 207 qui est comprise entre 7 et 8 UC bien que certaines stations aient enregistré des valeurs de pH se trouvant en-deçà de cette norme ; celle des eaux souterraines a été de 6,13 UC et se situant dans l'intervalle de la NC 207 comprise entre 5,5 et 8 U.C ; tandis que la moyenne du pH des eaux de pluie a été de 6,53 UC (Figure 30). Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux de surface ont eu un pH plus élevé que celui des eaux souterraines et des eaux de pluie qui sont légèrement acides.

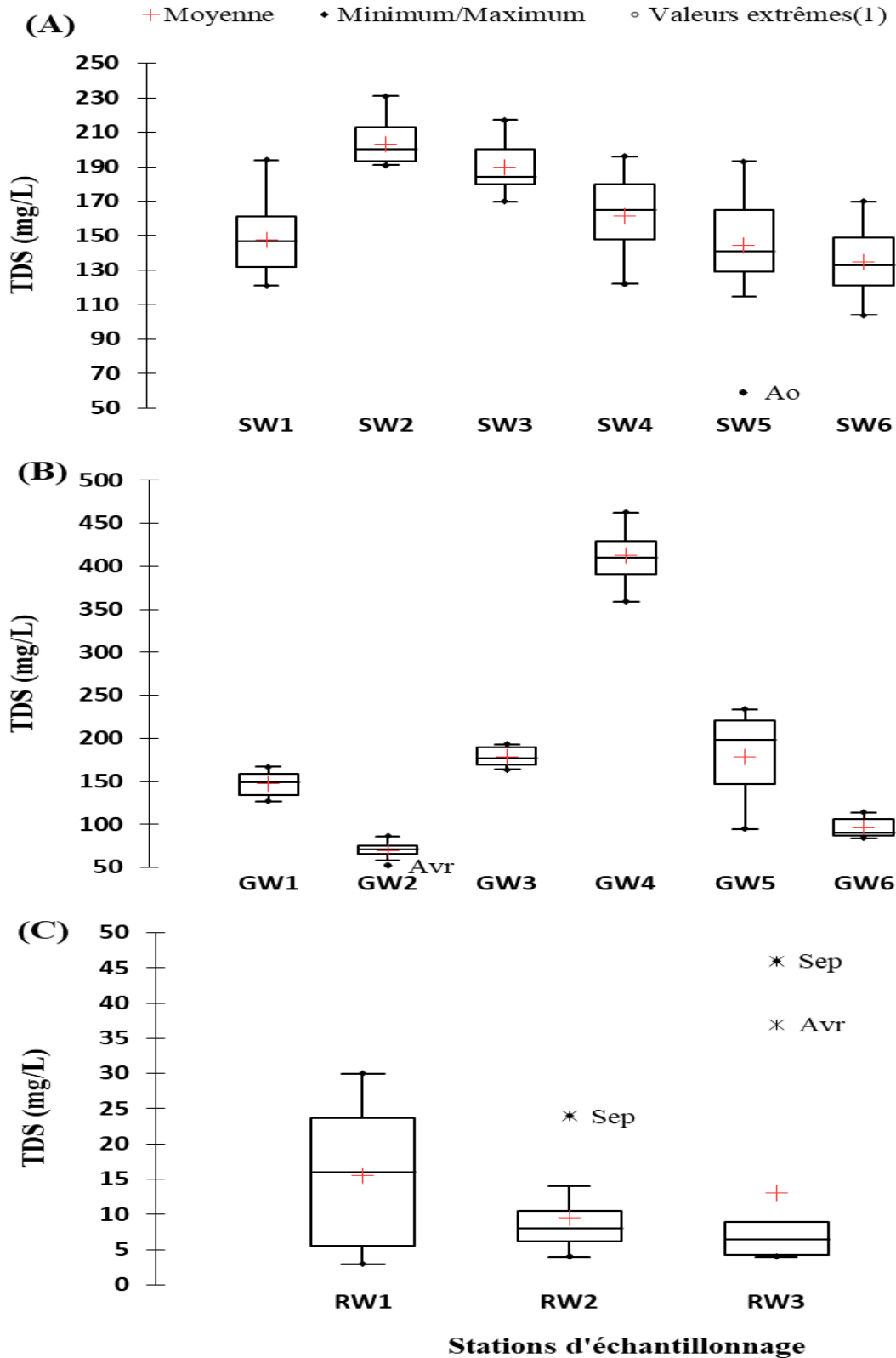


Figure 29 : Variation des valeurs moyennes des TDS dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

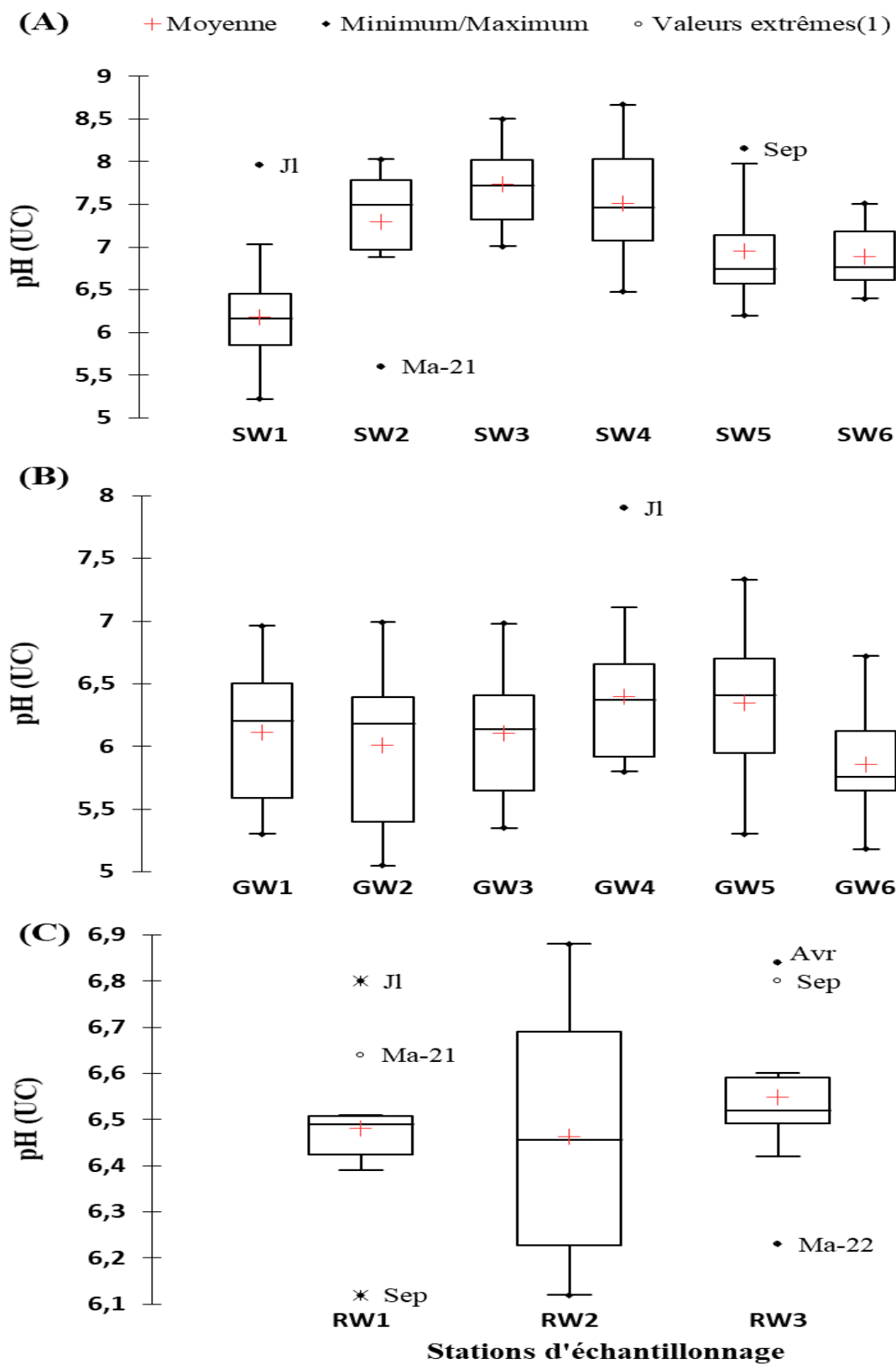


Figure 30 : Variation des valeurs moyennes du pH dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.3.2.5. Variation spatio-temporelle des nitrates

Les concentrations des nitrates ont fluctué entre 0 et 45,3 mg/L de NO_3^- ; entre 0,08 et 43,3 mg/L de NO_3^- ; et entre 0,1 et 15,6 mg/L de NO_3^- respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. La plus faible valeur moyenne soit 3,59 mg/L de NO_3^- a été enregistré dans les eaux de pluies à la station RW1 au mois d'Avril. S'agissant des valeurs ponctuelles, elles ont atteint 45,3 et 43,1 mg/L de NO_3^- aux stations SW4 et GW6 respectivement en Avril. La teneur moyenne dans les eaux de surface a été de 7,19 mg/L inférieure à celle de la NC 207 qui est de 30 mg/L de NO_3^- celle des eaux souterraines a été de 11,19 mg/L de NO_3^- et était très faible par rapport à la NC 207, qui est de 50 mg/L, tandis que celle des eaux de pluie a été de 6,24 mg/L de NO_3^- (Figure 31). Les différentes valeurs moyennes obtenues ont montré que les eaux souterraines ont eu une forte teneur en nitrates.

III.1.3.2.6. Variation spatio-temporelle des MES

Les concentrations des MES ont fluctué entre 0 et 56 mg/L ; entre 0 et 119 mg/L ; et entre 0 et 30 mg/L respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs ponctuelles ont atteint 56 mg/L à la station SW4 ; 119 mg/L à la station GW2 et 27 mg/L à la station RW1 en juin, mars 2021 et septembre respectivement La valeur moyenne des MES des eaux de surface a été de 17,66 mg/L et était inférieure à la Norme Camerounaise (NC 207) qui est de 75 mg/L, celle des eaux souterraines a été de 15,17 mg/L se trouvant légèrement supérieure à celle de la NC 207 qui est de 15 mg/L, tandis que celle des eaux de pluie a été de 14,56 mg/L (Figure 32). Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux de surface ont eu une valeur des matières en suspension plus élevée parmi les 3 biotopes aquatique.

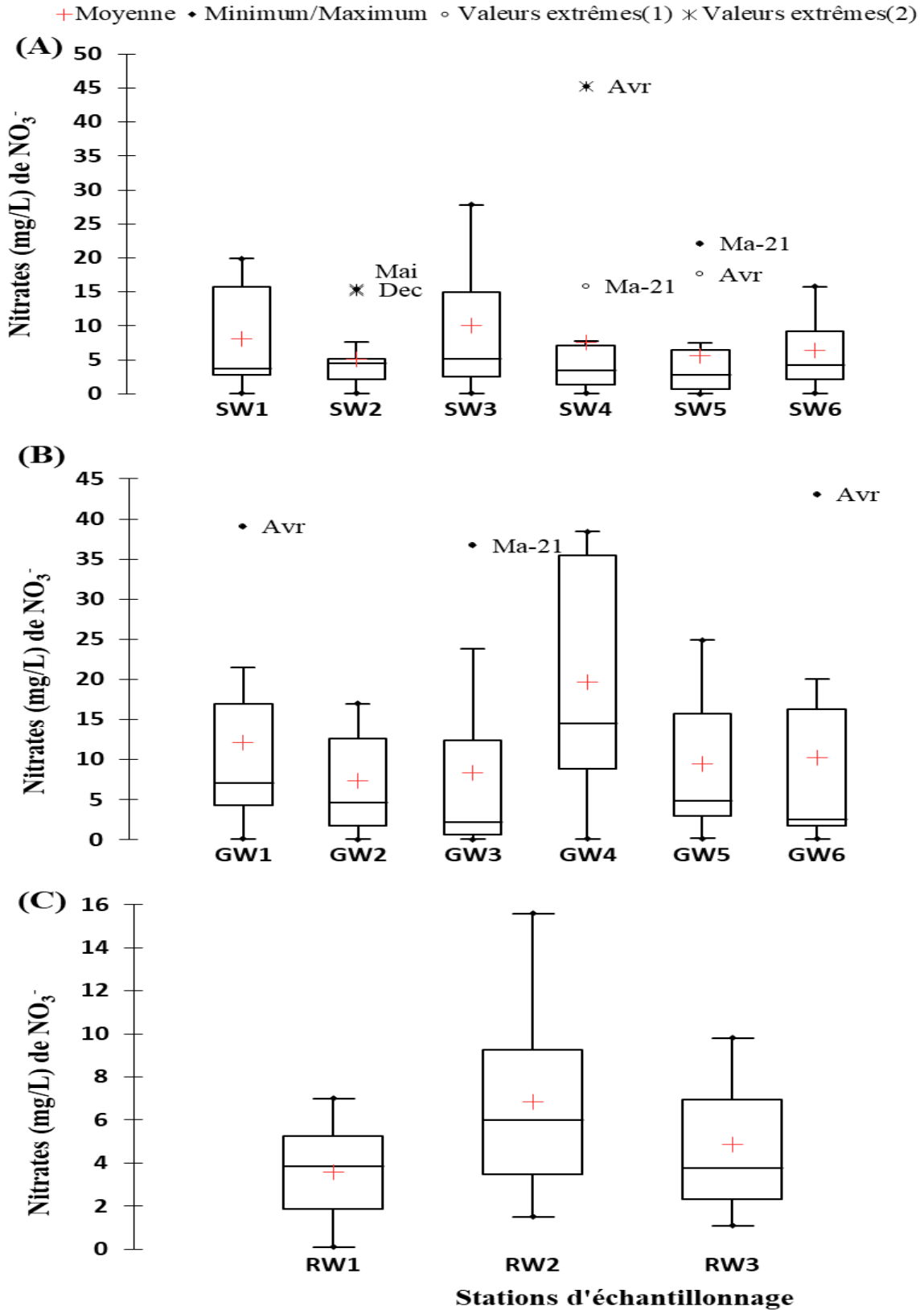


Figure 31 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en nitrates dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

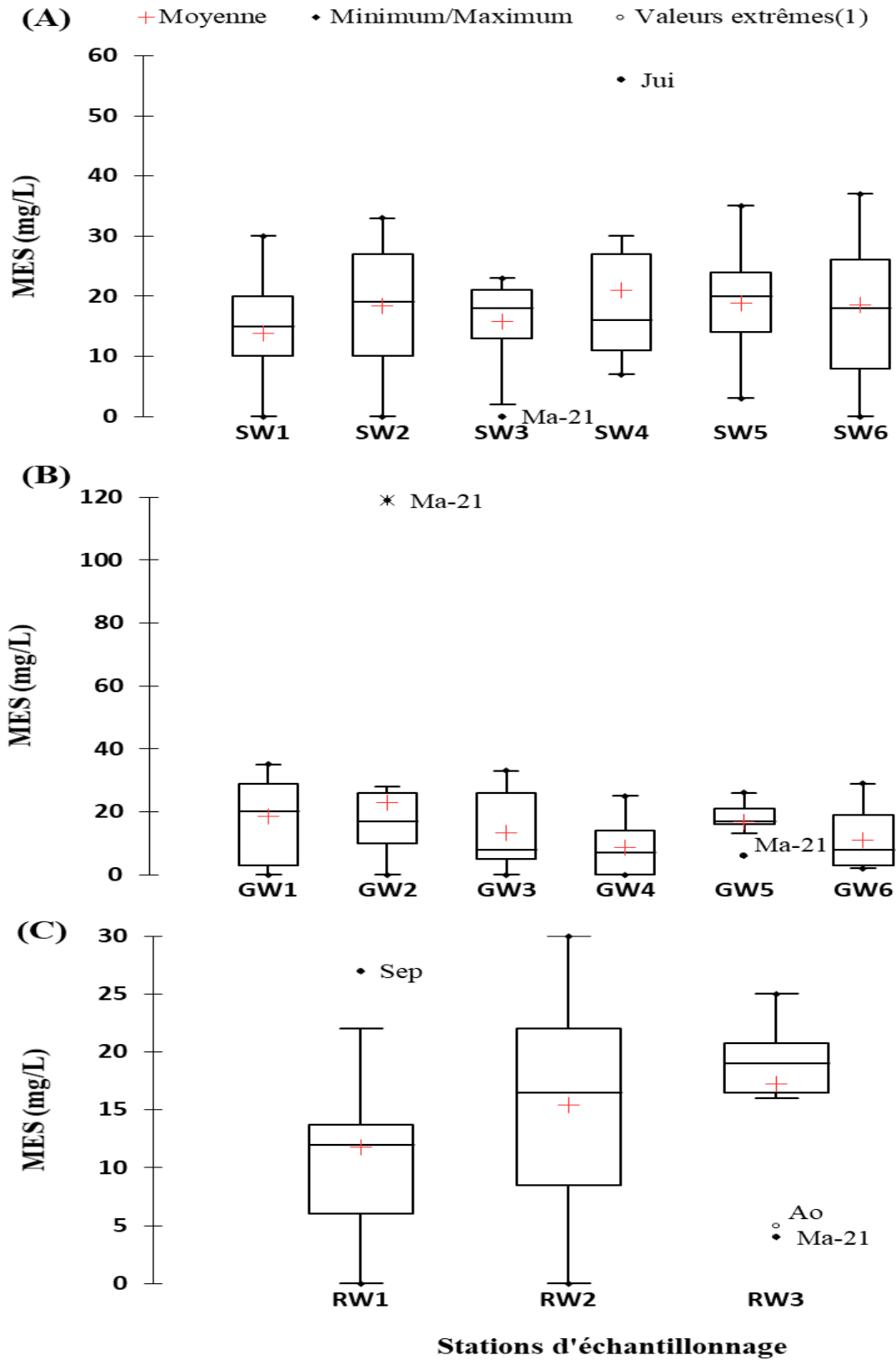


Figure 32 : Variation des valeurs moyennes des MES dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.3.2.7. Variation spatio-temporelle de la conductivité électrique

Les valeurs de la conductivité électrique ont fluctué entre 5 et 461 $\mu\text{S}/\text{cm}$; entre 33 et 920 $\mu\text{S}/\text{cm}$; et entre 3 et 92 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. La station GW4 a présenté la valeur moyenne la plus élevée soit 821,85 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La valeur moyenne a été de 326 $\mu\text{S}/\text{cm}$ dans les eaux de surface se trouvant en-dessous de la NC 207 comprise entre 500 et 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$; celle des eaux souterraines a été de 357 $\mu\text{S}/\text{cm}$ se situant en dessous de la NC 207 qui est de 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$ tandis que celle des eaux de pluies a été de 21 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Figure 33). Les différentes valeurs moyennes obtenues ont montré que la conductivité électrique a été très élevée dans les eaux souterraines.

III.1.3.2.8. Variation spatio-temporelle du CO_2 dissous

Les concentrations du CO_2 Dissous ont fluctué entre 3,52 et 24,64 mg/L ; entre 3,52 et 31,68 mg/L ; et entre 0 et 15,84 mg/L respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs moyennes du CO_2 (11,41 mg/L, 13,80 mg/L et 9,28 mg/L) respectivement des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluie sont supérieures à celle de la norme camerounaise (NC 207 comprise entre 5 et 8 mg/L) (Figure 34). Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux souterraines ont eu une valeur plus élevée parmi les 3 biotopes aquatiques.

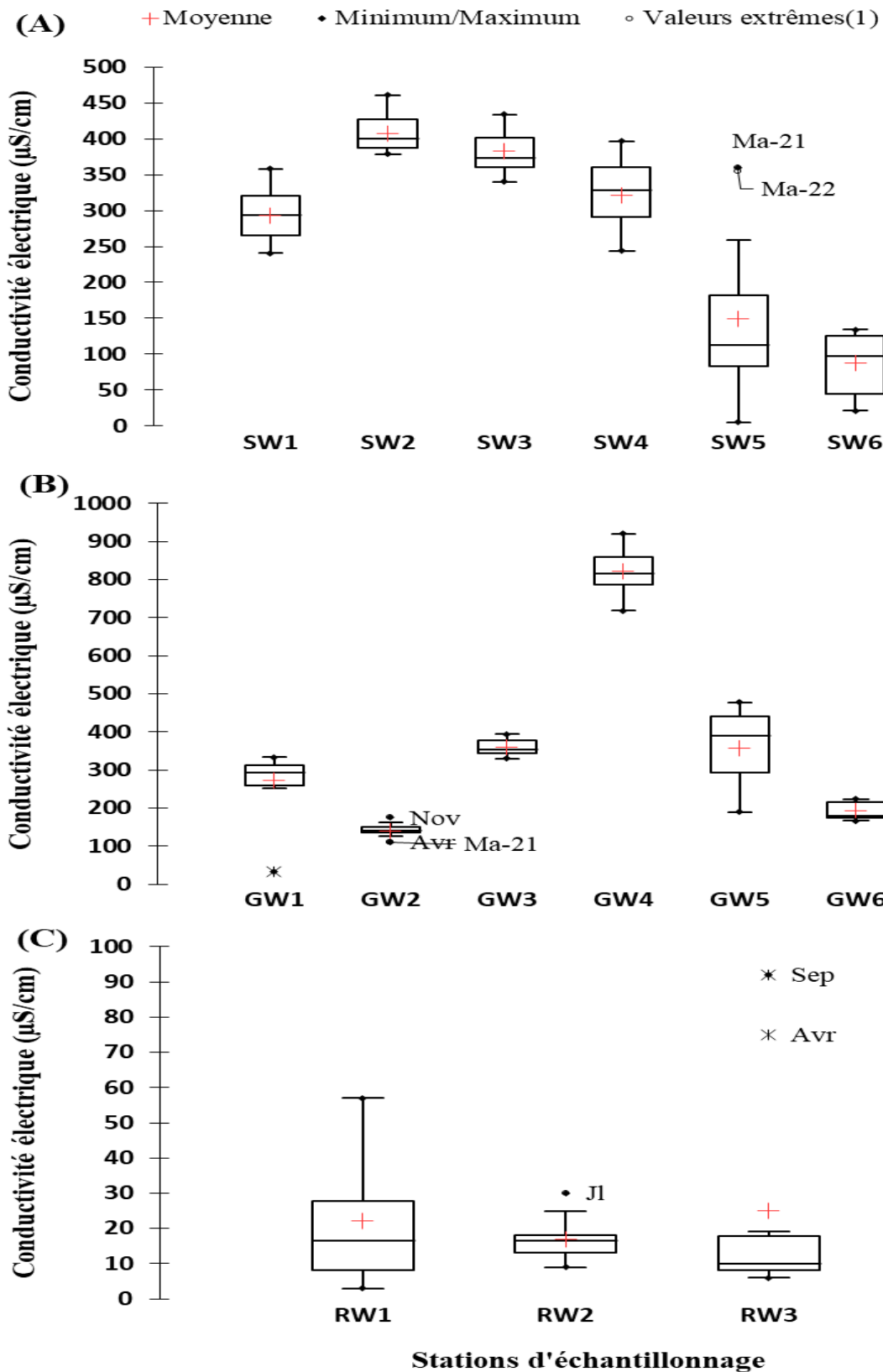


Figure 33 : Variation des valeurs moyennes de la conductivité électrique dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

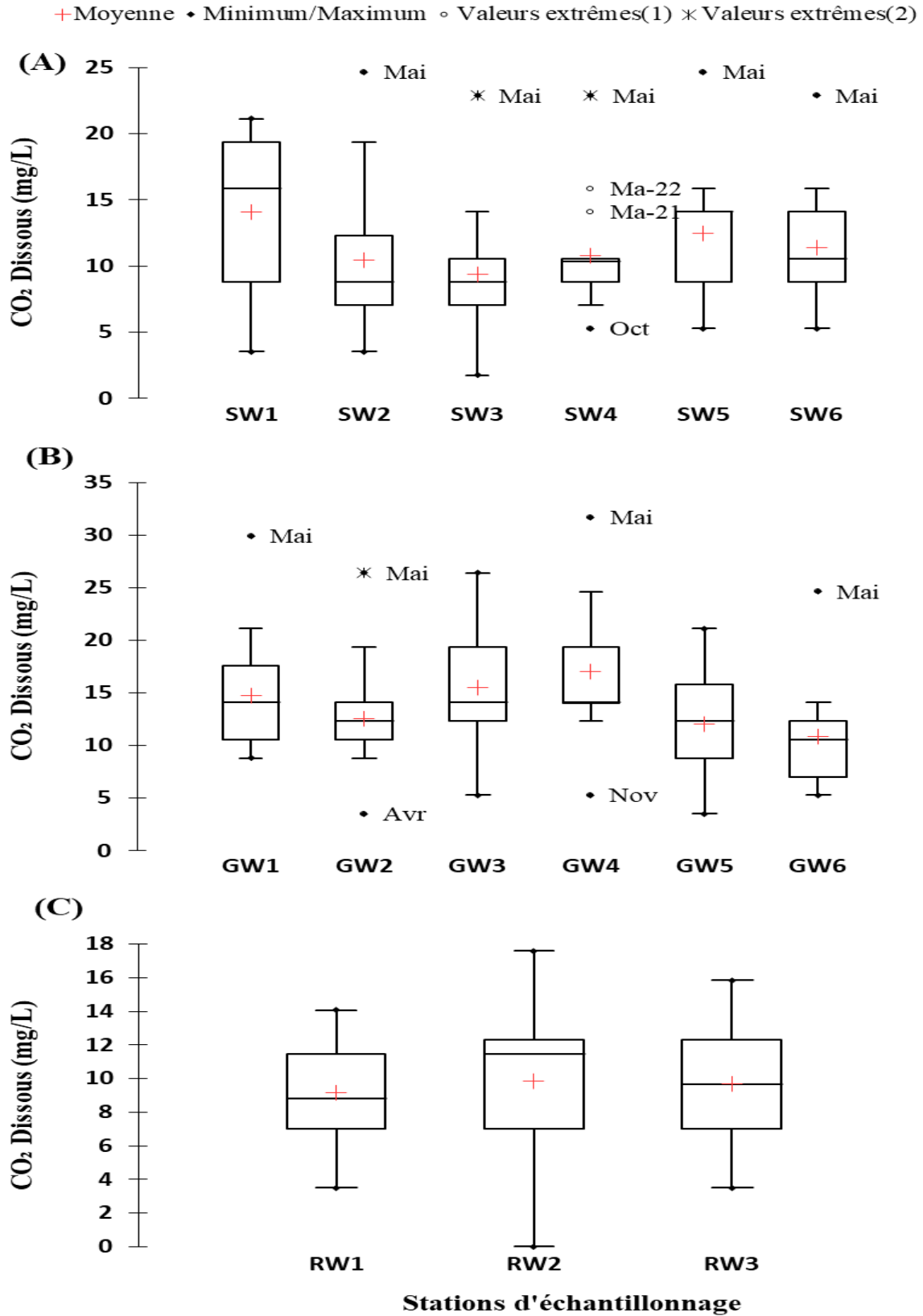


Figure 34 : Variation des valeurs moyennes des teneurs du CO₂ dissous dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.3.2.9. Variation spatio-temporelle des teneurs en azote ammoniacal

Les valeurs de l'azote ammoniacal ont fluctué entre 0 et 3,75 mg/L de NH_4^+ ; entre 0 et 6,04 mg/L de NH_4^+ ; et entre 0 et 2,01 mg/L de NH_4^+ respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs moyennes de l'azote ammoniacal dans les différents types de biotopes ont été de 1,52 mg/L de NH_4^+ , 1,97 mg/L de NH_4^+ et 0,42 mg/L de NH_4^+ respectivement dans les eaux de surfaces, les eaux souterraines et les eaux de pluie (Figure 35). Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux souterraines ont eu la valeur la plus élevée.

III.1.3.2.10. Variation spatio-temporelle des orthophosphates

Les concentrations des orthophosphates ont fluctué entre 0 et 4,91 mg/L de PO_4^{3-} ; entre 0 et 7,32 mg/L de PO_4^{3-} ; et entre 0,05 et 4,66 mg/L de PO_4^{3-} respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs ponctuelles ont atteint 4,91 mg/L de PO_4^{3-} en Mars 2021 ; 7,32 mg/L de PO_4^{3-} en Mars 2021 et 4,66 mg/L de PO_4^{3-} en Avril respectivement aux stations SW6, GW2 et RW3. La teneur moyenne a été de 1,16 mg/L de PO_4^{3-} et se situait largement au-dessus de la NC 207 qui est de 0,5 mg/L de PO_4^{3-} , celle des eaux souterraines a été de 1 mg/L de PO_4^{3-} se trouvant au-dessus de la NC 207 qui doit être $\leq 0,5$ mg/L de PO_4^{3-} tandis que celle des eaux de pluie a été de 1,19 mg/L de PO_4^{3-} (Figure 36). Au vu des teneurs moyennes obtenues, il ressort que les eaux de pluie ont eu une forte teneur en phosphates.

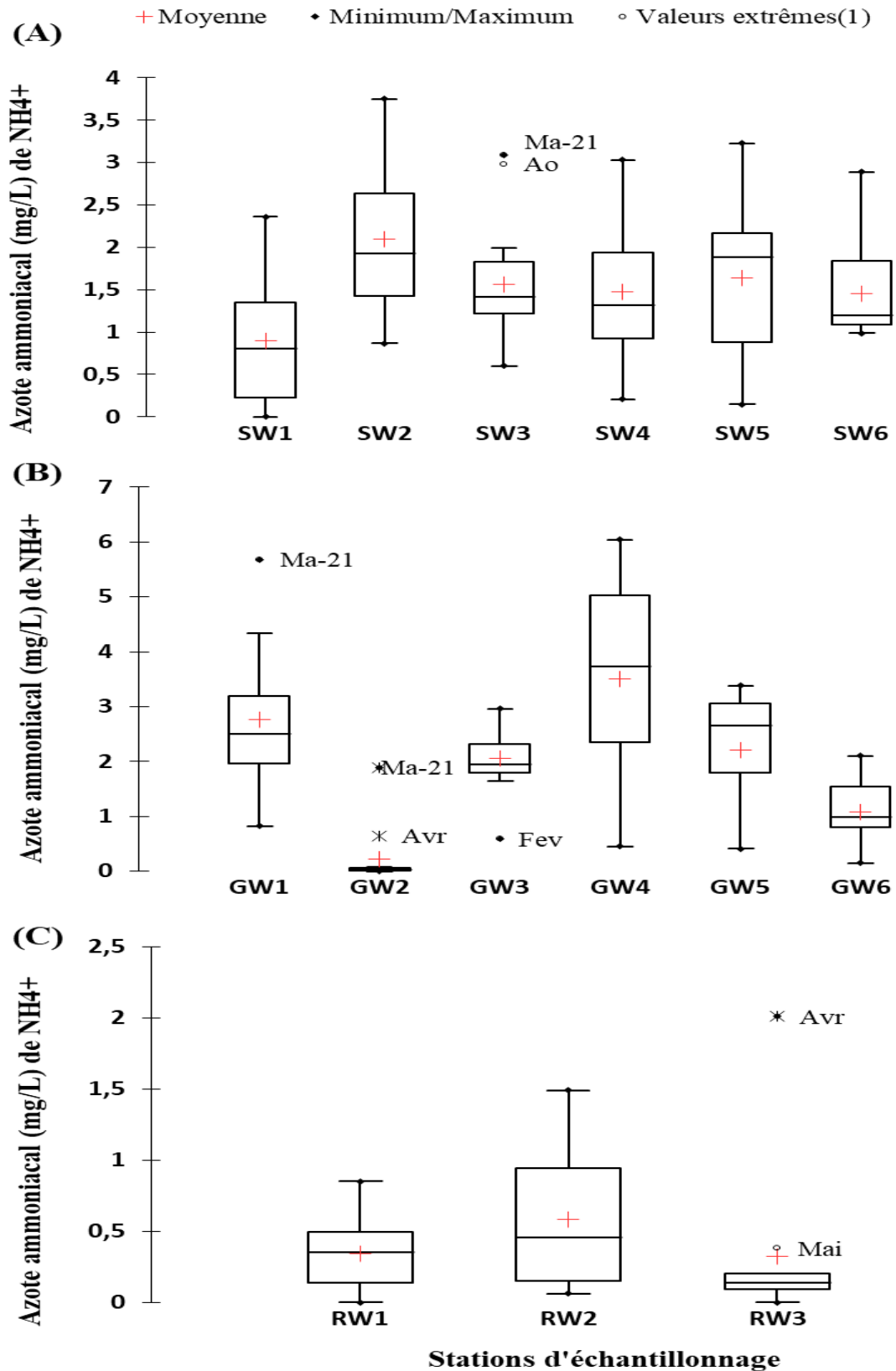


Figure 35 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en azote ammoniacal dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

+ Moyenne • Minimum/Maximum ◦ Valeurs extrêmes(1) ✱ Valeurs extrêmes(2)

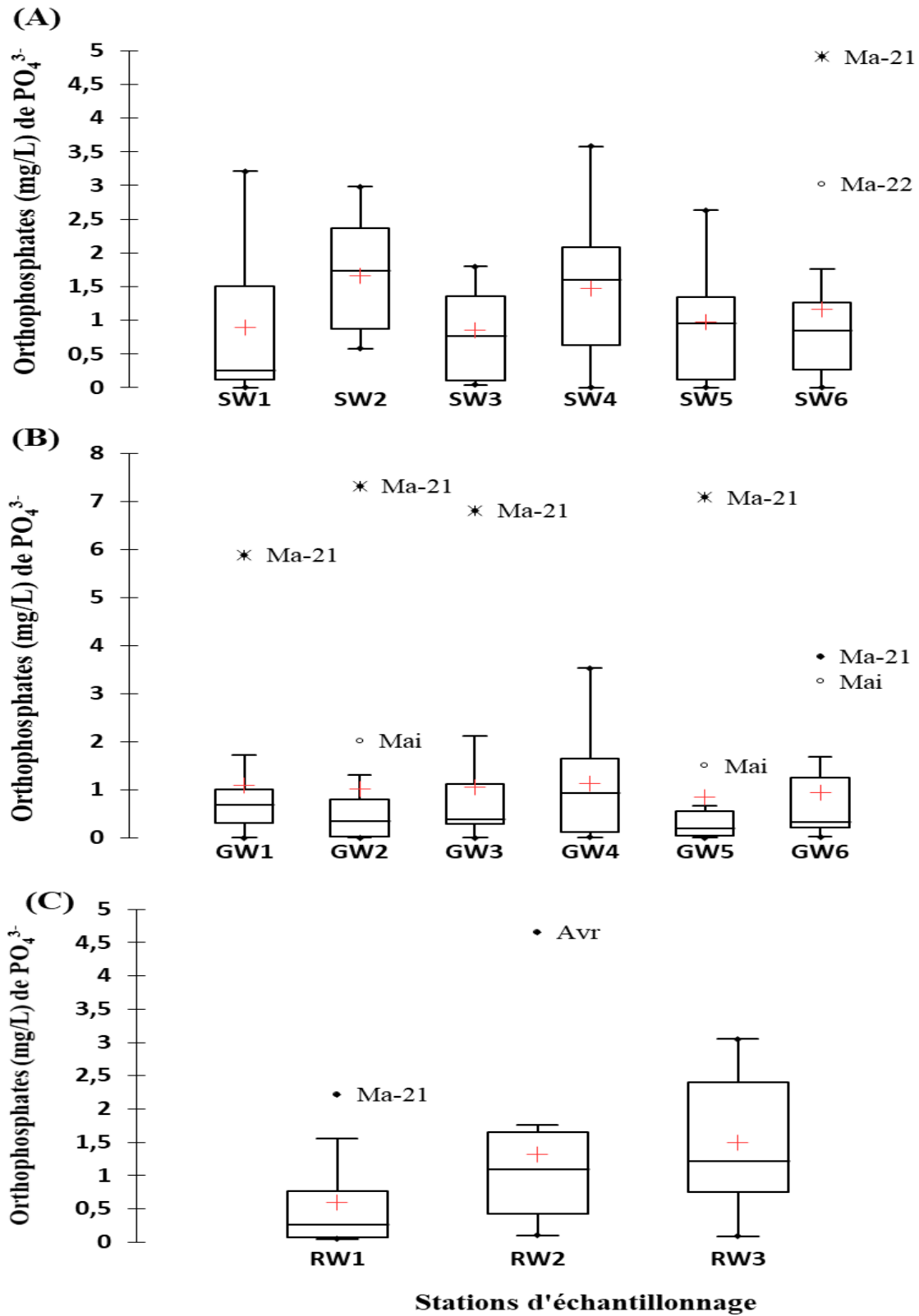


Figure 36 : Variation des valeurs moyennes des teneurs en orthophosphates dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)

III.1.3.2.11. Variation spatio-temporelle de la couleur

Les valeurs de la couleur ont fluctué entre 0 et 360 Pt.Co ; entre 0 et 768 Pt.Co ; et entre 0 et 83 Pt.Co respectivement dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Les valeurs ponctuelles ont atteint 360 Pt.Co et 768 Pt.Co en Mars respectivement aux stations SW5 et GW2. Les plus faibles valeurs moyennes ont été enregistrées aux stations SW1 (16,76 PtCo) et GW4 (16,61 Pt.Co). La valeur moyenne de la couleur des eaux de surface a été de 86,52 Pt.Co, celle des eaux souterraines a été de 44,32 Pt.Co tandis que celle des eaux de pluie a été de 30,53 Pt.Co (Figure 37). Les différentes valeurs moyennes ont montré que les eaux de surface ont eu une couleur plus élevée parmi les 3 biotopes aquatiques.

III.1.4. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux antibiotiques

La susceptibilité des souches bactériennes aux antibiotiques appartenant aux familles des β - lactamines, des Quinolones, des Aminoglycosides, des Sulfamides et autres a varié selon le type de biotope où les espèces ont été isolées. Les résultats y relatifs ont été notés en fonction du pourcentage de résistance (Figures 38, 39 et 40).

III.1.4.1. Susceptibilité aux antibiotiques des bactéries sporulantes isolées des eaux de surface

Les souches de *Bacillus thuringiensis* ont montré une forte résistance à la famille des β - lactamines (ampicilline et amoxicilline 100%), à la famille des aminosides (gentamycine 87,5%), à la famille des sulfamides (sulfaméthoxazole 87,5%) (Figure 38A). Les souches de *Bacillus cereus* ont montré une forte résistance ($\geq 85\%$) à toutes les familles d'antibiotiques testés à l'exception de la tétracycline avec une résistance de 6,25% (figure 38B). Les souches de *Bacillus subtilis* quant à elles ont montré une forte résistance ($\geq 90\%$) avec la famille des β - lactamines et des sulfamides (Figure 38C). Enfin les souches de *Clostridium perfringens* ont montré une très forte résistance 100% avec toutes les familles d'antibiotiques (figure 38D).

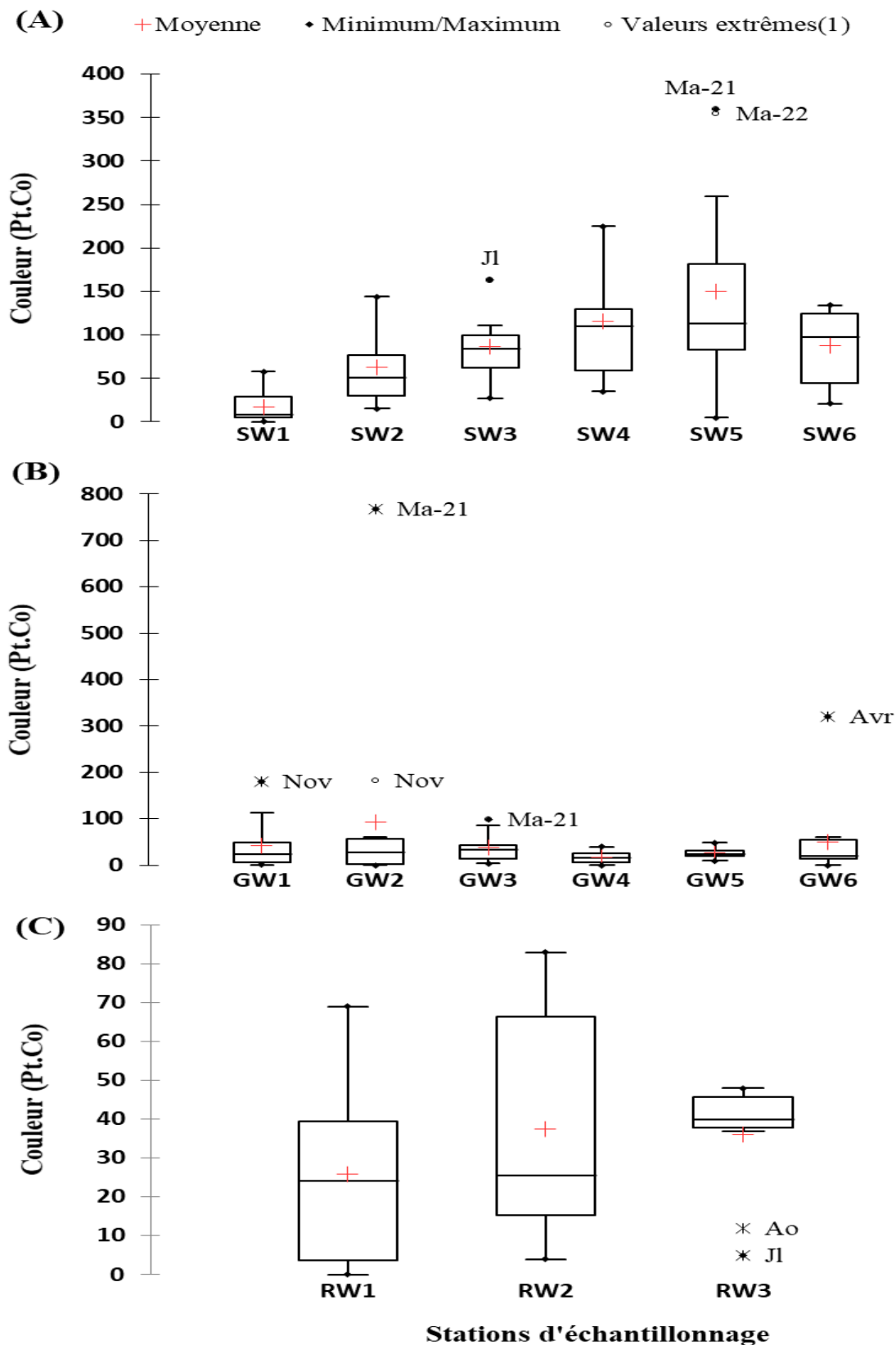
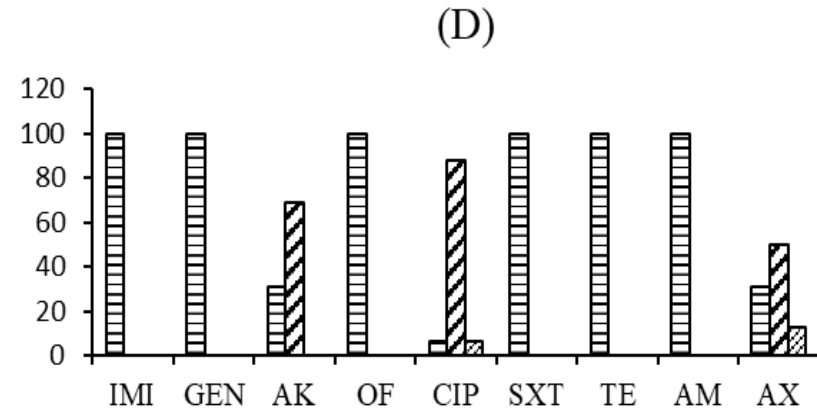
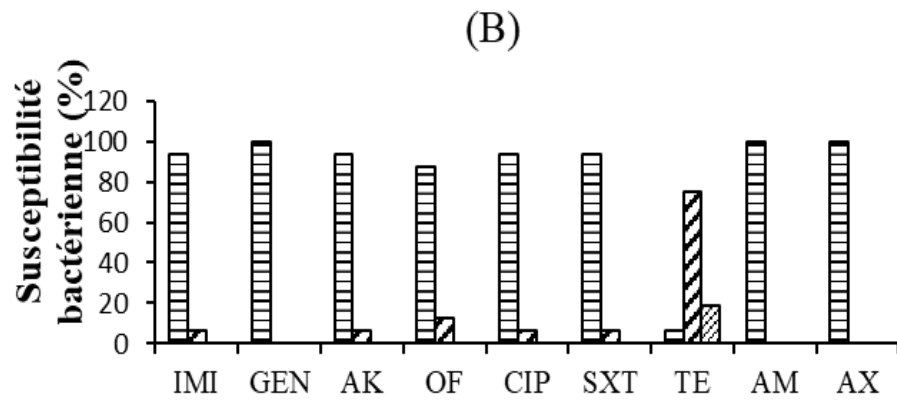
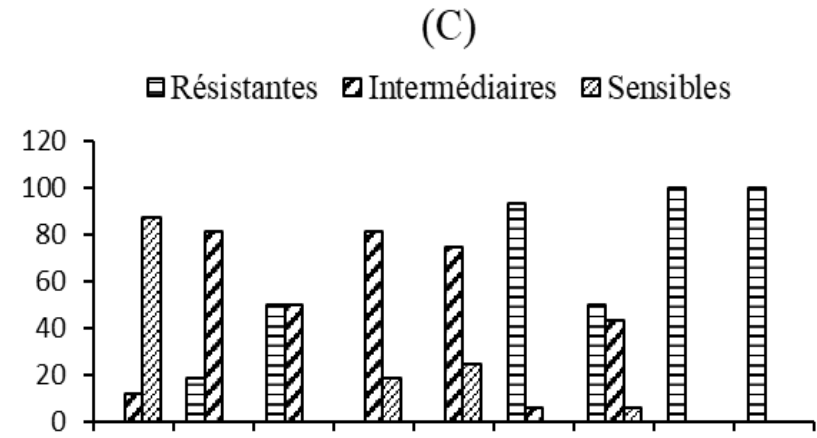
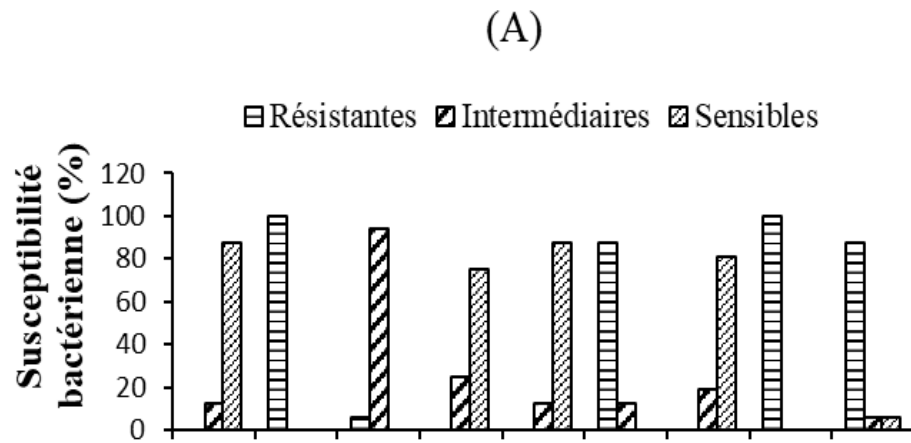


Figure 37 : Variation des valeurs moyennes de la couleur dans les eaux de surface (A), les eaux souterraines (B) et les eaux de pluie (C)



Antibiotiques testés

Antibiotiques testés

Figure 38 : Susceptibilité aux antibiotiques de *Bacillus thuringiensis* (A), *Bacillus cereus* (B), *Bacillus subtilis* (C) et *Clostridium perfringens* (C) isolés des eaux de surface

III.1.4.2. Susceptibilité aux antibiotiques des bactéries sporulantes isolées des eaux souterraines

Les souches de *Bacillus thuringiensis* ont montré une forte résistance à la famille des β -lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %), des aminosides (gentamycine 81,25 %) et à la famille des sulfamides (sulfaméthoxazole 81,25 %) (Figure 39A). Les souches de *Bacillus cereus* ont montré une forte résistance à la famille des β -lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %) et des sulfamides (sulfaméthoxazole 93,75 %). Cependant ces souches sont sensibles à l'imipénème antibiotique de la famille des β -lactamines (Figure 39B). Les souches de *Bacillus subtilis* ont montré une forte résistance à la famille des β -lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %), des sulfamides (sulfaméthoxazole 100 %) et des aminosides (gentamycine 87,5 %) (Figure 39C). Les souches de *Bacillus lentus* ont montré une très forte résistance (100 %) à toutes les familles des antibiotiques testés à l'exception de la famille des cyclines (tétracycline) (figure 39D) tandis que les souches de *Bacillus licheniformis* quant à ont montré une forte résistance aux antibiotiques de la famille des aminosides (gentamycine 100 %), des quinolones (Ofloxacin 100 %) et des sulfamides (sulfaméthoxazole 100 %). Cependant, elles ont présenté une forte sensibilité 100 % avec l'imipénème (figure 39E). Les souches de *Clostridium perfringens* ont montré une très forte résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %), des quinolones (ofloxacin 100 %), des sulfamides (sulfaméthoxazole 100%) et des cyclines (tétracycline 100%). Cependant, elles ont montré une forte sensibilité à la gentamycine 100% (figure 39F).

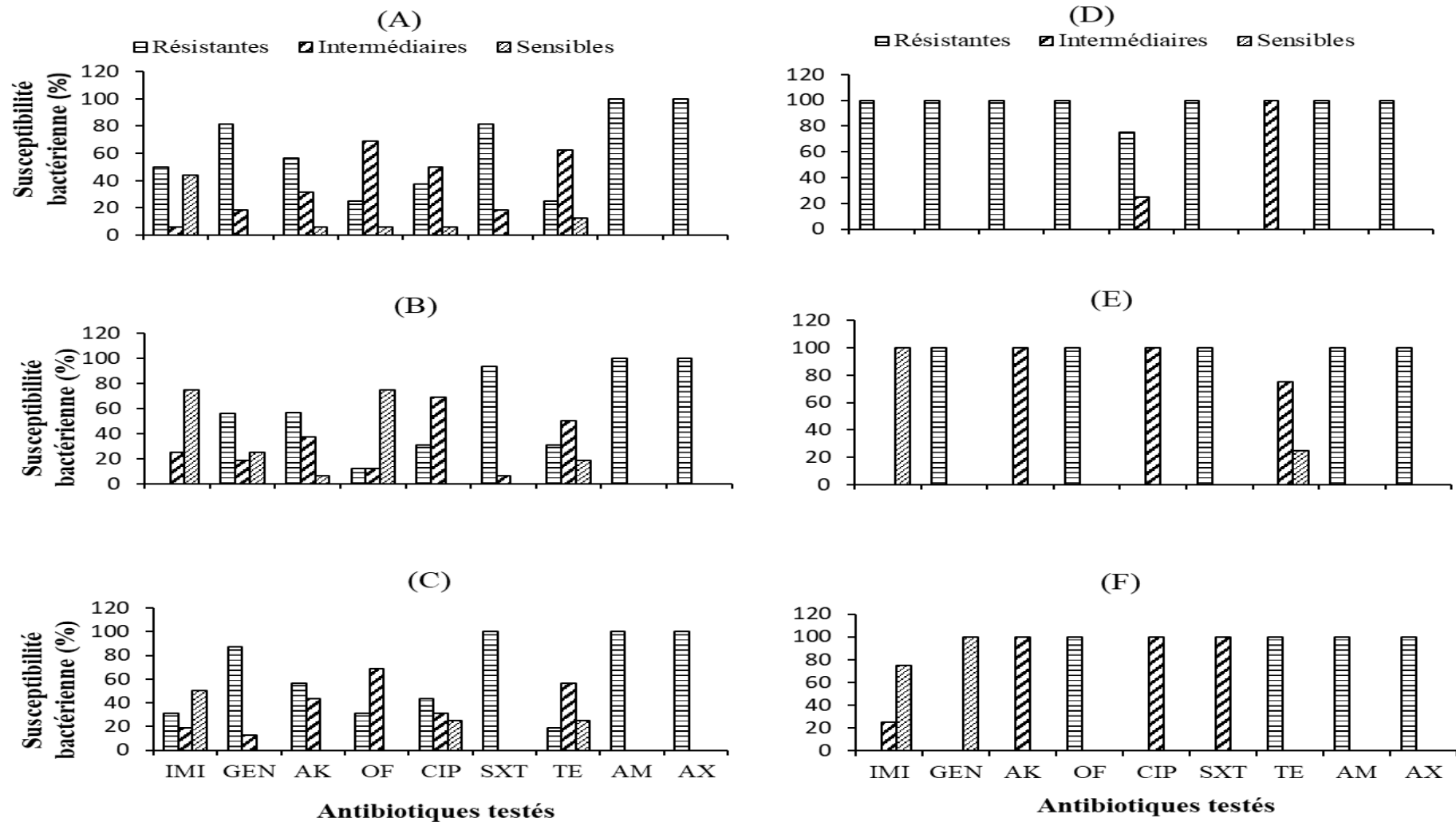


Figure 39 : Susceptibilité aux antibiotiques de *Bacillus thuringiensis* (A), *Bacillus cereus* (B), *Bacillus subtilis* (C), *Bacillus lentus* (D), *Bacillus licheniformis* (E) et *Clostridium perfringens* (F) isolés des eaux souterraines

III.1.4.3. Susceptibilité aux antibiotiques des bactéries sporulantes isolées des eaux de pluies

Les souches de *Bacillus thuringiensis* ont montré une très forte résistance 100% à toutes les familles d'antibiotiques testés β - lactamines (imipenème 100 %, ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %) ; des aminosides (amikacine 100 %), des quinolones (ciprofloxacine 100 %) et des sulfamides (sulfaméthoxazole 100 %) à l'exception de la famille des cyclines (Figure 40A). Les souches de *Bacillus cereus* et de *Bacillus subtilis* quant à elles ont montré une très forte résistance aux les antibiotiques de la famille des β - lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %), des quinolones (Ofloxacin 100 %) et à la famille des cyclines (tétracycline 100 %) (Figure 40B et 40C). Les souches de *Clostridium perfringens* quant à elles ont montré une très forte résistance aux les antibiotiques de la famille des β - lactamines (ampicilline 100 % et amoxicilline 100 %) et des quinolones (Ofloxacin 100 %), (Figure 40E).

Dans l'ensemble toutes les souches sont très résistantes aux antibiotiques de la famille des β - lactamines (ampicilline et amoxicilline) et des sulfamides (sulfaméthoxazole).

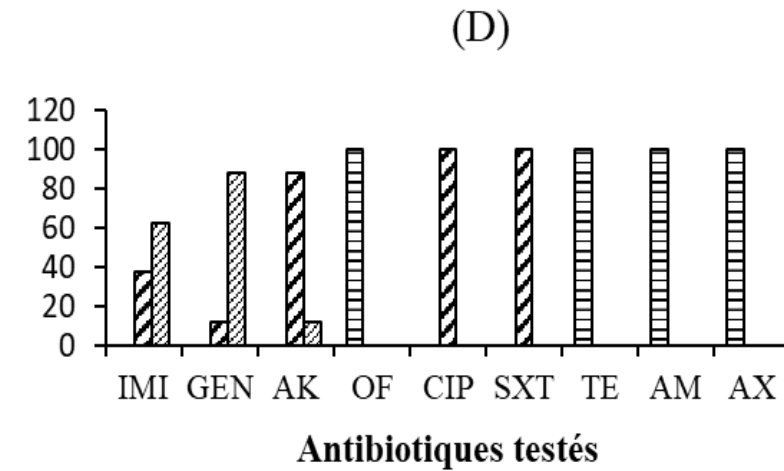
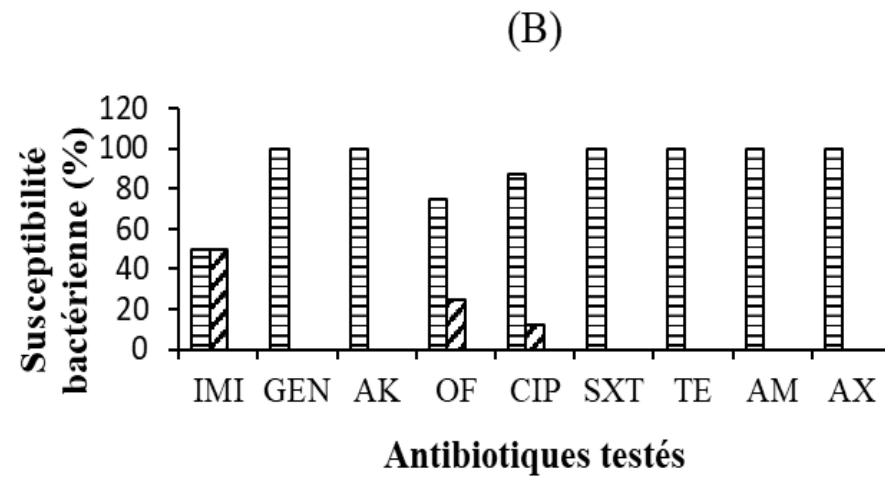
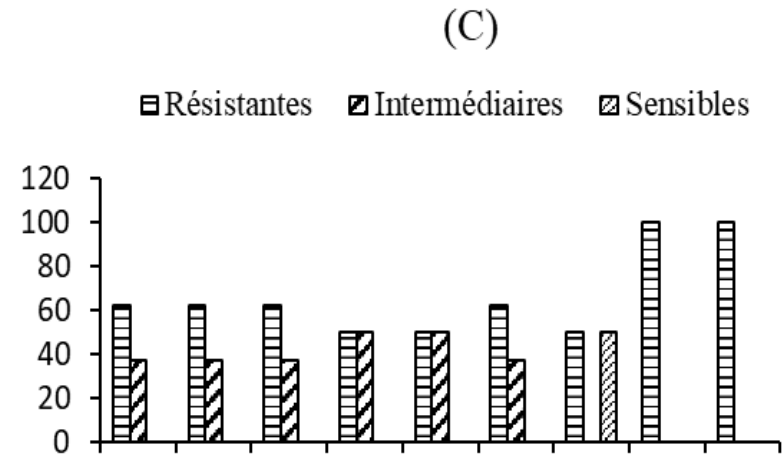
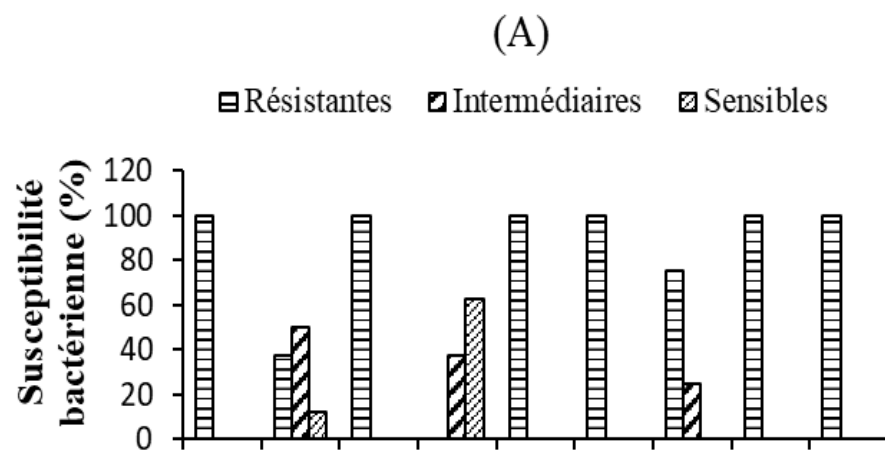


Figure 40 : Susceptibilité aux antibiotiques de *Bacillus thuringiensis* (A), *Bacillus cereus* (B), *Bacillus subtilis* (C) et *Clostridium perfringens* (D) isolés des eaux de pluies

III.1.5. Susceptibilité des bactéries sporulantes aux extraits de *M. oleifera*

III.1.5.1. Susceptibilité des bactéries isolées des eaux de surface

a) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. thuringiensis*

À 23 °C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* dans l'extrait aqueux aux concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L étaient respectivement de $30,4 \times 10^3$; $10,9 \times 10^3$; $21,1 \times 10^3$ et $2,34 \times 10^3$ UFC/100mL. Toutes ces abondances les plus faibles ont été enregistrées après 24 heures d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L ; et 3h dans les solutions de concentration 1,5g/L (Figure 40A). Les abondances les plus élevées étaient respectivement de 80×10^3 ; 60×10^3 ; 40×10^3 et 50×10^3 UFC /100mL respectivement. Tous ont été enregistrés après 6 heures d'incubation (Figure 41A).

Dans les extraits hydro-éthanoliques à une température de 23°C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* étaient respectivement de 1×10^3 ; $2,22 \times 10^3$; $1,8 \times 10^3$ et 20×10^3 UFC/100mL. Toutes ont été enregistrés après 24 h d'incubation pour les concentrations 0,5 et 1g et 3 heures d'incubation pour les concentrations 1,5 et 2g/L (Figure 41A). Les abondances les plus élevées étaient respectivement de $30,04 \times 10^3$; $10,01 \times 10^3$; 10×10^3 et $60,3 \times 10^3$ UFC/100mL. Elles ont été enregistrées après 6 heures d'incubation dans des extraits aux concentrations de 0,5 et 1,5 g/L, et après 9 heures d'incubation dans des extraits aux concentrations de 1 et 2 g/L (Figure 41A).

À 37°C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* dans les extraits aqueux ont été enregistrées après 24, 9, 3 et 6 heures d'incubation respectivement. Elles étaient de 43×10^3 ; $22,2 \times 10^3$; $10,05 \times 10^3$ et $0,34 \times 10^3$ UFC/100mL respectivement dans les extraits 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L (Figure 41B). Les plus élevées étaient respectivement de 80×10^3 , 39×10^3 , 40×10^3 et $20,5 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits à 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L. Elles ont été enregistrées après 6h d'incubation avec une concentration d'extrait de 0,5 et 1g/L, après 24h d'incubation avec 1,5g/L et après 9h d'incubation pour la concentration 2g/L (Figure 41B).

Avec les extraits hydro-éthanoliques à une température de 37°C, une variation temporelle de l'abondance des cellules cultivables a également été observée. Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 24h pour la concentration 0,5g/L et 3 heures d'incubation avec des concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2g/L. Les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 3 heures d'incubation avec une concentration d'extrait de 0,5g/L, après 6 heures avec une concentration d'extrait de 1g/L, après 9h avec une

concentration de 2g/L et après 24 heures d'incubation avec la concentration d'extrait de 1,5g/L (Figure 41B).

b) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. cereus*

Avec la bactérie *Bacillus cereus* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $8,3 \times 10^3$; 1×10^3 ; $2,58 \times 10^3$ et $2,78 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 9h d'incubation avec les extraits 0,5 à 2g/L, après 6h d'incubation avec la concentration 1,5g/L et après 24h d'incubation avec l'extrait 1g/L. Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation pour la concentration 1g/L et après 24h pour les concentrations 0,5 ; 1,5 et 2g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de $30,2 \times 10^3$; 41×10^3 ; $28,5 \times 10^3$ et 47×10^3 UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 41C).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de 10×10^3 et $1,32 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $7,2 \times 10^3$ et $0,95 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $3,3 \times 10^3$ et $0,41 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de $12,2 \times 10^3$ et $2,16 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement. Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 3h pour la concentration 1,5g/L ; après 6h pour les concentrations 0,5 et 2g/L et après 24 h d'incubation pour la concentration 1g/L. Les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 9 h d'incubation pour les concentrations 1 et 1,5g/L et 24h pour les concentrations 0,5 et 2g/L (Figure 41C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. cereus* dans les extraits aqueux étaient de 30×10^3 et $1,3 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $20,1 \times 10^3$ et $2,62 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 10×10^3 et $1,99 \times 10^3$ UFC/100mL avec celui de 1,5g/L d'extrait et 62×10^3 et $2,41 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 41D). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation dans les extraits de 0,5 ; 1 et 2g/L, et après 24 h d'incubation avec une concentration de solution d'extrait de 1,5g/L. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après des périodes d'incubation variables en fonction de la concentration de l'extrait (Figure 41D).

En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 24h pour les concentrations 0,5 et 1,5g/L, après 3h

d'incubation dans la concentration d'extrait de 2g/L et après 9h pour la concentration 1g/L. les plus faibles valeurs ont été enregistrées après 9h pour les concentrations 0,5 et 1,5g/L et après 24h d'incubation avec celles de 1 et 2g/L (Figure 41D).

c) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. subtilis*

Avec la bactérie *Bacillus subtilis* à 23 °C, les abondances de cellules cultivables les plus faibles étaient de $10,2 \times 10^3$; 13×10^3 ; $7,6 \times 10^3$ et $10,3 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 9h d'incubation avec les extraits 0,5 à 2g/L et après 3h d'incubation avec les concentrations 1 et 1,5g/L (Figure 42A). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 1,5 et 2g/L, après 6h pour la concentration 0,5g/L et après 9h d'incubation pour la concentration 2g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 44×10^3 ; 54×10^3 ; 32×10^3 et 72×10^3 UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 42A).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de 39×10^3 et $2,14 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; 71×10^3 et 6×10^3 UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $10,3 \times 10^3$ et $2,69 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de 7×10^3 et $1,88 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement. Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 6h pour la concentration 0,5g/L, après 9h pour les concentrations 1 et 1,5g/L et après 24 h d'incubation pour la concentration 2g/L, tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 6h d'incubation pour les concentrations 1 et 2g/L, 9h pour la concentration 0,5g/L et 3h pour la concentration 1,5 g/L (Figure 42B).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. subtilis* dans les extraits aqueux étaient de $28,8 \times 10^3$ et 10×10^3 UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $32,4 \times 10^3$ et $11,9 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 33×10^3 et $14,9 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et 38×10^3 et $15,8 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 42B). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation dans les extraits de 0,5 ; 1,5 et 2 g/L, et après 3 h d'incubation avec une concentration de solution d'extrait de 1 g/L. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après des périodes d'incubation variables en fonction de la concentration de l'extrait (Figure 42B). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, toutes les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 9h pour les concentrations 0,5 ;

1 ; 1,5 et 2g/L. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après 6h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 3h d'incubation avec celle de 0,5 g/L (Figure 42B).

d) Impact des extraits sur la cultivabilité de *C. perfringens*

Avec la bactérie *Clostridium perfringens* à 23 °C, les abondances de cellules cultivables les plus faibles étaient de $0,15 \times 10^3$; $0,32 \times 10^3$; $0,15 \times 10^3$ et $0,03 \times 10^3$ UFC/100 mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Toutes ces abondances ont été enregistrées après 24h d'incubation (Figure 42C). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de $3,6 \times 10^3$; $1,54 \times 10^3$; $0,95 \times 10^3$ et $0,58 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 42C).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $0,95 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $0,2 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $0,22 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 1,5 g/L et de $0,04 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 42C). Toutes les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 3h tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 9 et 24h d'incubation (Figure 42C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *C. perfringens* dans les extraits aqueux étaient de 6×10^3 et $1,38 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $3,24 \times 10^3$ et $1,21 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $1,7 \times 10^3$ et 0,2 UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et $0,55 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 42D). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après 3h pour la concentration 0,5/L et après 24h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L (Figure 42D).

En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 9h pour la concentration 0,5 g/L et après 3h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L. les plus faibles valeurs ont été enregistrées après 24h pour toutes les concentrations (Figure 42D).

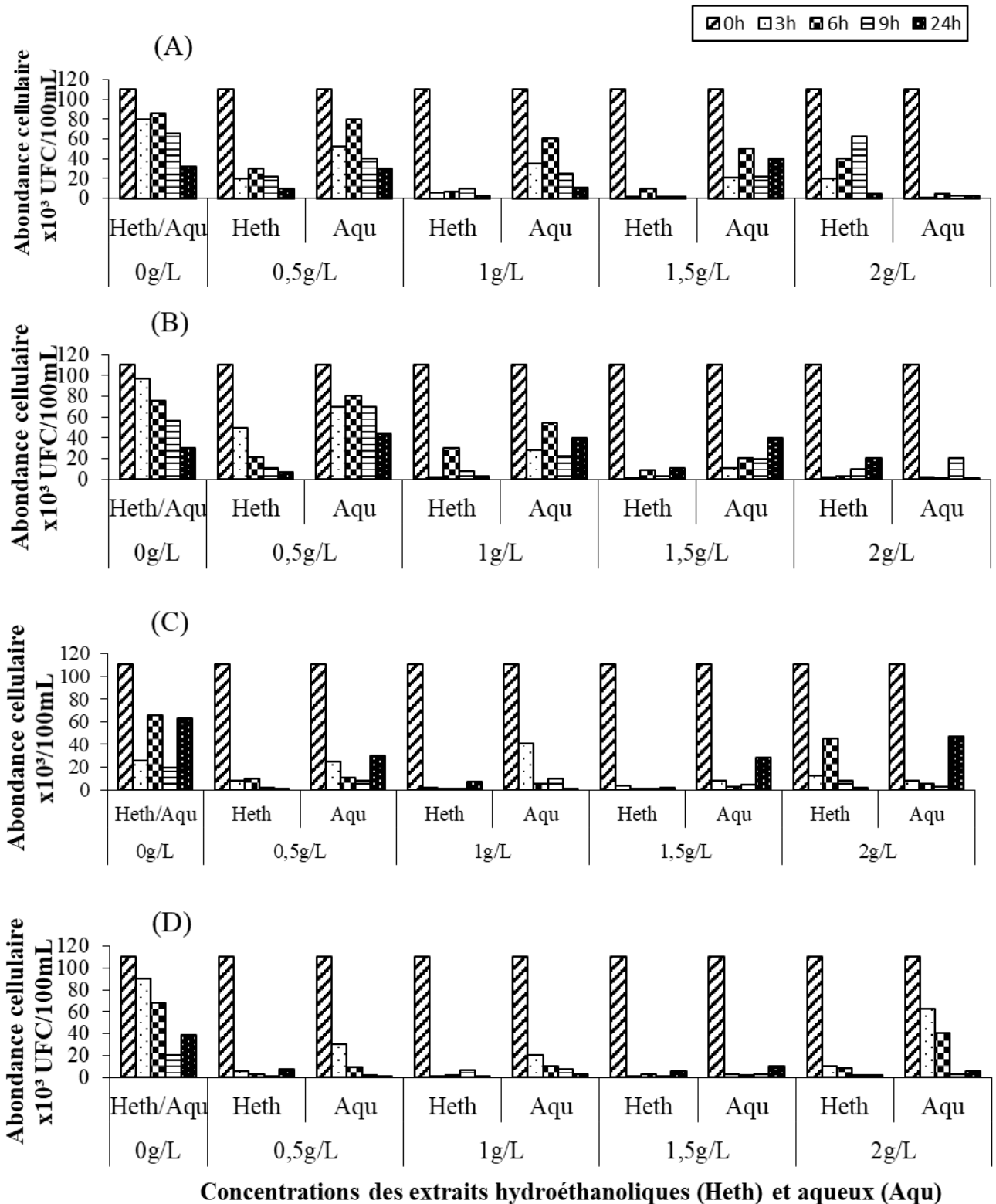


Figure 41 : Susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus thuringiensis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), et de *B. cereus* à 23 °C (C) et 37 °C (D), isolés des eaux de surface

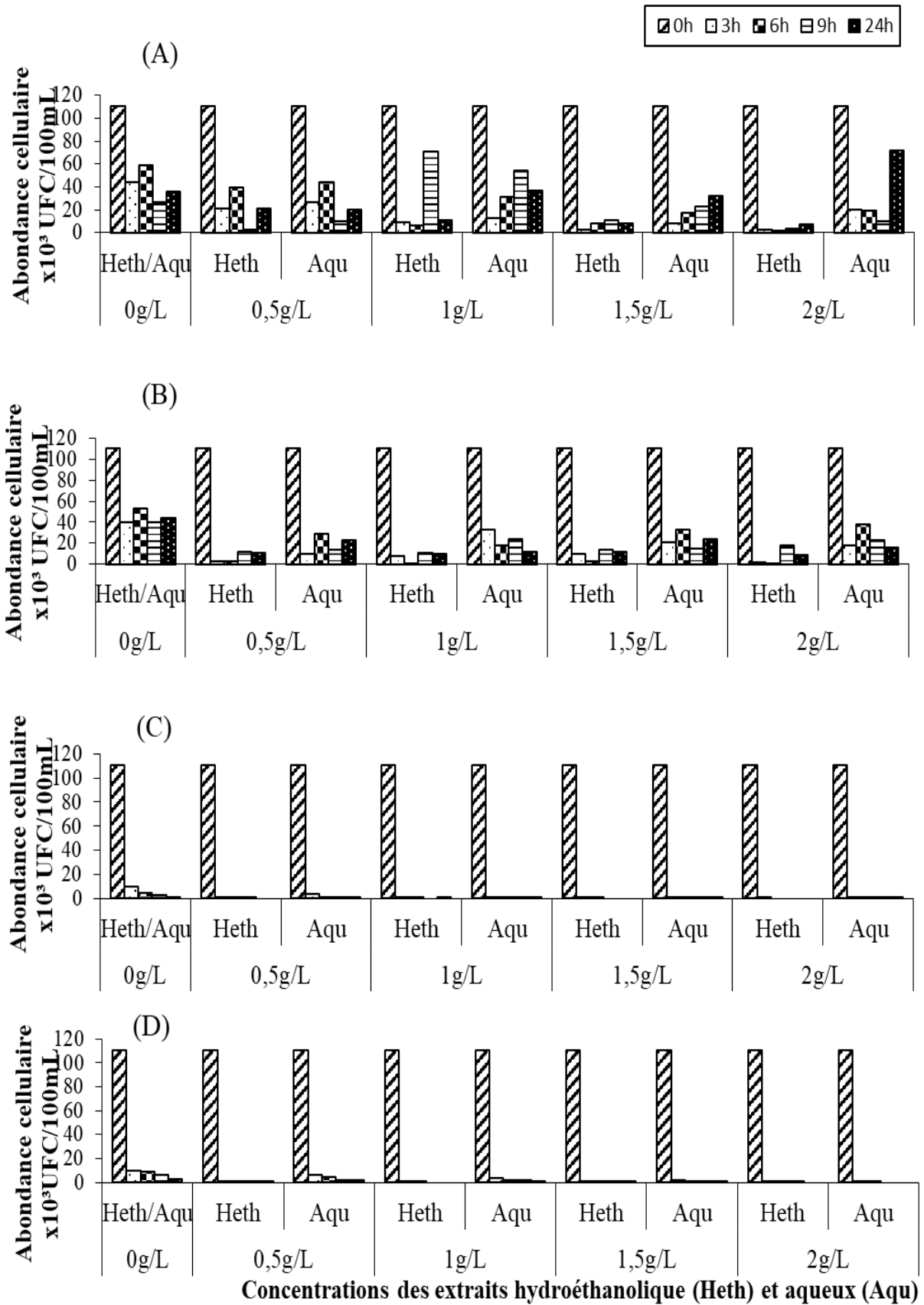


Figure 42 : susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus subtilis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), et de *Clostridium perfringens* à 23 °C (C) et 37 °C (D), isolés des eaux de surface

III.1.5.2. Susceptibilité des bactéries isolées des eaux souterraines

a) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. thuringiensis*

À 23 °C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* dans l'extrait aqueux aux concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L étaient respectivement de 8×10^3 ; 8×10^3 ; $2,2 \times 10^3$ et $0,48 \times 10^3$ UFC/100mL. Ces abondances les plus faibles ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 43A). Les abondances les plus élevées étaient respectivement de 40×10^3 ; 46×10^3 ; $32,5 \times 10^3$ et $15,8 \times 10^3$ UFC/100mL. Tous ont été enregistrés après 24 heures d'incubation (Figure 43A).

Dans les extraits hydro-éthanoliques à une température de 23°C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* étaient respectivement de $0,05 \times 10^3$; $0,07 \times 10^3$; $0,26 \times 10^3$ et $0,05 \times 10^3$ UFC/100mL. Tous ont été enregistrés après 3 h d'incubation pour toutes les concentrations (Figure 43A). Les abondances les plus élevées étaient respectivement de 53×10^3 ; 20×10^3 ; 42×10^3 et 24×10^3 UFC/100mL. Ils ont été enregistrés après 24 heures d'incubation dans toutes les concentrations (Figure 43A).

À 37°C, les plus faibles abondances de *B. thuringiensis* dans l'extrait aqueux ont été de 25×10^3 ; $18,2 \times 10^3$; $13,5 \times 10^3$ et 8×10^3 UFC/100mL respectivement dans les concentrations d'extraits 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L. Les plus élevées étaient respectivement de 60×10^3 ; 52×10^3 ; 53×10^3 et 60×10^3 UFC/100mL dans les extraits à 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L. Ils ont été enregistrés après les périodes d'incubation variables (Figure 43B).

Avec les extraits hydro-éthanoliques à une température de 37°C, une variation temporelle de l'abondance des cellules cultivables a également été observée. Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h pour la concentration 0,5g/L et 3 heures d'incubation avec des concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2g/L. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après 3 heures d'incubation avec une concentration d'extrait de 0,5g/L, après 9h avec les concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2g/L (Figure 43B).

b) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. cereus*

Avec la bactérie *Bacillus cereus* à 23 °C, les abondances de cellules cultivables les plus faibles étaient de $1,54 \times 10^3$; 10×10^3 ; $1,08 \times 10^3$ et $2,15 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 3h d'incubation pour les concentrations 1,5 et 2g/L et après 6h pour les concentrations 0,5 et 1g/L. Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 9h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1,5 et 2g/L et après 24h pour la concentration

1g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 31×10^3 ; 60×10^3 ; $10,5 \times 10^3$ et 40×10^3 UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5, 1, 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 43C).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $16,5 \times 10^3$ et $1,10 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; 25×10^3 et $1,39 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $33,2 \times 10^3$ et $1,35 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5 g/L et de $28,5 \times 10^3$ et $1,26 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 43C). Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 0,5 et 2g/L et après 9h d'incubation pour les concentrations 1et 1,5g/L tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 43C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. cereus* dans les extraits aqueux étaient de 40×10^3 et $9,5 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; 60×10^3 et $11,1 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 69×10^3 et 16×10^3 UFC/100mL avec celui de 1,5g/L d'extrait et $20,7 \times 10^3$ et 10×10^3 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 43D). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables pour toutes les concentrations. Les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L et après 3h pour la concentration 1,5g/L (Figure 43D). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 24h pour toutes les concentrations. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 43D).

c) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. subtilis*

Avec la bactérie *Bacillus subtilis* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $0,2 \times 10^3$; $0,19 \times 10^3$; $0,22 \times 10^3$ et $0,58 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L et après 9h pour la concentration 1,5g/L (Figure 43E). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 3h pour la concentration 0,5g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de $1,97 \times 10^3$; $1,39 \times 10^3$; $3,3 \times 10^3$ et $3,15 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 43E).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $5,5 \times 10^3$ et $1,13 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $4,2 \times 10^3$ et $0,92 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $8,3 \times 10^3$ et $1,02 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de $1,72 \times 10^3$ et $0,7 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 43E). Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 9h d'incubation aux concentrations 0,5 ; 1 et 1,5g/L après 24h pour une concentration de 2g/L (Figure 43E).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. subtilis* dans les extraits aqueux étaient de $5,3 \times 10^3$ et $0,2 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $7,9 \times 10^3$ et $1,36 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 4×10^3 et $0,32 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait, et $4,3 \times 10^3$ et $0,72 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 43F). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 3h d'incubation pour la concentration 0,5g/L. Les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 9h d'incubation à la concentration 0,5g/L (Figure 43F). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 3h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 6h pour la concentration 0,5g/L. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 43F).

d) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. licheniformis*

Avec la bactérie *Bacillus licheniformis* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $16,6 \times 10^3$; 11×10^3 ; $3,8 \times 10^3$ et $1,9 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 9h d'incubation pour toutes les concentrations (Figure 44A). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 0,5 et 2g/L et après 6h pour celles de 1 et 1,5g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 56×10^3 ; 58×10^3 ; 40×10^3 et 42×10^3 UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 44A).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $17,1 \times 10^3$ et $0,77 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; 25×10^3 et $0,4 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 30×10^3 et $0,16 \times 10^3$

UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de 20×10^3 et $0,35 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 44A). Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 9h pour les concentrations 0,5 et 1g/L et après 24h pour celles de 1,5 et 2g/L tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 3h pour toutes les concentrations (Figure 44A).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. licheniformis* dans les extraits aqueux étaient de 58×10^3 et 24×10^3 UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; 58×10^3 et 33×10^3 UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $18,1 \times 10^3$ et $16,6 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et 23×10^3 et 8×10^3 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 44B). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles ont été observées après les périodes d'incubation variables (Figure 44B). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 24h d'incubation et les plus faibles ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 44B).

e) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. lentus*

Avec la bactérie *Bacillus lentus* à 23 °C, les abondances de cellules cultivables les plus élevées et les plus faibles étaient de 40×10^3 et 15×10^3 UFC/100mL avec la concentration d'extrait 0,5g/L ; $29,5 \times 10^3$ et 8×10^3 UFC/100mL pour celle de 1g/L ; $17,4 \times 10^3$ et $1,92 \times 10^3$ UFC/100 mL pour celle de 1,5g/L et de 7×10^3 et $1,23 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L (Figure 44C). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation pour les concentrations 0,5 et 1g/L et après 24h pour celles de 1,5 et 2g/L et les plus faibles ont été enregistrées après 3h d'incubation.

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $10,2 \times 10^3$ et $0,5 \times 10^3$ UFC/100mL avec la concentration d'extrait 0,5g/L ; $1,21 \times 10^3$ et $0,2 \times 10^3$ UFC/100mL pour celle de 1g/L ; $0,98 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL pour celle de 1,5g/L et de $0,2 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 2g/L (Figure 44C). Les abondances les plus élevées et les plus faibles ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 44C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. lentus* dans les extraits aqueux étaient de $32,4 \times 10^3$ et $5,7 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; 35×10^3 et $3,8 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $18,8 \times 10^3$ et $1,24 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et $5,6 \times 10^3$ et $0,2 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de

2g/L respectivement (Figure 44D). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 9h d'incubation pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 24h pour celle de 0,5g/L et les plus faibles après 24h d'incubation (Figure 44D). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation et les plus faibles ont été enregistrées après 24h d'incubation (Figure 44D).

f) Impact des extraits sur la cultivabilité de *C. perfringens*

Avec la bactérie *Clostridium perfringens* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $1,21 \times 10^3$; $0,88 \times 10^3$; $0,03 \times 10^3$ et $1,01 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 24h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L et après 6h pour la concentration 1,5g/L (Figure 44E). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de $3,78 \times 10^3$; $2,21 \times 10^3$; 1×10^3 et $2,87 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 44E).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $1,87 \times 10^3$ et $0,18 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $0,9 \times 10^3$ et $0,18 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $0,12 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de $0,01 \times 10^3$ et 0 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 44E). Toutes les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 3h tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour toutes les concentrations (Figure 44E).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *C. perfringens* dans les extraits aqueux étaient de $3,1 \times 10^3$ et 2×10^3 UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $2,47 \times 10^3$ et $0,75 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $1,11 \times 10^3$ et $0,14 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et $0,87 \times 10^3$ et $0,55 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 44F). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation pour toutes les concentrations. Les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 9h pour la concentration 0,5g/L (Figure 44F). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation et les plus faibles ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 44F).

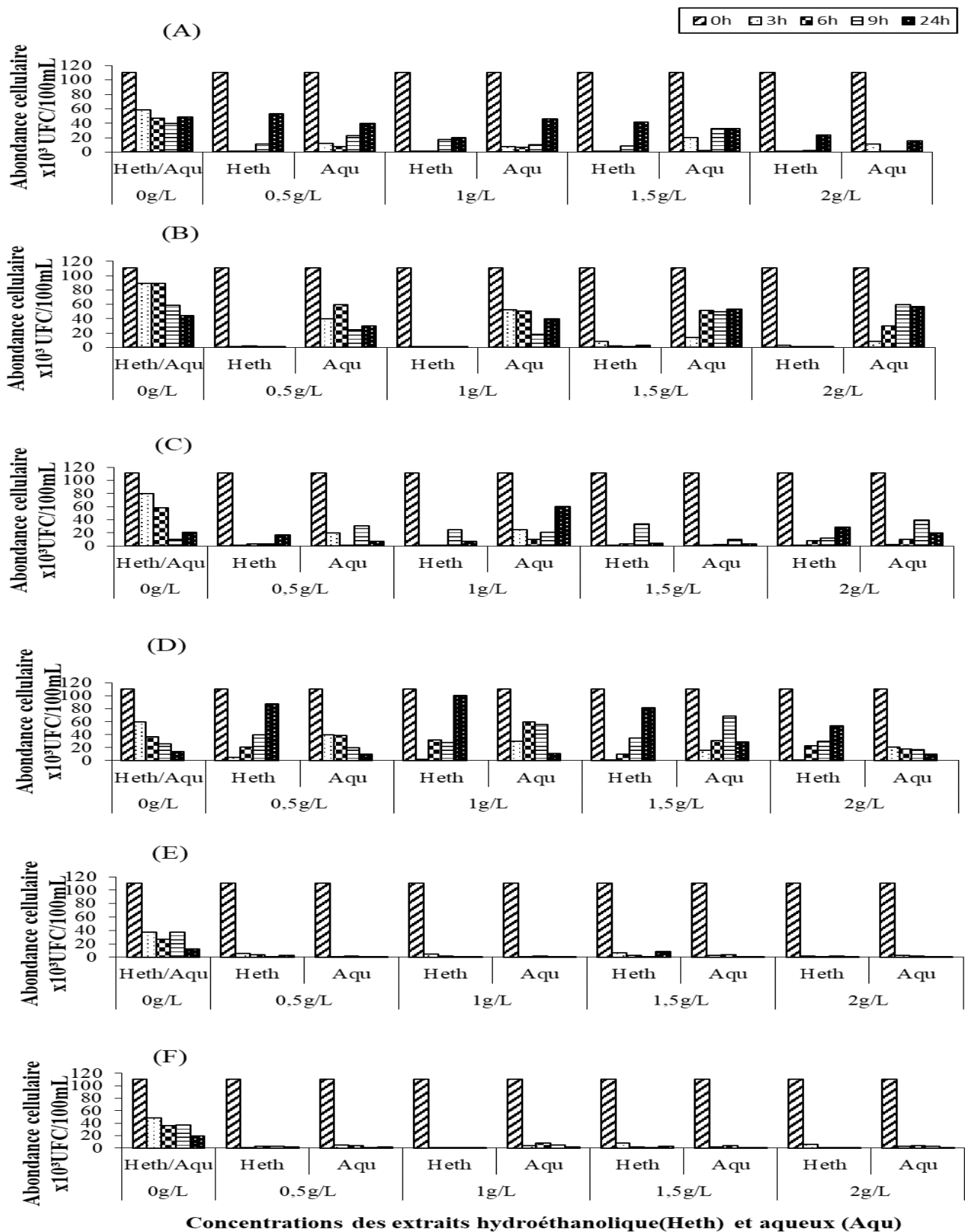


Figure 43 : Susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus thuringiensis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), *B. cereus* à 23 °C (C) et 37 °C (D), et *B. subtilis* à 23 °C (E) et 37 °C (F), isolés des eaux souterraines

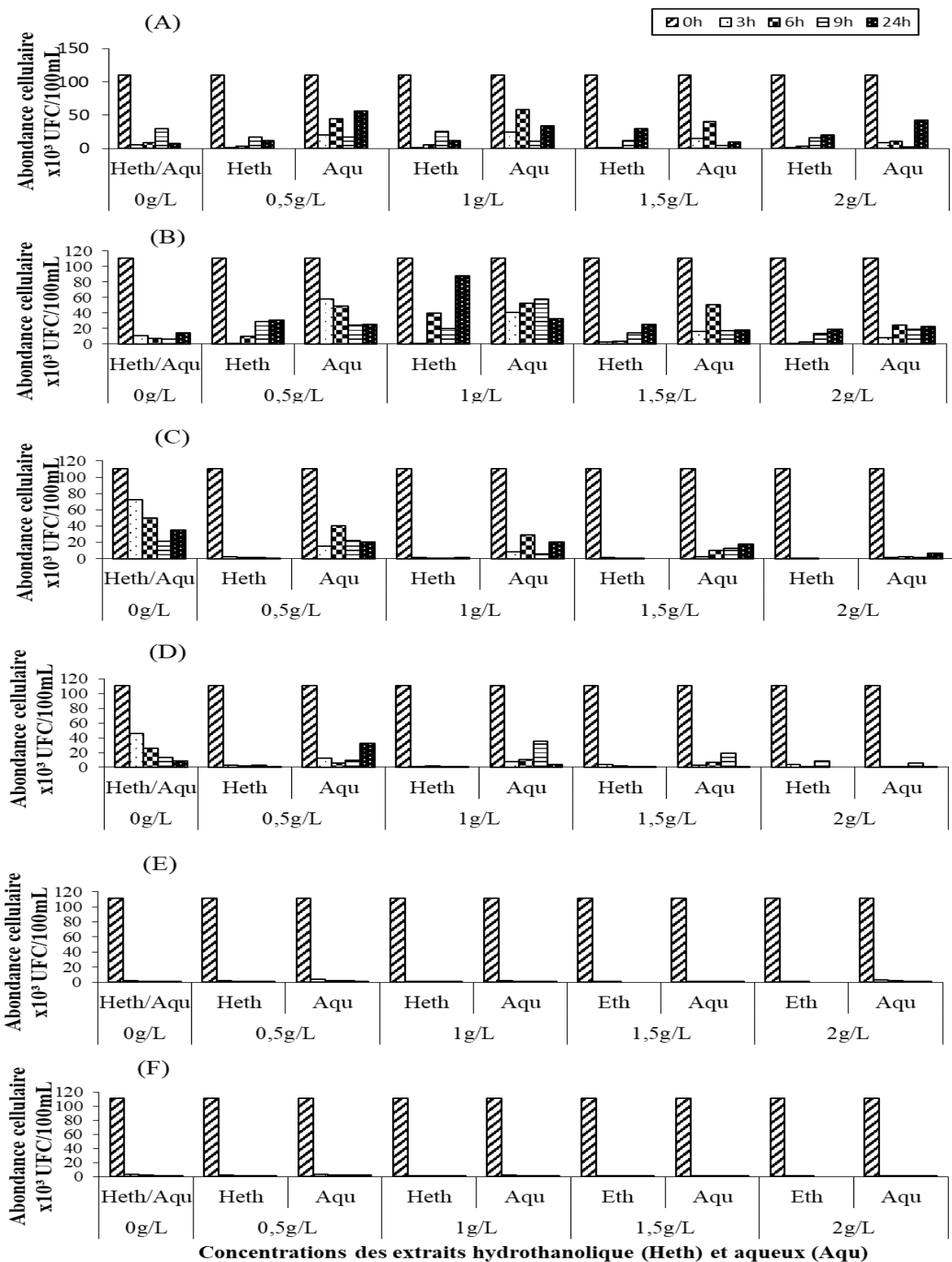


Figure 44 : susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus licheniformis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), *B. lentus* à 23 °C (C) et 37 °C (D), et *Clostridium perfringens* à 23 °C (E) et 37 °C (F) isolés des eaux souterraines

III.1.5.3. Susceptibilité des bactéries isolées des eaux de pluie

a) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. thuringiensis*

Avec la bactérie *Bacillus thuringiensis* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $10,4 \times 10^3$; $10,3 \times 10^3$; $2,28 \times 10^3$ et $3,4 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Toutes ces abondances ont été enregistrées après 24h d'incubation (Figure 45A). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de $20,4 \times 10^3$; $19,8 \times 10^3$; $14,6 \times 10^3$ et $14,4 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 45A).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de 23×10^3 et $0,35 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $27,6 \times 10^3$ et 0,57 UFC /100mL avec celle de 1g/L ; $10,2 \times 10^3$ et $0,36 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5 g/L et de $14,4 \times 10^3$ et $0,25 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 45A). Les abondances les plus élevées ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 45A).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. thuringiensis* dans les extraits aqueux étaient de 18×10^3 et $10,1 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; 20×10^3 et $10,1 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $32,4 \times 10^3$ et $10,2 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et $16,2 \times 10^3$ et 5×10^3 UFC /100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 45B). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L et après 9h pour la concentration 0,5g/L. Toutes les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour toutes les concentrations (Figure 45B). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 9h pour les concentrations 0,5 et 1,5 g/L et après 3h pour les concentrations, 1 et 2g/L. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 45B).

b) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. cereus*

Avec la bactérie *Bacillus cereus* à 23 °C, les abondances cellulaires cultivables les plus faibles étaient de $21,8 \times 10^3$; $10,4 \times 10^3$; $8,6 \times 10^3$ et $10,1 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après 3h d'incubation pour les concentrations 0,5 ; 1 et 2g/L et après 24h pour la

concentration 2g/L (Figure 45C). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 9h d'incubation. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 50×10^3 ; 50×10^3 ; 51×10^3 et 53×10^3 UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 45C).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de 85×10^3 et $1,69 \times 10^3$ UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; 117×10^3 et $2,35 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 102×10^3 et $2,85 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de 133×10^3 et $1,26 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 45C). Toutes les abondances les plus élevées ont été enregistrées après 24h d'incubation tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 45C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. cereus* dans les extraits aqueux étaient de 45×10^3 et $25,3 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; 54×10^3 et $24,3 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; 65×10^3 et $15,6 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait, et 52×10^3 et $18,6 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 45D). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 9h d'incubation pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 3h pour la concentration 0,5 g/L. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 45D). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après 6h pour les concentrations 1,5 et 2g/L et après 24h pour les concentrations 0,5 et 1g/L. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après 3h d'incubation (Figure 45D).

c) Impact des extraits sur la cultivabilité de *B. subtilis*

Avec la bactérie *Bacillus subtilis* à 23 °C, les abondances les plus faibles étaient de $10,2 \times 10^3$; $10,4 \times 10^3$; $8,7 \times 10^3$ et $11,6 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 46A). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation pour les concentrations 0,5 et 1g/L et après 9h pour les concentrations 1,5 et 2g/L. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 40×10^3 ; $31,6 \times 10^3$; $21,8 \times 10^3$ et 22×10^3 UFC/100 mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 g/L respectivement (Figure 46A).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $29,6 \times 10^3$ et $1,14 \times 10^3$ UFC /100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; $11,6 \times 10^3$ et 8×10^3 UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $11,6 \times 10^3$ et $7,7 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de 13×10^3 et $1,21 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 46A). Les abondances les plus élevées et les plus faibles ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 46A).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *B. subtilis* dans les extraits aqueux étaient de $27,9 \times 10^3$ et $10,2 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5 g/L ; $17,6 \times 10^3$ et $10,2 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $23,2 \times 10^3$ et $10,3 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait et $17,6 \times 10^3$ et $10,58 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 46B). Les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 6h d'incubation pour toutes les concentrations. Les abondances de cellules les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et après 9h pour la concentration 0,5g/L (Figure 46B). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées sous 37°C ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables. Les plus faibles valeurs ont été enregistrées après les périodes d'incubation de 6h pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L et 3h pour la concentration 0,5g/L (Figure 46B).

d) Impact des extraits sur la cultivabilité de *C. perfringens*

Avec la bactérie *Clostridium perfringens* à 23 °C, les abondances de cellules cultivables les plus faibles étaient de $3,6 \times 10^3$; $3,2 \times 10^3$; 4×10^3 et $3,12 \times 10^3$ UFC/100mL dans les extraits aqueux avec des concentrations de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement. Ces abondances ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 46C). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation. Ces abondances cellulaires les plus élevées étaient de 30×10^3 ; $8,3 \times 10^3$; $12,2 \times 10^3$ et $7,1 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations d'extrait de 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2g/L respectivement (Figure 46C).

Avec l'extrait hydro-éthanolique à 23°C, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles étaient de $7,5 \times 10^3$ et 1×10^3 UFC/100mL avec une concentration de solution d'extrait de 0,5g/L ; 2×10^3 et $2,5 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $5,6 \times 10^3$ et $1,9$ UFC/100mL avec celle de 1,5g/L et de 2×10^3 et $0,1 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 46C). Toutes les abondances les plus élevées ont été enregistrées après

3h tandis que les abondances les plus faibles ont été enregistrées après 6h pour la concentration 0,5g/L et 24h d'incubation pour les concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L (Figure 46C).

À 37 °C, les abondances les plus élevées et les plus faibles de *C. perfringens* dans les extraits aqueux étaient de $11,1 \times 10^3$ et $1,15 \times 10^3$ UFC/100mL avec des concentrations de solution d'extrait de 0,5g/L ; $11,4 \times 10^3$ et $2,6 \times 10^3$ UFC/100mL avec celle de 1g/L ; $6,9 \times 10^3$ et $1,88 \times 10^3$ UFC /100mL avec celle de 1,5g/L d'extrait, et $7,3 \times 10^3$ et 1×10^3 UFC/100mL avec celle de 2g/L respectivement (Figure 46D). Toutes les abondances cellulaires les plus élevées ont été enregistrées après 3h d'incubation pour toutes les concentrations. Les abondances cellulaires les plus faibles ont été enregistrées après 24h pour les concentrations 0,5 et 1g/L et après 9h pour les concentrations 1,5 et 2g/L (Figure 46D). En présence d'extraits hydro-éthanoliques, les abondances cellulaires les plus élevées et les plus faibles sous 37°C ont été enregistrées après les périodes d'incubation variables (Figure 46D).

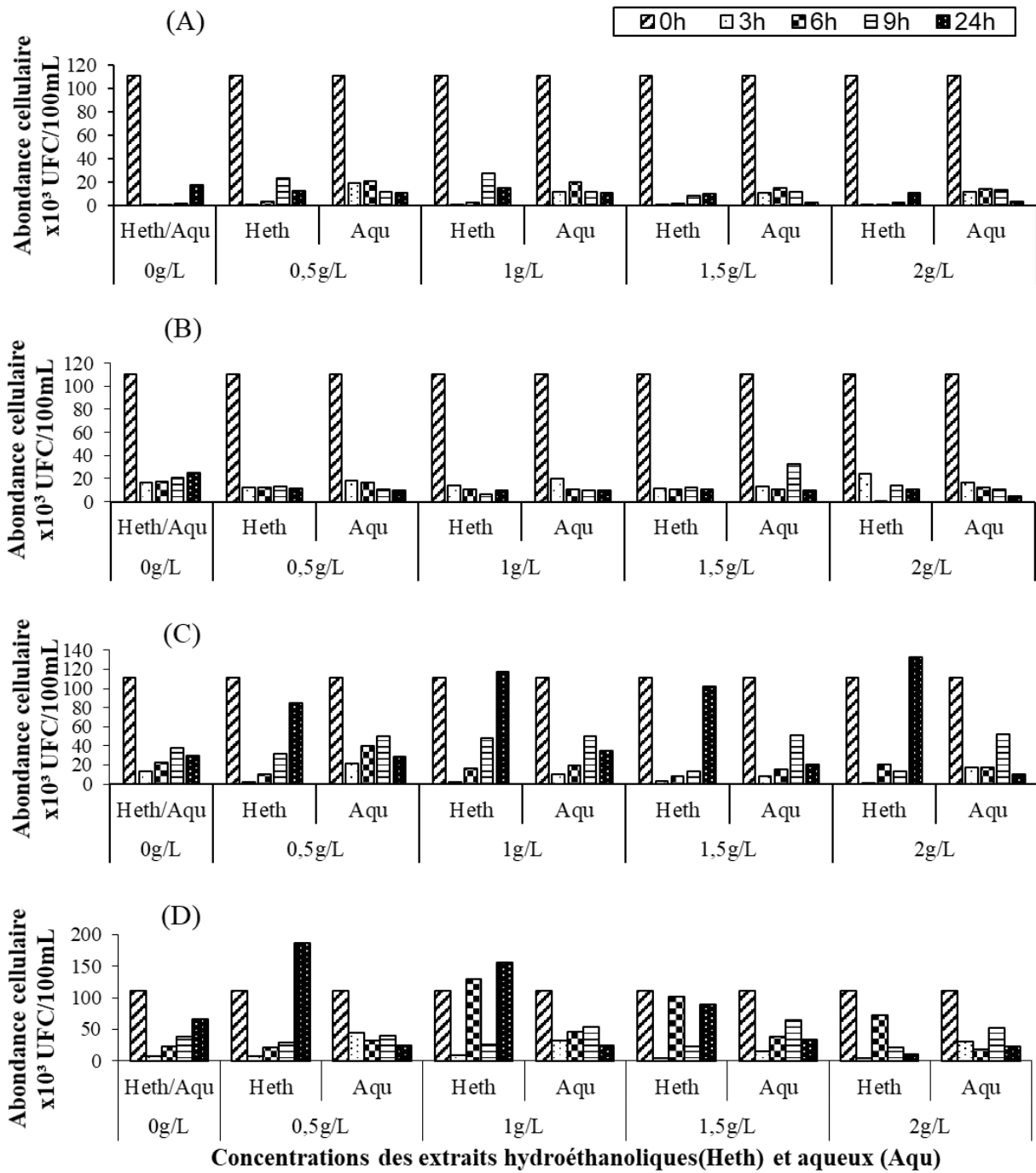


Figure 45 : Susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus thuringiensis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), et *B. cereus* à 23 °C (C) et 37 °C (D), isolés des eaux de pluies

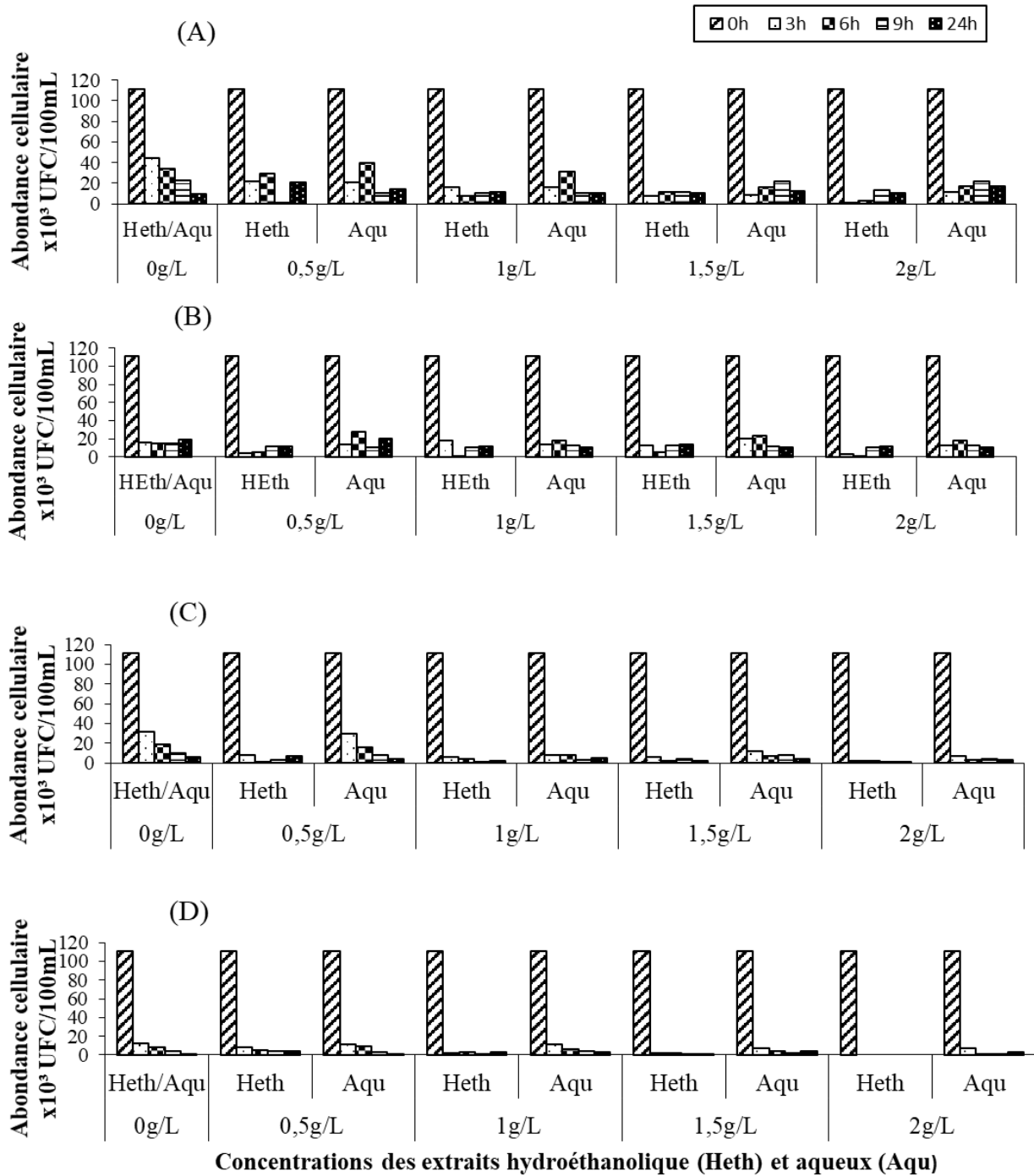


Figure 46 : susceptibilité aux extraits de *Moringa oleifera* de *Bacillus subtilis* à 23 °C (A) et 37 °C (B), et *Clostridium perfringens* à 23 °C (C) et 37 °C (C), isolées des eaux de pluies

III.1.6. Profil chimique des extraits de *M. oleifera* utilisés

La figure 47 montre les spectres de masse obtenus à partir de l'extrait de feuilles. Ce profil a été obtenu par ionisation négative. De nombreux composés chimiques ont été identifiés et sont présentés dans le tableau XIII. Il s'agit notamment du saccharose (hétéroside), de la glucomoringinine (glucosinolate), de l'acide néochlorogénique (acide phénolique), de l'ester méthylique 0-acétylshanzhiside (iridoïde), de l'isoquercétine (flavonoïde), du kaempférol-3-O-glucoside et du kaempférol acétyl glucoside (hétéroside flavonoïde).

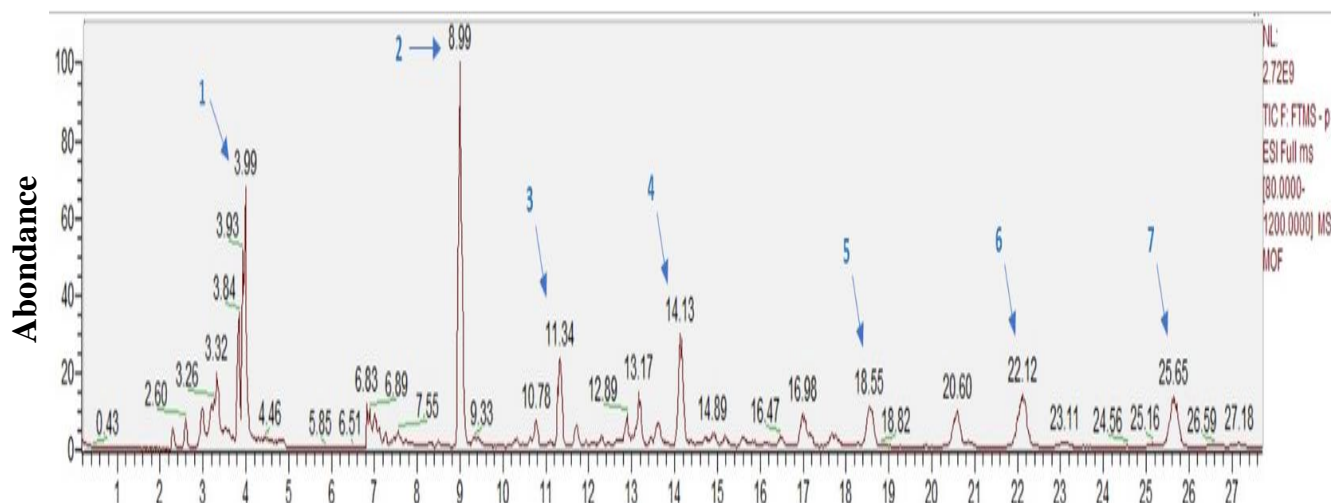


Figure 47 : Profil LC/MS de l'extrait brut au méthanol du spectre (-) des feuilles de *Moringa oleifera*

Tableau XIII : Profil phytochimique des extraits de feuilles MeOH de *M. oleifera* (spectre (-)) (comparaison avec la norme analytique ou selon les données de la littérature)

| N° | Temps de rétention (min) | Nom du composé | Formule du composé | M-H _{exp} (m/z) | Classe de molécule |
|----|--------------------------|----------------------------------|---|--------------------------|-------------------------|
| 1 | 3,99 | Saccharose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 341.1086 | Hétérosides |
| 2 | 8,99 | Glucomoringinine | C ₂₀ H ₂₉ NO ₁₄ S ₂ | 570.0956 | Glucosinolates |
| 3 | 11,34 | Acide Neochlorogénique | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 353.0875 | Acides Phenolique |
| 4 | 14,13 | Methyl ester O-acetylshanzhiside | C ₁₉ H ₂₈ O ₁₂ | 447.1508 | Iridoïdes |
| 5 | 18,55 | Isoquercetine | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 463.0883 | Flavonoïdes |
| 6 | 22,12 | Kaempferol-3-O-glucoside | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 447.0931 | Flavonoïdes hétérosides |
| 7 | 26,65 | Kaempferol acetyl glucoside | C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂ | 489.1037 | Flavonoïdes hétérosides |

III.1.7. Comparaisons des données biotiques et abiotiques entre les milieux aquatiques étudiés

Dans cette étude, 3 types d'écosystèmes ont été étudiés. Il s'agit des eaux de pluies, des eaux souterraines et des eaux de surface. A partir des données obtenues, les écosystèmes ont été comparés entre eux. La comparaison des abondances bactériennes et des données physico-chimiques a ainsi été faite au moyen du test « *H* » de Kruskal-Wallis. Il en ressort que les MES, les teneurs en nitrates et phosphates ne diffèrent pas significativement ($P > 0,05$) entre les différents biotopes aquatiques étudiés. Cette observation a permis d'effectuer le test « *U* » de Mann-Whitney dont les résultats sont présentés dans le tableau XIV.

Il a été noté une différence très significative ($P < 0,05$) entre les eaux de surface et les eaux souterraines de par le pH, O₂ dissous, la couleur, la conductivité électrique, l'abondance de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* et des BHAM. S'agissant des eaux de surface et des eaux de pluie, elles diffèrent très significativement ($P < 0,05$) par le pH, TDS, azote ammoniacal, conductivité électrique et en abondances des BHAM. Entre les eaux souterraines et les eaux de pluies, il a été noté une différence très significative ($P < 0,01$) de par les TDS, l'azote ammoniacal, pH, CO₂ Dissous, O₂ Dissous, la conductivité électrique, les abondances de *B. thuringiensis*, *ceruus* et BHAM.

III.1.8. Corrélations entre les abondances des espèces bactériennes et les facteurs abiotiques

Tous les points d'eau de puits ont été considérés comme appartenant au système d'eau souterraine, toutes les stations d'eau de pluies considérés comme appartenant au système d'eau pluviale, et les ruisseaux et lac comme appartenant au système d'eau de surface. Pour chaque système d'eau, les valeurs moyennes mensuelles de chaque paramètre ont été calculées. Puis, les degrés de liaison entre les variations des abondances des espèces bactériennes et les fluctuations des paramètres physicochimiques et météorologiques ont été recherchés au moyen du test de corrélation « *r* » de Spearman dans chaque système.

Tableau XIV : Comparaison à partir du test « U » de Mann-Whitney entre les différents biotopes aquatiques

| Paramètres physicochimiques et bactériologiques | Différents biotopes | | |
|---|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Eaux de surface/eau souterraine | Eaux de surface/eaux de pluie | Eaux souterraines/eau de pluie |
| Température | 0,858 | 0,022* | 0,011* |
| Ph | 0,000** | 0,000** | 0,022* |
| CO ₂ Dissous | 0,065 | 0,214 | 0,018* |
| O ₂ Dissous | 0,000** | 0,154 | 0,030* |
| Nitrates | 0,144 | 0,756 | 0,901 |
| Phosphates | 0,101 | 0,901 | 0,072 |
| TDS | 0,003** | 0,000** | 0,000** |
| MES | 0,355 | 0,153 | 0,733 |
| Azote ammoniacal | 0,065 | 0,000** | 0,000** |
| Couleur | 0,003** | 0,000** | 0,975 |
| Conductivité électrique | 0,008** | 0,000** | 0,000** |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,001** | 0,264 | 0,004** |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,000** | 0,687 | 0,000** |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0,011* | 0,191 | 0,427 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 0,001** | 0,066 | 0,260 |
| BHAM | 0,000** | 0,000** | 0,000** |

* : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous

III.1.8.1. Corrélations entre les paramètres physico-chimiques, météorologiques et les abondances des bactéries isolées des eaux de surface

Dans l'ensemble, les abondances bactériennes ont montré des liaisons significatives avec la température, l'O₂ Dissous, les TDS, les MES, la conductivité électrique, l'humidité relative et l'insolation. Aucune liaison n'a été notée avec le pH, le CO₂, les teneurs en nitrates, phosphates et azote ammoniacal, les précipitations et la température de l'air (Tableau XV).

Une corrélation très significative ($P < 0,01$) et négative entre les abondances de *Bacillus cereus* et l' O_2 Dissous ; des corrélations très significatives ($P < 0,01$) et positives entre les abondances des BHAM et les TDS, la conductivité électrique de même qu'une corrélation significative ($P < 0,05$) et négative vis-à-vis de la température. Des liaisons significatives ($P < 0,05$) et positives ont également été observées entre les TDS et les abondances de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus subtilis* ; entre l'insolation, les MES et les abondances de *Bacillus subtilis* ; des corrélations significatives ($P < 0,05$) et négatives entre l'humidité relative et les abondances de *Bacillus thuringiensis* et BHAM.

III.1.8.2. Corrélations entre les paramètres physico-chimiques, météorologiques et les abondances des bactéries isolées des eaux souterraines

Des liaisons significatives ont été enregistrées entre les abondances bactériennes et les paramètres physico-chimiques et météorologiques que sont la température, les teneurs en phosphates, les TDS, les MES, la couleur et l'insolation (Tableau XVI).

Des corrélations significatives ($P < 0,05$) et positives ont été observées entre les abondances de *C. perfringens* vis à vis de la température, des teneurs en nitrates et azote ammoniacal et des précipitations ; une corrélation très significative ($P < 0,01$) et négative a également été enregistrée avec es abondances de la même espèce vis à vis des TDS et de la conductivité électrique. Des corrélations significatives ($P < 0,05$) et négatives ont été enregistrées entre le pH, l' O_2 Dissous et les abondances de *Bacillus subtilis*, et des corrélations très significatives ($P < 0,01$) et négatives entre le CO_2 Dissous et les abondances de la même espèce bactérienne.

Tableau XV : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico-chimiques et les abondances cellulaires des espèces isolées des eaux de surface

| Paramètres physicochimiques et météorologiques | Espèce ou groupe de bactéries | | | | |
|--|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | -0,066 | -0,374 | -0,179 | -0,069 | -0,582* |
| pH | -0,286 | 0,006 | -0,157 | -0,221 | -0,316 |
| CO ₂ Dissous | -0,331 | 0,044 | -0,177 | 0,234 | 0,284 |
| O ₂ Dissous | -0,116 | -0,710** | -0,334 | -0,365 | -0,006 |
| Nitrates | 0,280 | -0,368 | -0,270 | 0,155 | 0,044 |
| Phosphates | -0,544* | -0,060 | -0,433 | 0,102 | -0,148 |
| TDS | 0,638* | 0,473 | 0,646* | 0,539* | 0,765** |
| MES | -0,235 | -0,434 | -0,637* | -0,233 | -0,188 |
| Azote ammoniacal | -0,165 | -0,308 | -0,116 | 0,257 | 0,115 |
| Couleur | 0,341 | -0,280 | -0,422 | 0,290 | 0,187 |
| Conductivité électrique | 0,648* | 0,407 | 0,604* | 0,514 | 0,813** |
| Précipitations | -0,280 | -0,407 | -0,394 | -0,163 | -0,242 |
| Humidité relative | -0,648* | -0,451 | -0,726** | -0,320 | -0,637* |
| Température de l'air | 0,154 | 0,071 | -0,105 | 0,481 | 0,071 |
| Insolation | 0,074 | 0,520 | 0,613* | 0,382 | 0,319 |

Ddl= 12 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

Tableau XVI : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico-chimiques et les abondances bactériennes des espèces isolées dans les eaux souterraines

| Paramètres physicochimiques et météorologiques | Espèce ou groupe de bactéries | | | | |
|--|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | -0,048 | -0,308 | -0,125 | 0,642* | 0,363 |
| pH | -0,280 | -0,445 | -0,603* | 0,105 | 0,308 |
| CO ₂ Dissous | -0,368 | -0,423 | -0,705** | -0,394 | 0,284 |
| O ₂ Dissous | -0,404 | -0,209 | -0,655* | -0,310 | -0,264 |
| Nitrates | 0,093 | -0,095 | 0,040 | 0,557* | -0,250 |
| Phosphates | -0,352 | 0,275 | -0,154 | 0,487 | 0,209 |
| TDS | 0,204 | -0,207 | 0,461 | -0,715** | 0,385 |
| MES | 0,228 | 0,322 | -0,313 | 0,086 | -0,196 |
| Azote ammoniacal | -0,434 | -0,390 | -0,116 | 0,580* | 0,066 |
| Couleur | 0,027 | 0,489 | 0,472 | 0,435 | 0,429 |
| Conductivité électrique | 0,399 | -0,050 | -0,051 | -0,642* | -0,272 |
| Précipitations | -0,385 | -0,165 | -0,307 | 0,706** | 0,209 |
| Humidité relative | -0,396 | -0,104 | -0,307 | 0,362 | -0,434 |
| Température de l'air | -0,011 | 0,308 | 0,358 | 0,230 | 0,451 |
| Insolation | 0,129 | 0,377 | 0,387 | -0,368 | -0,484 |

Ddl= 12 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

III.1.8.3. Corrélations entre les paramètres physico-chimiques, météorologiques et les abondances des bactéries isolées des eaux de pluie

Les espèces bactériennes isolées dans les eaux souterraines ont présenté des liaisons significatives avec le pH, les teneurs en phosphates et azote ammoniacal et avec la couleur (Tableau XVII).

Les corrélations très significatives ($P < 0,01$) et positives ont été observées entre l'azote ammoniacal et les abondances de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* et entre la couleur et les

abondances de *Bacillus subtilis*. Les corrélations significatives ($P < 0,05$) et positives quant à elles ont été enregistrées entre les teneurs en phosphates et la couleur respectivement avec les abondances de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Clostridium perfringens*. Une corrélation significative ($P < 0,05$) et négative a été observée entre les abondances de *Bacillus cereus* et le pH. Il existe également des corrélations significatives et positives entre l'insolation et les abondances de *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, entre l'humidité relative et les abondances de *Clostridium perfringens* ; enfin des corrélations très significatives et positives entre la température de l'air et les abondances de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*.

III.1.8.4. Corrélations pour le mois en cours entre les paramètres physico-chimiques et bactériologiques des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux de surface

Les corrélations ont été effectuées entre les paramètres des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux de surfaces afin d'évaluer l'influence des eaux de pluies déversées dans les eaux de surface. Dans l'ensemble, les espèces bactériennes isolées dans les eaux de surface ont présenté des liaisons significatives avec la couleur, les teneurs en phosphates et la conductivité électrique des eaux de pluie (Tableau XVIII).

Des corrélations significatives et positives ont été enregistrées entre la couleur, les teneurs en phosphates, les abondances de *Clostridium perfringens* des eaux de pluie et les abondances de *Clostridium perfringens* des eaux de surface. Il a également été observé des corrélations significatives et positives entre la conductivité électrique des eaux de pluie et abondances de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus subtilis* issues des eaux de surface. Une corrélation significative a été obtenue entre les abondances de *Bacillus thuringiensis* des eaux de surface et les abondances de BHAM des eaux de pluie.

Tableau XVII : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les paramètres physico-chimiques et les abondances bactériennes des espèces isolées dans les eaux de pluie

| Paramètres physicochimiques et météorologiques | Espèce ou groupe de bactéries | | | | |
|--|-------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | -0,503 | -0,430 | -0,210 | -0,470 | 0,479 |
| pH | -0,372 | -0,409 | -0,634* | -0,391 | 0,232 |
| CO ₂ Dissous | 0,442 | 0,224 | -0,080 | 0,395 | -0,455 |
| O ₂ Dissous | 0,164 | -0,176 | 0,031 | -0,345 | -0,552 |
| Nitrates | -0,612* | -0,309 | -0,123 | -0,332 | 0,430 |
| Phosphates | 0,261 | 0,697* | 0,309 | 0,496 | 0,297 |
| TDS | -0,462 | -0,207 | 0,297 | -0,315 | 0,122 |
| MES | -0,024 | 0,073 | -0,331 | -0,138 | -0,122 |
| Azote ammoniacal | 0,612* | 0,842** | 0,766** | 0,489 | 0,127 |
| Couleur | 0,612* | 0,952** | 0,642* | 0,684* | 0,115 |
| Conductivité électrique | -0,122 | 0,164 | 0,322 | 0,072 | 0,328 |
| Précipitations | -0,612 | -0,406 | -0,370 | 0,013 | 0,285 |
| Humidité relative | -0,273 | -0,224 | -0,259 | -0,351 | -0,261 |
| Température de l'air | 0,794** | 0,818** | 0,593 | 0,678* | 0,176 |
| Insolation | 0,382 | 0,721* | 0,482 | 0,671* | -0,406 |

Ddl= 9 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

Tableau XVIII : corrélation entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface

| Paramètres physicochimiques et bactériologiques des eaux des pluies | Bactéries dans les eaux de surface | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | 0,285 | 0,212 | 0,201 | -0,055 | -0,552 |
| pH | 0,091 | -0,122 | 0,071 | -0,199 | 0,079 |
| CO ₂ Dissous | -0,309 | 0,273 | -0,043 | 0,250 | 0,406 |
| O ₂ Dissous | -0,188 | 0,127 | -0,091 | -0,530 | -0,055 |
| Nitrates | 0,273 | -0,455 | -0,006 | -0,335 | 0,200 |
| Phosphates | 0,188 | -0,030 | 0,091 | 0,701* | 0,079 |
| TDS | 0,091 | -0,055 | 0,168 | 0,318 | -0,571 |
| MES | 0,267 | 0,079 | 0,119 | -0,165 | 0,255 |
| Azote ammoniacal | 0,418 | 0,261 | 0,390 | 0,585 | 0,212 |
| Couleur | 0,382 | 0,139 | 0,287 | 0,713* | 0,418 |
| Conductivité électrique | 0,711* | 0,261 | 0,743* | 0,052 | 0,231 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,333 | 0,285 | 0,049 | 0,463 | 0,576 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,248 | 0,091 | 0,171 | 0,610 | 0,430 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0,303 | 0,222 | 0,509 | 0,401 | 0,185 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 0,100 | 0,182 | 0,319 | 0,660* | 0,339 |
| BHAM | 0,685* | 0,127 | 0,201 | 0,494 | -0,030 |

Ddl=9 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

III.1.8.5. Corrélations pour le mois en cours entre les paramètres physico-chimiques et bactériologiques des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines

Les corrélations ont été effectuées entre les paramètres des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines afin d'évaluer l'influence des eaux de pluies déversées et infiltrées dans les eaux souterraines après la tombée des pluies. Dans l'ensemble, Les espèces bactériennes isolées dans les eaux souterraines ont présenté des liaisons significatives avec l'oxygène Dissous et les teneurs en azote ammoniacal des eaux de pluie. Seule les BHAM des eaux de pluie ont présenté des liaisons significatives avec *Clostridium perfringens* et les BHAM des eaux de pluie (Tableau XIX).

Il a été observé une corrélation très significative et négative entre l'oxygène Dissous des eaux de pluie et les abondances de *Clostridium perfringens* des eaux souterraines ; une corrélation significative et positive entre les teneurs en azote ammoniacal des eaux de pluie et les abondances de *Bacillus subtilis* des eaux souterraines a été notée. Des corrélations significatives et positives entre les abondances de *Clostridium perfringens* et celles des BHAM des eaux souterraines ont également été enregistrées.

III.1.8.6. Corrélations retard d'un mois entre les paramètres physico-chimiques et bactériologiques des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux de surface

Les corrélations retards d'un mois ont été effectuées entre les paramètres des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux de surface afin d'évaluer l'influence des eaux de pluies déversées dans les eaux de surface, un mois après la tombée des pluies (Tableau XX). Dans l'ensemble, les espèces bactériennes isolées dans les eaux de surface ont présenté des liaisons significatives avec la température, les TDS, la couleur et les teneurs en phosphates et azote ammoniacal des eaux de pluie. Seule l'espèce *Clostridium perfringens* des eaux de surface a présenté des liaisons significatives avec les espèces *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Clostridium perfringens* des eaux de pluie.

Des corrélations significatives et positives ont été enregistrées entre la couleur, les teneurs en phosphates et azote ammoniacal des eaux de pluie et les abondances de *Clostridium perfringens* des eaux de surface. Il a également été observé des corrélations significatives et négatives entre la température des eaux de pluie et les abondances de *Bacillus cereus* des eaux de surface et entre les TDS et les abondances de *Bacillus thuringiensis* issues des eaux de

surface. Des corrélations significatives et très significatives ont été obtenues entre les abondances de *Clostridium perfringens* des eaux de surface et les abondances de *Bacillus cereus*, *subtilis* et *Clostridium perfringens* des eaux de pluie.

Tableau XIX : corrélation entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface

| Paramètres physicochimiques et bactériologiques des eaux des pluies | Bactéries des eaux souterraines | | | | |
|--|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | 0,418 | 0,006 | 0,270 | 0,293 | 0,297 |
| pH | -0,463 | -0,567 | -0,316 | -0,154 | 0,091 |
| CO ₂ Dissous | -0,127 | 0,370 | 0,232 | -0,202 | -0,261 |
| O ₂ Dissous | 0,576 | 0,103 | -0,194 | -0,801** | -0,370 |
| Nitrates | -0,067 | -0,600 | -0,031 | 0,273 | 0,127 |
| Phosphates | -0,394 | 0,067 | 0,408 | 0,566 | 0,285 |
| TDS | 0,304 | -0,061 | 0,252 | 0,020 | -0,043 |
| MES | 0,353 | -0,267 | -0,098 | -0,297 | -0,243 |
| Azote ammoniacal | 0,079 | 0,345 | 0,703* | 0,156 | 0,018 |
| Couleur | -0,042 | 0,273 | 0,546 | 0,293 | -0,018 |
| Conductivité électrique | 0,237 | -0,085 | 0,478 | 0,170 | -0,280 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,248 | 0,309 | 0,332 | -0,260 | 0,115 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,055 | 0,297 | 0,445 | 0,091 | -0,139 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0,179 | 0,500 | 0,629 | 0,196 | -0,333 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | -0,075 | 0,552 | 0,409 | 0,418 | -0,270 |
| BHAM | 0,176 | 0,091 | 0,552 | 0,749* | 0,697* |

Ddl=9 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

Tableau XX : corrélation retard d'un mois entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux de surface

| Paramètres physicochimiques et bactériologiques des eaux des pluies | Bactéries dans les eaux de surface | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | -0,650* | -0,700* | -0,599 | -0,515 | -0,017 |
| pH | -0,118 | -0,202 | -0,306 | -0,332 | 0,387 |
| CO ₂ Dissous | 0,617 | -0,233 | 0,034 | -0,059 | 0,117 |
| O ₂ Dissous | -0,250 | -0,033 | 0,245 | -0,515 | -0,600 |
| Nitrates | -0,633* | 0,233 | -0,076 | 0,025 | 0,067 |
| Phosphates | 0,150 | 0,100 | -0,430 | 0,684* | 0,283 |
| TDS | -0,703* | -0,033 | -0,203 | 0,008 | -0,452 |
| MES | -0,427 | -0,293 | -0,483 | -0,479 | 0,469 |
| Azote ammoniacal | 0,033 | 0,167 | -0,211 | 0,667* | 0,000 |
| Couleur | 0,117 | 0,183 | -0,346 | 0,768* | 0,133 |
| Conductivité électrique | -0,636* | -0,192 | -0,445 | 0,072 | 0,126 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,567 | 0,233 | 0,211 | 0,380 | 0,050 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,150 | 0,300 | -0,236 | 0,836** | 0,117 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | -0,162 | 0,180 | -0,009 | 0,693* | -0,282 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 0,201 | 0,035 | -0,133 | 0,700* | 0,280 |
| BHAM | 0,033 | -0,250 | -0,076 | 0,118 | 0,383 |

Ddl=8 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

III.1.8.7. Corrélations retard d'un mois entre les paramètres physico-chimiques et bactériologiques des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines

Les corrélations retards d'un mois ont été effectuées entre les paramètres des eaux de pluies et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines afin d'évaluer l'influence des eaux de pluies déversées et infiltrées dans les eaux souterraines un mois après la tombée des

pluies (Tableau XXI). Dans l'ensemble, Les espèces bactériennes isolées dans les eaux souterraines ont présenté des liaisons significatives avec la température, les TDS, les MES, la couleur et les teneurs en nitrates des eaux de pluie. Seule les BHAM des eaux souterraines ont présenté des liaisons significatives avec l'espèce *Bacillus cereus* des eaux de pluie.

Il a été observé des corrélations très significatives et négatives entre la température des eaux de pluie et les abondances des *Bacillus thuringiensis* et *subtilis* des eaux souterraines ; des corrélations très significatives et positives entre la couleur, les teneurs en phosphates des eaux de pluie et les abondances des BHAM des eaux souterraines. Des corrélations significatives et négatives entre les TDS et MES et les abondances des *Bacillus thuringiensis* et *subtilis* des eaux souterraines ont également été enregistrées.

III.1.8.8. Analyse en Composantes Principales (ACP) et Analyse de Classification Hiérarchique (ACH) caractérisant les stations d'échantillonnage

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) appliquée aux variables physicochimiques et aux densités bactériennes des différentes stations d'échantillonnages a fourni plusieurs composantes principales ou facteurs. Les deux premiers facteurs F1 (37,52%) et F2 (30,74%) cumulés expliquent 68,26 % des fluctuations des variables initiales.

Le Biplot (Figure 48 A) montre que le pH, les phosphates, la couleur, et les densités des *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *Clostridium perfringens*) ont été positivement liés entre eux et à l'axe F1. Ceci signifie que lorsque la valeur de F1 augmente, les scores des variables corrélées positivement augmentent aussi. Par contre l'O₂ dissous a été négativement corrélé à l'axe F1. Pour ce qui est de l'axe F2, l'insolation, la conductivité électrique, les TDS, l'azote ammoniacal et les nitrates ont été positivement liés entre eux d'une part, et positivement corrélés à l'axe F2 ; tandis que le CO₂ dissous, la température de l'eau, la température de l'air, l'humidité relative et les précipitations ont été négativement corrélés à l'axe F2.

Les résultats de l'ACH obtenus ont présenté trois (03) classes de stations (C1, C2 et C3) (Figure 48B). La classe I regroupait les associations des stations SW1, GW1, GW2, GW3, GW4, GW5 et GW6, liées entre elles à environ 62% de similarité. En outre, dans cette classe les stations SW1 et GW1 sont plus proches entre elles ainsi que les stations GW3 et GW5. La classe C2 a été constituée des associations des stations SW2, SW3, SW4, SW5 et SW6 liées entre elles à plus de 70 % de similarité. En fin la classe C3 qui a été constituée des stations RW1, RW2 et RW3, liées entre elles à plus de 90 % de similarité.

La classe 1 est caractérisée par l'absence d'affinité avec les espèces bactériennes. La classe 2 est caractérisée par des fortes affinités des paramètres physicochimiques et bactériologiques (pH, couleur, orthophosphates, densités de *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*). La classe 3 caractérisée par des fortes affinités avec les variables abiotiques telles que l'humidité de l'air, les précipitations, la température de l'air et la température de l'échantillon d'eau (figure 48B).

Tableau XXI : corrélation retard d'un mois entre les paramètres des eaux de pluie et les paramètres bactériologiques des eaux souterraines

| Paramètres physicochimiques et bactériologiques des eaux des pluies | Bactéries des eaux souterraines | | | | |
|---|---------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | BHAM |
| Température | -0,867** | -0,467 | -0,895** | -0,330 | -0,283 |
| Ph | 0,286 | -0,269 | -0,285 | -0,056 | 0,000 |
| CO ₂ Dissous | 0,550 | -0,133 | 0,402 | 0,000 | 0,317 |
| O ₂ Dissous | -0,217 | 0,100 | -0,146 | -0,587 | -0,433 |
| Nitrates | -0,367 | 0,117 | -0,383 | 0,138 | -0,383 |
| Phosphates | 0,117 | 0,017 | 0,183 | 0,495 | 0,833** |
| TDS | -0,762* | 0,092 | -0,330 | -0,193 | -0,209 |
| MES | -0,251 | -0,527 | -0,724* | -0,332 | -0,126 |
| Azote ammoniacal | -0,067 | 0,167 | 0,183 | 0,376 | 0,600 |
| Couleur | 0,167 | 0,183 | 0,274 | 0,569 | 0,817** |
| Conductivité électrique | -0,444 | -0,092 | -0,458 | 0,161 | -0,100 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0,533 | 0,250 | 0,365 | 0,358 | 0,467 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0,150 | 0,233 | 0,347 | 0,569 | 0,783* |
| <i>Bacillus subtilis</i> | -0,282 | 0,359 | 0,337 | 0,428 | 0,197 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | -0,061 | 0,026 | 0,364 | 0,554 | 0,376 |
| BHAM | -0,267 | -0,100 | -0,347 | 0,495 | -0,183 |

Ddl=8 * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral) ; ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; pH : potentiel d'hydrogène ; TDS : Solides Totaux dissous ; MES : Matières en suspension ; CO₂ : Dioxyde de carbone ; O₂ : Oxygène

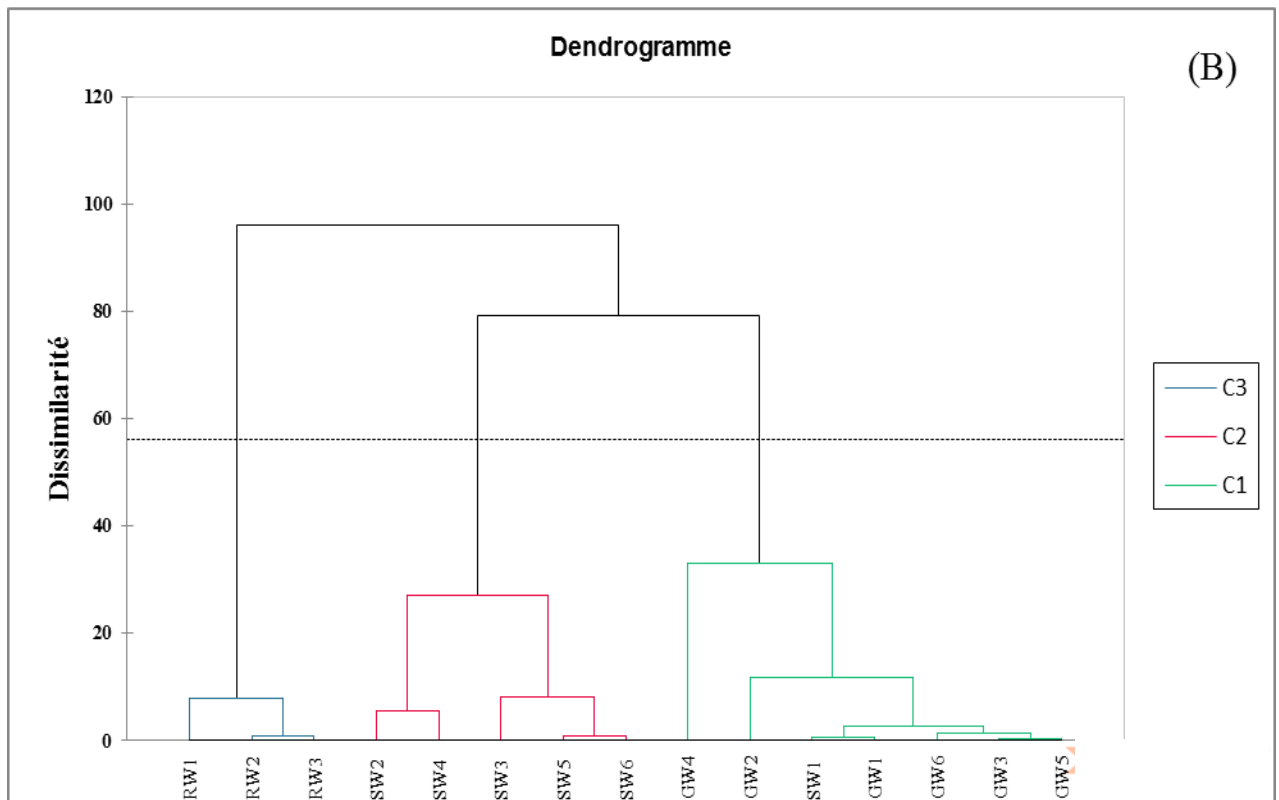
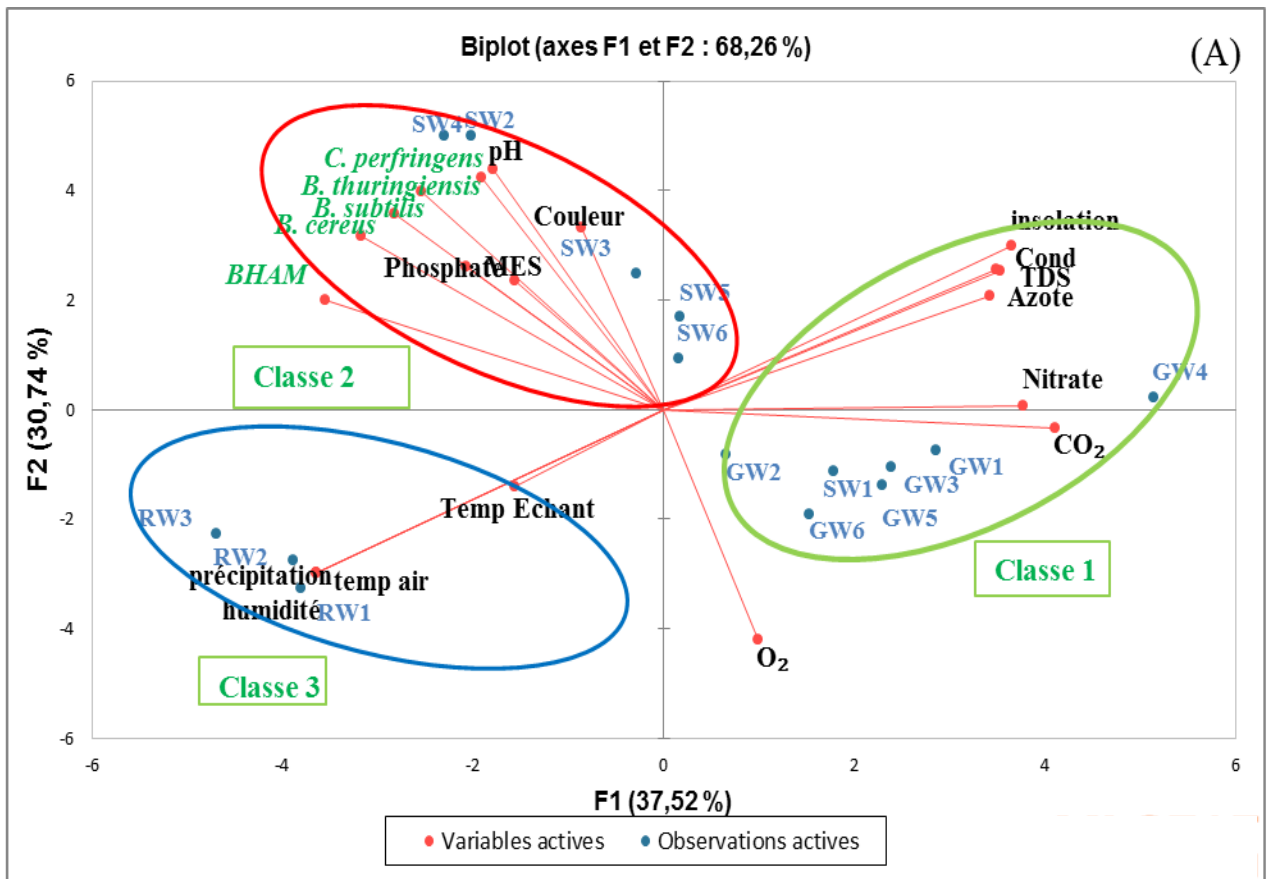


Figure 48 : Analyse en Composantes Principales (A) et Hiérarchisation (B), des stations d'échantillonnage à partir des valeurs des paramètres physico-chimiques et bactériologiques

III.1.9. Comparaison en présence des antibiotiques, des diamètres d'inhibition des espèces bactériennes isolées de l'ensemble des biotopes aquatiques considérés

A l'aide du test de Kruskal-Wallis, une comparaison des diamètres d'inhibition vis-à-vis de chaque antibiotique, des espèces isolées de l'ensemble des biotopes, a été effectuée. Les résultats sont consignés dans le Tableau XXII. Il en ressort que pour la majorité des cas, les diamètres d'inhibition diffèrent significativement pour chaque bactérie, d'un biotope aquatique à l'autre ($P \leq 0,05$). Chez l'espèce *Bacillus thuringiensis* le diamètre d'inhibition de l'Ampicilline et l'amoxicilline ne varie pas en fonction de l'origine de la bactérie ($P > 0,05$). Il en est de même de *Bacillus subtilis* vis-à-vis de l'Amikacine, la Tétracycline et l'Ampicilline ainsi que de *Clostridium perfringens* vis-à-vis de la Ciprofloxacine ($P > 0,05$) (Tableau XXII).

Tableau XXII : test de kruskal-wallis entre les diamètres d'inhibition des espèces isolées des différents biotopes

| Antibiotiques utilisés | Espèces bactériennes des différents biotopes | | | |
|---------------------------|--|------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> |
| Imipenème | 0,000** | 0,000** | 0,000** | 0,000** |
| Gentamycine | 0,048* | 0,010* | 0,001* | 0,000** |
| Amikacine | 0,000** | 0,008** | 0,495 | 0,001* |
| Ofloxacine | 0,000** | 0,000** | 0,037* | 0,000** |
| Ciprofloxacine | 0,000** | 0,000** | 0,010* | 0,291 |
| Sulfaméthoxazole | 0,001* | 0,038* | 0,003** | 0,000** |
| Tétracycline | 0,000** | 0,000** | 0,709 | 0,001* |
| Ampicilline | 0,577 | 0,001* | 0,216 | 0,000** |
| Amoxicilline | 0,282 | 0,000** | 0,029* | 0,000** |

** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

Cette observation a permis d'effectuer le test « *U* » de Mann-Whitney afin de comparer les diamètres d'inhibition des espèces isolées des eaux de surface, des eaux de pluie et des eaux souterraines. Les résultats sont présentés dans le Tableau XXIII. On observe une différence très significative entre les diamètres d'inhibition de l'Amikacine, l'Ofloxacine, la ciprofloxacine et la tétracycline testés contre l'espèce *Bacillus thuringiensis* isolée des eaux de surface et des eaux souterraines ($P \leq 0,05$). De même, une différence significative entre les

diamètres d'inhibition du Sulfaméthoxazole contre *Bacillus thuringiensis* des eaux de surface et des eaux souterraines a aussi été observée ($P \leq 0,05$). Entre les eaux de surface et les eaux de pluie, il existe des différences significatives entre les diamètres d'inhibition de la plupart des antibiotiques testés contre *Bacillus thuringiensis* ($P \leq 0,05$), à l'exception de l'Ofloxacin, l'ampicilline et l'amoxicilline. Il existe également des différences très significatives entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés contre *Bacillus thuringiensis* à l'exception de la gentamycine, l'amoxicilline et l'ampicilline.

Concernant les antibiotiques testés contre *Bacillus cereus*, il existe des différences significatives entre les diamètres d'inhibition des antibiotiques testés à l'exception de la tétracycline entre les eaux de surface et les eaux souterraines ($P \leq 0,05$). Entre les eaux de surface et les eaux de pluie, la tétracycline et l'ampicilline présentent des différences significatives ($P \leq 0,05$) entre les diamètres d'inhibition des eaux souterraines et des eaux de pluie.

Tableau XXIII : Comparaison à partir du test « U » de Mann-Whitney entre les différents biotopes aquatiques

| Antibiotiques testés | Espèces bactériennes | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|--------------------------|---------|--------|--------------------------------|---------|-------|
| | <i>B. thuringiensis</i> | | | <i>B. cereus</i> | | | <i>Bacillus subtilis</i> | | | <i>Clostridium perfringens</i> | | |
| | SW/GW | SW/RW | GW/RW | SW/GW | SW/RW | GW/RW | SW/GW | SW/RW | GW/RW | SW/GW | SW/RW | GW/RW |
| Imipenème | 0,118 | 0,000** | 0,003** | 0,000** | 0,951 | 0,000** | 0,006** | 0,000** | 0,159 | 0,002** | 0,000** | 0,665 |
| Gentamycine | 0,597 | 0,013* | 0,050 | 0,035* | 0,091 | 0,021* | 0,000** | 0,011* | 0,645 | 0,002** | 0,000** | 0,932 |
| Amikacine | 0,009** | 0,000** | 0,002* | 0,002** | 0,390 | 0,036* | 0,249 | 0,646 | 0,517 | 0,058 | 0,000** | 0,146 |
| Ofloxacine | 0,000** | 0,668 | 0,001** | 0,000** | 0,854 | 0,003** | 0,045* | 0,032* | 0,538 | 0,002** | 0,000** | 0,302 |
| Ciprofloxacine | 0,000** | 0,000** | 0,009** | 0,000** | 0,061 | 0,005** | 0,418 | 0,001** | 0,043* | 0,368 | 0,139 | 1,000 |
| Sulfaméthoxazole | 0,040* | 0,001** | 0,091 | 0,028* | 0,828 | 0,080 | 0,001** | 0,806 | 0,121 | 0,002** | 0,000** | 0,303 |
| Tétracycline | 0,000** | 0,000** | 0,007* | 0,584 | 0,000** | 0,001** | 0,266 | 0,902 | 0,481 | 0,008 | 0,001** | 0,731 |
| Ampicilline | 0,702 | 0,926 | 0,441 | 0,000** | 0,037* | 0,012* | 0,864 | 0,139 | 0,092 | 0,002** | 0,000** | 0,345 |
| Amoxicilline | 0,281 | 0,569 | 0,569 | 0,000** | 0,358 | 0,011* | 0,068 | 0,086 | 0,711 | 0,006** | 0,000** | 0,541 |

** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

SW=Eau de surface ; GW= Eau souterraine ; RW= Eau de pluie

III.1.10. Comparaison dans chaque condition expérimentale, des abondances des microorganismes cultivables en présence d'extraits de *M. oleifera*

III.1.10.1. Cas des espèces bactériennes isolées des eaux de surface

*Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation

Une comparaison des abondances cellulaires entre 23 °C et 37 °C a été réalisée pour chaque type et concentration d'extrait en considérant toutes les durées d'incubation. Il a été noté que les abondances de cellules d'une température d'incubation à l'autre sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour l'extrait aqueux à la concentration 1g/L lorsque les cellules de *C. perfringens* étaient présentes et pour l'extrait hydro-éthanolique à la concentration de 2 g/L lorsque les cellules de *B. thuringiensis* étaient présentes (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait

| Espèces bactériennes | Types d'extrait et concentration | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------------|--------|-------|--------------------------|-------|--------|---------------|
| | Extrait aqueux | | | | Extrait hydroéthanolique | | | |
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0,248 | 0,773 | 0,083 | 0,083 | 1,000 | 1,000 | 0,564 | 0,043* |
| <i>B. cereus</i> | 0,248 | 0,773 | 0,386 | 0,773 | 0,564 | 0,885 | 0,773 | 0,191 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,564 | 0,248 | 0,564 | 1,000 | 0,248 | 0,386 | 0,248 | 1,000 |
| <i>C. perfringens</i> | 0,083 | 0,043* | 0,309 | 0,384 | 0,386 | 0,457 | 0,561 | 0,166 |

Ddl=1 ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

*Comparaison des abondances bactériennes entre extrait aqueux et extrait hydroéthanolique

En considérant l'ensemble des températures et des périodes d'incubation, une comparaison des abondances cellulaires d'un type d'extrait à l'autre a également été réalisée, et ce pour chaque concentration d'extrait. Il a été noté que les abondances de cellules entre l'extrait aqueux et l'extrait hydro-éthanolique différaient significativement ($P < 0,05$), à l'exception de la concentration de 0,5 g/L lorsque les cellules de *B. cereus* et *B. subtilis* étaient présentes et la concentration de 2g/L lorsque les cellules de *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *C. perfringens* étaient présentes (Tableau XXV).

Tableau XXV : Comparaison des abondances bactériennes entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration

| Espèces bactériennes | Concentrations d'extraits | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------|---------|---------|
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0,003** | 0,003** | 0,001** | 0,156 |
| <i>B. cereus</i> | 0,074 | 0,024* | 0,021* | 0,528 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,172 | 0,012* | 0,006** | 0,002** |
| <i>C. perfringens</i> | 0,006** | 0,001** | 0,003** | 0,106 |

Ddl=1 ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

III.1.10.2. Cas des espèces bactériennes isolées des eaux souterraines

*Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation

Une comparaison des abondances cellulaires entre 23 °C et 37 °C a été réalisée pour chaque type et concentration d'extrait en considérant toutes les durées d'incubation. Il a été noté que les abondances de cellules d'une température d'incubation à l'autre sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour l'extrait aqueux à la concentration 1g/L et 2g/L lorsque les cellules de *B. subtilis* et *B. cereus*, *C. perfringens* étaient présentes respectivement et pour l'extrait hydro-éthanolique à la concentration de 0,5 g/L lorsque les cellules de *B. cereus* étaient présentes (Tableau XXVI).

Tableau XXVI : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait

| Espèces bactériennes | Types et concentrations d'extrait | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------|--------|---------------|--------------------------|-------|--------|-------|
| | Extrait aqueux | | | | Extrait hydroéthanolique | | | |
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,386 | 0,248 | 0,773 | 0,773 |
| <i>B. cereus</i> | 0,100 | 0,191 | 0,468 | 0,021* | 0,043* | 0,083 | 0,386 | 0,386 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,309 | 0,043* | 0,773 | 0,248 | 0,386 | 0,083 | 0,773 | 0,564 |
| <i>B. lentus</i> | 0,149 | 0,773 | 0,564 | 0,149 | 0,149 | 0,386 | 0,083 | 0,139 |
| <i>B. licheniformis</i> | 0,386 | 0,386 | 0,149 | 0,386 | 0,386 | 0,248 | 0,564 | 0,564 |
| <i>C. perfringens</i> | 0,309 | 0,773 | 0,554 | 0,021* | 0,149 | 0,773 | 0,142 | 0,538 |

Ddl=1 ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

***Comparaison des abondances bactériennes entre extrait aqueux et extrait hydroéthanolique**

En considérant l'ensemble des températures et des périodes d'incubation, une comparaison des abondances cellulaires d'un type d'extrait à l'autre a également été réalisée, et ce pour chaque concentration d'extrait. Il a été noté que les abondances de cellules entre l'extrait aqueux et l'extrait hydro-éthanolique différaient significativement ($P < 0,05$), à l'exception de toutes les concentrations lorsque les cellules de *B. cereus* et *B. subtilis* étaient présentes, aux concentrations 1 ; 1,5 et 2g/L lorsque les cellules de *B. licheniformis* étaient présentes et à la concentration de 2g/L lorsque les cellules de *B. lentus* étaient présentes (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : Comparaison des abondances entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration

| Espèces bactériennes | Concentrations d'extraits | | | |
|-------------------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0,012* | 0,009** | 0,016* | 0,027* |
| <i>B. cereus</i> | 0,563 | 0,248 | 1,000 | 0,916 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,172 | 0,529 | 0,345 | 0,270 |
| <i>B. lentus</i> | 0,001** | 0,001** | 0,003** | 0,206 |
| <i>B. licheniformis</i> | 0,016* | 0,093 | 0,093 | 0,172 |
| <i>C. perfringens</i> | 0,007** | 0,002** | 0,027* | 0,001** |

Ddl=1 ** : corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

II.1.10.3. Cas des espèces bactériennes isolées des eaux de pluies

***Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation**

Une comparaison des abondances cellulaires entre 23 °C et 37 °C a été réalisée pour chaque type et concentration d'extrait en considérant toutes les durées d'incubation. Il a été noté que les abondances de cellules d'une température d'incubation à l'autre sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour l'extrait hydro-éthanolique à la concentration de 1,5 g/L lorsque les cellules de *B. thuringiensis* et *C. perfringens* étaient présentes et à la concentration de 2g/L lorsque les cellules de *C. perfringens* étaient présentes (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Comparaison des abondances bactériennes entre les différentes températures d'incubation pour différents types d'extrait

| Espèces bactériennes | Types et concentration d'extrait | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-------|--------|-------|--------------------------|-------|---------------|---------------|
| | Extrait aqueux | | | | Extrait hydroéthanolique | | | |
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0,386 | 0,384 | 0,773 | 1,000 | 0,773 | 1,000 | 0,021* | 0,149 |
| <i>B. cereus</i> | 0,773 | 0,386 | 0,386 | 0,248 | 0,773 | 0,386 | 0,564 | 1,000 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,773 | 0,773 | 0,773 | 0,386 | 0,248 | 0,773 | 0,248 | 0,773 |
| <i>C. perfringens</i> | 0,248 | 0,773 | 0,083 | 0,248 | 0,564 | 0,386 | 0,043* | 0,014* |

Ddl=1 **: corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

***Comparaison des abondances bactériennes entre extrait aqueux et extrait hydroéthanolique**

En considérant l'ensemble des températures et des périodes d'incubation, une comparaison des abondances cellulaires d'un type d'extrait à l'autre a également été réalisée, et ce pour chaque concentration d'extrait. Il a été noté que les abondances de cellules entre l'extrait aqueux et l'extrait hydro-éthanolique différaient significativement ($P < 0,05$) à la concentration 1, 1,5 et 2g/L lorsque les cellules de *C. perfringens* étaient présentes et à la concentration de 2g/L lorsque les cellules de *Bacillus subtilis* étaient présentes (Tableau XXVIX).

Tableau XXIX : Comparaison des abondances entre extrait aqueux et hydroéthanolique pour toutes les températures et à chaque concentration

| Espèces bactériennes | Concentrations d'extraits | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0,5g/L | 1g/L | 1,5g/L | 2g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0,600 | 0,430 | 0,128 | 0,141 |
| <i>B. cereus</i> | 0,318 | 0,834 | 0,753 | 0,529 |
| <i>B. subtilis</i> | 0,294 | 0,462 | 0,208 | 0,006* |
| <i>C. perfringens</i> | 0,227 | 0,018* | 0,012* | 0,008* |

Ddl=1 **: corrélation significative au niveau 0,01 (bilatéral) ; * : corrélation significative au niveau 0,05 (bilatéral)

III.2. Discussion

III.2.1. Abondances des germes bactériens dans différents biotopes aquatiques

L'analyse bactériologique réalisée à partir des échantillons d'eau recueillis au cours de la période d'étude a montré que ces eaux contiennent des bactéries sporulantes. Au cours de l'étude, 2 genres bactériens ont été identifiés dans tous les biotopes aquatiques. Il s'agit des genres *Bacillus* et *Clostridium*. Les espèces issues de ces 2 genres ont été retrouvées dans presque toutes les stations des différents biotopes aquatiques considérés. Ces résultats rejoignent ceux d'Ait Kaki (2014), qui ont démontré que ces bactéries étaient très abondantes dans l'environnement (sols, eaux entre autres) par leur caractère ubiquiste. Les résultats similaires ont été obtenus par Bencheikh Souad (2017) qui a montré que les eaux superficielles de la région de Guelma en Algérie hébergeaient les espèces de *Bacillus*. On constate que les eaux de surface, pluie et de puits échantillonnées abritent les BHAM. Les espèces du genre *Bacillus* rencontrées étaient : *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus lentus*. Celle du genre *Clostridium* était *Clostridium perfringens*. Ces germes sont des bactéries sporulées se trouvant en proportions variables dans les différents biotopes aquatiques. Ces résultats sont similaires à ceux d'Anses (2011) montrant la distribution des différentes espèces de *Bacillus* en milieu aquatique.

Les fortes abondances enregistrées dans les stations d'eaux de surface seraient liées à la mauvaise qualité des eaux usées qu'elles reçoivent. Menye *et al.* (2012) ont en effet indiqué que les eaux usées rejetées dans la rivière du Mfoundi (Yaoundé, Cameroun) favorisent une croissance des bactéries car elles sont riches en nutriments et en matières organiques nécessaires à la survie et à la croissance de celles-ci. Concernant l'abondance bactérienne des eaux souterraines, certains auteurs ont indiqué que les micro-organismes récupérés au niveau du sol ne sont pas significativement différents de ceux trouvés à une altitude relativement plus élevée (238 m), suggérant ainsi l'apparition d'un large mélange atmosphérique (Li *et al.*, 2010). Brillard *et al.* (2014) ont étudié la pluie et les eaux souterraines étroitement liées au *B. cereus*. Ils ont constaté la présence de cette espèce bactérienne essentiellement sous forme de spores, dans tous les compartiments testés. Lors d'épisodes pluvieux, les lixiviats collectés après transfert à travers le sol ont finalement atteint les eaux souterraines et ont été chargés en *B. cereus*. Dans les échantillons d'eau souterraine, les spores nouvellement introduites d'une souche de *B. cereus* ont pu germer et les cellules végétatives résultant de cet événement ont été détectées pendant jusqu'à 50 jours (Brillard *et al.*, 2014).

Il a été constaté que l'impact des propriétés de l'eau de pluie sur celles des eaux souterraines est significatif au bout de quelques semaines à un mois, bien qu'en fonction de la profondeur de la nappe phréatique (Nola *et al.*, 2000 ; sugiwama *et al.*, 2016).

Dans cette étude, il a été noté que l'abondance bactérienne a subi des variations spatio-temporelles dans les trois milieux. Les micro-organismes présents dans l'eau de pluie doivent être contenus dans les aérosols. Selon Tignat-Perrier *et al.* (2019), les communautés microbiennes aéroportées semblent être le résultat d'apports importants provenant des sources proches avec d'éventuels apports faibles et dilués provenant des sources distantes. La plupart des micro-organismes en suspension dans l'air seraient transportés avec des fractions granulométriques supérieures à 10 μm de diamètre aérodynamique.

Les communautés bactériennes aéroportées semblent être en changement permanent et ce changement est fonction de l'emplacement et de l'utilisation des terres autour du point d'échantillonnage (Bowers *et al.*, 2011), ainsi que d'un ensemble complexe de facteurs environnementaux, notamment des changements dans les conditions atmosphériques et des changements dans l'importance relative des sources microbiennes disponibles, peut agir pour contrôler sa composition (Bowers *et al.*, 2013). Les changements temporels dans la composition de la communauté microbienne pourraient parfois être liés à l'origine différente des masses d'air (Jeon *et al.*, 2011 ; Gandolfi *et al.*, 2013) mais cela semble possible uniquement lorsque les masses d'air situées au même endroit proviennent d'environnements clairement différents. La variation spatio-temporelle de la composition bactérienne des échantillons d'eau de pluie a également été notée par Cheol Cho & Jang, (2014) et ils ont suggéré qu'elle pourrait être attribuée à un phénomène local et à la variabilité spatiale des gamma-bactéries aérosolisées capturées par la pluie qui est dépendante des saisons.

La stabilité temporelle de la composition des communautés microbiennes aéroportées s'explique principalement par la diversité et l'uniformité des paysages environnants et par la variabilité de la direction du vent dans le temps (Tignat *et al.*, 2019). Cheol Cho & Jang (2014) ont analysé la teneur en ATP dans la fraction bactérienne de l'eau de pluie et les résultats suggèrent que les bactéries de l'eau de pluie étaient métaboliquement actives.

La variation de l'abondance bactérienne de l'eau de pluie notée dans cette étude pourrait être liée à des facteurs environnementaux du cycle journalier. Gusareva *et al.* (2019) ont en effet noté que les organismes microbiens en suspension dans l'air suivaient un cycle journalier clair,

probablement motivé par des facteurs environnementaux. La diversité taxonomique inter journalière dépassait la variation quotidienne et mensuelle.

III.2.2. Impact des paramètres abiotiques des eaux sur l'abondance des bactéries sporulantes isolées

La température moyenne des eaux de surface a été de 24,45°C, celle des eaux souterraines (24,28°C) ces résultats corroborent ceux obtenus par Diane *et al.* (2020) dans les eaux souterraines de Yaoundé. Quant à la température des eaux de pluie, la valeur moyenne a été de (25,74°C). La température des eaux de pluie a été plus élevée et se justifierait par la variation de la température ambiante de l'environnement et des échanges avec l'atmosphère. Ces valeurs de température enregistrées dans les différents biotopes aquatiques seraient favorables à la croissance des bactéries car se situant autour de la température ambiante (Bouteleux, 2005). Selon Chippaux *et al.* (2007), une température de l'eau comprise entre 25 et 28°C serait idéale pour la productivité microbienne.

Il a été constaté que la quasi-totalité des stations d'échantillonnage des eaux de surface ont eu un pH légèrement alcalin (7,9), tandis que celui des eaux souterraines et de pluie a été légèrement acide (6,3). Ces résultats sont similaires à ceux de Takem *et al.* (2010) qui ont montré que l'acidité constante des eaux souterraines serait liée à la minéralogie de la roche réservoir qui héberge la nappe phréatique. Dans la région de Yaoundé, le substratum rocheux est riche en minéraux de nature acide. Toutefois, il a été établi que l'acidité des eaux souterraines en zones urbaines comme Douala et Yaoundé, peut résulter de l'expression d'une pollution organique (Nola *et al.*, 2001 ; Nougang *et al.*, 2011). Les valeurs de pH obtenues seraient idéales pour la croissance des bactéries sporulantes car selon Noah *et al.* (2021), le pH situé entre 6 et 8,5 U.C serait favorable pour l'expression du potentiel biologique de plusieurs groupes bactériens. Quant aux teneurs en CO₂, elles ont été élevées dans tous les biotopes considérés. En effet, la solubilité du dioxyde de carbone dans l'eau dépend de la pression partielle du gaz dans l'atmosphère, de la température de l'eau (la solubilité décroît avec l'élévation de la température) et de la concentration en sels dissous dans l'eau, celle-ci réduisant la solubilité des gaz (Rodier, 2009).

Les valeurs moyennes de la conductivité électrique dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluies ont été de 326 µS/cm, 357 µS/cm et 21µS/cm respectivement. Les eaux souterraines sont plus minéralisées par rapport aux autres types d'eau. D'après Mohamed *et al.* (2015), la forte minéralisation des eaux souterraines serait

principalement due aux mouvements verticaux entraînant un apport de flux minéralisé des parties plus profondes. Selon Ajeegah *et al.* (2018), la conductivité électrique des eaux de surface serait influencée par le niveau de dégradation de la matière organique présent dans l'environnement et par conséquent reflèterait le niveau de pollution.

Les valeurs moyennes des TDS ont été élevées dans les eaux de surface (163 mg/L) et les eaux souterraines (180 mg/L) et constitueraient un facteur de pollution de l'eau car sont des indicateurs des caractéristiques esthétiques et de la présence d'un large éventail de contaminants chimiques (Atekwanaa *et al.*, 2004). Ces résultats s'expliqueraient par la nature des rejets que ces eaux reçoivent qui sont généralement chargées des déchets provenant d'activités anthropiques (Taffouo *et al.*, 2017). Quant aux teneurs en nitrates et phosphates, les valeurs moyennes ont été plus élevées dans les eaux souterraines cela supposerait qu'il y'a la présence des charges organiques très élevées provenant soient des rejets domestiques et/ou hospitaliers, soient des activités anthropiques autour de ces biotopes (Atteia, 2005 ; Matini *et al.*, 2009).

Le test de comparaison « *H* » de Kruskal-Wallis réalisé entre les paramètres physico-chimiques, bactériologiques et météorologiques a montré que les nitrates, les phosphates et les MES ne présentaient aucune différence significative entre les différents biotopes aquatiques. Le test « *U* » de Mann-Whitney a montré des différences significatives entre le pH, l'O₂ Dissous, les TDS, la couleur et la conductivité électrique des eaux de surface et ceux des eaux souterraines. Des différences significatives entre la température le pH, les TDS, l'azote ammoniacal, la couleur et la conductivité électrique des eaux de surface et des eaux de pluie ont été notées. Ces différences ont été également notées entre la température, le pH, le CO₂ Dissous, l'O₂ Dissous, les TDS, l'azote ammoniacal et la conductivité électrique des eaux souterraines et des eaux de pluie. Par ailleurs, ces différences entre le pH, les TDS et la conductivité électrique de tous les couples de biotopes se justifieraient par le fait que le pH dépendrait de la nature de l'eau (Nola *et al.*, 2002). Celles de la conductivité électrique et TDS seraient dues à la quantité de sels inorganiques et la variation des matières dissoutes dans les différents milieux (Ajeegah *et al.*, 2018b).

Le test de corrélation « *r* » de Spearman établi entre les abondances des espèces bactériennes et les paramètres physico-chimiques des différents biotopes aquatiques a montré des liaisons significatives positives ou négatives ($P < 0,05$). Dans les eaux de surface, les TDS et la conductivité électrique ont présenté des liaisons significatives et positives avec les espèces *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus subtilis* montrant qu'ils auraient agi parallèlement sur la

croissance de ces espèces. Par contre, l'humidité relative et les MES ont agi inversement sur la croissance ces espèces.

Dans les eaux souterraines, plusieurs paramètres auraient agi parallèlement sur les espèces isolées. Le pH, l'O₂ Dissous et le CO₂ Dissous ont présenté des liaisons significatives et négatives avec l'espèce *Bacillus subtilis*. Ces résultats montrent que le métabolisme des bactéries a été modifié ceci selon le type d'ion présent dans le milieu (Chenel, 2011).

Dans les eaux de pluie, la température de l'air a agi significativement et positivement sur les abondances de *Bacillus thuringiensis*. Plusieurs paramètres tels que les phosphates, l'azote ammoniacal, la couleur, les phosphates, l'insolation et la température de l'air ont agi de façon significative et positive sur l'abondance des *Bacillus cereus*. D'après Alonso *et al.* (2022), ces paramètres joueraient un rôle important et sélectifs dans la croissance des bactéries car conditionneraient la prolifération exclusive de certaines espèces dans un biotope donné. (Maron *et al.*, 2006 ; Bowers *et al.*, 2012) ont indiqué que la température de l'air et l'humidité relative sont le plus souvent les facteurs qui ont façonné de manière significative les communautés microbiennes. Le pH a présenté une liaison significative et négative avec les abondances de *Bacillus subtilis*. Ce résultat pourrait s'expliquer d'après Alonso *et al.* (2022) par la modification de la membrane cytoplasmique des espèces bactériennes ne pouvant plus assurer la régulation des ions H⁺.

L'impact significatif des paramètres microbiologiques et chimiques des eaux de pluie sur les propriétés biotiques des eaux souterraines et de surface a varié d'un paramètre à l'autre. En effet par temps de pluies, les eaux de ruissellement se chargent de bactéries du sol et des eaux usées dans les régions où l'assainissement est faible ou inexistant, et s'infiltrent dans le sol pour recharger la nappe sous-jacente. Cette infiltration peut multiplier la charge bactérienne des eaux souterraines et superficielles d'un facteur de 100 durant les précipitations (Curriero *et al.*, 2001). D'après Codex Alimentarius (2021), la pluie et les eaux de ruissellement sont responsables de la dissémination des polluants dans l'environnement. En effet, le sol peut être un réservoir pour les germes pathogènes. Ces germes circulent relativement peu dans les sols or, en saison des pluies lors des infiltrations des eaux de ruissellement, ces germes peuvent se retrouver dans les nappes et les eaux de surface. Ce transfert des microorganismes vers les nappes ou les eaux de surface dépend de la nature des sols (Mba *et al.*, 2019). Cela suggère que, ce sont les propriétés des sols, leur capacité à retenir l'eau, leur sensibilité au ruissellement qui déterminent le potentiel de transfert des bactéries.

III.2.3. Susceptibilité des bactéries sporulantes identifiées aux antibiotiques

Les espèces de *Bacillus* et *Clostridium* ont montré un pourcentage très élevé de résistance aux antibiotiques de différentes familles. Dans la famille des β -lactamines, les pourcentages de résistance aux antibiotiques des espèces de *Bacillus* isolées ont été de 77,08% ; de 78,75% et de 90,27% respectivement chez les espèces isolées des eaux de surface, des souterraines et des eaux de pluie. Les pourcentages de résistance aux antibiotiques de l'espèce *Clostridium perfringens* isolée ont été de 77,08% ; de 66,66% et de 66,66% respectivement chez les espèces isolées des eaux de surface, des souterraines et des eaux de pluie. Selon Nikolaidis *et al.* (2014), les principales raisons pour lesquelles les bactéries à Gram positif développent une résistance aux antibiotiques β -lactamines comprennent les mutations des protéines natives liant la pénicilline (PBP), leur hyperproduction et la synthèse de nouvelles PBP ne répondant pas à l'inhibition par les β -lactames.

Dans la famille des aminosides, les pourcentages de résistance aux antibiotiques des espèces de *Bacillus* isolées dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie ont été de 66,54% ; de 54,86% et de 77,08% respectivement. Ceux de l'espèce *Clostridium* ont été de 65,63% ; de 0% isolées des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluie respectivement. La présence des souches résistantes notée dans le cadre de cette étude pourrait s'expliquer par l'origine des effluents que ces eaux reçoivent à savoir les rejets hospitaliers et communautaires hébergeant des bactéries ayant développé les mécanismes de résistance suite à la présence des antibiotiques dans l'environnement aquatique.

Dans la famille des quinolones, les *Bacillus* ont enregistré des pourcentages de résistance de 40,18% ; de 42,36% et de 60,41% respectivement chez les espèces isolées dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. L'espèce *Clostridium* quant à lui a enregistré des pourcentages de 53,13% ; de 50% et de 50% dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux de Cattoir & Nordmann, (2009) qui ont montré que la résistance aux antibiotiques de la famille des Quinolones serait due à l'acquisition des mécanismes de résistance parmi lesquelles la résistance plasmidique qui est le mécanisme le plus développé chez les entérobactéries vis-à-vis des Quinolones. Cette résistance observée pourrait également être le résultat d'une mutation chromosomique entraînant une altération des enzymes cibles bactériennes (Muylaert & Mainil, 2013).

Dans la famille des Sulfamides, les pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été de 91,66% ; de 95% et de 87,5% respectivement chez les espèces de *Bacillus* isolées dans

les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Chez l'espèce de *Clostridium*, les pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été de 100% ; de 0% et de 0% respectivement isolée des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluie. Les sulfamides sont les antibiotiques auxquels les bactéries sont généralement sensibles ; cependant, dans cette étude, il y avait un niveau élevé de résistance. La cible des sulfamides chez les bactéries est l'enzyme dihydroptéroate synthase. Il est impliqué dans la synthèse bactérienne du coenzyme vital, l'acide folique. Les sulfamides entrent en compétition avec le substrat normal de l'enzyme, l'acide p-aminobenzoïque, lors de la formation du dihydroptéroate qui, après ajout d'acide glutamique, donne de l'acide folique (Sköld 2010). Une diminution de la perméabilité membranaire ou l'acquisition de plasmides ou de transposons résistants pourraient contribuer à la perte de sensibilité (Chelkia 2019). La résistance notée serait due à un mécanisme génétique de la résistance acquise avec la présence des intégrons de classe 1 (sul1) qui portent souvent des cassettes de résistance à la streptomycine et au Triméthoprim (Tani & Arlet 2014).

Dans la famille des cyclines, les pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été de 18,75% ; de 15% et de 75% respectivement chez les espèces de *Bacillus* isolées dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie. Chez l'espèce de *Clostridium*, les pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été de 100% ; de 100% et de 100% respectivement isolée des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluie.

Les espèces isolées de différents types d'eau étaient très résistantes à plusieurs antibiotiques utilisés. Cela refléterait la résistance multi-drogues. Egorov *et al.* (2018) ont indiqué que depuis que la synthèse d'antibiotiques existait dans la nature (plus de 2 milliards d'années), les bactéries ont développé des mécanismes de résistance à leur action toxique. La résistance peut survenir comme un processus adaptatif sans rapport avec la structure d'un antibiotique ou se développer à la suite de la sélection de souches résistantes de micro-organismes sous l'influence d'antibiotiques. La résistance aux antibiotiques peut survenir via trois mécanismes généraux : la prévention de l'interaction du médicament avec la cible, l'efflux de l'antibiotique de la cellule et la destruction ou la modification directe du composé (Wright 2005). La résistance intrinsèque aux antibiotiques (propriétés structurelles ou fonctionnelles partagées au sein d'une espèce bactérienne indépendamment d'une exposition antérieure aux antibiotiques) et la résistance acquise aux antibiotiques sont également connues (Duarte 2022). Les mécanismes de résistance acquis incluent la modification des cibles antibiotiques par mutation génétique ou modification post-traductionnelle de la cible (Nadeem *et al.*, 2020 ;

Uluseker *et al.* 2021 ; Duarte *et al.*, 2022). Les bactéries pourraient également devenir résistantes aux antibiotiques via (i) des modifications de la paroi cellulaire ou de la membrane externe, réduisant la perméabilité à la substance antibiotique, (ii) l'expression d'enzymes de dégradation pouvant rendre la substance inoffensive, (iii) la protection de la cible moléculaire de l'antibiotique en empêchant l'antibiotique de pénétrer dans la cellule ou en le pompant plus rapidement qu'il ne peut y entrer, ou (iv) des modifications du site d'action primaire et la production d'une cible alternative (généralement une enzyme) qui résiste à l'inhibition par l'antibiotique (Arzanlou *et al.*, 2017 ; Bengtsson-Palme *et al.*, 2018 ; Perry *et al.*, 2021). Le rôle des enzymes bactériennes dans le développement de la résistance est plutôt polyvalent et implique plusieurs mécanismes clés (Wright 2005 ; Egorov *et al.*, 2018). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire, ainsi que dans la synthèse des acides nucléiques et des métabolites, constituent une cible directe pour les antibiotiques.

La résistance notée chez les espèces isolées dans les eaux souterraines serait due à l'infiltration dans l'aquifère des effluents communautaires contenant des gènes de résistance qui se sont développés suite à une consommation excessive des antibiotiques (Muhammad *et al.*, 2022). Les fortes valeurs de résistance témoigneraient du phénomène de multirésistance à travers l'augmentation des bactéries résistantes dans l'environnement qui constituent un grand fléau sanitaire mondial (Ebongue *et al.*, 2014 ; Hayward *et al.*, 2020). De nombreuses souches isolées de l'eau de pluie étaient également résistantes à de nombreux antibiotiques. Certaines études ont été réalisées sur la sensibilité aux antibiotiques des micro-organismes présents dans les bioaérosols. Ils ont noté que certains aérosols bactériens cultivables dans l'air pollué étaient résistants à la vancomycine, tandis que d'autres étaient sensibles à l'ampicilline (β -lactamines). Et la plupart d'entre eux ont des modèles de distribution différents des gènes de résistance aux antibiotiques (Wang *et al.*, 2022).

Travaillant sur les gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) et la sensibilité aux antibiotiques dans les aérosols bactériens, Wang *et al.* (2022) ont noté que l'air représente un réservoir actif important de divers ARG. Ils ont observé que 24,66 % des aérosols bactériens cultivables dans l'air pollué étaient résistants à la vancomycine (un des antibiotiques les plus puissants à ce jour). Selon Chen *et al.* (2022), les gènes de résistance aux antibiotiques présents dans les aérosols sont nombreux, y compris les activités humaines telles que les usines de traitement des eaux usées, les eaux grises, les décharges municipales de déchets solides, les élevages de bétail, l'industrie médicale et les phénomènes naturels tels que les éruptions volcaniques.

III.2.4. Activité des extraits de *M. oleifera* sur les bactéries identifiées

L'activité antimicrobienne des différents extraits de *Moringa oleifera* a été évaluée sur les souches microbiennes isolées des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluies. Ces différentes souches microbiennes ont été isolées par la méthode d'étalement à la surface des milieux gélosés spécifiques. Une variation temporelle des abondances des cellules bactériennes en présence des extraits aqueux et hydroéthanolique de *Moringa oleifera* a été observée. Cette variation dépend de plusieurs facteurs tels la concentration de l'extrait de plante, les types d'extraits, mais aussi des paramètres associés tels que la température d'incubation.

L'activité des extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Moringa oleifera* sur la survie des espèces considérées tels que *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* et *Clostridium perfringens* a été évalué par l'activité antibactérienne de ces microorganismes. En générale une réduction importante des microorganismes en présence des extraits aqueux et éthanoïques de *Moringa oleifera* a été notée, avec les gammes de concentrations choisies. Des variations temporelles des abondances des cellules microbiennes en présence des extraits sur les souches microbiennes testées ont été observées. Ces variations étaient dépendantes des concentrations d'extraits, du type d'extrait, et des températures d'incubation.

Tous les extraits se sont révélés être actifs aux concentrations différentes sur les souches microbiennes. Mais l'extrait hydroéthanolique s'est avéré plus actif et cela aux concentrations 1 et 2g/L pour la majorité des espèces isolées des différents biotopes et ceci peu importe la température d'incubation. On observe qu'en présence des extraits des feuilles de *M. oleifera*, les abondances cellulaires des espèces considérées sont ralenties. Le ralentissement semble s'accroître avec l'augmentation de la concentration des extraits. Cela serait lié aux composés chimiques présents dans les extraits. Les composés chimiques identifiés dans les extraits comprennent la glucomoringinine qui appartient à la classe des glucosinolates, l'acide néochlorogénique qui appartient à la classe des acides phénoliques, l'ester méthylique de l'O-acétylshanzhiside, qui appartient à la classe des iridoïdes, l'isoquercétine, le kaempférol acétyl glucoside et le kaempférol-3-O. -glucoside qui appartiennent respectivement aux classes des flavonoïdes et des hétérosides flavonoïdes. Certains de ces composés auraient des effets antibactériens sur les bactéries à Gram positif.

L'effet inhibiteur des composés phénoliques contre la croissance des agents pathogènes humains à Gram positif *Bacillus cereus*, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* a été indiquée par Metsamuuronen & Siren (2019). Cela pourrait être dû à leur capacité à former un complexe avec la paroi cellulaire bactérienne, inhibant ainsi la croissance microbienne (Kozyra *et al.*, 2017). La perturbation des voies métaboliques peut être le principal mode d'action (Erguden & Unver, 2022). La lipophilie des composés phénoliques peut être l'un des facteurs déterminants de leur potentiel antimicrobien ; leur plus grande lipophilie, leur plus grande capacité d'inhibition (Kauffmann & Castro, 2023).

Il a été rapporté que les glucosinolates expriment une large gamme d'activités d'inhibition de la croissance contre les bactéries à Gram positif ainsi que contre les bactéries à Gram négatif et les champignons (Blazevic *et al.*, 2010). Ils seraient plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram négatif, et ils augmenteraient spécifiquement l'oxydation et l'inhibition des protéines/enzymes essentielles conduisant à la mort des cellules bactériennes (Aires *et al.*, 2009).

Les flavonoïdes exercent des effets antibactériens en perturbant l'intégrité cellulaire. Il a également été suggéré que les flavonoïdes peuvent affecter la respiration bactérienne et interférer avec le métabolisme énergétique en inhibant l'activité de la cytochrome c réductase chez certaines bactéries à Gram positif (Dzoyem *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2022). Leurs activités antimicrobiennes ne seraient pas liées à leur structure particulière, mais pourraient être liées à leurs polarités ou à leurs coefficients de partage lipide-eau (Yuan *et al.*, 2021). Les activités inhibitrices des flavonoïdes sur les bactéries à Gram positif augmentent de manière non linéaire dans la plupart des cas (Yuan *et al.*, 2021). Le kaempférol, bien qu'ayant des effets sur les maladies du système nerveux central (Silva dos Santos *et al.*, 2021), a également des effets sur les cellules bactériennes. Il a un effet néfaste sur la paroi cellulaire ou la membrane cellulaire, entraînant finalement une fuite du contenu et la mort cellulaire (Li *et al.*, 2022). Il inhibe également l'ADN gyrase chez certaines bactéries à Gram positif (Periferakis *et al.*, 2022).

De plus, la diminution de l'abondance cellulaire n'était dans la plupart des cas pas toujours proportionnelle aux durées d'incubation ou aux concentrations de l'extrait. Ceci serait probablement lié à la présence de certains composés qui pourraient servir de nutriments à la croissance des cellules, comme le saccharose (hétéroside) présent dans les extraits. Tian *et al.* (2021) ont montré en effet que le saccharose induit une motilité de surface solide robuste de *Bacillus* en déclenchant une cascade de signalisation, d'abord par la synthèse extracellulaire de lévane polymère, qui à son tour stimule une forte production de surfactine et une hyper-

flagellation des cellules, et favorise la croissance des cellules. Par ailleurs, certains auteurs ont indiqué que le type d'extrait pour une même partie de plante varie selon le micro-organisme à neutraliser chez le patient, probablement en raison de la variation de diversité des molécules antimicrobiennes qui seront diffusées (Hadis *et al.*, 2020 ; Tavares *et al.*, 2021). Cela expliquerait une différence substantielle entre l'extrait aqueux et l'extrait hydro-éthanolique, conduisant à la différence substantielle observée entre leurs deux activités. La libération dans le milieu de ces ingrédients de croissance cellulaire en quantité et en qualité, ainsi que d'autres ingrédients dotés de propriétés antimicrobiennes, subiraient des variations temporelles, et notamment dans le respect de l'ensemble des conditions d'incubation. Cela pourrait être la cause de l'absence de différence significative dans l'abondance des cellules constatée entre l'extrait aqueux et l'extrait hydro-éthanolique, ainsi qu'entre 23°C et 37°C d'incubation dans la plupart des cas.

A decorative border in a dark blue color, shaped like a scroll. It has a vertical strip on the left side that tapers at the top and bottom, and a horizontal strip at the top and bottom that tapers at the ends. The corners are rounded with a scroll-like flourish.

**CONCLUSION,
RECOMMANDATIONS
ET PERSPECTIVES**

CONCLUSION

Il était question de déterminer la diversité et la dynamique des abondances des bactéries sporulantes dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie, puis d'évaluer leur susceptibilité à quelques antimicrobiens ainsi que l'influence des facteurs abiotiques sur la dynamique des abondances des bactéries isolées dans ces biotopes aquatiques.

Les caractéristiques physicochimiques de ces différents plans d'eaux ont montré qu'ils sont de mauvaise qualité et constituent un risque sanitaire pour les populations utilisatrices. Il ressort des analyses bactériologiques que les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie hébergent les bactéries sporulantes aux abondances variables dans le temps. Les abondances de ces bactéries subissent des variations spatio-temporelles. Ces abondances ont été relativement élevées dans les eaux de surface que dans les eaux souterraines et les eaux de pluie. Plusieurs espèces de bactéries sporulantes ont été identifiées. Il s'agit de *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus* et *Clostridium perfringens*. Dans les eaux de pluies, les eaux souterraines et les eaux de surfaces, les degrés de corrélation entre les facteurs météorologiques ou chimiques et la dynamique d'abondance bactérienne varient selon le paramètre abiotique et l'espèce bactérienne considérés. Les relations entre les données météorologiques et les propriétés des eaux de pluies du mois précédent sur la dynamique d'abondance de la microflore des eaux de surface et de puits du mois en cours montrent une diversité de degrés d'impact. Cela signifierait que même si les eaux de pluies alimentent les eaux de surface et celles de la nappe phréatique, les propriétés générales de ces dernières résulteraient des interactions des facteurs de confusion. L'utilisation de ces eaux présente des risques sanitaires à court terme pour les populations.

Les antibiogrammes ont montré que les souches des différentes espèces expriment des résistances à la majorité des antibiotiques testés. Les diamètres d'inhibition de la plupart des antibiotiques vis-à-vis de chacune des espèces bactériennes ont significativement varié ($P < 0,05$) entre les différents biotopes aquatiques. Les souches de *Bacillus* et *Clostridium* trouvées dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluie présentent divers profils de sensibilité contre l'Imipénème (famille des β -Lactamines), l'Amikacine et la Gentamycine (famille des Aminosides), la Ciprofloxacine et l'Ofloxacine (famille des Quinolones), le Sulfaméthoxazole (famille des Sulfamides) et la Tétracycline (famille des Cyclines). Toutes ces souches ont été multirésistantes.

En présence des extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles de *M. oleifera*, l'abondance des cellules bactériennes sporulantes cultivables isolées des 3 types de biotopes a diminué. Les bactéries du genre *Bacillus* ont subi de relatives inhibitions aux différentes concentrations d'extraits après toutes les périodes d'incubation et aux températures 23 °C et 37°C. L'espèce *Clostridium perfringens* a semblé sensible aux extraits hydroéthanoliques de concentrations 1,5 et 2g/L après 6h et 24h d'incubation. Dans l'ensemble, les diminutions des abondances des bactéries sporulantes identifiées a semblé s'accroître avec l'augmentation de la concentration des extraits. Le ralentissement du métabolisme de ces bactéries en présence des extraits des feuilles de *M. oleifera* serait consécutif à la présence de certains composés antimicrobiens identifiés appartenant pour la plupart à la classe des acides phénoliques, des glucosinates, des iridoïdes et des flavonoïdes. Les extraits aqueux et hydroéthanoliques de feuilles de *M. oleifera* pourraient, après des études complémentaires notamment de toxicologie, être exploités comme alternative au traitement microbiologique des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux de pluie principalement contre les bactéries *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *Clostridium perfringens* pour un usage domestique.

RECOMMANDATIONS

La présence des souches multirésistantes des bactéries sporulantes dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux de pluies pourrait causer des maladies résistantes à l'antibiothérapie, et entraîner l'augmentation du taux de morbidité chez les sujets infectés. Les solutions pour pallier à la dissémination des bactéries multirésistantes dans l'environnement ne résideront pas uniquement dans la recherche des nouvelles molécules d'antibiotiques actives sur ces bactéries, mais dans la prévention contre la diffusion de ces pathogènes résistants dans les eaux naturelles. De ce fait :

- les **pouvoirs publics** devraient veiller à l'adduction d'eau potable dans toute la localité afin de limiter l'usage des eaux de qualité douteuse par les populations, encourager les études complémentaires sur l'activité des extraits de *M. oleifera*, ainsi que sur d'autres plantes médicinales du pays ; Ces extraits pourraient être exploités comme alternative au traitement des eaux destinées à un usage domestique.

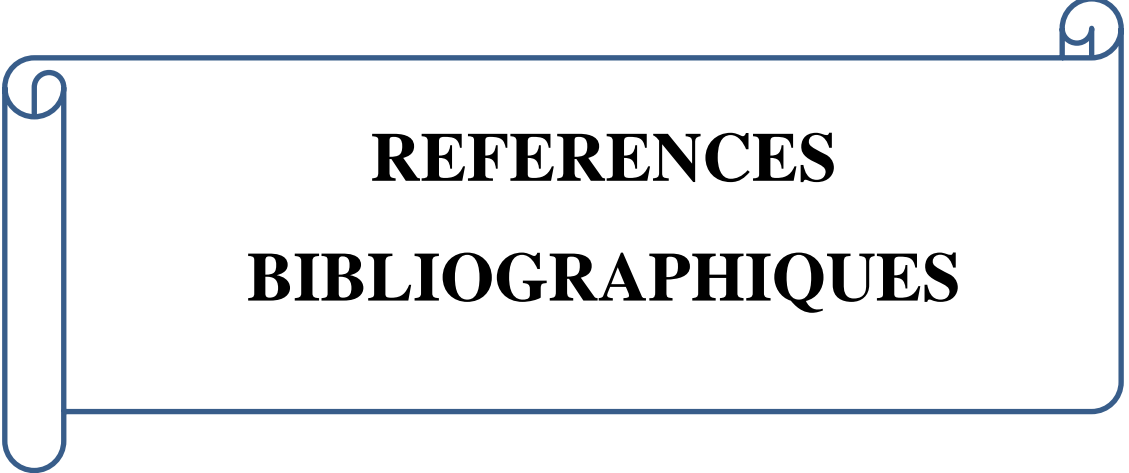
- les **institutions de recherches scientifiques** pourraient approfondir les recherches sur les mécanismes de résistance développés par les bactéries, et vulgariser les études faites afin de trouver des solutions palliatives ;

- les **populations** devraient respecter les mesures de protection des eaux souterraines et de procéder au traitement de toute eau d'origine douteuse avant sa consommation, éviter la pollution des eaux superficielles, pollution pouvant occasionner celles des eaux souterraines et limiter l'automédication aux antibiotiques car parfois source de l'antibiorésistance microbienne.

PERSPECTIVES

Afin d'approfondir les connaissances sur la résistance aux antibiotiques des souches des bactéries sporulantes, il serait judicieux :

- Rechercher les gènes de résistance chez ces bactéries sporulantes isolées de ces divers biotopes aquatiques ;
- Etablir les profils phylogénétiques des souches bactériennes isolées des trois biotopes ;
- Etendre le travail à d'autres bactéries environnementales d'importance sanitaire.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Hack M.E., Alqhtani A.H., Swelum A.A., El-Saadony M.T., Salem H.M., Babalghith A.O., Taha A.E., Ahmed O., Abdo M. & El-Tarabily K.A. (2022). Pharmacological, nutritional and antimicrobial uses of *Moringa oleifera* Lam. leaves in poultry nutrition: an updated knowledge. *Poultry Science*, 101, 102031. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102031>
- Abderrazak M. & Joël R. (2007). *La botanique d'A à Z*. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Aberra M., Workinesh T et Tegene N. (2011). Effects of feeding *Moringa stenopetala* leaf meal on nutrient intake and growth performance of Rhode Island Red chicks under tropical climate. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 485-492.
- Abulhamd A. (2010). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic Aeromonads. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 2 1(1): 90-95. Doi:10.7763/IJCEA.2010.V1.15.
- Adewoye L., Sutherland A. & Srikumar R. (2002). The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *Journal of Bacteriology*, 184 (12) :4308-4312.
- Agregé S., Belguith J. & Hadiji R. (2015). Généralités sur les Anti-infectieux, en médecine vétérinaire. Ecole Nationale de médecine vétérinaire Sidi thabet. pp 13-14.
- Aires A., Mota V.R., Saavedra M.J., Rosa E.A.S. & Bennett R.N. (2009). The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 2086-2095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04180.x>
- Ait Kaki A., (2014). Recherche de nouvelles potentialités des bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Thèse, Université de Liège. 113p.
- Ajeegah A., Mbainissem M., Njawouo P. & Ngakomo A. (2018). Physico-chemical and biological characterisation in peri-urban areas in Equatorial Africa: case of Ngoumou in the Center of Cameroon. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 23(1): 33-43.
- Al-Hinai M. A., Jones S. W. & Papoutsakis E. T. (2015). The *Clostridium* sporulation programs: Diversity and preservation of endospore differentiation. *Microbiology and Biology Reviews: MMBR*, 79(1), 19-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-14>
- Alignan M. (2006). Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 297p.
- Allen S.D. (2003). *Clostridium*. In: Murray, P.R. Baron, E.J.O Jorgensen, J.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed ; p. 835-856
- Alonso J.M., Bejot J. & Forterre P. « BACTÉRIES », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 24 mai 2022. URL: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/bacteries/>
- Amin M., Zeinab R. & Ahmady Z.A. (2015). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*; 2(1). e23233, ID: 86083865. Doi:10.17795/ajcm-23233.

- Angeles D. M. & Scheffers D. J. (2020). The Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Current Issues Molecular Biology* 2021, Vol. 41, Pages 539-596 41, 539–596. Doi : 10.21775/CIMB.041.539.
- Anses., (2011). *Bacillus cereus* - Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments. <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-FicheBacillusCereus.pdf> (consulté 02 février 2023)
- APHA: American Public Health Association (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition /American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Arora D.S., Onsare J.G. & Kaur H. (2013). Bioprospecting of Moringa (Moringaceae): Microbiological perspective, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1: 193-215.
- Arzanlou M., Chai W.C., Venter H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochemistry*; 61: 49-59. Doi:10.1042/EBC20160063.
- Atekwana E.A., Atekwana E.A., Roweb R.S., Werkema J.D., Dale D., Legalld & Franklyn D. (2004). La relation des mesures de solides dissous totaux à la conductivité électrique en vrac dans un aquifère contaminé par des hydrocarbures. *Journal of Applied Geophysics*, 56(4): 281-294.
- Atteia O. (2005). Chimie et pollution des eaux souterraines. Edition Lavoisier, TEC&DOC, 398 p.
- Aubert P., Guinobert I., Blondeau C., Bardot V., Ripoche I., Chalard P. & Neunlist M. (2019). Basal and spasmodic effects of a hydroethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L. on intestinal motility: An ex vivo study. *Journal of Medicinal Food*, 22(7), 653-662. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0154>
- Baechler L. (2012). La bonne gestion de l'eau : un enjeu majeur du développement durable, *Cain info*, Vol.3 (365), pp 3-21.
- Becton & Dickinson, (2014). Procédures de contrôle de qualité : KliglerIron Agar Slants. Dublin, France, 4 p.
- Beladjal L., Gheysens T., Clegg S.J., Amar M. & Mertens J. (2018) 'Life from the ashes: survival of dry bacterial spores after very high temperature exposure', *Extremophiles*. Springer Japan, 22(5), 751–759. doi: 10.1007/s00792-018-1035-6.
- Ben Salem H & Makkar H. (2009). Defatted *Moringa oleifera* seed meal as a feed additive for sheep, *Animal Feed Science and Technology* 50: 27-33.
- Bencheikh S.B.K. (2017). Etude de la métallosensibilité des bactéries isolées des eaux de surface de la région de Guelma. Mémoire, Université de Guelma, Algérie. 69p.
- Bengtsson-Palme J., Kristiansson E. & Joakim Larsson D.J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*; fux053, 42: 68-80. Doi:10.1093/femsre/fux053.

- Berendsen E. M., Boekhorst J., Kuipers P.O. & Wells-Bennik H.M. (2016) 'A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores', *ISME Journal. Nature Publishing Group*, 10(11), 2633–2642. doi: 10.1038/ismej.2016.59.
- Berreta C., Gnecco I., La Barbera P. & Lanza L.G. (2004). Monitoring first flush water quality under various anthropic activities. In : 5e conference Internationale Techniques et strategies durables pour la gestion urbaine des eaux pluviales par temps de pluie, Lyon, NOVATECH 2004, 177185.
- Bertani G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of Bacteriology*. 186 :595-600. PMID 14888646.
- Besnard A., & Salle, J. M. (2000). Suivi scientifique d'espèces animales. Aspects méthodologiques essentiels pour l'élaboration de protocoles de suivis. Note méthodologique à l'usage des gestionnaires de sites Natura 2000. *Rapport DREAL PACA, pôle Natura*, 62, 169.
- Bevan E.R., Jones A.M. & Hawkey P.M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8):2145-2155
- Blazevic C., Radonic A., Mastelic J., Zevic M., Skcibusic M., & Maravic A. (2010). Glucosinolates glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). *Food Chemistry*, 121(4), 10201028. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.041>
- Blazquez J. (2003). Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 37(9):1201-1209.
- Böhlke J. K. (2002). Groundwater recharge and agricultural contamination. *Hydrogeology Journal*, 10:153–179.
- Bohlmann J & Keeling C.I. (2008). Terpenoid biomaterials, *Plant Journal* 54: 656-669.
- Boizot N. & Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère, *Le Cahier des Techniques de l'INRA* 1 :79-82.
- Bouteleux C. (2005). Survie d'entérobactéries dans les eaux de distribution : rôle de la matière organique d'origine algale. Thèse en Chimie et Microbiologie de l'eau, Faculté de Microbiologie et de Parasitologie, Université Henri-Poincaré-Nancy I, France, 275 p.
- Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J. & Dakka •N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(1):173-183.
- Bowers R. M., McCubbin I. B., Hallar A. G. & Fierer N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment*, 50: 41-49. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.01.005.
- Bowers R.M., Clements N., Emerson J.B., Wiedinmyer C., Hannigan M.P. & Fierer N. (2013). Seasonal variability in bacterial and fungal diversity of the near-surface atmosphere.

- Bowers R.M., McLetchie S., Knight R. & Fierer N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of the potential source environments. *ISME Journal*, 5 :601–612. Doi :10.1038/ismej.2010.167
- Bressuire-Isoard C. (2015). Mécanisme d'assemblage des enveloppes de la spore en fonction de la température de sporulation : rôle des protéines morphogénétique cotE chez *Bacillus cereus*. Bactériologie. Université Montpellier.
- Brillard J., Dupont C. M. S., Berge O., Dargaignaratz C., Oriol-Gagnier S., Doussan C., Broussolle V., Gillon M., Clavel T. & Bérard A. (2014). The water cycle, a potential source of the bacterial pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*, Article ID 356928. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/356928>
- Brillard J., Dupont C. M. S., Berge O., Dargaignaratz C., Oriol-Gagnier S., Doussan C., Broussolle V., Gillon M., Clavel T. & Bérard A. (2015). The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*, 356928. <https://doi.org/10.1155/2015/356928>
- Broin M. (2005). Composition nutritionnelle des feuilles de *Moringa oleifera*. CTA, 5p. Disponible sur <http://www.moringanews.org>.
- Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales*. Ed. Technique et Documentation, 3^e édition Lavoisier, Paris 1120 p.
- Bull R.J. (2012). "Toxicological evaluation of experimental data that informs the magnitude of cancer risk from disinfection by-products». p. 179-212, dans: Hrudey, S.E & J.W.A. Charrois. Eds.2012. *Disinfection By-Products and Human Health*. IWA Publishing London, mai 2012. 324p.
- Burkholder W.F., & Grossman A.D. (2000). Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J., (Eds.), *Prokaryotic Development*. ASM Press, Washington DC
- Buxeraud J. & Faure S. (2016). Les macrolides et les cyclines. *Actualités Pharmaceutiques*, 55 (558):7-12.
- Cabrera-Martinez R.M., Setlow B. & Setlow P. (2002). Studies on the mechanisms of the sporicidal action of ortho-phthalaldehyde. *Journal of Applied Microbiology* 92, 675680.
- [Bucrep • Fiche pays • PopulationData.net](#) » [archive], sur PopulationData.net (consulté le 30 octobre 2021).
- Cano R.J. & Borucki M.K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40million-year-old Dominican amber. *Science* 268, 1060-1064.
- Canon F. (2010). Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins. Thèse de doctorat, Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, 272 p.

- Carlin F. (2011). "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiology* 28(2): 177-182.
- Cattoir V. & Nordmann P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16 : 1028-1046.
- Cavalla M. (2003). Identification biochimique des *Bacillus* par galeries API 20 E. <http://mcavalle.free.fr>
- CBD (2018). Convention on Biological Diversity, Subsidiary Body on Scientific, Technical and Technological Advice. 22nd meeting of SBSTTA "Conservation and Sustainable use of Pollinators", Montreal, Canada.
- Chaudhary A.S. (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics ' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6) :552-556.
- Chebil L. (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 229 p.
- Chelkia H. & Gueriani A. (2019). Abiotic factors and bacterial sensitivity/resistance to antibiotics: impact of pH and salinity. Master in Biological Sciences, Faculty of biology, AkliMohand Oulhadj-Bouira University, Algérie, 70 p.
- Chen P., Guo X. & Li F. (2022). Antibiotic resistance genes in bioaerosols: Emerging, non-ignorable and pernicious pollutants. *Journal of Cleaner Production*; 348. 131094. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131094>.
- Chenel J.P. (2011). Production de protéases thermostables par des bactéries thermophiles en utilisant des boues d'épuration municipale comme substrat. Thèse en Sciences de l'eau, Institut National de la Recherche Scientifique Eau-Terre-Environnement, Université du Québec, Canada. 159 p.
- Cheol Cho B. & Jang G.I. (2014). Active and diverse rainwater bacteria collected at an inland site in spring and summer 2011. *Atmospheric Environment*, 94: 409-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.05.048>
- Cherkaoui H. D., Moussadek R., & Sahbi H. (2007). Apport des techniques géo-spatiales pour la caractérisation de la qualité des eaux sous-terraines des oasis de la vallée du Draa-cas de la nappe de Fezouata. *Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches*, 2(56), 295.
- Chippaux J-P., Pernot C., Jouanneau D., Ciornei G., Moulin-Esnart P., Courel D. (2007). Evaluation de la potabilité de l'eau dans une zone peuplée du Sahel sénégalais : Niakhar. *Environnement Risques Santé*, 6(5): 373-381.
- Cho W. & Chung, M.S. (2020). *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation/processing technologies. *Food Science Biotechnology*, 29(11):1447–1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>
- Chocat B., Bertrand K.J.L. & Barraud S. (2007). Eaux pluviales urbaines et rejets urbains par temps de pluie. *Techniques de l'Ingenieur*, vol W2, n° W6800,17 p.

- Choudhary L.C., Kumara D.N., Neeta A. & Ravindra K. (2006). Evaluation of *Moringa oleifera* leaves in Sheep, *Indian Journal Animal and Nutrition* 23(3): 196-98.
- Christie G. & Setlow P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cell Signal.* 74, 109729. Doi : 10.1016/J.CELLSIG.2020.109729.
- Cissé H., Savadogo A., Taale E., Tapsoba F., Guira F., Zongo C. & Traore Y. (2016). Influence des substrats carbonés et minéraux sur l'activité des substances BLIS (Bacteriocin-Like Inhibitory Substances) produites par des souches de *Bacillus* isolées à partir d'aliments fermentés au Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences*, 106, 10236-10248.
- Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen-The C. & Schmitt P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.
- Codex Alimentarius (Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires) (2021). Rapport de la quatorzième session du comité du Codex sur les contaminants dans les aliments. Quarante-quatrième Session Genève (Suisse), 79 p.
- Coohill T.P. & Sagripanti J.L. (2009). Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation. *Photochemistry and Photobiology* 85: 1043-1052.
- Cortezzo D.E., Koziol-Dube K., Setlow B. & Setlow P. (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology* 97: 838-852.
- Cossart, P., Pizarro-Cerdà J. & al. (2004). Microbial pathogens: an overview. In Cellular microbiology. P. Cossart, P. Boquet, S. Normark and R. Rappuoli. Washington, D.C., ASM Press: 1-33.
- Couvert O. (2002). Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des Traitements thermiques, Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France. 180p.
- Curriero FC, Patz JA, Rose JB, Lele S (2001). The association between extreme precipitation and waterborn outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health*, 91(8): 1194-1199.
- Cutting S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* 28(2) : 214-220.
- David Quéré (2003). Qu'est-ce qu'une goutte d'eau ? Ed Le Pommier.
- Davies J. & Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3): 417-433.
- Diagnostic Pasteur, (1987). Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. *Maury*, 3e édition, Paris, 727p.
- Diane A.M.Y., Ange A.T., Bertrand Z.Z., Line T., Aboubakar A., Nzeket A.B., Fokouong T.B.H., & Mewouo Y.C.M. (2020). Qualité physico-chimique et bactériologique des eaux souterraines et risques sanitaires dans quelques quartiers de Yaoundé VII,

- Cameroun. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 14(5): 1902-1920.
- Driks A. & Eichenberger P. (2016). The Spore Coat. *Microbiology Spectrum*. 4, 179–200. Doi : 10.1128/microbiolspec.TBS-0023-2016.
- Du y., Zou W., Zhang K., Ye G. & Yang J. (2020). Advances and Applications of *clostridium* Co-culture Systems in Biotechnology. *Frontiers in Micribiology* 11, 560223.
- Duarte A.C., Rodrigues S., Afonso A., Nogueira A. & Coutinho P. (2022) Antibiotic resistance in the drinking water: old and new strategies to remove antibiotics, resistant bacteria, and resistance genes. *Pharmaceuticals*; 15. 393. <https://doi.org/10.3390/ph15040393>.
- Duc L. H. & Hong H. A. (2003). Bacterial spores as vaccine vehicles. *Infection and Immunity* 71(5) : 2810-2818.
- Durand C. (2003). Caractérisation physicochimique des bproduits de l'assainissement pluvial- Origine et devenir des métaux traces et des polluants orgniques. Thèse de Doctorat. Poitiers : Université de Poitiers, 248 p.
- Dzoyem J.P., Hamamoto H., Ngameni B., Ngadjui B.T. & Sekimizu K. (2013). Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(2), 66-72. <https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.2.66>
- Ebongue C.O., Tsiazok M.D., Mefo'o J.P., Ngaba G.P., Beyiha G. & Adiogo D. (2014). Sensibilité et évolution de la résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolés à l'Hôpital Général de Douala. *Revue de Médecine et de Pharmacie*, 4(1) : 393-399.
- Egorov A.M., Ulyashova M.M. & Yu Rubtsova M. (2018). Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae* ; 10(4) : 33-48. PMID : 30713760 ; PMCID : PMC6351036.
- Eheth J.S. (2021). Antibiorésistance et risque sanitaire lié à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* isolée de quelques systèmes aquatiques dans les villes de Douala et Yaoundé (Cameroun). Thèse de Doctorat en Hydrobiologie et Environnement, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, Cameroun. 165 p.
- Eheth J.S., Lontsi D.C., Nana P.A, Tamsa A.A., Noah O.V.E., _Moungang L.M., _Bricheux G., _Sime_Ngando T. & _Nola M. (2019). Less effect of well physicochemical properties on the antimicrobial susceptibility *Pseudomonas aeruginosa* isolated in equatorial region of Central Africa. *Applied Water Science*, 9(2): 30-38.
- Eichenberger P. (2007). Genomics et cellular biology of endospore formation. In *Bacillus: Cellular and molecular biology*. P. Graumann. Wymondham, UK, Caister Academic Press: 319-350.
- Ellar D.J. (1978). Spore specific structures and their functions. *Symposia of the Society for General Microbiology* 28: 295-324.

- Erguden B. & Unver Y. (2022). Phenolic chalcones lead to ion leakage from Gram-positive bacteria prior to cell death. *Archives of Microbiology*, 204(3). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02603-0>
- Etoa François-Xavier, (2018). La spore bactérienne et ses utilisations, 254 pages
- Faille C., Tauveron G., Gentil-Lelievre C.L. & Slomianny C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection* 70: 2346-2353.
- FAO/OMS (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- Fatima L. et EL Hassani Y.A., (2022). Evaluation of the Physicochemical Quality of Water Used for Irrigation in Urban and Periurban Farms of Meknes City Morocco. *Alexandria science exchange journal* , 7(43) : pp471-474
- Fauchère J.L. & Avril J.L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Edition Ellipses. Paris. 365-367 : 520 p.
- Fekraoui F., Ferret F., Panidl N., Auvy O., Charmantin C., André S., Simonin H. & Perrier cornet J.M. (2021) ‘Cycling versus Continuous High Pressure treatments at moderate temperatures: Effect on bacterial spores?’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74, p. 102828. doi: 10.1016/j.ifset.2021.102828.
- Ferreira P.M.P., Carvalho A.F.F.U., Sousa D.F., Ferreira J.M., Martins A.R., Martins A.M.C & Queiroz M.G.R. (2007). Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica* 1 (4): 45- 53.
- Fimlaid K. A. & Shen A. (2015). Diverse mechanisms regulate sporulation sigma factor activity in the Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.006>
- FMS-EUCAST (2022). French Microbiology Society-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2022. <https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/comite-de-lantibiogramme-de-la-sfm-casfm/>
- Foidl N., Makkar H.P.S & Becker K. (2001). Potentiel de *Moringa oleifera* en agriculture et dans l’industrie, Dar es Salaam.Tanzanie. 29 octobre - 2 novembre 2001.
- Fuglie L.J. (2002). Combating malnutrition with *Moringa* (Senegal). In: Development potential for *Moringa* products De Saint Sauveur A., Appora V et Besse F. (eds.). *International Workshop*, Dar es Salam, Tanzanie ISBN 2-87614-516-2.
- Fujioka T., Yoshida K., Fujii H., Nagao T., Okabe H. & Mihashi K. (2003). Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VI. New ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51: 365-372.

- Gainche M., Ogeron C., Ripoche I., Senejoux F., Cholet J., Decombat C., Delort L., Berthon J.Y., Saunier E., Caldefie Chezet F., & Chalard P. (2021). Xanthine oxidase inhibitors from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and their efficient detections by HPTLC and HPLC analyses. *Molecules*, 26, 1939. <https://doi.org/10.3390/molecules26071939>
- Galperin M. Y., Yutin N., Wolf Y. I., Alvarez R. V. & Koonin E. V. (2022). Conservation and Evolution of the Sporulation Gene Set in Diverse Members of the Firmicutes. *Journal of Bacteriology*. 204. doi: 10.1128/JB.0007922.
- Galperin M.Y., Mekhedov S.L., Puigbo P., Smirnov S., Wolf Y.I. & Rigden D.J. (2012). Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* 14, 2870-2890.
- Gandolfi I., Bertolini V., Ambrosini R., Bestetti G., Franzetti A. (2013). Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. *Apply Microbiology Biotechnology*, 97:4727-4736. Doi:10.1007/s00253-013-4901-2
- Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. Elsevier, Amesterdam. 269 p.
- Gauvry E., Mahot A.G., Leguériel I., Couvert O., Postollec F., Broussolle V & Corroler L. (2017) 'Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment', *Research in Microbiology*, 168(4), pp. 369–378. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.006.
- Genest P.C., Setlow B., Melly E. & Setlow P. (2002). Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxydinitrite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology SGM* 148 : 307314.
- Gnecco I., Berreta C. & Barbera P. (2005). Storm xater pollution in the urban of Genoa, Italy. *Atmospheric Research*, vol .77, pp. 60-73.
- Gniadkowski M. (2008). Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infectious*, 14(1): 11-32
- Guha S.R.D & Negi J.S. (1965). Wrapping, printing, and writing paper from *Moringa pterygasperma*. *Indian Pulp* 6:377-379.
- Gusareva E.S., Acerbi E., Lau K.J.X., Luhung I., Premkrishnan B.N.V., Kolundzija S., Purbojati R.W., Wong A., Houghton J.N.I., Miller D., Gaultier N.E., Heinle C.E., Clare M.E., Kodengil Vettath V., Kee C., Lim S.B.Y., Chénard C., Wen Jia Phung, Kavita K., Kushwaha, Poh Nee, Putra A., Panicker D., Koh Yanqing, Yap Zhei Hwee, Sachin R., Lohar, Mikinori Kuwata, Hie Lim Kima, Liang Yang, Akira Uchida, Drautz-Moses D.I., Junqueira A.C.M., & Schuster S.C. (2019). Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *PNAS*, 116(46): 23299-23308. <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1908493116/-/DCSupplemental>
- Hadis M., Gebreyohannes Y., & Gameda N. (2020). Potential therapeutic uses of *Moringa stenopetala*: a scoping review. *Journal of Global Health Science*, 2(2), e26. <https://doi.org/10.35500/jghs.2020.2.e26>

- Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T and Yoshida T. 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66: 2047-2055.
- Hayward C., Ross K.E., Brown M.H. & Whiley H. (2020). Water as a source of antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. *Pathogens*. 9(8) : 667.
- He L., Chen Z., Wang S., Wu M., Setlow P. & Li Y. (2018) 'Germination, Outgrowth, and Vegetative-Growth Kinetics of Dry-Heat-Treated Individual Spores of *Bacillus* Species', *Applied environmental Microbiology*, 84(7), pp. 1–14.doi:10.1128/AEM.02618-17.
- Hemmer M. (2011). *Conception, Synthèse et Évaluation Biologique de Dérivés Coumariniques en tant qu'Agents Anticancéreux Potentiels*. Thèse de médecine, Université de Liège, 216 p.
- Hieng I.O. (2003). Study of Geotechnical Parameters of the Soils in Cameroon. CLE (edition), Yaounde, Cameroon, 119 p.
- Higgins D. & Dworkin J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131-148. <https://doi.org/10.1111/j.15746976.2011.00310.x>
- Hollenbeck B.L. & Rice L.B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3(5): 421-433.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Williams S.T. (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams and Wilkins, edition. *Philadelphia*, 524 p.
- Hong H. A. & H. Duc le, (2005). "The use of bacterial spore formers as probiotics." *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4): 813-35.
- Igesobta (2015). L'Intégration de la Gestion des Eaux Souterraines pour les Organismes de Bassins Transfrontaliers en Afrique. Les eaux souterraines et l'environnement-un manuel de formation produit par AGW-Net, BGR, IWMI, CapNet, RAOB, et IGRAC.
- Iranshahi M., Arfa P., Ramezani M., Jaafari M.R., Sadeghian H., Bassarello C., Piacente S. & Pizza C. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and *in vitro* antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry* 68 : 554–561.
- Islam M. A., Roy S., Nabi A., Solaiman S., Rahman M., Huq M., Siddiquee N.A., Ahmed N. (2018). Microbiological quality assessment of milk at different stages of the dairy value chain in a developing country setting. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 11–19. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.028.
- Jacques B. (2007). L'eau dans son environnement rural : hydraulique et cycle de l'eau, l'alimentation en eau potable, l'assainissement des agglomérations. Edition Johanet (ISBN : 978-2-900086-71-1).

- Jeon E.M., Kim H.J., Jung K., Kim J.H., Kim M.Y., Kim Y.P. & Ka J.O. (2011). Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed by molecular analyses. *Atmospheric Environment*, 45:4313-4321. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.11.054
- Kalia V.C., Mukherjee T., Bhushan A., Joshi J., Shankar P & Huma N. (2011). Analysis of the unexplored features of rrs (16S rDNA) of the Genus *Clostridium*. *BM: Genomics* 12,18 <https://doi.org/10.1186/147.2164-12-18>
- Kalkhambkar R.G., Kulkarni G.M., Shivkumar H. & Rao R.N. (2007). Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 1272 -1276.
- Kamath M., Malagi K.J., Kranthi K. & Adiga S.H. (2015). Ethno botanical and antimicrobial activity of *Terminalia arjuna* and *Terminalia chebula*. *Asia Pacific Journal of Research* 1: 99-105.
- Kashiwada Y., Nonaka G. & Nishioka I. (1984). Tannins and related compounds. XXIII. Rhubarb (4): isolation and structures of new classes of gallotannins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 3461-3470.
- Kauffmann, A.C. & Castro, V.S. (2023). Phenolic compounds in bacterial inactivation: A perspective from Brazil. *Antibiotics*, 12, 645. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040645>
- Kévin L. L., (2012). Les eaux souterraines : captage, exploitation et gestion. Mémoire, université de Kinshasa.
- Koller E. (2004). Traitement des pollutions industrielles : eau, air, déchets, sols, boues. Paris, France : Dunod,155p.
- Kozyra M., Biernasiuk A., & Malm A. (2017). Analysis of phenolic acids and antibacterial activity of extracts obtained from the flowering herbs of *Carduus acanthoides* L. *Acta Polonicae Pharmaceutica-Drug Research*, 74(1), 161-172. PMID: 29474772
- Krajčiková D., Bugárová V., & Barák I. (2021). Interactions of *Bacillus subtilis* Basement Spore Coat Layer Proteins. *Microorganisms*, 9, 1–15. doi: 10.3390/microorganisms9020285.
- Lablaine A., Serrano M., Bressuire-Isoard C., Chamot S., Bornard I., Carlin F., Henriques O.A. & Broussolle V. (2021). The Morphogenetic Protein CotE Positions Exosporium Proteins CotY and ExsY during Sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere* 6. doi: 10.1128/MSPHERE.00007-21.
- Lalas S., Tsaknis J., & Sflomos K. (2003). Characterisation of *Moringa stenopetala* seed oil variety “Marigat” from island Kokwa. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 23-31. <https://doi.org/10.1002/EJLT.200390002>
- Laleye O.A.F., Ahissou H., Olounlade AP., Azando E.V.B & Laleye A. (2015). Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa*

- oleifera* Lam (Moringaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 9 (5): 2682-2700.
- Larmet H. (2007). Mobilisation et transfert de Zn, Cd, Cu et des colloïdes bactériens dans les bassins d'infiltration d'eaux fluviales : Influence des conditions hydrodynamiques. Ecole doctorale Terre Univers Environnemen. Grenoble : Université Joseph Fourier-Grenoble 136 p.
- Lassabatère L. (2002). Modification du transfert de trois métaux lourds (Zn, Pb et Cd) dans un sol issu d'un dépôt luvioglacière carbonaté par l'introduction géotextiles. Thèse de Doctorat. Lyon : INSA de Lyon, 252p.
- Lawson P., A. & Rainey FA. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal Syst Evol Microbiology*, 66:1009–1016
- Lawson Paul A., Diane Citron M., Kerin Tyrrell L. & Sydney Finegold M. (2016). *Anaerobe* 40, 95-9
- Leggett M. J., McDonnell G., Denyer S. P., Setlow P. & Maillard J.-Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 485-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>
- Leinmüller E., Steingass H & Menke K.H. (1991). Tannins in feeds for ruminants. II Effects on rumen metabolism in vitro. *Übersichten zur Tierernährung* (19):45-70.
- LeJeune S. (2021). Les fluoroquinolones. Diplôme Universitaires de Thérapeutiques Antiinfectieuses, Université de Grenoble, Alpes, 77 p.
- Li A.P., He Y.H., Zhang S.Y. & Shi Y.P. (2022). Antibacterial activity and action mechanism of flavonoids against phytopathogenic bacteria. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105221. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105221>
- Li K., Dong S., Wu Y. & Yao M. (2010) Comparison of the biological content of air samples collected at ground level and at higher elevation. *Aerobiologia* 26:233-244. Doi:10.1007/s10453-010-9159-x
- Lin H., Zhu H., Tan J., Wang H., Wang Z., Li P., Zhao C & Liu J. (2019). Comparative Analysis of Chemical Constituents of *Moringa oleifera* Leaves from China and India by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050942>
- Logan N. A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 417-429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
- Lugasi A., Hovari J., SagiK & Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Journal Acta of Biologica. Szegediensis* 47 (1-4): 119-125.
- Lutge U., Kluge M. & Bauer G. (2002). *Botanique*. 3ème Edition : Technique et documentation.

- Madi O P., Bourou S et Noé W. 2012. Utilisation et importances socio-économiques du *Moringa oleifera* lam. En zone de savanes d'Afrique central.cas de la ville de Moribga au Nord-Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 60 :4421-4432.
- Madiélé M.A.B., Nkounkou L.C, Agnanié H., Moutsamboté J.M et Ouamba J.M. (2013). Les plantes tinctoriales d'Afrique Centrale : enquête ethnobotanique et screening phyto chimique. *Journal of Applied Biosciences* 67 :5236-5251.
- Madigan M. & Martinko J. (2007). Biologie des microorganismes 11ème édition. *PEARSON Education, France*, pp 354-355.
- Makkar H.P.S. & Becker K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science* 128 : 311-322.
- Malecky M. (2008). Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), 205p.
- Mandell G.L., Banett J.E., Dolin R. & Mandell D.B. (2009). Principales and parctice of infectious diseases. 6th edition, Elsevier, Churchill, Livingstone éditeurs, USA. *Edition en ligne*. <http://www.ppidon-line.com>.
- Manouore Njoya A., Poutoum Yogne Y., Eheth J.S., Mouafo Tamnou E.B., Metsopkeng C.S., Noah Ewoti O.V., Tamsa Arfao A., Mounsang L.M., Nana P.A., Chinche Belengfe S., Masseret E., Sime-Ngando T., Nola M. (2021). Antibiotic susceptibility of four Enterobacteriaceae strains (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei*) isolated from wastewater, surface water and groundwater in the equatorial zone of Cameroon (Central Africa). *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 11(01): 120-137. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.11.1.0303>
- Maron P. A., Mougél C., Lejon D. P. H., Carvalho E., Bizet K., Marck G., Cubito N., Lemanceau P. & Ranjard L. (2006). Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area. *Atmospheric Environment*, 40: 8074-8080. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.08.047.
- Marshall B.M., Ochieng D.J. & Levy S.B. (2009). Commensals: unappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe*, 4(8) :231-238.
- Mast Group, (2016). Citrate de Simmons (géluse). Manassas, Virginia, 1page.
- Matini L., Moutou J.M. & Kongo-Mantono M. (2009). Evaluation hydro-chimique des eaux souterraines en milieu urbain au Sud-Ouest de Brazzaville, Congo. *Afrique Science* 05(1) : 82 - 98
- Mba F.F., Temgoua E. Kengne P.D. & Natheu Kamhoua S. (2019). Vulnérabilité des eaux souterraines à la pollution dans la ville de Dschang, Ouest-Cameroun. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(5): 39-56.
- Mbikay M. (2012). Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia adyslipidemia: areview. *Frontiers Pharmacology* 3:24. doi:10.3389/fphar. 2012.00024

- Medjeber N., 2015. Isolement, Identification et production des Polyhydroxyalcanoates (PHAs) chez le genre *Bacillus* (Doctoral dissertation). 200p
- Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Detsi A., Koufaki M., Kontogiorgis C and Hadjipavlou & Litina D.J. (2009). Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 320-326.
- Mellon F. A.; Bennett R. N.; Holst B.; Williamson G. (2002). Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage Electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analogy Biochemistry*, 306, 83-91.
- Menye D.E., Zébazé T.S.H., Menbohan S.F., Kemka N., Nola M., Boutin C. & Njiné T. (2012). Bio-écologie des diatomées épilithiques de la rivière Mfoundi (Yaoundé, Cameroun) : diversité, distribution spatiale et influence des pollutions organiques. *Revue des Sciences de l'eau*, 25(3), 203-218.
- Metsamuuronen S. & Siren H. (2019). Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: A review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Review*, 18, 623-664. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2>
- Metsopkeng C.S., Nougang M.E., Nana P. A., Tamsa Arfao A., Ngo Bahebeck P., Lontsi Djimeli C., Eheth J.S., Noah Ewoti O.V., Mougang L.M., Agbor G.A., Perrière F., Sime-Ngando T. & Nola M. (2020). Comparative study of *Moringa stenopetala* root and leaf extracts against the bacteria *Staphylococcus aureus* strain from aquatic environment. *Scientific African*, 10, e00549. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00549>
- Metsopkeng C.S., Nougang M.E., Tamsa Arfao A., Perrière F., Mougang L.M., Noah Ewoti O.V., Donnadiou F., Nana P.A., Bricheux G., Eheth J.S., Mouafo Tamnou E.B., Ripoché I., Chalard P., Sime-Ngando T. & Nola M. (2022). Minimum inhibition and bactericidal concentrations of the plant *moringa oleifera* extracts against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Bacterial Empire*, 5(4), e484. <https://doi.org/10.36547/be.484>
- Mock M. & Fouet A. (2001). Anthrax. *Annual Review Microbiology*, 55: 647 -671.
- Mohamed G.Z., Taupin J.D., Ranaivoarisoa A. & Robison L.R. (2015). Caractérisation géochimique et bactériologique des nappes d'une région à climat tropical sec au centre Sud de Madagascar. *Hydrological Sciences Journal*, 60(4) : 746-759.
- Momento Degremont de Suez. Eaux de surface. <http://www.suezwaterhaandbook.fr> consulté le 26/10/21.
- Mossel D.A.A., Koopman M.J. & Jongerius E. (1996). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Apply microbiology*, 15. (3):650-653.
- Muhammad J., Syeda M.Z., Nan X., Mamona S. & Jun W. (2022). Antibiotics and antibiotic resistant genes in urban aquifers. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 26:100324.

- Muylaert A. & Mainil J.G. (2013). Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 157(1):15-26.
- Nadeem S.F., Gohar U.F., Tahir S.F., Mukhtar H., Pornpukdeewattana S., Nukthamna P., Moula Ali A.M., Bavisetty S.C.B. & Massa S. (2020). Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*; 46: 578-599. Doi:[10.1080/1040841X.2020.1813687](https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1813687).
- Nagarajan S., et Rema R.,(2022). An Investigation on the Adoption of Rainwater Harvesting Based on the Theory of Planned Behaviour and Norm Activation Model.*Research Square* ; 3 :pp 24-30
- Narayanan S.R., Surya Prakash G.K., Advait M. & Sankarganesh K. (2016). High-Performance Aqueous Organic Flow Battery with Quinone-Based Redox Couples at Both Electrodes », *Journal of The Electrochemical Society*. 163 (7) : 1442-1449
- Nauciel C. & Vildé J.L. (2005). Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action. Edition : Masson. Paris. pp 49-56.
- NC (Norme Camerounaise). (2014). Norme pour l'eau destinée à la consommation humaine. ANOR.
- Nguyen Thi Minh H., Durand A., Loison P., Perrier-Cornet J.-M. & Gervais P. (2011). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 90: 1409-1417.
- Nicholson W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 410-416.
- Nicholson W., Fajardo-Cavazos P., Rebeil R., Slieman T., Riesenman P., Law & J., Xue, Y. (2002). Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 27-32.
- Nicholson W.L., Schuerger A.C., & Setlow P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571: 249-264.
- Nikolaidis I., Favini-Stabile S. & Dessen A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Sciences* 2014; 23(3): 243-259. Doi:[10.1002/pro.2414](https://doi.org/10.1002/pro.2414).
- Noah O.V.E., Tamsa A.A., Baleng S.D., Mounsang L.M., Metsopkeng C.S., Tuekam Kayo R.P., Poutom Y.Y., Ebang M.D & Nola M. (2021). Microbiological and physicochemical quality of some water points in the Nkolafamba Subdivision (Center Region, Cameroon). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(2): 816-834.
- Nola M., Djarmaila E., Kemka N., Chihib N.-E., Zébazé Togouet S. H., Krier F., Servais P., Hornez J.-P. & Njiné T. (2010). Assessment of the future of heterotrophic aerobic bacteria and electrical conductivity in groundwater samples stored in households conditions at different temperatures, in the equatorial region of Central Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (20): 2055-2066.

- Nola M., Njiné T., Boutin C., Servais P., Messouli M., Monkiedje A., Zebaze Togouet S. H. & Kemka N. (2005). Sorption kinetics of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp on two soil layers associated with a groundwater table in Yaounde, Cameroon (Central Africa). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2 (3): 447-455.
- Nola M., Njiné T., Djuikom E. & Sikati F. (2002). Faecal coliforms and fecal streptococci community in the underground water in an equatorial area in Cameroon (Central Africa): the importance of some environmental chemical factors. *Water Research*. 36: 3289-3297.
- Nola M., Njine T., Djuikom E., & Sikati Foko V. (2000). Bacteria indicators dynamics in wells as influenced by well depth and well water column thickness, in Yaounde (Cameroon). *African Journal of Science and Technology*, 1(2): 82-91.
- Nola M., Njiné T., Kemka N., Zebaze Togouet S. H., Foto Menbohan S., Monkiedje A., Servais P., Messouli M. & Boutin, C. (2006). Retention of staphylococci and total coliforms during wastewater percolation through equatorial soil in Central Africa: The role of the soil column near soil surface and that closely above groundwater table. *Water, Air and Soil Pollution*, 171 (1-4): 253-271. Doi: 10.1007/s11270-005-9039-0.
- Nola M., Njine T., Sikati V.F. & Djuikom E. (2001). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* in groundwaters in equatorial region of Cameroon and relationships with some chemical parameters of water. *Revue des Sciences de l'Eau*, 14 : 35-53.
- Nola M., Noah Ewoti O. V., Nougang M. E., Mougang L. M., Chihib N.-E., Krier F., Hornez J.-P. & Njiné T. (2012). The growth of *Escherichia coli* in soil layers separating the soil surface from the underground water table, in Central Africa: The hierarchical influence of the soil chemical characteristics. *Research Journal of Environment and Earth Sciences*, 4 (2): 196-206.
- Nola M., Noah Ewoti O. V., Nougang M., Krier F., Chihib N.-E., Hornez J.-P. & Njiné T. (2011). Assessment of the hierarchical involvement of chemical characteristics of soil layer particles during bacterial retention in Central Africa. *International Journal of Environment and Pollution*, 46 (3-4) : 178-198.
- Noubouwo A. (2014). Développement urbain et stratégies d'acteurs dans les quartiers précaires de Douala au Cameroun, thèse de Doctorat, Université du Québec.
- Nougang M.E., Nola M., Djuikom E., Noah E.O.V., Mougang L.M. and Ateba, B.H. (2011). Abundance of Faecal Coliforms and Pathogenic *E. coli* Strains in Groundwater in the Coastal Zone of Cameroon (Central Africa), and Relationships with Some Abiotic Parameters. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3 : 622-632.
- Nya S.L. (2020). Accès à l'eau potable et à l'assainissement dans le département du Ndé (région de l'ouest-Cameroun), thèse de Doctorat, Université de Yaoundé I.
- Obafemi A.F. L., Ahissou H., Abiodoun P.O., Azondo E. V. B. & Lalaye A. (2015). Etude Bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore Béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A. jus (Meliaceae), *Nomordica charantia* Linn (curcubitacea) et

- Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). *International journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(5) :2682-2700. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i5.38>
- Odee D. (1998). Forest biotechnology research in drylands of Kenya: the development of *Moringa* species. *Dryland Biodivers* 2 :7-8.
- Odeyemi O. A., Alegbeleye O. O., Strateva M., & Stratev D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 19, 311– 331. doi: 10.1111/1541-4337.12526.
- Olson M.E & Carlquist S. (2001) Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in *Moringa* (Moringaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 135(4): 315-348.
- Olson M.E. (2002). Intergeneric Relationships within the *Caricaceae-Moringaceae* Clade (Brassicales) and Potential Morphological Synapomorphies of the Clade and Its Families, *Australian Systematic Botanic* 27: 55-73.
- Olugbemi T.S., Mutayoba S.K. S.K & Lekule F.P. (2010). Effet du *Moringa (Moringa oleifera)* Inclusion dans les régimes à base de manioc nourris aux poulets à griller. *International Journal of Poultry Science* 9 : 363-367.
- OMS (2000). Directives de qualité pour l'eau de boisson ; volume 2 – critères d'hygiène et documentation à l'appui. Organisation mondiale de la Santé, 2e édition, 1050 p.
- OMS (2014). Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques : une menace grave d'ampleur mondiale 2014. Disponible sur : [\(http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/\)](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/).
- Paguia H.M., Paguia R.Q., Balba C.H & Flores R.C. (2014). Utilisation and evaluation of *Moringa oleifera* L. As poultry feeds. *Apcbee Procedia* 8: 343-347.
- Pamo E.T., Niba A.T., Fonteh F.A., Tedonkeng F., Kana J.R., Boukila B. & Tsachoung J. (2005). Effet de la supplémentation au *Moringa oleifera* ou aux blocs multinationnels sur l'évolution du poids post partum et la croissance pré-sevrage des cobayes (*Cavia porcellus* L.). *Livestock Research for Rural Development* 17: 1-8.
- Panda S.K., Horie T., Kaneko T., Sugimota G., Sasano S., Shibasaka M & Katsuhara M. (2008). Mechanisms of Water transport mediated by PIP aquaporins and Their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Oxford Journals: Plant and Cell physiology* 52 (4): 663-675.
- Park J. D., Rhee D. K & Lee Y. H. (2005). Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Phytochemistry Reviews* 4 : 1579-1584.
- Patrice B. (2006). Contribution à la maîtrise de l'hygiène et de l'assainissement dans les établissements classés de Yaoundé. Master en Biologie et Médecine, 2ie de Ouagadougou, Togo, 67 p.

- Pauline L. (2013). Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Thèse de Doctorat, Biotechnologies. Université de Bourgogne.
- Peeking A., Picand B., Hacene K., Lokiec F & Guerin P. (1987). Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. *Publications médicales AGCF* 6 : 512-513.
- Periferakis A., Periferakis K., Badarau I.A., Petran E.M., Popa D. C., Caruntu A., Costache R.S., Scheau C., Caruntu C. & Costache D.O. (2022). Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications. *International Journal of Molecular Science*, 23, 15054. <https://doi.org/10.3390/ijms232315054>
- Perry J., Wagelchner N. & Wright G. (2021). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*; 6(6). a025197. Doi:10.1101/cshperspect.a025197.
- Persico O. (2021). Bon usage des aminosides et carbapénèmes en officine de ville : État des lieux dans la région Sud. Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille-Faculté de Pharmacie, 142 p.
- Petruzzi L., Corbo M. R., Sinigaglia M., & Bevilacqua A. (2017). Microbial Spoilage of Foods: *Fundamentals*. Elsevier Ltd doi: 10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9.
- Poumayea N., Mabinguia J., Iutgen D.P & Etbiganc M. (2012). Contribution to the clarification of surface water from the *Moringa oleifera*: case M'Poka River to Bangui, Central African Republic. *Chemical engineering research and design* .90 :2346-2352.
- Prescott J.F., McInnes J.I. & Wu A.K. (2016). Taxonomic relationships among the clostridia. *Clostridial Dis.Anim.*1-5.
- Prescott L. M. & J. P. Harley, (2010). Microbiologie 3e édition. Bruxelles, De Boeck.
- Privas E. (2013). *Matériaux ligno-cellulosiques « Élaboration et Caractérisation laboration »*. Thèse de Doctorat en Science et génie des matériaux, L'École Nationale Supérieure des Mines, Paris. France.
- Ramachandran C., Peter K.V & Gopala krishnana P.K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany* 34: 276-83. doi: 10.1007/BF02858648
- Reyes-Sanchez N., Spordly E & Ledin I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to Creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science* 101 (1-3) 24-31.
- Riley E. P., Schwarz C., Derman A. I. & Lopez-Garrido J. (2020). Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microbiology cell* (Graz, Austria) 8. doi: 10.15698/MIC2021.01.739.
- Roberts S. & Zembower T. (2021). Global increases in antibiotic consumption: a concerning trend for WHO targets. *Lancet Infectious Diseases*, 21(1) : 10-11.

- Rodenburg C. M., McPherson S. A., Turnbough C. L., & Dokland T. (2014). Cryo-EM analysis of the organization of BclA and BxpB in the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Structural Biology*, 186, 181. doi: 10.1016/J.JSB.2014.02.018.
- Rodier J., Legube B. & Merlet N. (2016). *L'analyse de l'eau : Contrôle et interprétation* (10e éd. Entièrement mise à jour). Dunod.
- Rodier J., Legube B., Marlet N. & Brunet R. (2009). *L'analyse de l'eau*. 9^e édition, Dunod, Paris, France, 1579 p.
- Romagni J.G & Dayan F.E. (2002). Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation R.K. Upadhyay (Edition) 151-169.
- Rosenberg A., Sinai L., Smith Y. & Ben-Yehuda S. (2012). Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. *PLOS ONE* 7 : e41921
- Saint-Sauveur A & Broin M. (2010). *Produire et transformer les feuilles de Moringa*. Editeurs Moringa Association of Ghana (MAG) et Moringanews, 26p.
- Salmeron-Manzano E., Garrido-Cardenas J.A. & Manzano-Agugliaro F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *Internatinal journal of Environmemental Research and Public Health*, 17 (10), 3376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
- Sanner A. (2008). *L'artémisinine et ses dérivés : apports de la médecine traditionnelle chinoise dans la lutte contre le paludisme chimiorésistant et perspectives contemporaines*. Thèse de doctorat en médecine, Université Henry Poincaré de Nancy, 182p.
- Schoeller H. J. (2011). Pollution des Eaux Souterraines. Actes du Colloque de Moscou, IAHS-AISH Publ. No. 103.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R & Lewinsohn E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* 54: 712-732.
- Schwarz S, Schink AC, Roberts MC (2017). Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiology Spectrum*, 6(1): 51-82.
- Sella S.R.B.R., Vandenberghe L.P.S., & Soccol C.R., (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research* 169 :931-939. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>
- Sen T., & Samanta S.K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 147, 59-110. https://doi.org/10.1007/10_2014_273
- Seong C. N., Kang J. W., Lee J. H., Seo S. Y., Woo J. J., Park C. (2018). Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *Journal of Microbiology*, 56, 1–10. doi: 10.1007/s12275-018-7318-x.
- Setlow B. & C. A. Loshon, (2002). Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2): 362-375.

- Setlow B. & Setlow P. (1993). Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10): 3418-3423.
- Setlow P. & Johnson E.A. (2007). Spores and their significance. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 550-556.
- Setlow P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6): 550-556.
- Setlow P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3): 514-525.
- Setlow P. (2014a). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, 196, 1297–1305. doi: 10.1128/JB.01455-13
- Setlow P. (2014b). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* 2. doi: 10.1128/microbiolspec.tbs-0003-2012.
- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204-228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
- Signe J.M., Lontsi C.D., Njoya A.M., Eheth J.S., Tchakounté S., Tamsa A.A., Ateba B.H., Bricheux G., Nola M. & Sime-Ngando T. (2015). Assessment of the potential effect of some streams properties on the isolated *Aeromonas hydrophila* strains susceptibility against some β -Lactams and Sulfamids. *Research Biotechnology*, 6: 33-44.
- Silva dos Santos J., Gonçalves Cirino J.P., de Oliveira Carvalho P., & Ortega M.M. (2021). The pharmacological action of Kaempferol in central nervous system diseases: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 565700. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.565700>
- Silva M.L., Cargnello C., Aulois-Griot M. & Dumartina C. (2019). Antibiotic misuse: How to evaluate the costs? Mésusage des antibiotiques : quelle évaluation du coût ? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(7):485-494.
- Singleton P. (2005). *Bactériologie pour la médecine, la biologie et la bactériologie. Edition: Durot, Paris, pp 100-102.*
- Sköld O. (2010). Sulfonamides and trimethoprim. *Expert Review of Anti-infective Therapy*; 8(1): 1-6. PMID: 20014895. Doi:10.1586/eri.09.117.
- Sonenshein A. L. (2000a). Bacterial sporulation: a response to environmental signals. In *Bacterial stress responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis. Washington, D.C., ASM Press: 199-215.
- Song B., Wang G., Tan M. & Yuan J. (2006). A europium (III) complex as an efficient singlet oxygen luminescence probe. *Journal of American Chemistry Society* 128: 13442–13450.
- Soni A., Oey I., Silcock P., & Bremer P. (2016). *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Comprehensive*

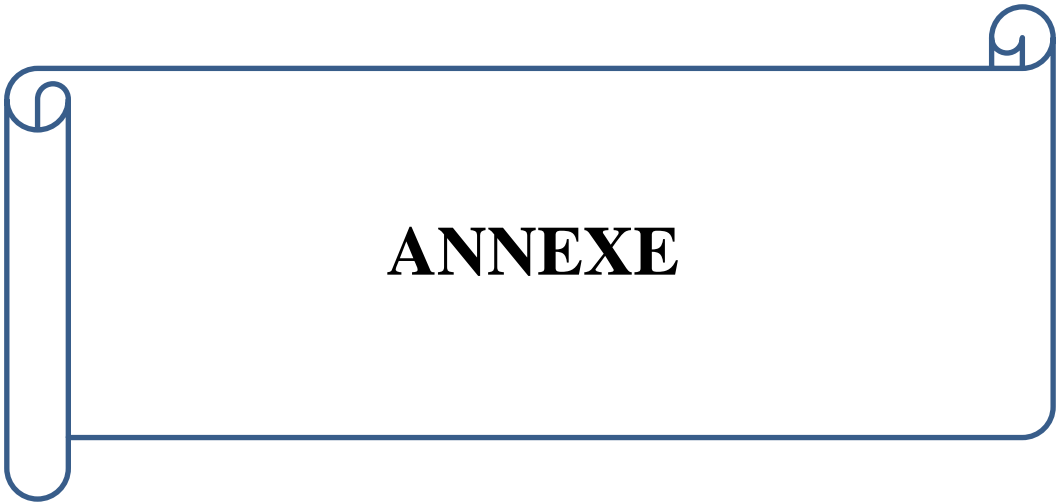
- Review of Food Science and Food Safety*, 15, 1139–1148. doi: 10.1111/1541-4337.12231.
- Stephens C. (1998). Bacterial sporulation: a question of commitment? *Current Biology* 8, R45–R48.
- Stewart G. C. (2015). The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiology Molecular Biology Review*, 79, 437–457. doi: 10.1128/mmbr.00050-15.
- Stockigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko, I., Warzecha, H. & Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography*, 967: 85-113
- Sugiwama A., Masuda S., Nagaosa K., Tsujimura M., & Kato K. (2016). Tracking the direct impact of rainfall on groundwater at Mt. Fuji by multiple analyses including microbial DNA. *Biogeosciences Discuss.* [https:// doi.org/10.5194/bg-2016-78](https://doi.org/10.5194/bg-2016-78)
- Tabué Y.J.G., Ntamack D., Feumba R., Ngnikam E., Wéthé J. & Tanawa É. (2009). Vulnérabilité des eaux souterraines et périmètres de protection dans le bassin versant de la Mingoa (Yaoundé, Cameroun). *Revue de l'Université de Moncton*, 40(2) : 7196.
- Taffouo V.D., Rai S., Mbeng L.O. & Eyang M.T. (2017). Impacts of the physico-chemical characteristics of water on the distribution of phytoplankton and macrophytes in the Nkam River (Cameroon). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(4):1766.
- Takem G.E., Chandrasekharam D., Ayonghe S.N. & Thambidurai P. (2010). Pollution characteristics of alluvial groundwater from springs and bore wells in semi-urban informal settlements of Douala, Cameroon, Western Africa. *Environmental Earth Sciences*, 61: 287-298.
- Tallent M.S., Kotewicz M.K., Strain A.E. & Bennett W.R. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International* 95(2): 446-451. PMID: 22649932. Doi:10.5740/jaoacint.11-251.
- Talukdar P. K., Olguín-Araneda V., Alnoman M., Paredes-Sabja D. & Sarker M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology*, 166(4), 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001>
- Tamsa A.A. (2017). *Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'Eucalyptus microcorys Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire*. Thèse de Doctorat PhD, Université de Yaoundé 1 (Cameroun), Faculté des Sciences, Département de Biologie et Physiologie Animales, Laboratoire d'Hydrobiologie et Environnement, 237p.
- Tamsa Arfao A., Nola M., Lontsi Djimeli C., Nougang ME., & Hzounda Fokou J.B. (2013) Cultivability of *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *Escherichia coli* in water microcosm in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract: Effect of the concentration of leaves extract and incubation temperature. *International Journal of*

Research in BioSciences. 2(4): pp15.

- Tani Z.B.A. & Arlet G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3): 169-178.
- Tavares W.R., Barreto M.D.C. & Seca A.M.L. (2021). Aqueous and ethanolic plant extracts as bio-insecticides - Establishing a bridge between raw scientific data and practical reality. *Plants*, 10, 920. <https://doi.org/10.3390/plants10050920>
- Tekam D.D., Vogue N., Nkfusai C.N., Ela M.E. & Cumber S.N. (2019). Accès à l'eau potable et à l'assainissement : cas de la commune d'arrondissement de Douala V (Cameroun). *Pan African Medical Journal*, 33 : 244.
- Thierry S., Macarie H., Iizuka T., Geibdörfer W., Assih E.A., Spanevello M. & al. (2004). *Pseudoxanthomonas Mexicana* sp. Nov. and *Pseudoxanthomonas Japonensis* sp. Nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* and of its type's species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 6:2245-2255. Doi:10.1099/ij.s.0.02810-0.
- Tian T., Sun B., Shi H., Gao T., He Y., Liu Y., Li X., Zhang L., LI S., Wang Q. & Chai, Y. (2021). Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal*, 15, 2723-2737. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00966-2>
- Tignat-Perrier R., Dommergue A., Thollot A., Keuschnig C., Magand O., Vogel T.M. & Larose C. (2019). Global airborne microbial communities controlled by surrounding landscapes and wind conditions. *Scientific Reports*, 9:14441. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51073-4>
- Tocheva E. I., Ortega D. R. & Jensen G. J. (2016). Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(8), 535-542. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.85>
- Todar's K. (2003). Online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology. P: 579: 462-477.
- Torred M., Benjelloun E. & Dibala (2012). Historical Notes and introduction to bacterial Spores. In E. Abel-Santos: Bacterial spores (1-8). Caister Academic Press.
- Tyler E.J., Milner M. & Converse J.C. (1993). Soil acceptance of wastewaters from chamber and gravel infiltration systems. University of Wisconsin-Madison, SSWMP Publication. p. 12.
- Uluseker C., Kaster K.M., Thorsen K., Basiry D., Shobana S., Jain M., Kumar G., Kommedal R. & Pala-Ozkok I. (2021). A Review on occurrence and spread of antibiotic resistance in wastewaters and in wastewater treatment plants: Mechanisms and perspectives. *Frontiers in Microbiology*; 12. 3003. Doi:10.3389/fmicb.2021.717809.
- Verpoorte R. & Alfermann A.W. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Ed. Kluwer Academic, Dordrecht. Netherlands. 286 p.

- Veysiere A. (2019). La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux, 107p.
- Vincent W.U., Jaclyn A.B., William W.D., Dennis B.W. & Christopher C.S. (2009). Exploitation des eaux souterraines. Baltimore, MD : Catholic Relief Services. www.crsprogramquality.org.
- Vincken J.P., Heng L., DE Groot A & Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68: 275-297.
- Vreeland R.H., Rosenzweig W.D. & Powers D.W. (2000). Isolation of a 250 million-yearold halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407, 897-900.
- Wang M., Yao M. & Zhu Y.G. (2022). Antibiotic resistance genes and antibiotic sensitivity in bacterial aerosols and their comparisons with known respiratory pathogens. *Journal of Aerosol Science*; 161. 105931. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105931>.
- Wei J., Shah I.M., Ghosh S., Dworkin J., Hoover D.G. & Setlow P. (2010). Superdormant spores of *Bacillus* species germinate normally with high pressure, peptidoglycan fragments, and bryostatin. *Journal of Bacteriology*, 192: 1455-1458.
- Wellington E.M., Boxall A.B., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H. & Hawkey P.M. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 13(2): 155-165.
- Wen J., Pasma R., Manders M.M.E., Setlow P & Brul S. (2019) ‘Visualization of germinosomes and the inner membrane in bacillus subtilis spores’, *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), pp. 1–9. doi: 10.3791/59388.
- Wéthé J. (1999). Urbanisation et protection de la ressource en eau : une approche par les Systèmes d'Information Géographique appliqué à Yaoundé - Cameroun. Mémoire de fin d'étude de DEPA, Département de gestion de l'environnement, Université de Senghor, Alexandrie, Egypte, 104 p.
- William G., Hpkins C. M & Evrard M. (2003). Physiologie végétale. *Molécules et Métabolisme* : 532-539.
- Williams D.J., Edwards D., Hamernig I. Jian L., James A. P., Johnson S. K & Tapsell. L.C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International* 52: 323–333.
- Win M., Abdul-Hamid A., Baharin B., Anwar F., Sabu M.C & Mohd S. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pakistan Journal of Botanic*, 43(3): 1635-1642.
- Wollgast J & Anklam E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423-447.

- Wright G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 57(10): 1451-1470. Doi:10.1016/j.addr.2005.04.002.
- Xing Y. & Harper W. F. (2020) ‘*Bacillus* spore awakening: recent discoveries and technological 196 developments’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 64, pp. 110–115. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.024.
- Xiong Y., Shahid Riaz Rajoka M., Zhang M. & Zhendan H. (2022). Isolation and identification of two new compounds from the seeds of *Moringa oleifera* and their antiviral and anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 36 (4), 974-983. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1851218>
- Xu Y.B., Chen G.L. & Guo M.Q. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*, 8, 296. <https://doi.org/10.3390/antiox8080296>
- Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. & Ouar Korich M.N. (2001). Classification et mode d’action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1): 5-12.
- Yang Y & Zhang F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus Alatus* (Thumb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry* 15(4) : 308-313.
- Yogo S. (2005). Contribution à la maîtrise de la gestion des boues de vidange dans la ville de Yaoundé. Mémoire de fin d’étude d’ingénierie des industries agricoles et agroalimentaire, ENSAI, Université de Ngaoundéré (Cameroun), 54 p.
- Young S.B. & Setlow P. (2003). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology* 95(1): 54-67.
- Yuan G., Guan Y., Yi H., Lai S., Sun Y. & Cao S. (2021). Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific Reports*, 11, 10471. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90035-7>



ANNEXE

Annexe : Composition des milieux de culture utilisés pour l'isolement des bactéries sporulantes

Milieu Luria Bertani (LB) (Bertani, 2004)

Masse des ingrédients pour 1000 ml de milieu à préparer :

- Tryptone (peptone de caséine) : 10,0g
- Extrait de levure (pour vitamines, oligo-éléments, entre autres): 5,0g
- Chlorure de sodium 10,0g
- Agar agar bactériologique 20g
- pH 7,0

Milieu de Mossel (Mossel, 1996)

Masse des ingrédients pour 1000 ml de milieu à préparer :

- Tryptone : 10,0g
- Extrait de viande : 1,0g
- Chlorure de sodium : 10,0g
- D-mannitol : 10,0g
- Rouge phénol : 0,025g
- Agar agar bactériologique : 13,5g
- Additifs : polymyxine B 5×10^4 UI, Emulsion stérile de jaune d'œuf 50,0 mL

Gélose tryptone sulfite cyclosérine

Masse des ingrédients pour 1000 ml de milieu à préparer :

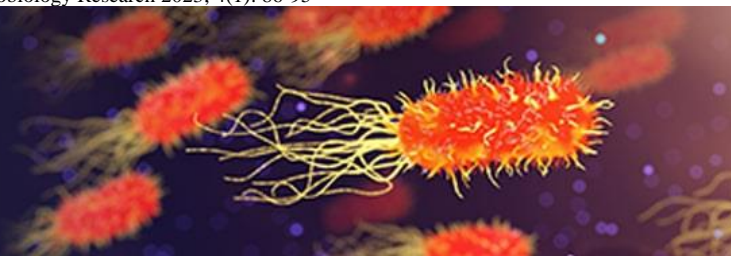
- Tryptone : 15,0g
- Peptone papainique de soja : 5,0g
- Extrait autolytique de levure : 5,0g
- Métabisulfite de sodium : 1,0g
- Citrates ferrique ammoniacal : 1,0g
- Agar agar bactériologique : 15,0g
- Supplément : D cyclosérine : 200 mg

PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE

Djiala Tagne M.R., Nougang M.E., Mouafo Tamnou E.B., Manouore Njoya A, Ngo Bahebeck P., Baleng S.D., Nana P.A., Yogne Poutoum Y., Bricheux G., Metsopkeng C.S., Sime-Ngando T. & Nola M., 2023. Antibiotics susceptibility of some *Bacillus* strains isolated in the ground and rainwater in urbanized area in Cameroon (Central Africa), and potential impact of the season change. *Journal of Advances in Microbiology Research*, 4(1): 86-95. Doi: [10.22271/micro.2023.v4.i1b.72](https://doi.org/10.22271/micro.2023.v4.i1b.72)

Djiala Tagne M.R., Nougang M.E., Metsopkeng C.S., Bricheux G., Donnadiou F., Nana P.A., Ripoche I., Donfagsiteli Tchinda N., Agbor G.A., Chalard P., Sime-Ngando T. & Nola M., 2023. Effects of aqueous and hydro-ethanolic *Moringa oleifera* Lam leaf extracts on the cultivability of 2 *Bacillus* strains isolated from rainwater. *Journal of Food Stability*, 6(4): 1-19. Doi: [10.36400/J.Food.Stab.6.4.2024-045](https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.6.4.2024-045)

Djiala Tagne M.R., Metsopkeng C.S., Nougang M.E., Mouafo Tamnou E.B., Manouore Njoya A., Ngo Bahebeck P., Baleng S.D., Yogne Poutoum Y., Nana P.A., Sime-Ngando T. & Nola M., 2022. Abundance dynamics of 2 *Bacillus* species in rain and underground water in an urbanized area in Cameroon (Central Africa) and impact of some abiotic parameters. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management* 7(2): 109-120. Doi: [10.11648/j.ijnrem.20220702.16](https://doi.org/10.11648/j.ijnrem.20220702.16)



E-ISSN: 2709-944X
P-ISSN: 2709-9431
JRM 2023; 4(1): 86-95
© 2023 JAMR
www.microbiojournal.com
Received: 01-11-2022
Accepted: 11-12-2022

Author's details are given
below the reference section

Antibiotics susceptibility of some *Bacillus* strains isolated in the ground and rainwater in urbanized area in Cameroon (Central Africa), and potential impact of the season change

Morelle Raïsa Djiala Tagne, Mireille Ebiane Nougang, Edith Brunelle Mouafo Tannou, Awawou Manouore Njoya, Pierrette Ngo Bahebeck, Samuel Davy Baleng, Paul Aain Nana, Yves Yogne Poutoum, Genevieve Bricheux, Claire Stéphane Metsopkeng, Télésphore Sime-Ngando and Moïse Nola

Abstract

This study assessed the antibiotics susceptibility of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. subtilis* strains isolated in wells and rainwater samples in Yaounde (Cameroon). Water samples in wells were collected monthly during a long dry season (LDS), a short dry season (SDS), a long rainy season (LRS) and a short rainy season (SRS), and during the LRS and the SRS for rainwater. The antibiotics considered included Imipenem, Amikacin, Gentamycin, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Sulfamethazol, and Tetracycline. With strains from the groundwater, the antibiotic inhibition diameters varied from 9.13 mm (Sulfametazole during SDS) to 32.78 mm (Imipenem during LDS) with *B. thuringiensis*, from 8.2 mm (Sulfametazole during SDS) to 35.25 mm (Imipenem during LDS) with *B. cereus*, and from 5.05 mm (Ofloxacin during LRS) to 29.25 mm (Imipenem during LDS) with *B. subtilis*. With those from the rainwater, they varied from 4.55 mm (Sulfametazole during LRS) to 25.65mm (Imipenem during LRS) with *B. thuringiensis*, from 2.13 mm (Imipenem during LRS) to 20.05mm (Imipenem during SRS) with *B. cereus*, and from 5.03 mm (Gentamicin during SRS) to 25.15mm (Tetracycline during SRS) with *B. subtilis*. *Bacillus* strains isolated during LRS were multiresistant to the majority of antibiotics. The inhibition diameters of the most antibiotics varied significantly from one season to another ($p < 0.05$).

Keywords: Antibiotic susceptibility, *Bacillus* strains, ground and rainwater, inhibition diameters variation

1. Introduction

Water consumption varies greatly from one country to another. It depends on their development, population and the resource itself. When it is polluted, water can be one of the main vectors for the transmission of many diseases which are the cause of major human or animal epidemics. It can concern rivers, water bodies, brackish water as well as rainwater, dew, snow and polar ice.

Water found in each type of environment can be polluted by chemicals and microorganisms including protozoa, virus and bacteria [1]. Various bacteria families can be found in aquatic environments. These microorganisms are of various properties. Some properties commonly used to identify bacterial microorganisms are the Gram staining cell wall and spore-forming character. *Bacillus* genera bacteria are known as Gram positive and spore-forming bacteria. They are found in the air, in water or in the soil [2].

For humans, some *Bacillus* species are pathogens or opportunistic pathogens while others are simply commensal. The commensal character of a germ, however, depends on several factors in its environment [3]. In addition to food poisoning, these bacteria cause local and systemic infections, sometimes resulting in the death of the patient [4, 5].

The potential relevance of biological particles for atmospheric processes has also been recognized for many years [6, 7]. Airborne biological particles as a whole are also denoted as bioaerosols. They can include bacterial cells and cellular fragments, fungal spores and fungal hyphae, pollen grains, viruses, by-products of microbial metabolism and other biological material [8].

Correspondence

Moïse Nola
Faculty of Sciences,
Laboratory of Hydrobiology
and Environment, University
of Yaounde I, Yaounde,
Cameroon

After emission from the biosphere, primary biological aerosol particles can serve as nuclei for water droplets or ice crystals, leading to the formation of clouds and precipitation [7]. The spores contained in the atmosphere are likely to be transported to the soil surface by precipitation. The recharge of the water table occurs with a delay of one month compared to precipitation, the time necessary to saturate the soil layers above the water table [9].

On the other hand, the growing challenge of the emergence and spread of antibiotic resistance has been the subject of several investigations [10], and has been flagged by world health organizations as one of the major health challenges of the 21st century [11, 12]. The bacteria involved are increasingly varied and above all have become more resistant to antibiotics and its public health consequences have resulted in increased bacterial resistance to various antibiotics [13].

Some work carried out in urban areas in Central Africa has indicated that rainwater contains bacteria of the *Bacillus* genus. Their abundance dynamics undergoes a spatio-temporal variation, and differs from that of groundwater [14]. Few studies have been carried out on the susceptibility to antibiotics of the *Bacillus* species isolated at the same periods in rainwater and groundwater from the same geographical region. Less information's also available regarding the role of the season changing on the bacterial susceptibility to antibiotics. This study aims to assess the seasonal variation in the antibiotics susceptibility to strains of 3 *Bacillus* species (*Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. subtilis*) isolated in underground and rainwater in an urbanized area in Cameroon (Central Africa).

2. Material and Methods

2.1 Study Area and Sampling Sites

Yaounde is the capital of Cameroon. It is located 300 km from the Atlantic coast, between 3°5' North latitude and 11°31' East longitude. The climate is equatorial, characterized by the alternation of two dry seasons and two rainy seasons: a long dry season (LDS) from December to mid-March, a short rainy season (SRS) from mid-March to June, a short dry season (SDS) from July to August and a long rainy season (LRS) from September to November. The annual average temperature is 23.5°C, varying between 16 and 31°C depending on the season, and that of rainfalls is 1650 mm [15].

Six wells points encoded W1-D5, W2-D5, W3-D3, W4-D3, W5-D6 and W6-D6 were chosen in 3 different administrative districts of Yaounde. Wells W1-D5 and W2-D5 were choose in N°5 district area, wells W3-D3 and W4-D3 in N°3 district area, and W5-D6 and W6-D6 in N°6 district area. At the same time, one station was installed in each of the 3 districts to collect rainwater. It was named R1-D5 in N°5 district area, R2-D3 in N°3 district area and R3-D6 in N°6 district area. The location of each sampling wells and each station for rainwater collection is indicated in Figure 1. The geographic coordinates of each sampling site are indicated in Table 1.

The meteorological data during the sampling period have been downloaded from the NASA web site (<https://power.larc.nasa.gov/data.access.viewer/>). During this sampling period, the rainfall varied from 0.34 mm/day (January 2022) to 11.8 mm/day (July 2021). The air temperature and the air relative humidity varied from 20.02°C (July 2021) to 24.28°C (March 2021), and from

75.26% (January 2022) to 91.25% (August 2021) respectively. The insolation varied from 2.59 Kw-h/m²/day (July 2021) to 5.54 Kw-h/m²/day (September 2021). The temporal variation of these data is presented in Figure 2.

2.2 Water Sampling

Rainwater and wells were analyzed once a month, from March 2021 to March 2022. This study period therefore includes 4 different seasons: a LDS, a SRS, a SDS and a LRS. Samples were collected once a month. During the short rainy season, it rains at least once a week, while during the short dry season it rains 1 to 2 every 15 days. During the long rainy season, it rains 3 to 5 times a week.

Each rainwater sample was collected using an autoclaved glass container and placed in the yard of a specific dwelling. The said container was opened just when the rain started to fall. The collected water was poured into a sterile 500 mL glass vial. After the rain, it was then immediately transported in a refrigerated conditions to the laboratory.

For each well chosen, the water sample was taken using a sterile bucket attached to a rope. The collected water was poured into a sterile 500 mL glass vial. After taking this sample, the hydrological parameters of the well were measured using a graduated metal rope, also sterilized in an autoclave and connected to ballast at its end.

2.3 Bacterial isolation and identification

Bacteriological analyzes consisted of the isolation of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. subtilis*. *Bacillus cereus* was isolated on Mossel agar medium (Humeau laboratories) containing Polymyxin and the egg yolk added after autoclaving. *Bacillus thuringiensis* and *B. subtilis* was isolated on were isolated on Luria Bertani agar culture medium (Sigma-Aldrich) [16, 17]. For that, 100 µl or a diluted water sample was analyzed, by the surface plating method. Petri dishes were then incubated at 36 ± 1°C for 24 hours. The morphological identification of the colonies considered the size and the outlines the color. *B. cereus* on Mossel agar medium formes colonies of around 5mm diameter, pink colour (mannitol negative) and typically sorrounded by an opaque halo due to egg precipitation (lecethinase positive) [18-20]. On Luria Bertani agar, the colonies of *B. thuringiensis* are white, with a diameter varying from 0.5 to 1 mm [18, 19], and colonies of *B. subtilis* are yellow [16]. Biochemical identification of strains isolated was further performed using API 20E system [18, 19, 21].

2.4 Antibiotics susceptibility tests

2.4.1 Nutrient media and culture conditions

The medium used was Müeller Hinton agar (Biorad) poured into Petri dishes. The thickness of the agar was approximately 4 mm. The surface of the agar was dried before use [22]. From an 18-24 h culture on non-selective agar medium (Plate Count Agar), a bacterial suspension in saline solution (0.9% NaCl) with a turbidity equivalent to that of the standard 0.5 of the range of McFarland was carried out, which corresponds to a bacterial density of approximately 1x10⁸ CFU/100 mL. The inoculum was then diluted 1/10 (1x10⁷ CFU/100 mL) before inoculation [22].

The agar was inoculated with the bacterial inoculum by the swab method. The entire surface of the agar was swabbed in three directions. The antibiotic discs were placed on the surface of the inoculated and dried agar. The gap between the discs was 3 cm in order to avoid overlapping of the

inhibition diameters. The Petri dishes were then incubated within 15 min following the depositing of the discs, at 37°C aerobically for 24 h [22].

2.4.2 Antibiotic susceptibility assay

The antimicrobial susceptibility tests were carried out using the disk diffusion method according to the recommendations of the FMS-EUCAST [22]. The antibiotic molecules were chosen in depending on the uses of the population but also on their availability in the laboratory.

A total of 7 antibiotics belonging to five major families were used. Antibiotic of the β -lactam family was Imipenem. Those of the Aminoglycoside family included Amikacin and Gentamycin. Antibiotics of the Quinolone family were Ciprofloxacin and Ofloxacin. That of the Sulfonamide family was Sulfamethazol, and that of the Cyclin family was Tetracycline. The inhibition diameters were measured using the caliper and the results were scored as resistant, sensitive or intermediate according to CA-SFM recommendations and others [22, 23].

2.5 Data analysis

The values of the antibiotic inhibition diameters were illustrated by histograms plotted using Excel 2010 software. The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed to compare the antibiotic inhibition diameters tested between seasons (a value of $P < 0.05$ was assumed to be significant). Statistical analyzes were performed using SPSS version 25.0 software.

3. Results

3.1 Antibiotics inhibition diameters with *Bacillus* species isolated

With *Bacillus* strains isolated in the groundwater, it was noted that the inhibition diameters ranged from 5.05 to 35.25 mm for the whole antibiotics used. With *B. thuringiensis*, the inhibition diameters varied from 9.13 mm to 32.78 mm. The greatest value was obtained with Imipenem (family of beta lactams) during the long dry season while the smallest was obtained with Sulfamethazole (family of sulfonamides) during the short dry season. With *B. cereus* the inhibition diameters varied from 8.2 to 35.25 mm. The highest value was also obtained with Imipenem during the long dry season while the lowest value was recorded also with sulfamethazole during the short dry season. With *B. subtilis* inhibition diameters varied from 5.05 to 29.25 mm. The lowest value was recorded with Ofloxacin (Quinolone family) during the long rainy season while the highest value was noted with Imipenem during the long dry season. The temporal variation with respect to the antibiotic used, of the inhibition diameters of each *Bacillus* species isolated from wells samples is presented in Figure 3. The antibiotic inhibition diameters relatively varied with the season changing.

With *Bacillus* strains isolated in the rainwater samples, it was noted that inhibition diameters varied from 2.13 to 25.65 mm for the whole antibiotics used. With *B. thuringiensis*, the inhibition diameters varied from 4.55 mm to 25.65 mm. The greatest value was obtained with Imipenem during the long rainy season while the smallest value was obtained with sulfamethazole during the same season. With *B. cereus* the inhibition diameters varied from 2.13 to 20.05 mm. These values were obtained with Imipenem during the long and the short rainy season respectively. Inhibition diameters in *B. subtilis* varied from

5.03 to 25.15 mm. The smallest value was recorded with Gentamicin (family of Aminoglycosides) and the largest value was noted with Tetracycline (family of Cyclins) during the short rainy season. The temporal variation with respect to the antibiotic used, of these inhibition diameters is showed in Figure 3. The antibiotic inhibition diameters also relatively varied with the season changing.

3.2 Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species

In groundwater, *B. thuringiensis* was sensitive to Imipenem (Beta-lactam family) during the long and short dry season and was resistant against others of the same family during the short and long rainy season. It has a high resistance against Gentamicin and Akamicin (family of Aminoglycosides) and Sulfamethazole (Sulfamides family), and moderate resistance against Ciprofloxacin and Ofloxacin (family of quinolones) and Tetracycline (Cyclins). *B. cereus* showed a high sensitivity to Imipenem, a medium sensitivity to ciprofloxacin and ofloxacin, a high resistance and a medium resistance against the sulfonamides and aminoglycosides family respectively. *B. subtilis* showed a high resistance against antibiotics of the Aminoglycoside and Sulfonamide family in all seasons and an average sensitivity to Imipenem of the beta-lactam family. In rainwater, a strong resistance of all species of *Bacillus* against all the families of antibiotics tested was recorded, with the exception of *B. subtilis* which was sensitive to antibiotics of the cyclin family during the short rainy season. The susceptibility of the 3 *Bacillus* species against all the antibiotics used is presented in Table 2 for groundwater and Table 3 rainwater. The results of the sensitivity to the antibiotics tested showed that the *Bacillus* species isolated during the long rainy season were mostly multiresistant to the majority of antibiotics.

3.3 Comparison of antibiotic inhibition diameters

Using the Kruskal-Wallis test, a comparison of the inhibition diameters of bacteria amongst the isolation seasons of the cell strains (4 different seasons for groundwater and 2 different seasons for rainwater), was made for each type of water and each antibiotic tested. The results are presented in Table 4. When cell strains were isolated from groundwater, it was noted for *B. thuringiensis* that the inhibition diameter varied significantly ($P < 0.05$) from one of the 4 seasons to another at the presence of Imipenem, Ofloxacin and Ciprofloxacin. When the strains were instead isolated from rainwater, the inhibition diameters varied significantly from one rainy season to another ($P < 0.05$) only when the cells were at the presence of Gentamycin or Tetracyclin (Table 4).

With *B. cereus* when the bacterial strains were isolated from the groundwater, the inhibition diameters varied significantly from one of the 4 seasons to another ($P < 0.05$), at the presence of Imipenem, Gentamycin, Ciprofloxacin, Sulfamethazole/trimethoprim and Tetracyclin. With the strains isolated from rainwater, the inhibition diameters varied significantly from one rainy season to another ($P < 0.05$), only at the presence of Imipenem, Ofloxacin and Sulfamethazole/Trimethoprim (Table 4).

For *B. subtilis* cells, the inhibition diameters varied significantly from one of the rainy season to another at the presence of all the antibiotics tested ($P < 0.05$) with the strains isolated from rainwater. The same observation is made with the strains isolated during the 4 different seasons

of the year from groundwater, except when the cells were at the presence of Sulfamethazole/Trimethoprim (Table 4). It is noted from Table 3 that the profiles susceptibility of strains isolated from a water type varied relatively depending on the species. This susceptibility profiles for each cell species to the antibiotics seems to vary from season to season. However, this depends on the bacterial species, its original aquatic biotope and the antibiotic tested. In addition, with regard to strains isolated from groundwater, the Mann-whitney U test was made to compare the inhibition diameters between the seasons taken two by two, in order to know precisely between which seasons the susceptibility to antibiotics varied. It appeared a significant difference ($P < 0.05$) for the *B. thuringiensis* strains inhibition diameters at the presence of Imipenem, Ofloxacin, Ciprofloxacin between the long dry season and the long rainy season and between the short dry season and the short rainy season. Concerning the *B. cereus* strains, a significant difference in the susceptibility to antibiotics ($P < 0.05$) was recorded between the long and short dry season at the presence of Imipenem, Gentamycin, Akamicin, Ofloxacin, Ciprofloxacin and Tetracycline. A significant difference in the cells susceptibility ($P < 0.05$) was also recorded between the short dry and rainy season at the presence of Imipenem, Gentamycin, Ciprofloxacin, Sulfamethazol and Tetracycline. For the *B. subtilis* strains, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between the long dry season and the short dry rainy season, then between the short dry season and short rainy season at the presence of Imipenem, Gentamycin, Akamicin, Ofloxacin, Ciprofloxacin and Sulfamethazol.

4. Discussion

4.1 Antibiotic resistant *Bacillus* strains in wells and rainwater

Bacillus species isolated from different water types were highly resistant to several antibiotics used (Tables 2-3). This would reflect the multidrug resistance. This multi-resistance was observed for different families of antibiotics tested during the long and short rainy season for rainwater and during almost all seasons for groundwater. Egorov *et al* [24] indicated during all the time that synthesis of antibiotics has existed in nature (more than 2 billion years), bacteria have developed resistance mechanisms to their toxic action. Antibiotic resistance can occur via three general mechanisms: prevention of interaction of the drug with target, efflux of the antibiotic from the cell, and direct destruction or modification of the compound [25].

All the *Bacillus* strains isolated were resistant to Sulfamethazol. Sulfonamides are the antibiotics to which bacteria are generally sensitive; however, in this study there was a high level of resistance. The target of sulfonamides in bacteria is the enzyme dihydropteroate synthase [26].

The role of bacterial enzymes in resistance development is rather versatile and involves several key mechanisms [24, 25]. The enzymes involved in cell wall biosynthesis, as well as the synthesis of nucleic acids and metabolites, serve as a direct target for antibiotics. These enzymes in most cases included a)-those as the targets of antimicrobial drugs, b)-those modifying the cell targets of antimicrobial drugs, c)-those modifying antimicrobial drugs, and d)-bifunctional enzymes [24, 27, 28].

Intrinsic antibiotic resistance and acquired antibiotic resistance are also known [29]. The acquired resistance

mechanisms also include modification of antibiotic targets by genetic mutation or post-translational modification of the target [29-31]. Various antibiotic resistance mechanisms and may vary with respect to the considered cells strains and antibiotic. They include (i) modifications to the cell wall or outer membrane, reducing permeability for the antibiotic substance, (ii) expression of degradation enzymes that can render the substance harmless, (iii) protection of the molecular target of the antibiotic by preventing the antibiotic from entering the cell or pumping it out faster than it can enter, or (iv) alterations to the site of primary action and production an alternative target (usually an enzyme) that resists inhibition by the antibiotic [32-34].

Rainwater comes from the atmosphere. Many strains isolated from rainwater were also resistant against many antibiotics. Some studies carried out on the antibiotics susceptibility of culturable microorganisms in bioaerosols noted that this susceptibility varied with respect to antibiotic tests on one hand and the bacterial species considered, and most of germs have different antibiotic resistance genes distribution patterns [35]. It has been indicated that air represents an important active reservoir of diverse antibiotic resistance genes (ARGs) [35], and their origins may be extensive, including human activity such as wastewater treatment plants, gray water, municipal solid waste landfill, livestock farm, and medical industry and natural phenomena such as volcanic eruptions [36, 37].

4.2 Relative variation of antibacterial susceptibility with the change of the aquatic biotope

A relative variation of the bacterial resistance to an antibiotic has sometimes been noted with the change of the type of aquatic biotope (Tables 2-4). This would reflect the impact of the biotope properties on the genotypic properties of the microorganism. Working on the abundance dynamics of the strains of an aquatic species of Aeromonadaceae their antibiotic susceptibility, Signe *et al* [38] noted that there was a positive and significant relationship between the *A. hydrophila* susceptibility against Oxacillin and pH ($P < 0.01$) and between susceptibility against Amoxicillin-clavulanic acid and temperature. They noted that the increase in water temperature affect the cells strains antibiotic susceptibility. On the contrary, a negative and significant relationship ($P < 0.05$) between cell species susceptibility against Imipenem and pH was noted. The water physicochemical properties would influence the genetic makeup of aquatic microorganisms. This would then have repercussions on the enzymes activity in the presence of antibiotics.

It has thus been suggested that the regulation of some bacterial genes would be regulated by complex mechanisms including interactions of some abiotic characteristics of water [38, 39]. In addition, Dutta and Ramamurthy [40] indicated that the ecosystem is continuously exposed to a wide variety of chemicals and antimicrobials, which act as a source for the spread of antimicrobial resistance genes. It has also been suggested that water chemicals could potentially stimulate the conjugative transfer of plasmid-encoded multidrug resistance genes within and across the bacterial species [40].

4.3 Variation of the antibacterial susceptibility with the season changing

Significant variations of the antibiotics susceptibility and inhibition diameters from one season to another have been

recorded for a given antibiotic against the same bacterial species isolated from the same aquatic biotope (Tables 2-4). This would suggest the evolutionary and ecological aspects of the chemical and biological reactions in bacteria. It has been indicated that the accumulation of antibiotics in the environment, including wastewaters and drinking water, can contribute to the development of antibiotic resistant bacteria and the dissemination of ARGs. It has been indicated that ARGs can temporary be transferred horizontally to other microorganisms within the atmosphere or aquatic environment, thus promoting the dissemination of antibiotic resistance [29].

For rainwater, the temporal variation of the antibiotic susceptibility of the *Bacillus* isolated strains could be related to meteorological factors such as wind and lightning. It is indicated that aeration in wastewater treatment processes can increase microbial activity, intensify aerosolization, and increase bioaerosol emissions. High aeration shear can affect the size distribution and morphology of activated sludge flocs and further affect the size of bioaerosol particles discharged into the air. And these particles in the air can be transported at different speeds from one region of the world to another [37, 41, 42].

In addition, the presence and concentration of dust particles in the atmosphere would vary according to the seasons. The concentration of these particles in the atmosphere should be relatively high in the dry season, and relatively low in the rainy season. Their wind transport from one part of the

world to another could be influenced by wind speeds, the degree of humidity in the atmosphere, as well as by sunshine duration and the sun intensity. Kumar and Attri [43] indicated that the dominant bacterial species in the air are different in different seasons. Some authors have suggested that the influence of season on the concentration of microorganisms in the atmosphere is intertwined with various factors, and the distribution of dust-associated microorganisms may change vertically in space [37, 44]. According to Kataki *et al* [45], many factors may affect the microbial emission load in bioaerosol. They include: a)-the seasonal impact on bioaerosol formation although bioaerosol concentration may vary with respect to type of microbial contaminant [46], b)-the wind speed and direction which directly influence microbial emission around a wastewater treatment plants [47, 48], c)-the sampling height which increase with the decreasing of the concentrations of the microorganisms and total suspended particles [49], d)-the mode and aeration and bioaerosol formation which have the aeration basin in wastewater treatment process trains [50], e)-the chemical components in bioaerosol, the proportion depending upon the source of generation [51, 52], and f)-the meteorological factors (including temperature, humidity, wind speed), the seasonal variation (the dominant bacteria in the air vary with respect to the seasons), the geographic conditions and location, as well as the particle size and atmospheric pollutants [37].

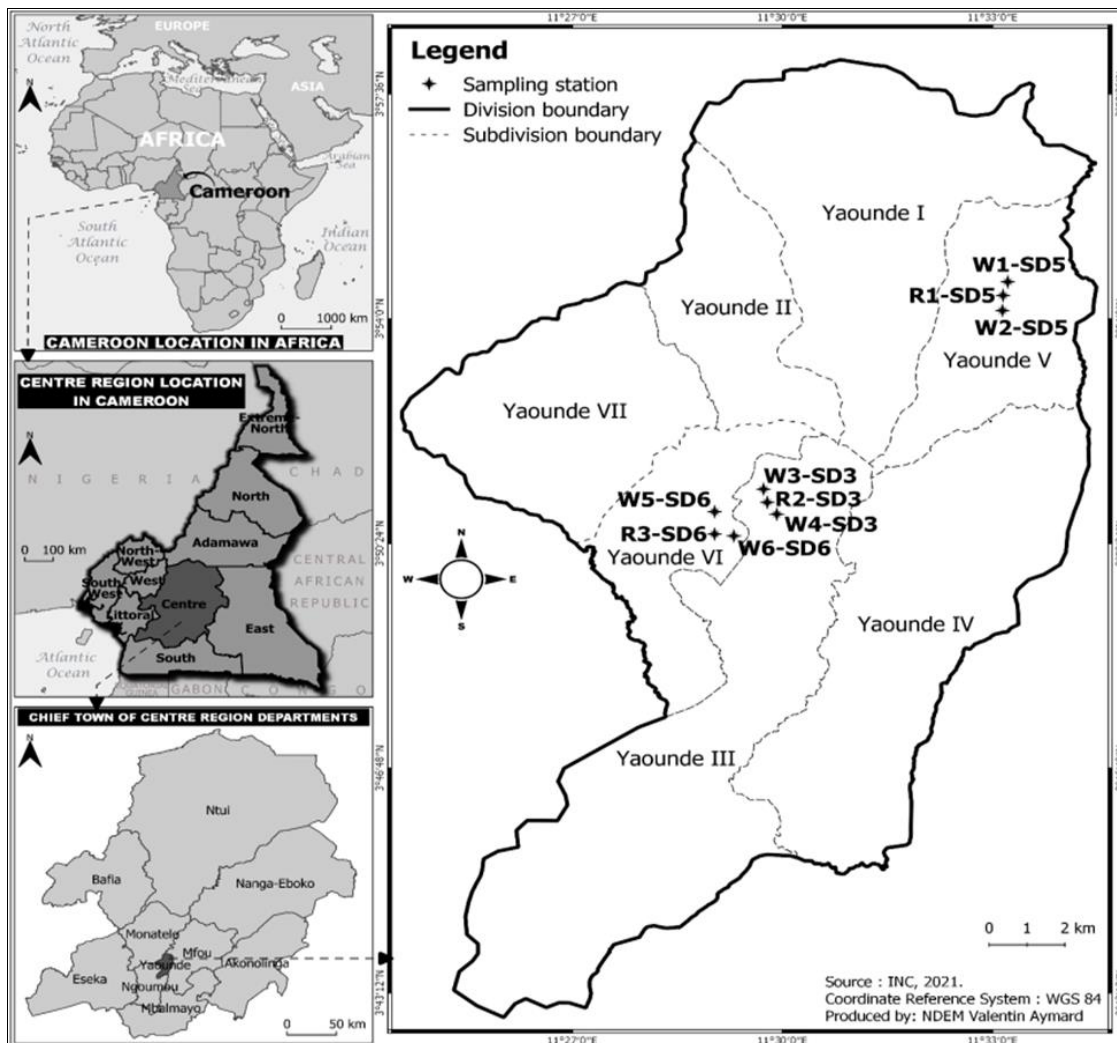


Fig 1: Sampling sites of the water samplings (National Institute of Cartography, Cameroon, 2020, modified)

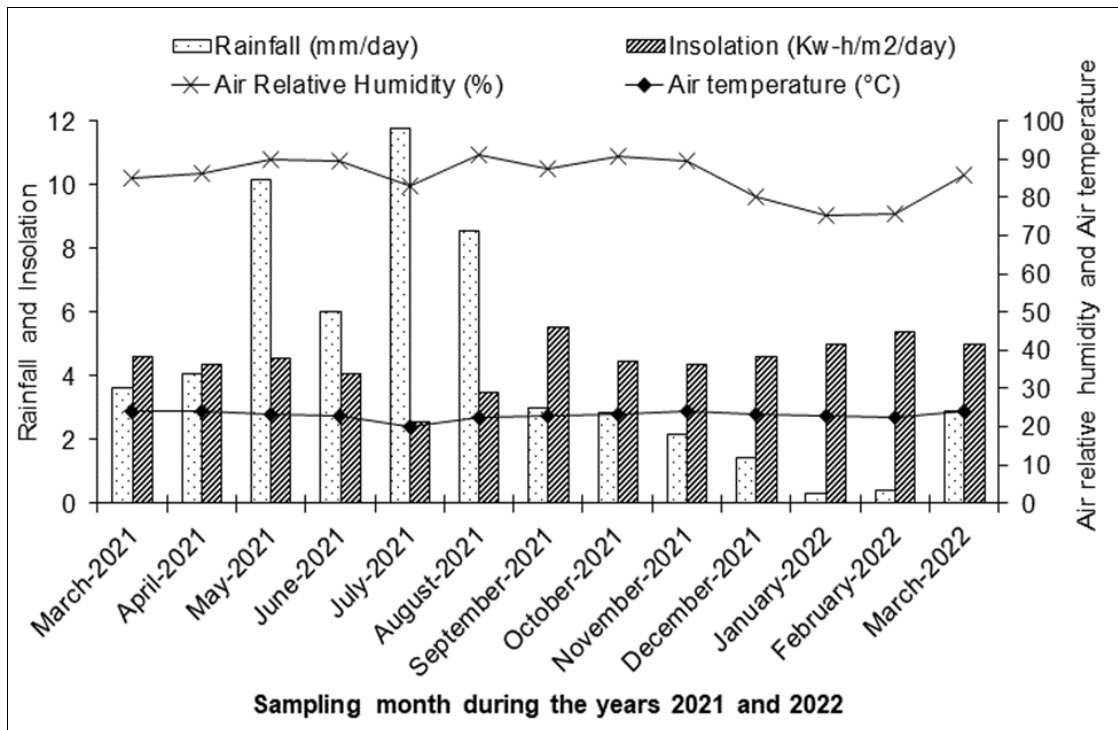


Fig 2: Temporal variation of rainfall, insolation, air relative humidity and air temperature during the sampling period

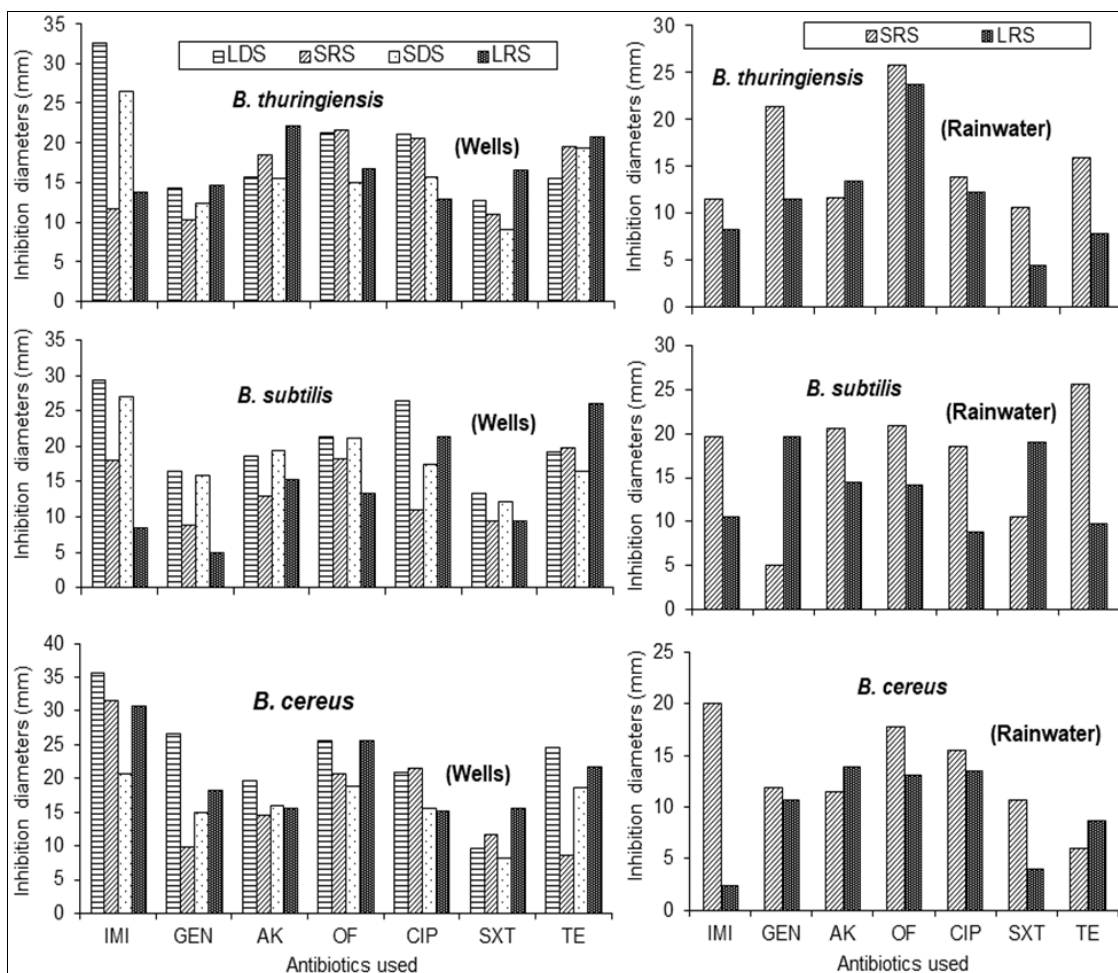


Fig 3: Seasonal variation with respect to the antibiotic used, of the inhibition diameters of each *Bacillus* species isolated from wells and from rainwater (LDS: long dry season; SRS: short rainy season; SDS: short dry season; LRS: long rainy season)

Table 1: Geographic coordinates of sampling sites

| Location of the sampling site and nature of the water sampled | | Geographic coordinates of the sampling site and total depth of well | | | | |
|---|-----------------------------|---|--------------|--------------|----------------------|--|
| Location of the sampling site | Nature of the water sampled | Latitude | Longitude | Altitude (m) | Total well depth (m) | |
| W1-SD5 | Wells | 03°54'19.9"N | 11°33'12.9"E | 692 | 9.5 | |
| W2-SD5 | Wells | 03°54'18.0"N | 11°33'11.3"E | 707 | 17.3 | |
| W3-SD3 | Wells | 03°51'14.4"N | 11°29'43.9"E | 728 | 11.5 | |
| W4-SD3 | Wells | 03°51'04.2"N | 11°29'48.5"E | 725 | 5 | |
| W5-SD6 | Wells | 03°50'31.0"N | 11°29'07.1"E | 711 | 20 | |
| W6-SD6 | Wells | 03°50'31.5"N | 11°29'10.2"E | 720 | 17 | |
| R1-SD5 | Rainwater | 03°50'31.5"N | 11°33'06.3"E | 729 | / | |
| R2-SD3 | Rainwater | 03°51'04.2"N | 11°29'48.5"E | 725 | / | |
| R3-SD6 | Rainwater | 03°50'31.0"N | 11°29'07.1"E | 711 | / | |

Table 2: Antibiotic inhibition diameter (mm) and antibiotic susceptibility (R: resistant, I: intermédiaire, S: sensitive) of strains of the bacterial species isolated in groundwater during the long dry season (LDS), the short rainy season (SRS), the short dry season (SDS) and the long rainy season (LRS)

| Bacterial species and isolation period | | Antibiotics used | | | | | | |
|--|-----|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | IMI10 | GEN10 | AK30 | OF5 | CIP5 | SXT25 | TE30 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | LDS | 32.7 (S) | 14.3 (R) | 15.8 (R) | 21.4 (I) | 21.1 (I) | 12.8 (R) | 15.6 (R) |
| | SRS | 11.8 (R) | 10.4 (R) | 18.5 (I) | 21.6 (I) | 20.7 (I) | 11 (R) | 19.5 (I) |
| | SDS | 26.5 (S) | 12.4 (R) | 15.5 (R) | 15 (R) | 15.7 (R) | 9.2 (R) | 19.4 (I) |
| | LRS | 13.9 (R) | 14.7 (R) | 22.2 (I) | 16.8 (R) | 13 (R) | 16.7 (R) | 20.8 (I) |
| <i>Bacillus cereus</i> | LDS | 35.5 (S) | 26.5 (S) | 19.7 (I) | 25.5 (S) | 20.8 (I) | 9.5 (R) | 24.5 (S) |
| | SRS | 31.5 (S) | 9.8 (R) | 14.5 (R) | 20.6 (I) | 21.5 (I) | 11.7 (R) | 8.5 (R) |
| | SDS | 20.7 (I) | 15 (R) | 16 (R) | 18.7 (I) | 15.5 (R) | 8.2 (R) | 18.5 (I) |
| | LRS | 30.7 (S) | 18.2 (I) | 15.6 (R) | 25.5 (S) | 15.2 (R) | 15.5 (R) | 21.7 (I) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | LDS | 29.5 (S) | 16.5 (R) | 18.7 (I) | 21.5 (I) | 26.5 (S) | 13.5 (R) | 19.2 (I) |
| | SRS | 18.1 (I) | 9 (R) | 13 (R) | 18.3 (I) | 11 (R) | 9.5 (R) | 19.8 (I) |
| | SDS | 27 (S) | 16 (R) | 19.5 (I) | 21.2 (I) | 17.5 (R) | 12.3 (R) | 16.5 (R) |
| | LRS | 8.5 (R) | 5 (R) | 15.3 (R) | 13.5 (R) | 21.5 (I) | 9.5 (R) | 26.1 (S) |

IMI: Imipenem; GEN: Gentamycin; AK: Amikacin; OFX: Ofloxacin CIP: Ciprofloxacin; SXT: Sulfamethazole/Trimethoprim; TE: Tetracyclin

Table 3: Antibiotic inhibition diameter (mm) and antibiotic susceptibility (R: resistant, I: intermédiaire, S: sensitive) of strains of the bacterial species isolated in rainwater during the short rainy season (SRS) and the long rainy season (LRS)

| Bacterial species and isolation period | | Antibiotics used | | | | | | |
|--|-----|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | IMI10 | GEN10 | AK30 | OF5 | CIP5 | SXT25 | TE30 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | SRS | 11.5 (R) | 21.4 (I) | 11.7 (R) | 25.8 (S) | 13.9 (R) | 10.6 (R) | 15.9 (R) |
| | LRS | 8.3 (R) | 11.6 (R) | 13.5 (R) | 23.8 (I) | 12.2 (R) | 4.5 (R) | 7.8 (R) |
| <i>Bacillus cereus</i> | SRS | 20.1 (I) | 12 (R) | 11.5 (R) | 17.9 (I) | 15.5 (R) | 10.8 (R) | 6 (R) |
| | LRS | 2.5 (R) | 10.7 (R) | 14 (R) | 13.1 (R) | 13.6 (R) | 4 (R) | 8.7 (R) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | SRS | 19.5 (I) | 5 (R) | 20.5 (I) | 20.8 (I) | 18.5 (I) | 10.5 (R) | 25.5 (S) |
| | LRS | 10.5 (R) | 19.5 (I) | 14.3 (R) | 14 (R) | 8.7 (R) | 18.9 (I) | 9.7 (R) |

IMI: Imipenem; GEN: Gentamycin; AK: Amikacin; OFX: Ofloxacin CIP: Ciprofloxacin; SXT: Sulfamethazole/Trimethoprim; TE: Tetracyclin

Table 4: P-values of the Kruskal-Wallis test comparing for each of the bacterial species and each of the sampled water type, the antibiotics inhibition diameters among cells strains isolation seasons

| Antibio-tics used | P-values for each bacterial species isolated from each water type | | | | | |
|-------------------|---|-----------|------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | | <i>Bacillus cereus</i> | | <i>Bacillus subtilis</i> | |
| | Groundwater | Rainwater | Groundwater | Rainwater | Groundwater | Rainwater |
| IMI10 | 0.007** | 0.149 | 0.022* | 0.019* | 0.005** | 0.021* |
| GEN10 | 0.616 | 0.021* | 0.003** | 0.372 | 0.005** | 0.020* |
| AK30 | 0.300 | 0.462 | 0.086 | 0.237 | 0.007** | 0.019* |
| OFX5 | 0.010* | 0.309 | 0.143 | 0.028* | 0.007** | 0.020* |
| CIP5 | 0.018* | 0.306 | 0.043* | 0.137 | 0.003** | 0.020* |
| SXT25 | 0.065 | 0.146 | 0.010* | 0.027* | 0.067 | 0.019* |
| TE30 | 0.291 | 0.021* | 0.004** | 0.381 | 0.021* | 0.021* |

*: $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; IMI: Imipenem; GEN: Gentamycin; AK: Amikacin; OFX: Ofloxacin; CIP: Ciprofloxacin; SXT: Sulfamethazole/Trimethoprim; TE: Tetracyclin

5. Conclusion

Bacillus strains found in ground and rainwater undergoes various susceptibility profile against Imipenem (β -lactam family), Amikacin and Gentamycin (Aminoglycoside family), Ciprofloxacin and Ofloxacin (Quinolone family),

Sulfamethazol (Sulfonamide family), and Tetracycline (Cyclin family). This antibiotics susceptibility and inhibition diameters can significantly vary from one season to another for a given antibiotic against the same bacterial species isolated from the same aquatic biotope. This seasonal

variation in susceptibility to antibiotics would be due to several factors including anthropogenic and meteorological factors, as well as the temporal variation of the abiotic properties of aquatic biotopes.

6. Conflict of Interest

Not available

7. Financial Support

Not available

8. References

- Thierry S, Macarie H, Iizuka T, Geibdörfer W, Assih EA, Spanevello M, *et al.* *Pseudoxanthomonas Mexicana* sp. Nov. and *Pseudoxanthomonas Japonensis* sp. Nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* and of its types species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;6:2245-2255. Doi:10.1099/ij.s.0.02810-0.
- Brillard J, Dupont CMS, Berge O, Dargaignaratz C, Oriol-Gagnier S, Doussan C, *et al.* The water cycle, a potential source of the bacterial pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*; c2014. Article ID 356928. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/356928>.
- Hamilton K, Reyneke B, Waso M, Clements T, Ndlovu T, Khan W, *et al.* A global review of the microbiological quality and potential health risks associated with roof-harvested rainwater tanks. *Npj Clean Water*. 2019;2. <https://doi.org/10.1038/s41545-019-0030-5>.
- Glasset B, Herbin S, Granier SA, Cavalié L, Lafeuille E, Guérin C, *et al.* *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS ONE*. 2018;13(5):e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>.
- Fernandez-Chapa D, Ramírez-Villalobos J, Galan-Wong L. Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: An overview. *Intech Open books*; c2019. Doi: 10.5772/intechopen.85756.
- Jaenicke R. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere. *Science* 2005; 308: 73. PMID: 15802596. Doi:10.1126/science.1106335.
- Després VR, Huffman JA, Burrows SM, Hoose C, Safatov AS, Buryak G, *et al.* Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*. 2012;64:15598. <https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.15598>.
- Stetzenbach LD. Airborne infectious microorganisms. *In Pathogenesis-Airborne Infectious Microorganisms*. *Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier Inc; c2009. p. 176-182. PMID: PMC7150350.
- Nola M, Njiné T, Djuikom E, Sikati Foko V. Bacteria indicators dynamics in wells as influenced by well depth and well water column thickness, in Yaounde (Cameroon). *African Journal of Science and Technology*. 2000;1(2):82-91.
- FAO. The FAO action plan on antimicrobial resistance: 2016-2020. Policy Support and Governance Gateway. Guidelines & methodologies; c2016. <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>.
- WHO. WHO global strategy on people-centred and integrated health services: interim report. *World Health Organization*; c2015. WHO/HIS/SDS/2015.6; <http://www.who.int/servicedeliverysafety/areas/people-centred-care/globalstrategy/en/>. (accessed 9th June 2015).
- O'Neill J. An audience with. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15:526. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.160>.
- Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, *et al.* Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *BMJ*. 1998;317:609-610. Doi:10.1136/bmj.317.7159.609.
- Djiala Tagne MR, Metsopkeng CS, Nougang ME, Mouafo Tamnou EB, Manouore Njoya A, Ngo Bahebeck P, *et al.* Abundance dynamics of 2 *Bacillus* species in rain and underground water in an urbanized area in Cameroon (Central Africa) and impact of some abiotic parameters. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management*. 2022;7(2):109-120. Doi:10.11648/j.ijnrem.20220702.16.
- Abossolo SA, Amougou JA, Tchindjang M, Mena MS, Batha RAS. Analyse des précipitations annuelles à la station de Yaoundé de 1895 à 2006. *Afrique science*. 2015;11(2):183-194.
- Pauline L. Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Thèse de Doctorat, Biotechnologies. Université de Bourgogne; c2013.
- Nair K, Al-Thani R, Al-Thani D, Al-Yafei F, Ahmed T, Jaoua S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and cry gene content. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9. Article 708. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>.
- Tallent MS, Kotewicz MK, Strain AE, Bennett WR. Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*. 2012;95(2):446-451. PMID: 22649932. Doi:10.5740/jaoacint.11-251.
- Amin M, Zeinab R, Ahmady ZA. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. 2015;2(1):e23233. ID: 86083865. Doi:10.17795/ajcm-23233.
- Koua Abea M, Bomo Assanvo J, Sanogo M, Koffi KM. Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biology and Chemical Science*. 2018;12(5):2284-2293. Doi: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.28>.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000.
- FMS-EUCAST 2022. French Microbiology Society-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2022*. <https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/comite-de-lantibiogramme-de-la-sfm-casfm/>
- Abulhamd A. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic Aeromonads. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2010;1(1):90-95. Doi: 10.7763/IJCEA.2010.V1.15.
- Egorov AM, Ulyashova MM, Yu Rubtsova M. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta*

- Naturae. 2018;10(4):33-48. PMID: 30713760; PMCID: PMC6351036.
25. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(10):1451-1470. Doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002.
 26. Sköld O. Sulfonamides and trimethoprim. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2010;8(1):1-6. PMID: 20014895. Doi:10.1586/eri.09.117.
 27. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards understanding MCR-like Colistin resistance. *Trends Microbiology*. 2018;26(9):794-808. Doi: 10.1016/j.tim.2018.02.006.
 28. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(5):1138-1151. Doi: 10.1093/jac/dkx506.
 29. Duarte AC, Rodrigues S, Afonso A, Nogueira A, Coutinho P. Antibiotic resistance in the drinking water: old and new strategies to remove antibiotics, resistant bacteria, and resistance genes. *Pharmaceuticals*. 2022;15:393. <https://doi.org/10.3390/ph15040393>.
 30. Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, *et al.* Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2020;46:578-599. Doi: 10.1080/1040841X.2020.1813687.
 31. Uluseker C, Kaster KM, Thorsen K, Basiry D, Shobana S, Jain M, *et al.* A Review on occurrence and spread of antibiotic resistance in wastewaters and in wastewater treatment plants: Mechanisms and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:3003. Doi: 10.3389/fmicb.2021.717809.
 32. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochemistry*. 2017;61:49-59. Doi: 10.1042/EBC20160063.
 33. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Joakim Larsson DJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. fux053. 2018;42:68-80. Doi: 10.1093/femsre/fux053.
 34. Perry J, Waglechner N, Wright G. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2021;6(6):a025197. Doi: 10.1101/cshperspect.a025197.
 35. Wang M, Yao M, Zhu YG. Antibiotic resistance genes and antibiotic sensitivity in bacterial aerosols and their comparisons with known respiratory pathogens. *Journal of Aerosol Science*. 2022;161:105931. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105931>.
 36. Ruiz-Gil T, Acuna JJ, Fujiyoshi S, Tanaka D, Noda J, Maruyama F, Jorquera MA. Airborne bacterial communities of outdoor environments and their associated influencing factors. *Environment International*. 2020;145:106156. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106156>.
 37. Chen P, Guo X, Li F. Antibiotic resistance genes in bioaerosols: Emerging, non-ignorable and pernicious pollutants. *Journal of Cleaner Production*. 2022;348:131094. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131094>.
 38. Signe Mbiada J, Lontsi Djimeli C, Manouore Njoya A, Eheth JS, Tchakonté S, Tamsa Arfao A, *et al.* Assessment of the potential effect of some streams properties on the isolated *Aeromonas hydrophila* strains susceptibility against some β -Lactams and Sulfamids. *Research in Biotechnology*. 2015;6(5):33-44.
 39. Eheth JS, Lontsi Djimeli C, Nana PA, Tamsa Arfao A, Noah Ewoti OV, MOUNGANG LM, *et al.* Less effect of wells physicochemical properties on the antimicrobial susceptibility *Pseudomonas aeruginosa* isolated in equatorial region of Central Africa. *Applied Water Science*. 2019;9(30). <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0909-9>.
 40. Dutta S, Ramamurthy T. Influence of abiotic factors in the emergence of antibiotic resistance. In: Thomas, S. (eds) *Antimicrobial Resistance*. Springer, Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3658-8_4.
 41. Su HC, Guo YG, Ying HL, Sheng LY, Quan ZR, Ran T. Antibiotic resistance, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and ampC gene in two typical municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science Process and Impacts*. 2014;16:324-332. <https://doi.org/10.1039/c3em00555k>.
 42. Moreira NFF, Sousa JM, Macedo G, Ribeiro AR, Barreiros L, Pedrosa M, *et al.* Photocatalytic ozonation of urban wastewater and surface water using immobilized TiO₂ with LEDs: micropollutants, antibiotic resistance genes and estrogenic activity. *Water Research*. 2016;94:10-22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.003>.
 43. Kumar A, Attri AK. Characterization of fungal spores in ambient particulate matter: a study from the Himalayan region. *Atmospheric Environment*. 2016;142:182-193. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.07.049>.
 44. Hu W, Wang ZH, Huang S, Ren LJ, Yue SY, Li P, *et al.* Biological aerosol particles in polluted regions. *Current Pollution Reports*. 2020;6:65-89. <https://doi.org/10.1007/s40726-020-00138-4>.
 45. Katakai S, Patowary R, Chatterjee S, Vairale MG, Sharma S, Dwivedi SK, *et al.* Bioaerosolization and pathogen transmission in wastewater treatment plants: Microbial composition, emission rate, factors affecting and control measures. *Chemosphere*. 2022;287:132180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132180>.
 46. Dehghani M, Sorooshian A, Ghorbani M, Fazlzadeh M, Miri M, Badiie P, *et al.* Seasonal variation in culturable bioaerosols in a wastewater treatment plant. *Aerosol Air Quality Research*. 2018;18(11):2826-2839. Doi: 10.4209/aaqr.2017.11.0466.
 47. Han Y, Wang Y, Li L, Xu G, Liu J, Yang K. Bacterial population and chemicals in bioaerosols from indoor environment: sludge dewatering houses in nine municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. 2018;618:469-478. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.071.
 48. Han Y, Li L, Wang Y, Ma J, Li P, Han C, *et al.* Composition, dispersion, and health risks of bioaerosols in wastewater treatment plants: a review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2020;15(38):1-16. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1330-1>.
 49. Wang Y, Lan H, Li L, Yang K, Qu J, Liu J. Chemicals and microbes in bioaerosols from reaction tanks of six

- wastewater treatment plants: survival factors, generation sources, and mechanisms. *Scientific Reports*. 2018;8:9362. Doi: 10.1038/s41598-018-27652-2.
50. Burdsall AC, Xing Y, Cooper CW, Harper WF. Bioaerosol emissions from activated sludge basins: characterization, release, and attenuation. *Science of the Total Environment*. 2021;753:141852. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141852.
51. Yang K, Li L, Wang Y, Xue S, Han Y, Liu J. Airborne bacteria in a wastewater treatment plant: emission characterization, source analysis and health risk assessment. *Water Research*. 2019;149:596-606. PMID: 30522052. Doi:10.1016/j.watres.2018.11.027.
52. Yang T, Jiang L, Bi X, Cheng L, Zheng X, Wang X, *et al.* Submicron aerosols share potential pathogens and antibiotic resistomes with wastewater or sludge. *Science of the Total Environment*. 2022;821:153521. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153521>.

Author's details

Morelle Raïsa Djiala Tagne

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Mireille Ebiane Nougang

Zoology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Maroua, Maroua, Cameroon

Edith Brunelle Mouafo Tamnou

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Awawou Manouore Njoya

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Pierrette Ngo Bahebeck

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon, Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), Yaoundé, Yaoundé, Cameroon

Samuel Davy Baleng

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Paul Aain Nana

Department of Oceanography and Limnology, Institute of Fisheries and Aquatic Sciences, University of Douala, Douala, Cameroon

Yves Yogne Poutoum

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Genevieve Bricheux

Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), UMR CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, TSA 60026 - CS 60026, 63178 AUBIÈRE Cedex, France

Claire Stéphane Metsopkeng

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Télesphore Sime-Ngando

Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), UMR CNRS 6023 et Laboratoire Magmas et Volcans (LMV), UMR IRD 163. Campus Universitaire des Cézeaux, TSA 60026 - CS 60026, 63178 AUBIÈRE Cedex, France

Moïse Nola

Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

How to Cite This Article

Tagne MRD, Nougang ME, Tamnou EBM, Njoya AM, Bahebeck PN, Baleng SD, *et al.* Antibiotics susceptibility of some *Bacillus* strains isolated in the ground and rainwater in urbanized area in Cameroon (Central Africa), and potential impact of the season change. *Journal of Advances in Microbiology Research*. 2023;4(1):86-95.

Creative Commons (CC) License

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**ORIGINAL ARTICLE**

Effects of aqueous and hydro-ethanolic *Moringa oleifera* Lam leaf extracts on the cultivability of 2 *Bacillus* strains isolated from rainwater

Morelle Raisa Djiala Tagne^a / Mireille Ebiane Nougang^b / Claire Stéphane Metsopkeng^a / Geneviève Bricheux^c / Florence Donnadiou^c / Paul Alain Nana^d / Isabelle Ripoché^e / Nehemie Donfagsiteli Tchinda^f / Gabriel A. Agbor^f / Pierre Chalard^c / Téléphore Sime-Ngando^g / Moïse Nola^{a*}

Authors' Affiliation

^aFaculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

^bZoology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Maroua, Maroua, Cameroon

^cLaboratoire « Microorganismes: Génome et Environnement » (LMGE), UMR CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Campus Universitaire des Cèzeaux, 1 Impasse Amélie Murat, TSA 60026 - CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

^dDepartment of Oceanography and Limnology, Institute of Fisheries and Aquatic Sciences, University of Douala, Douala, Cameroon

^eICCF UMR 6296, SIGMA Clermont, 20 avenue Blaise Pascal - TSA 62006, 63178 Aubière Cedex, France

^fInstitute of Medical Research and Medicinal Plants Study, P. O. Box 13033 Yaounde, Cameroon

^gLaboratoire « Microorganismes: Génome et Environnement » (LMGE), UMR CNRS 6023, et Laboratoire Magmas et Volcans (LMV), UMR IRD 163. Campus Universitaire des Cèzeaux, TSA 60026 - CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

Corresponding author

Moïse Nola

Email:moise.nola@yahoo.com**Tel:**

(237) 699 43 26 39

Funding

CNRS International Office - Africa, Middle East and India division (AMOI)

Abstract

In most developing countries, rainwater is used by many people to meet their water needs. Many *Bacillus* species known to be harmful to humans have also been identified in rainwater samples. Improving the microbiological quality of the rainwater using modern techniques seems expensive in rural areas for poor people. Extracts from several medicinal plants are often used in rural areas to treat certain bacterial infections. Water and alcohol are often used in traditional therapy to extract the principles of medicinal plants. But little is known about their functional differences or similarities. This study aims to assess the effects of aqueous and hydro-ethanolic leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam on the cultivability of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from rainwater. Leaf extracts of concentrations 2, 1.5, 1 and 0.5 g/L in contact with cells were incubated at 23°C and 37°C for 3 h, 6 h, 9 h and 24 h. The results showed a decrease in cultivable cells abundance. In most cases, cell abundances between the aqueous extract and hydro-ethanolic extract were not significantly different ($P > 0.05$). A significant difference ($P < 0.05$) was noted amongst cell abundances from each incubation period to another. The effectiveness of each extract for cell inhibition was evaluated and then expressed as a decrease percentage in the number of cultivable cells. A decrease in cultivable *B. thuringiensis* abundance varied from 75.09 to 99.68% in hydro-ethanolic extract and from 70.75 to 97.94% in aqueous extract. That of *B. cereus* varied from 0 to 98.86% in hydro-ethanolic extract and from 41.09 to 92.20% in the other. This difference could be linked to the differences in the cell species intrinsic properties. It could also be linked to the presence of some compounds identified. Some of these compounds would act as nutrients for cell growth, counterbalancing cell inhibition caused by others that have antimicrobial effects.

Practical application

M. oleifera leaves extract could nevertheless be exploited as an alternative to the microbiological treatment of rainwater, mainly against *B. thuringiensis* in particular, for household use in rural areas. However, further work is essential to clarify the effective constituents inactivating bacteria in the extracts, their potential impact on the water organoleptic properties as well as on human health.

Key words: *Bacillus* strains, cells cultivability, extracts antimicrobial compounds, *M. oleifera* leaves extracts, rainwater

1. Introduction

The microbiological treatment of drinking water proceeds by various methods sometimes using panoply of chemical reagents and materials whose acquisition costs are sometimes high. Several products currently used in the bacteriological treatment of drinking water by municipalities or public authorities sometimes leave disinfection by-products which have long-term health risks for water consumers. These by-products derive from the interactions between these products added to water and various chemical compounds present in natural water. If the treatment is ineffective, the eradication of bacteria in the event of an infection generally requires the use of antibiotics. The bacteria are increasingly varied and above all have become more resistant to antibiotics leading an important public health problem (Chen *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). This microbial antibiotic resistance varies from one antibiotic to another and from one individual to another. It is sometimes linked to the poverty of the populations in certain regions of the world. The use of the phytotherapy thus seems as an alternative to conventional antibiotics.

In some Asian and African countries, about 80% of the population use medicinal plants to treat various health problems (Salmeron-Manzano *et al.*, 2020). According to Metsopkeng *et al.* (2020), medicinal plants are consumed in the form of infusion, decoction or maceration, and solvents are often water or alcohol. These medicinal plants are of various species, genera and families. Species of the genus *Moringa* are widely used throughout the world in the form of decoctions and macerations (aqueous and alcoholic) of the different parts of the plant (Sen & Samanta, 2015). The genus *Moringa* belongs to the superkingdom of Tracheobionta, superdivision of Spermatophyta, division of Magnoliophyta, class

of Magnoliopsida, subclass of Dilleniidae, order of Capparales, family of Moringaceae (Mallenakuppe *et al.*, 2019). They includes 13 species (*Moringa oleifera*, *M. Stenopetala*, *M. arborea*, *M. borziana*, *M. concanensis*, *M. drouhardi*, *M. hildebrandtii*, *M. longituba*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. pygmaea*, *M. rivae* and *M. Ruspoliana*), some of which are endemic to Africa (Arora *et al.*, 2013; Laleye *et al.*, 2015). These species produce secondary metabolites which depend on the general physiological properties of the plant (Li *et al.*, 2020).

Several parts of *Moringa* have nutritional benefits. The leaves, for example, are an excellent source of protein. They have several essential amino acids for humans (histidines, arginines, leucines, lysines, phenylalanines, treonine, tryptophanes, tsoleucine) and a relatively high content of metabolizable energy (Laleye *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2021). There are also significant concentrations of vitamins A, B, B1, B2, C, E, β -carotene and several mineral elements (iron, calcium, zinc, selenium, magnesium, manganese, molybdenum, potassium, sodium, among others) (Adouko *et al.*, 2019; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2021). Their seeds rich in oils and proteins have neuroprotective properties against oxidative stress and provide necessary nutrients for a healthy diet (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2021). The *M. oleifera* Lam extracts are sometimes used to fight against some microorganisms of health importance including *Escherichia*, *Aspergillus* and *Candida* cells species (Abd El-Hack *et al.*, 2022; Metsopkeng *et al.*, 2020, 2022).

Many of the bacterial species can be found in the atmosphere in the form of bioaerosols and exhibit pronounced biogeography, driven by a combination of biotic and abiotic factors (Santl-Temkiv *et al.*, 2022). In several regions of the world, the presence of enterococci and other

bacteria of the genera *Escherichia*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* as well as *Giardia lamblia*, has been reported in rainwater (Bitton, 2014). Many *Bacillus* species have also been identified in rainwater samples and their abundance undergoes spatio-temporal variation (Djiala *et al.*, 2022).

Bacteria species, especially the genus *Bacillus* are rod-shaped bacteria. They are gram-positive, aerobic or anaerobic, and are widely found in soil and water. They can form dormant spores under adverse environmental conditions. Some types of *Bacillus* bacteria are harmful to humans. *B. cereus* for example sometimes causes spoilage in canned foods and food poisoning of short duration (Dietrich *et al.*, 2021). *B. subtilis* is a common contaminant of laboratory cultures and is often found on human skin. Others *Bacillus* strains are not pathogenic for humans but may infect humans incidentally (Esmkhani & Shams, 2022; Rollan-Martínez *et al.*, 2022).

In many developing countries around the world, both in rural and urban areas, rainwater with all its microbial and non-microbial pollutants, is used without any prior treatment by a large part of the population to meet water needs. Under natural conditions, warm water vapor rises up through Earth's atmosphere. As this water vapor rises higher and higher, the cool air of the atmosphere causes the water vapor to turn back into liquid water, creating clouds. When a cloud becomes full of liquid water, it falls from the sky as rain or snow, also known as precipitation (MLA, 2023). As a result of precipitation, bioaerosols could reach the soil surface, then the groundwater and surface water through infiltration and surface runoff respectively (Muller *et al.*, 2020). The present study is a contribution to the improvement in general, by use of extracts of natural substances, of the microbiological quality

of water that can be used by populations in rural areas. Water and alcohol are often used in traditional therapy to extract the principles of medicinal plants. But little is known about their functional difference or similarity. This study aims to assess the effects of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam on the cultivability of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from rainwater.

2. Materials and Methods

2.1 Harvesting the plant leaves and collection of rain water samples

Moringa oleifera leaves were harvested from a farm in Yaounde, Center Region of Cameroon in May 2021. The plant was identified at the National Herbarium of Cameroon. It was given the code 8241/SRF/Cam. The leaves were dried and then ground.

Rain water samples were collected in the Yaoundé, Center Region of Cameroon in November 2021 using autoclaved glass containers and placed the yard of a specific dwelling. The containers were opened when the rain started falling. The collected water was poured into a sterile 500 mL glass vial. The vials were immediately transported in refrigerated boxes (4 ± 2 °C) to the laboratory for analyses. Bacteriological analyses consisted of the isolation and identification of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*.

2.2 Isolation of microorganisms

Bacillus cereus was isolated on Mossel agar culture medium (Humeau laboratories) containing Polymyxin and the egg yolk added after autoclaving. *Bacillus thuringiensis* was isolated on Luria Bertani agar culture medium (Sigma-Aldrich) (Pauline, 2013; Nair *et al.*, 2018). For that, 100 mL of water sample was analyzed by

the membrane filtration method (porosity 0.45 μm). Petri dishes were then incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours. The morphological identification of the colonies considered the size and the outlines the color. *B. cereus* on Mossel agar medium forms colonies of around 5 mm diameter, pink colour (mannitol negative) and typically surrounded by an opaque halo due to egg precipitation (lecithinase positive) (Bouali *et al.*, 2016; Koua Abea *et al.*, 2018). On Luria Bertani agar, the colonies of *B. thuringiensis* are white, with a diameter varying from 0.5 to 1 mm (Hassan *et al.*, 2021). Biochemical identification of strains isolated was further performed using API 20^E system (Holt *et al.*, 2000; Bouali *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2021).

2.3. Preparation of aqueous extract

194 g of leaf powder was mixed with 1940 mL of sterile distilled water for 48h and stirred in the morning and evening. The macerate obtained was filtered successively using cotton wool and Whatman N° 4 filter membrane. The filtrate obtained was dried in an oven at $45 \pm 2^\circ\text{C}$ until the water is totally evaporated. The amount of extract was 17.05 g. The obtained extract had a paste form and was introduced in sterile glass bottles and kept in the refrigerator/freezer ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) for further use.

2.4. Preparation of hydro-ethanolic extract

The macerate obtained was successively filtered using cotton and Whatman No. 4 paper. The filtrate obtained was dried in an oven at $45 \pm 2^\circ\text{C}$ until the solvent had completely evaporated. 1180 and 760 ml of ethanol (95°) and sterile distilled water respectively and allowed to extract for 48 h with stirring morning and evening. The amount of extract was 158.95 g. The obtained extract had a paste form and was introduced in sterile glass

bottles and kept in the refrigerator/freezer ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) for further use.

2.5. Evaluation of the effect of extracts on cell cultivability (cells growth)

For aqueous or hydro-ethanolic extract, the solutions were prepared at concentrations 2, 1.5, 1 and 0.5 g/L from physiological sterile water (NaCl, 8.5%). The prepared solutions were first filtered on sterile absorbent cotton then on sterile whatman paper and finally through a filtering membrane of porosity 0.45 μm around a Bunsen burner in order to limit contamination (Metsopkeng *et al.*, 2022). For each type of extract and for each extract concentration, 2 series of sterile tubes encoded A and B were prepared.

Subsequently, the microbial inoculum was prepared from a pure 18-24 hours' culture on standard agar. This microbial suspension was adjusted as standard solution using a densitometer (density 0.5 on the Mc Farland scale). It is composed of 0.5 mL of 0.0048M BaCl₂ (1.17% w/v BaCl₂ · 2H₂O) and 99.5mL of 0.18M H₂SO₄ (1% v/v). It contains approximately 1.5×10^8 CFU/mL and was diluted (to 1/100) for the saline dilutions test (Andrews, 2001).

1 mL of the bacterial suspension was introduced into the 2 series of test tubes A and B containing 9 mL of solutions of aqueous extract of each concentration and 9 mL of physiological water only which was the blank.

The cells concentration in each tube at the initial moment was then approximately 1.5×10^5 CFU/mL (1.5×10^4 CFU/100 μL). The test tubes coded A were incubated at 23°C and those coded B were incubated at 37°C . For each incubation temperature, the incubation times were 3h, 6h, 9h and 24h. For each incubation period, the test tubes were in duplicate. After each incubation period, bacteriological analyses were carried on

agar medium (Mossel agar culture medium for *B. cereus* and Luria Bertani agar culture medium for *B. thuringiensis*) as indicated above.

2.6. Control of the sterility of the extract before the inoculation

To check the absence of *B. cereus* and *B. thuringiensis*, 5 mL of each type of extract was filtered using membrane (0.45 μm of porosity). Mossel agar culture medium and Luria Bertani agar medium were used respectively as indicated above. The sterility of the extracts was controlled by checking the absence of the 2 bacteria considered.

2.7. Preparation of *M. oleifera* leaves extracts for chromatographic and mass spectral analyses

The leaves were cut up and dried in the shade, at laboratory temperature ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) for 30 days. After drying, they were crushed and grinded. Thirty grams (30 g) of powder, was extracted with methanol at room temperature for 24 hours (1 g of powder in 10 mL of methanol). After filtration, the solvent was removed under vacuum to furnish a crude extract (Mellon *et al.*, 2002).

From the crude methanolic extract prepared, 5 mg of crushed leaves were diluted in 5 mL of Methanol (MeOH) HPLC Grade. The solution was then homogenized in an ultrasonic tank. Using a 2 mL syringe, the solution was withdrawn and filtered first through a 0.45 μm porosity membrane, and then through a 0.22 μm porosity membrane. Part of the filtrate was transferred to an HPLC vial.

HPLC analyses were performed on an Agilent 1260 Infinity apparatus, with DAD detector equipped with an Uptisphere C18-3 (250 x 4.6 mm, 5 μm) column from Interchim (Montluçon, France). LC-MS analyses were carried out on an UHPLC Ultimate 3000 RSLC chain and an

Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific, Waltham, USA) with the column mentioned above. Source operating conditions were: 3 kV spray voltage; 320 $^\circ\text{C}$ heated capillary temperature; 400 $^\circ\text{C}$ auxiliary gas temperature; sheath, sweep and auxiliary gas (nitrogen) flow rates were at 50, 10 and 2 arbitrary units, respectively; collision cell was used in stepped nCE mode with ionization voltage between 10 and 50 arbitrary units. Full scan data were obtained at a resolution of 70 000. Data was processed using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). The identification of all compounds described was carried out using the negative ionization mode.

For both analyses, the mobile phase was a mixture of 0.1% (v:v) formic acid in water (phase A) and 0.1% (v:v) formic acid in acetonitrile (phase B). The gradient of phase A (usable phase) was 100% (0 min), 80% (10 min), 73% (35 min), 0% (40-50 min) and 100% (51-60 min). The flow rate was 0.8 mL/min, and the injection volume was 5 μL .

Mass spectrum data were registered in a standard Excel format. These data included the exact mass of each compound, the mass M+H, the mass M-H, the mass in M+NH₄, the mass in M-COOH, the mass M+Na and the experimental mass (Aubert *et al.*, 2019; Gainche *et al.*, 2021). Each compound detected was characterized. Its potential raw formula was then calculated using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, Inc.), which takes into account its relative abundance, its molar masses and its retention time (Aubert *et al.*, 2019; Gainche *et al.*, 2021). The names of chemical compounds were determined by comparison with analytical standard or according to literature data (Kashiwada *et al.*, 1984; Lalas *et al.*, 2003; Shakeri

et al., 2016; Lin *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2022).

2.8. Data presentation and analysis

After each incubation period, the mean values of the cultivable cells abundance (cells that can grow) were assessed and expressed as CFU/100 μ L. The decrease in cultivable cells abundance (DCCA) was assessed and expressed in percentage using the following formula:

$$DCCA = \frac{(CA_{t0} - CA_{tn})}{CA_{t0}} \cdot 100$$

In this formula, CA_{t0} is the cells abundance at the initial moment, and CA_{tn} is the cells abundance after incubation period t_n . This DCCA was assessed only in all cases where $CA_{tn} \leq CA_{t0}$. Temporal variations of both data with respect to the type and concentration of extract, as well as the incubation temperature were also illustrated using histograms. Their comparisons were made using the Kruskal-Wallis H-test. All of these analyzes were performed using SPSS version 25.0 software.

3. Results

3.1. Temporal fluctuation of cultivable *B. thuringiensis* abundance

At 23°C, the lowest abundances of *B. thuringiensis* in aqueous extract at concentrations 0.5, 1, 1.5 and 2 g/L were respectively 0.14x10⁴, 0.14x10⁴, 0.03x10⁴ and 0.05x10⁴ CFU/100 μ L. All these lowest abundances were recorded after 24 hours of incubation (Figure 1). The highest abundances were respectively 0.28x10⁴, 0.27x10⁴, 0.2x10⁴ and 0.2x10⁴ CFU/100 μ L. All were recorded after 6 hours of incubation (Figure 1).

In the hydro-ethanolic extracts at temperature 23°C, the lowest abundances of *B. thuringiensis*

were respectively 0.005x10⁴, 0.008x10⁴, 0.005x10⁴ and 0.004x10⁴ CFU/100 μ L. All were recorded after 3 hours of incubation (Figure 1). The highest abundances were respectively 0.31x10⁴, 0.37x10⁴, 0.14x10⁴ and 0.14x10⁴ CFU/100 μ L. They were recorded after 9 hours of incubation in extracts with concentrations 0.5 and 1 g/L, and after 24 hours of incubation in extracts with concentrations 1.5 and 2 g/L (Figure 1).

At 37°C, the lowest abundances of *B. thuringiensis* in the aqueous extracts were all recorded after 24 hours of incubation. They were 0.13x10⁴ CFU/100 μ L in the extracts at 0.5 and 1 g/L, and 0.14x10⁴ and 0.07x10⁴ CFU/100 μ L respectively in the extracts at 1.5 and 2 g/L. All these lowest cells abundances were recorded after 24 hours of incubation (Figure 1). The highest were 0.24x10⁴, 0.27x10⁴, 0.44x10⁴ and 0.22x10⁴ CFU/100 μ L respectively in the extracts at 0.5, 1, 1.5 and 2g/L. They were recorded after 3 h of incubation with extract concentration 0.5, 1 and 2 g/L, and after 9 h of incubation in that 1.5 g/L (Figure 1).

With the hydro-ethanolic extracts at temperature 37°C, a temporal variation in the cultivable cells abundances was also observed. The highest cell abundances were recorded after 9 h of incubation with extract concentrations 0.5, 1.5 and 2 g/L, and after 3 h 1 g/L (Figure 1). The lowest cells abundances were recorded after 3 hours of incubation with extract concentration 1g/L, after 6 hours with extract concentration 2 g/L, and after 24 hours of incubation with extract concentrations 0.5 and 1.5 g/L (Figure 1).

3.2. Temporal fluctuation of cultivable *B. cereus* abundance

With the bacteria *Bacillus cereus* at 23°C, the lowest cultivable cells abundances were 0.29x10⁴,

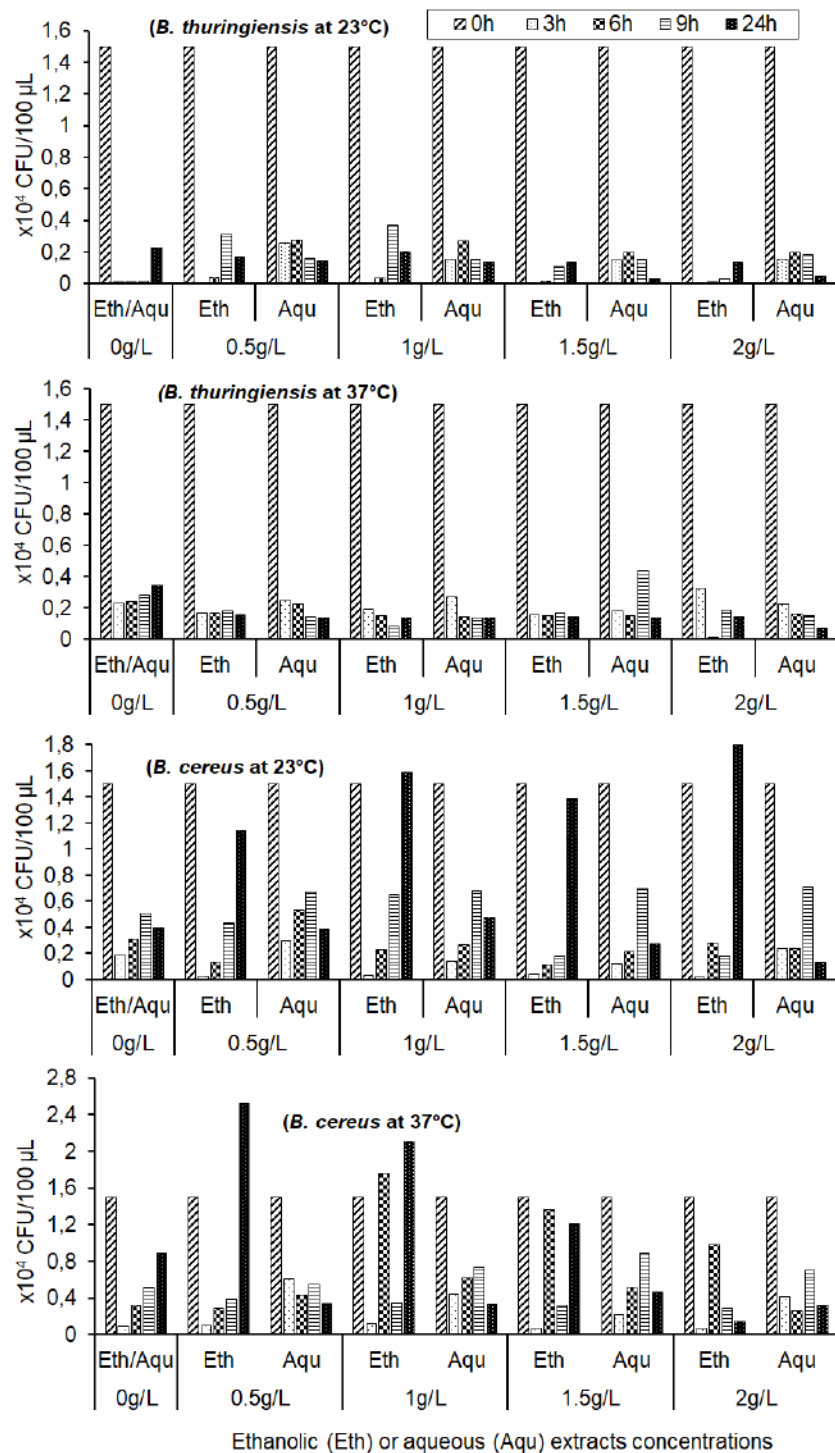


Figure 1. Temporal variation of the abundance of cultivable *B. thuringiensis* and *B. cereus*, at the presence of each concentration of ethanolic (Eth) and aqueous (Aqu) extract, after each incubation duration (0, 3, 6, 9 and 24h) under 23°C and 37°C

0.14×10^4 , 0.11×10^4 and 0.13×10^4 CFU/100 μ L in the aqueous extracts with concentrations 0.5, 1, 1.5 and 2 g/L respectively.

These abundances were recorded after 3h of incubation with the extracts 0.5 to 1.5 g/L, and after 24 h of incubation with the extract 2g/L (Figure 1). All the highest cell abundances were recorded after 9 h of incubation. These highest cell abundances were 0.67×10^4 , 0.68×10^4 , 0.69×10^4 and 0.71×10^4 CFU/100 μ L with extract concentrations 0.5, 1, 1.5 and 2 g/L respectively (Figure 1).

With the hydro-ethanolic extract at 23°C, the highest and lowest cell abundances were 1.13×10^4 and 0.02×10^4 CFU/100 μ L with extract solution concentration 0.5 g/L, 1.59×10^4 and 0.03×10^4 CFU/100 μ L with that of 1 g/L, 1.38×10^4 and 0.04×10^4 CFU/100 μ L with that of 1.5 g/L, and of 1.8×10^4 and 0.02×10^4 CFU/100 μ L with that of 2 g/L respectively (Figure 1). All the highest abundances were recorded after 24 h of incubation while all the lowest abundances were recorded after 3 h of incubation (Figure 1).

At 37°C, the highest and lowest abundances of *B. cereus* in the aqueous extracts were 0.61×10^4 and 0.34×10^4 CFU/100 μ L with extract solution concentrations of 0.5 g/L, 0.73×10^4 and 0.33×10^3 CFU/100 μ L with that of 1g/L, 0.88×10^3 and 0.21×10^4 CFU/100 μ L with that of 1.5 g/L extract, and 0.70×10^4 and 0.25×10^4 CFU/100 μ L with that of 2g/L respectively (Figure 1). All the highest cell abundances were recorded after 9h of incubation in the extracts 1, 1.5 and 2 g/L, and after 3h of incubation with extract solution concentration of 0.5 g/L. The lowest cell abundances were recorded after variable incubation periods depending on the extract concentration (Figure 1).

In the presence of hydro-ethanolic extracts, the highest and lowest cell abundances under 37°C

were recorded respectively after 24h and 3h of incubation in the extract concentrations of 0.5 and 1 g/L, and after 6 h and 3 h of incubation with those of 1.5 and 2 g/L (Figure 1).

It can thus be noted that there is a clear cell growth in some cases. This was mostly recorded in the ethanoic extracts. The cell abundances at the end of the incubation period were thus sometimes greater than the concentration at the initial instant (Figure 1).

3.3. Temporal variation of decrease in cultivable cells abundance

The abundance of cultivable cells decreased is presented in Figure 2. It can be noted that the decrease in cultivable cells abundance varied with the type and concentration of extract, the incubation temperature and duration, and with the bacterial species. The cultivable *B. thuringiensis* abundance decreased under 23°C varied from 75.09 to 99.68% with the hydro-ethanolic extract, and from 81.55 to 97.94% with aqueous extract. Under 37°C, it varied from 78.34 to 99.61% with hydro-ethanolic extract, and from 70.75 to 95.52% with aqueous extract. The cultivable *B. cereus* abundance decreased in hydro-ethanolic extract reached 98.86% under 23°C and 95.59% under 37°C, and was sometime 0% (Figure 2). In aqueous extract, it varied from 52.55 to 92.20% under 23°C, and from 41.09 to 85.92% under 37°C.

3.4. Comparison of the cells abundances based on the type of extract, the incubation temperatures and the incubation durations

When considering all the temperatures and incubation periods, a comparison of the cell abundances from one type of extract to another was made, and this for each extract's concentration.

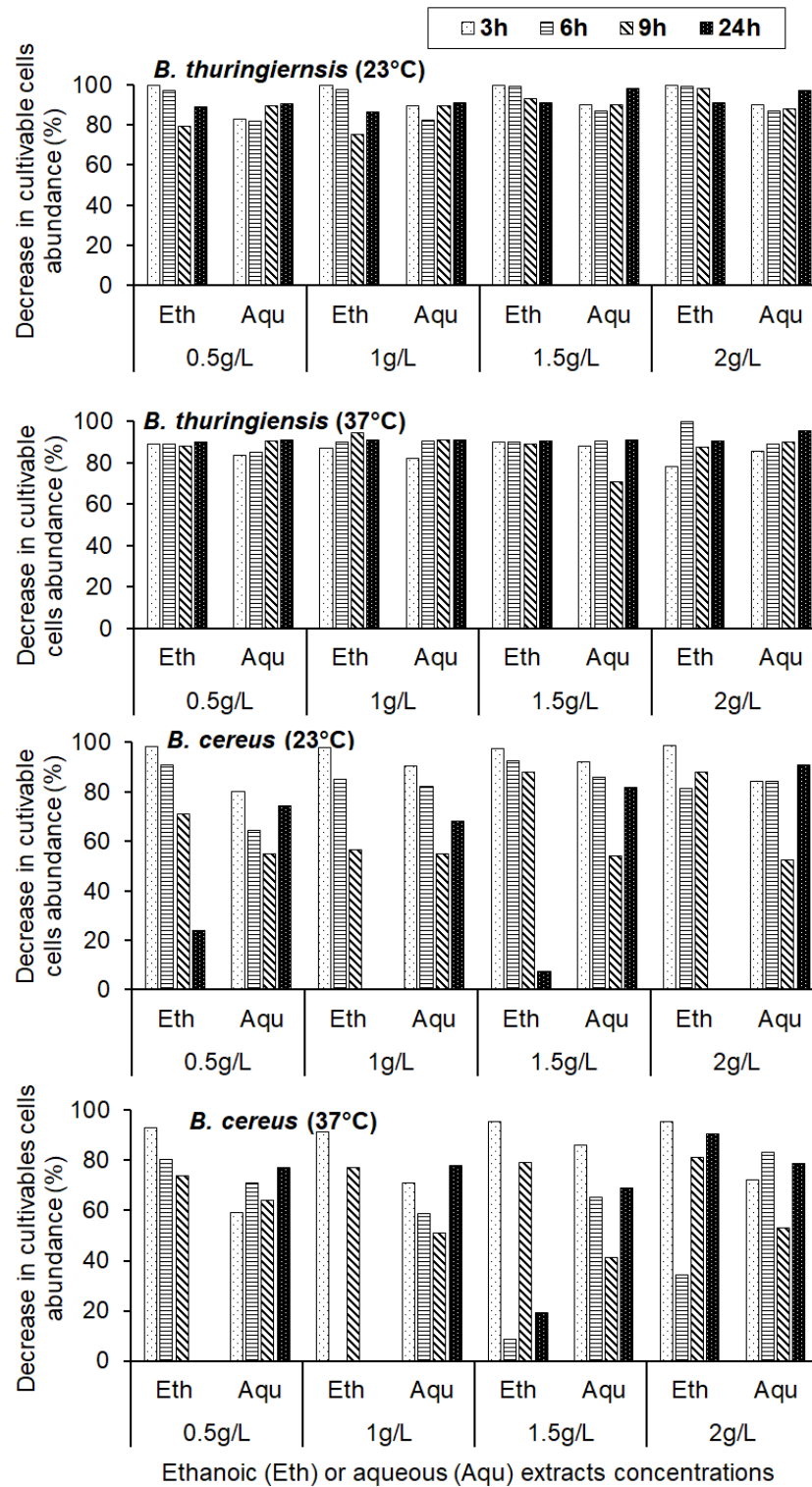


Figure 2. Temporal variation of decrease in cultivable cells abundance at the presence of each concentration of ethanoic (Eth) and aqueous (Aqu) extract, after each incubation duration (3, 6, 9 and 24h) under 23°C and 37°C

It was noted that cell abundances between the aqueous extract and the hydro-ethanolic extract did not significantly differ ($P>0.05$), except for the concentration 1.5 g/L when the *B. thuringiensis* cells were present (Table 1). Most of the antimicrobial active molecules against these 2 bacterial species would thus be present in each of the 2 types of extracts.

A comparison of the cells abundances between 23 °C and 37°C was also carried out for each type of extract and each extract concentration when considering all the incubation durations. It was noted that cells abundances from one incubation temperature to another are not significantly different ($P>0.05$), except for hydro-ethanolic extract at concentration 1.5 g/L when the *B. thuringiensis* cells were present (Table 2).

In a third step, a comparison of cell abundances from one incubation period to another was made for each incubation temperature, and for each type and concentration of extract. A significant difference ($P<0.05$) was noted from one cell abundance to another and from each incubation period to another. The contact duration between the extract and the bacterial cells present thus seems to play an important role, whatever the type of extract and the incubation temperature.

Table 1. “P” values of the comparisons (Kruskal-Wallis test) of the cells abundances between aqueous extract and ethanolic extract at each extract concentration when considering all the incubation durations and all the incubation temperatures

| Bacterial species | Extracts concentrations | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------|---------------|-------|
| | 0.5 g/L | 1 g/L | 1.5 g/L | 2 g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0.506 | 0.322 | 0.048* | 0.062 |
| <i>B. cereus</i> | 0.318 | 0.287 | 0.690 | 0.594 |

*: $P \leq 0.05$

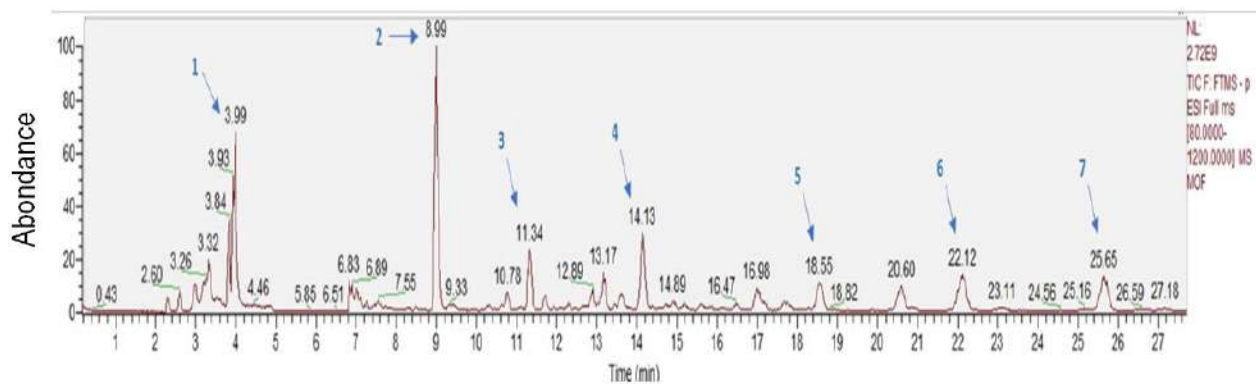


Figure 3. LC/MS profile of the crude methanol extract of *M. oleifera* leaves (spectrum (-))

Table 2. “P” values of the comparison (Kruskal-Wallis test) of the cells abundances between 23°C and 37°C for each type of extract and each extract concentration when considering all the incubation durations

| Bacterial species | Type of extract and concentration | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|---------|------------------|---------|-------|---------------|-------|
| | Aqueous extract | | | Ethanoic extract | | | | |
| | 0.5 g/L | 1 g/L | 1.5 g/L | 2 g/L | 0.5 g/L | 1 g/L | 1.5 g/L | 2 g/L |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0.263 | 0.329 | 0.709 | 1 | 0.707 | 1 | 0.003* | 0.062 |
| <i>B. cereus</i> | 0.71 | 0.265 | 0.213 | 0.135 | 0.455 | 0.136 | 0.457 | 0.708 |

*: P ≤ 0.05

Table 3. Phytochemical profile of MeOH leaves extracts of *M. oleifera* (spectrum (-)) (comparison with analytical standard or according literature data (Kashiwada *et al.* 1984; Lalas *et al.* 2003; Shakeri *et al.* 2016; Lin *et al.* 2019; Xu *et al.* 2019; Xiong *et al.* 2022))

| N° | Retention time (min) | Compound name | Compound formula | M-H _{exp} (m/z) | Class of molecule |
|----|----------------------|----------------------------------|---|--------------------------|-----------------------|
| 1 | 3.99 | Saccharose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 341.1086 | Heterosides |
| 2 | 8.99 | Glucomoringinin | C ₂₀ H ₂₉ NO ₁₄ S ₂ | 570.0956 | Glucosinolates |
| 3 | 11.34 | Neochlorogenic acid | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 353.0875 | Phenolic acids |
| 4 | 14.13 | O-acetylshanzhiside methyl ester | C ₁₉ H ₂₈ O ₁₂ | 447.1508 | Iridoids |
| 5 | 18.55 | Isoquercetin | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 463.0883 | Flavonoids |
| 6 | 22.12 | Kaempferol-3-O-glucoside | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 447.0931 | Flavonoid heterosides |
| 7 | 26.65 | Kaempferol acetyl glucoside | C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂ | 489.1037 | Flavonoid heterosides |

3.5. Chemical profile of the *M. oleifera* leaves

Figure 3 shows the mass spectra obtained from leave extract. This profile was obtained by negative ionization. Many chemical compounds have been identified and are presented in Table 3. They include Saccharose (heteroside), Glucomoringinin (glucosinolate), Neochlorogenic acid (phenolic acid), O-acetylshanzhiside methyl ester (iridoid), Isoquercetin (flavonoid), Kaempferol-3-O-glucoside and Kaempferol acetyl glucoside (flavonoid heteroside) (Table 3).

4. Discussion

It is observed that in the presence of the extracts of the leaves of *M. oleifera*, the cells culture of the 2 *Bacillus* species considered is slowed down. The slowdown seems to be accentuated with the increase in the concentration of the extracts. This would be linked to the chemical compounds present in the extracts. Chemical compounds identified in the extracts include glucomoringinin which belongs to the class of glucosinolates, neochlorogenic acid which belongs to the class of phenolic acids, O-acetylshanzhiside methyl ester, which is of iridoids class, isoquercetin, kaempferol

acetyl glucoside and kaempferol-3-O-glucoside which are of flavonoids and flavonoid heterosides classes respectively. Some of these compounds have been reported to have antibacterial effects on Gram-positive bacteria.

Inhibitory effect of phenolic compounds against the growth of the Gram-positive human pathogens *Bacillus cereus*, *S. aureus*, and *Listeria monocytogenes* have been indicated by Metsamuuronen & Siren (2019). It might be due to their ability to form a complex with bacterial cell wall thus inhibiting the microbial growth (Kozyra *et al.*, 2017). Disruption of metabolic pathways may be the principal mode of action (Erguden & Unver, 2022). The phenolic compounds lipophilicity may be one of the determining factors for their antimicrobial potential; their greater lipophilicity, their greater the inhibitory capacity (Kauffmann & Castro, 2023).

The iridoids health-related significance has been reported. In addition to their their anti-inflammatory, hypoglycemic, antioxidative, antitumor, neuroprotective and hepatoprotective effects, they can inhibit DNA polymerase activity in the bacteria cells (Wang *et al.*, 2020; Przybylska *et al.*, 2022).

Glucosinolates have been reported as expressing a wide range of growth inhibition activity against Gram-positive bacteria as well as against Gram-negative and fungi (Blazevic *et al.* 2010). They are indicated to be more effective against Gram positive bacteria than the Gram negative, and they would specifically increase the oxidation and inhibition of essential proteins/enzymes leading to bacterial cell death (Aires *et al.*, 2009).

Flavonoids exert antibacterial effects by disrupting cell integrity. It has also been suggested that flavonoids can affect bacterial respiration and

interfere with energy metabolism by inhibiting the activity of cytochrome *c* reductase in some Gram-positive bacteria (Dzoyem *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022). Their antimicrobial activities would not be related to their special structure, but may be related to their polarities or lipid-water partition coefficients (Yuan *et al.*, 2021). The inhibitory activities of the flavonoids to Gram-positive bacteria are nonlinearly increase in most cases (Yuan *et al.*, 2021).

Kaempferol, although having effects on the central nervous system diseases (Silva dos Santos *et al.*, 2021), also has effects on bacteria cells. It has damaging effect on the cell wall or cell membrane, leading to leakage of contents and cell death finally (Li *et al.*, 2022). It also inhibits the DNA gyrase in some Gram-positive bacteria (Periferakis *et al.*, 2022). It disrupt normal metabolism in bacteria mainly by affecting microbial metabolism in diverse environments, and energy metabolism including carbon metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism and fructose and mannose metabolism, and affected bacterial secretion systems and quorum sensing significantly (Li *et al.*, 2022). Quorum sensing is a chemical communication system in which bacterial pathogens express certain virulence genes at high cell densities and communicate with each other by small diffusible signalling molecules called self-inducers (Silva *et al.*, 2016).

Kaempferol may also exert its antibacterial activity by decreasing the ATP content and increasing ATPase activity through a series of intracellular biochemical reactions. This led to metabolic disorders (Li *et al.*, 2022).

Isoquercitin has been reported to inhibit several enzymes in vitro (Valentova *et al.*, 2014). Quercetin could inhibit cell wall synthesis through inhibiting D-alanine-D-alanine ligase (Wu *et al.*,

2008; Li *et al.*, 2022). Isoquercetin, like quercetin, has shown broad-spectrum antiviral activities, for example against severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) (Mbikay & Chrétien, 2022). Mixture of kaempferol and quercetin exerts antibacterial effects through cell membrane disruption, followed by activation of apoptosis and DNA fragmentation in some Gram-positive bacteria. They also interact with 3-oxyacyl-[acyl carrier protein] reductase and enoyl-acyl carrier protein reductase therefore inhibiting the biosynthesis of fatty acids in bacteria cell (Periferakis *et al.*, 2022).

Despite all the above information on the antibacterial activities of the chemical compounds identified in the considered extracts, it is noted that all the cells were not inhibited. This would reflect a resistance of a few cells. An *et al.* (2022) indicated that kaempferol in some cases could induce bacterial pathogen resistance. In addition, bacteria strains tested were from rainwater. It is indicated that air represents an important active reservoir of diverse antibiotic resistance genes, and their origins may be extensive, including human activity such as wastewater treatment plants, gray water, municipal solid waste landfill, livestock farm, and medical industry and natural phenomena such as volcanic eruptions (Ruiz-Gil *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). *Bacillus* strains antibiotics susceptibility can also undergo temporal variation due to seasonal change (Djiala *et al.*, 2023).

In addition, the decrease in cell abundance in most cases was not always proportional to the incubation durations or to the extract's concentrations. This would probably be linked to the presence of some compounds that could serve as cells growth nutrients, such as saccharose (heteroside) which has been identified. Tian *et al.* (2021) showed in fact that sucrose induces robust

solid surface motility of *Bacillus* by triggering a signalling cascade, first through extracellular synthesis of polymeric levan, which in turn stimulates strong production of surfactin and hyper-flagellation of the cells, and promotes the cells growth. Furthermore, some authors have indicated that the type of extract for the same plant part varies according to the microorganism to be neutralized in the patient, probably because of the variation in diversity of the antimicrobial molecules which will be diffused (Hadis *et al.*, 2020; Tavares *et al.*, 2021). This would explain a substantial difference between the aqueous extract and the hydro-ethanolic extract, leading to the observed substantial difference between their both activities. The release into the medium of these cell growth ingredients in quantity and quality, as well as other ingredients with antimicrobial properties, would undergo temporal variation, and especially with respect of all of incubation conditions. This could be the cause of no significant difference in cells abundance noted between aqueous extract and hydro-ethanolic extract, as well as between 23°C and 37°C incubation in most cases.

Many ingredients that could promote the bacterial growth have been reported in the extracts by other authors (Adouko *et al.*, 2019; Gonzalez-Burgos *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021). Those growth cells ingredients would be released much more with the hydro-ethanolic extract and would be more favourable to the growth of *B. cereus*. This would be at the origin of the extremely low percentage of inhibition of cultivable cells of this species (0%) sometimes observed. A relative cryptic growth of cells would counterbalance their inhibition caused by the identified chemical compounds with antimicrobial effects. Furthermore, it is noted that for each incubation temperature, and for each type and concentration of extract, cells abundance significantly varied from one incubation period to

another ($P < 0.05$). The increase in incubation times would allow the molecules with antibacterial effects identified above to reach targets not reached by short periods.

5. Conclusion

The metabolism of *Bacillus* strains contained in rainwater can be relatively slowed down in the presence of aqueous and hydro-ethanolic extracts of *M. oleifera* Lam. This slowing would be the consequence of the presence of some identified antimicrobial compounds belonging to the class of phenolic acids, glucosinates, iridoids and flavonoids. These antimicrobials seem to act on bacterial cells with the same amplitude whether the extract is aqueous or hydro-ethanolic, and whether it is incubated at 37°C or at 23°C. The effects of these compounds on bacteria differ significantly with varying cell-chemical compound contact durations. Bacterial inhibition however may not be complete, probably due to the intrinsic resistance of some cells. Growth cells ingredients and antimicrobial chemicals would be released in the 2 types of extracts and would be much more with the hydro-ethanolic extract. Aqueous *M. oleifera* Lam leaves extracts could nevertheless be exploited as an alternative to the microbiological treatment of rainwater, mostly against *B. thuringiensis*, for household use in rural areas. However, further work is essential to clarify the effective constituents inactivating bacteria in the extracts, their potential impact on the water organoleptic properties as well as on human health.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics

This Study does not involve Human or Animal Testing.

Funding source

The authors would like to thank the CNRS International Office - Africa, Middle East and India division (AMOI) for its financial support of our project. It was entitled “*Extraction and characterisation of active ingredients from extracts of medicinal plants from sub-Saharan Africa with antibacterial and antifungal activities*” (project leaders: M Nola and T. Sime-Ngando). It was through call for projects "Device for Supporting Collaborations with Sub-Saharan Africa (DSCA)", 2021 edition.

References

- Abd El-Hack, M.E., Alqhtani, A.H., Swelum, A.A., El-Saadony, M.T., Salem, H.M., Babalghith, A.O., Taha, A.E., Ahmed, O., Abdo, M., & El-Tarabily, K.A. (2022). Pharmacological, nutritional and antimicrobial uses of *Moringa oleifera* Lam. leaves in poultry nutrition: an updated knowledge. *Poultry Science*, 101, 102031. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102031>
- Adouko, J.S.I., Koutonin, B.O.M., Soha, A.S.S., Ohouko, F.O.H., & Dougnon, T.J. (2019). Evaluation de l'effet de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* sur la qualité des oeufs de poule ISA Brown. *Revue Internationale des Sciences Appliquées*, 2(1), 40-47.
- Aires, A., Mota, V.R., Saavedra, M.J., Rosa, E.A.S., & Bennett, R.N. (2009). The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 2086-2095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04180.x>
- An, J., Nguyen, X.C., Kim, S.H., Bahk, S., Kang, H., Pham, M. L.A., Park, J., Ramadany, Z.,

- Kim, S. H., Park, H., & Chung, W. S. (2022). Kaempferol promotes bacterial pathogen resistance through the activation of NPR1 by both SA and MPK signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Reports*, 16, 655-663.
<https://doi.org/10.1007/s11816-022-00806-5>
- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (Suppl. S1), 5-16.
https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Arora, D.S., Onsare, J.G., & Kaur, H. (2013). Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): Microbiological perspective. *Journal of Pharmacognosy Phytochemistry*, 6(1), 193-215.
- Aubert, P., Guinobert, I., Blondeau, C., Bardot, V., Ripoche, I., Chalard, P., & Neunlist, M. (2019). Basal and spasmolytic effects of a hydroethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L. on intestinal motility: An ex vivo study. *Journal of Medicinal Food*, 22(7), 653-662.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0154>
- Bitton, G. (2014). Microbiological aspects of drinking water treatment. In *Microbiology of drinking water production and distribution*. First Edition, John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9781118743942.ch2>
- Blazevic, C., Radonic, A., Mastelic, J., Zekic, M., Skocibusic, M., & Maravic, A. (2010). Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). *Food Chemistry*, 121(4), 1020-1028.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.041>
- Bouali, W., Malek, F., Sahin, F., & Abdelouahid, D. E. (2016). Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(29), 1094-1103.
<https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8054>
- Chen, P., Guo, X., & Li, F. (2022). Antibiotic resistance genes in bioaerosols: Emerging, non-ignorable and pernicious pollutants. *Journal of Cleaner Production*, 348, 131094.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131094>
- Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Martlbauer, E., & Granum, P.E. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)*, 13(2), 98.
<https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
- Djiala Tagne, M.R., Metsopkeng, C.S., Nougang, M.E., Mouafo Tammou, E.B., Manouore Njoya, A., Ngo Bahebeck, P., Baleng, S.D., Yogne Poutoum, Y., Nana, P.A., Sime-Ngando, T., & Nola, M. (2022). Abundance dynamics of 2 *Bacillus* species in rain and underground water in an urbanized area in Cameroon (Central Africa) and impact of some abiotic parameters. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management*, 7(2), 109-120.
<https://doi.org/10.11648/j.ijnrem.20220702.16>
- Djiala Tagne, M.R., Nougang, M.E., Mouafo Tammou, E.B., Manouore Njoya, A., Ngo Bahebeck, P., Baleng, S.D., Nana, P.A., Yogne Poutoum, Y., Bricheux, G., Metsopkeng, C.S., Sime-Ngando, T., & Nola, M. (2023). Antibiotics susceptibility of some *Bacillus* strains isolated in the ground and rainwater in urbanized area in Cameroon (Central Africa), and potential impact of the season change. *Journal of Advances in Microbiology Research*, 4(1), 86-95.
<https://doi.org/10.22271/micro.2023.v4.i1b.72>
- Dzoyem, J.P., Hamamoto, H., Ngamei, B., Ngadjui, B.T., & Sekimizu, K. (2013). Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(2), 66-72.
<https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.2.66>

- Erguden, B., & Unver, Y. (2022). Phenolic chalcones lead to ion leakage from Gram-positive bacteria prior to cell death. *Archives of Microbiology*, 204(3).
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02603-0>
- Esmkhani, M., & Shams, S. (2022). Cutaneous infection due to *Bacillus cereus*: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 22, 393.
<https://doi.org/10.1186/s12879-022-07372-9>
- Gainche, M., Ogeron, C., Ripoche, I., Senejoux, F., Cholet, J., Decombat, C., Delort, L., Berthon, J.-Y., Saunier, E., Caldefie Chezet, F., & Chalard, P. (2021). Xanthine oxidase inhibitors from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and their efficient detections by HPTLC and HPLC analyses. *Molecules*, 26, 1939.
<https://doi.org/10.3390/molecules26071939>
- Gonzalez-Burgos, E., Urena-Vacas, I., Sanchez, M., & Gomez-Serranillos, M.P. (2021). Nutritional value of *Moringa oleifera* Lam. Leaf powder extracts and their neuroprotective effects via antioxidative and mitochondrial regulation. *Nutrients*, 13(7), 2203.
<https://doi.org/10.3390/nu13072203>
- Hadis, M., Gebreyohannes, Y., & Gameda, N. (2020). Potential therapeutic uses of *Moringa stenopetala*: a scoping review. *Journal of Global Health Science*, 2(2), e26.
<https://doi.org/10.35500/jghs.2020.2.e26>
- Hassan, A. A., Youssef, M.A., Elashtokhy, M.M.A., Ismail, I.M., Aldayel, M., & Afkar, E. (2021). Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains native of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 6.
<https://doi.org/10.1186/s41938-020-00352-8>
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Islam, Z., Rashadul Islam, S.M., Hossen, F., Mahtab-ul-Islam, K., Hasan, M.R., & Karim, R. (2021). *Moringa oleifera* is a prominent source of nutrients with potential health benefits. *International Journal of Food Science*, Article ID 6627265, 11 p.
<https://doi.org/10.1155/2021/6627265>
- Kashiwada, Y., Nonaka, G., & Nishioka, I. (1984). Tannins and related compounds. XXIII. Rhubarb (4): isolation and structures of new classes of gallotannins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 3461-3470.
- Kauffmann, A.C., & Castro, V.S. (2023). Phenolic compounds in bacterial inactivation: A perspective from Brazil. *Antibiotics*, 12, 645.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12040645>
- Koua Abea, M., Bomo Assanvo, J., Sanogo, M., & Koffi, K. M. (2018). Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biology and Chemical Science*, 12(5), 2284-2293.
<https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.28>
- Kozyra, M., Biernasiuk, A., & Malm, A. (2017). Analysis of phenolic acids and antibacterial activity of extracts obtained from the flowering herbs of *Carduus acanthoides* L. *Acta Polonicae Pharmaceutica-Drug Research*, 74(1), 161-172. PMID: 29474772
- Lalas, S., Tsaknis, J., & Sflomos, K. (2003). Characterisation of *Moringa stenopetala* seed oil variety "Marigat" from island Kokwa. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 23-31.
<https://doi.org/10.1002/EJLT.200390002>
- Laleye, O.A.F., Ahissou, H., Olounlade, A.P., Azando, E.V.B., & Laleye, A. (2015). Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise: *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn

- (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). *International Journal of Biology and Chemistry Science*, 9(5), 2682-2700. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i5.38>
- Li, A.-P., He, Y.-H., Zhang, S.-Y., & Shi, Y.-P. (2022). Antibacterial activity and action mechanism of flavonoids against phytopathogenic bacteria. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105221. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105221>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Lin, H., Zhu, H., Tan, J., Wang, H., Wang, Z., Li, P., Zhao, C., & Liu, J. (2019). Comparative analysis of chemical constituents of *Moringa oleifera* leaves from China and India by Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050942>
- Mallenakuppe, R., Homabalegowda, H., Demappa Gouri, M., Basavaraju, P.S., & Chandrashekharaiah, U.B. (2019). History, taxonomy and propagation of *Moringa oleifera* - A Review. *SSR Institute of International Journal of Life Sciences*, 5(3), 2322-2327. <https://doi.org/10.21276/SSR-IJLS.2019.5.3.7>
- Mbikay, M., & Chrétien, M. (2022). Isoquercetin as an anti-Covid-19 medication: A potential to realize. *Frontiers in Pharmacology*, 13, Article 830205. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.830205>
- Mellon, F.A., Bennett, R.N., Holst, B., & Williamson, G. (2002). Intact glucosinolate analysis in plant extracts by programmed cone voltage Electrospray LC/MS: Performance and comparison with LC/MS/MS methods. *Analytical Biochemistry*, 306, 83-91. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5677>
- Metsamuuronen, S., & Siren, H. (2019). Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: A review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Review*, 18, 623-664. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09630-2>
- Metsopkeng, C.S., Nougang, M.E., Nana, P. A., Tamsa Arfao, A., Ngo Bahebeck, P., Lontsi Djimeli, C., Eheth, J.S., Noah Ewoti, O.V., MOUNGANG, L.M., Agbor, G.A., Perrière, F., Sime-Ngando, T., & Nola, M. (2020). Comparative study of *Moringa stenopetala* root and leaf extracts against the bacteria *Staphylococcus aureus* strain from aquatic environment. *Scientific African*, 10, e00549. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00549>
- Metsopkeng, C.S., Nougang, M.E., Tamsa Arfao, A., Perrière, F., MOUNGANG, L.M., Noah Ewoti, O.V., Donnadiou, F., Nana, P.A., Bricheux, G., Eheth, J.S., Mouafo Tannou, E.B., Ripoche, I., Chalard, P., Sime-Ngando, T., & Nola, M. (2022). Minimum inhibition and bactericidal concentrations of the plant *Moringa oleifera* extracts against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Bacterial Empire*, 5(4), e484. <https://doi.org/10.36547/be.484>
- MLA (2023). "Water cycle summary". Encyclopedia Britannica, The Editors of Encyclopaedia. <https://www.britannica.com/science/water-cycle>. Accessed 21 May 2023.
- Muller, A., Osterlund, H., Marsalek, J., & Viklander, M. (2020). The pollution conveyed by urban runoff: A review of sources. *Science of the Total Environment*, 709, 136125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136125>
- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., & Jaoua, S. (2018). Diversity of

- Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and cry gene content. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 708.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>
- Pauline, L. (2013). Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Thèse de Doctorat, Biotechnologies. Université de Bourgogne.
- Periferakis, A., Periferakis, K., Badarau, I.A., Petran, E.M., Popa, D. C., Caruntu, A., Costache, R.S., Scheau, C., Caruntu, C., & Costache, D.O. (2022). Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications. *International Journal of Molecular Science*, 23, 15054.
<https://doi.org/10.3390/ijms232315054>
- Przybylska, D., Kucharska, A.Z., & Sozanski, T. (2022). A Review on bioactive iridoids in edible fruits - from farden to food and pharmaceutical products. *Food Reviews International*, Corpus ID: 252373625.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2117375>
- Rollan-Martínez, H.M., González-Urdiales, P., Zubizarreta-Zamalloa, A., Rodríguez-Merino, E., & Martínez-Dubarbie, F. (2022). Central nervous system infection by *Bacillus cereus*: a case report and literature review. *Revista de Neurología*, 75 (8), 239-245. PMID: 36218254.
<https://doi.org/10.33588/rn.7508.2021412>
- Ruiz-Gil, T., Acuna, J.J., Fujiyoshi, S., Tanaka, D., Noda, J., Maruyama, F., & Jorquera, M. A. (2020). Airborne bacterial communities of outdoor environments and their associated influencing factors. *Environment International*, 145, 106156.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106156>
- Salmeron-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J.A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (10), 3376.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>
- Santl-Temkiv, T., Amato, P., Casamayor, E.O., Lee, P.K.H., & Pointing, S.B. (2022). Microbial ecology of the atmosphere. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 1-18.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuac009>
- Sen, T., & Samanta, S.K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147, 59-110.
https://doi.org/10.1007/10_2014_273
- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204-228.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
- Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J., & Trentin, D.S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews*, 116(16), 9162-9236.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>
- Silva dos Santos, J., Gonçalves Cirino, J.P., de Oliveira Carvalho, P., & Ortega, M.M. (2021). The pharmacological action of Kaempferol in central nervous system diseases: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 565700.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.565700>
- Tavares, W.R., Barreto, M.D.C., & Seca, A.M.L. (2021). Aqueous and ethanolic plant extracts as bio-insecticides - Establishing a bridge between raw scientific data and practical reality. *Plants*, 10, 920.
<https://doi.org/10.3390/plants10050920>
- Tian, T., Sun, B., Shi, H., Gao, T., He, Y., Liu, Y., Li, X., Zhang, L., LI, S., Wang, Q., & Chai, Y. (2021). Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal*, 15, 2723-2737.

<https://doi.org/10.1038/s41396-021-00966-2>

Valentova, K., Vrba, J., Bancirova, M., Ulrichova, J., & Kren, V. (2014). Isoquercetin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.018>

Wang, C., Gong, X., Bo, A., Zhang, L., Zhang, M., Zang, E., Zhang, C., & Li, M. (2020). Iridoids: Research advances in their phytochemistry, biological activities, and pharmacokinetics. *Molecules*, 25(2), 287.

<https://doi.org/10.3390/molecules25020287>

Wang, M., Yao, M., & Zhu, Y.G. (2022). Antibiotic resistance genes and antibiotic sensitivity in bacterial aerosols and their comparisons with known respiratory pathogens. *Journal of Aerosol Science*, 161, 105931.

<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105931>

Wu, D., Kong, Y., Han, C., Chen, J., Hu, L., Jiang, H., & Shen, X. (2008). D-alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(5), 421-426.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.010>

Xiong, Y., Shahid Riaz Rajoka, M., Zhang, M., & Zhendan, H. (2022). Isolation and identification of two new compounds from the seeds of *Moringa oleifera* and their antiviral and anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 36 (4), 974-983.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1851218>

Xu, Y.B., Chen, G.L., & Guo, M.Q. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*, 8, 296.

<https://doi.org/10.3390/antiox8080296>

Yuan, G., Guan, Y., Yi, H., Lai, S., Sun, Y., & Cao, S. (2021). Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive

bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific Reports*, 11, 10471.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90035-7>

Cite this paper as: Djiala Tagne, M.R., Metsopkeng S.C., Bricheux, G., Donnadiou, F., Nana, A.P., Ripoche, I., Donfagsiteli Tchinda N., Agbor, A.G., Chalard, P., Sime-Ngando, T. & Nola, M. (2023). Effects of aqueous and hydro-ethanolic *Moringa oleifera* Lam leaf extracts on the cultivability of 2 *Bacillus* strains isolated from rainwater. *Journal of Food Stability*, 6 (4), 1-19
DOI: 10.36400/J.Food.Stab.6.4.2023-045



Abundance Dynamics of 2 *Bacillus* Species in Rain and Underground Water in an Urbanized Area in Cameroon (Central Africa) and Impact of Some Abiotic Parameters

Morelle Raïsa Djiala Tagne¹, Claire Stéphane Metsopkeng¹, Mireille Ebiane Nougang², Edith Brunelle Mouafo Tamnou¹, Manouore Njoya Awawou¹, Pierrette Ngo Bahebeck^{1,3}, Samuel Davy Baleng¹, Yves Yogne Poutoum¹, Paul Alain Nana⁴, Télésphore Sime-Ngando⁵, Moïse Nola^{1,*}

¹Faculty of Sciences, Laboratory of Hydrobiology and Environment, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

²Zoology Laboratory, Faculty of Sciences, University of Maroua, Maroua, Cameroon

³Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), Yaoundé, Cameroon

⁴Department of Oceanography and Limnology, Institute of Fisheries and Aquatic Sciences, University of Douala, Douala, Cameroon

⁵Laboratoire «Microorganismes: Génome et Environnement», UMR CNRS 6023, Université Clermont Auvergne, Campus Universitaire des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat CS Aubière Cedex, France

Email address:

moise.nola@yahoo.com (M. Nola)

*Corresponding author

To cite this article:

Morelle Raïsa Djiala Tagne, Claire Stéphane Metsopkeng, Mireille Ebiane Nougang, Edith Brunelle Mouafo Tamnou, Manouore Njoya Awawou, Pierrette Ngo Bahebeck, Samuel Davy Baleng, Yves Yogne Poutoum, Paul Alain Nana, Télésphore Sime-Ngando, Moïse Nola. Abundance Dynamics of 2 *Bacillus* Species in Rain and Underground Water in an Urbanized Area in Cameroon (Central Africa) and Impact of Some Abiotic Parameters. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management*. Vol. 7, No. 2, 2022, pp. 109-120. doi: 10.11648/j.ijnrem.20220702.16

Received: May 25, 2022; Accepted: June 14, 2022; Published: June 27, 2022

Abstract: The present study aimed to assess the abundance dynamics 2 spore forming bacteria of sanitary importance *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*, in the rain and groundwater in urbanized area in Cameroon (Central Africa) and potential impact of some abiotic parameters. The bacteriological analyzes were made by cultures on agar media and the chemical analyzes by spectrophotometry. It appears that heterotrophic aerobic mesophilic bacterial abundances ranged from 1×10^6 to 1×10^8 CFU/100 μ L in wells and from 9×10^6 to 196×10^6 CFU/100 μ L in rainwater. The abundances of *B. thuringiensis* reached 320 CFU/100 μ L in wells, and 730 CFU/100 μ L in rainwater. That of *B. cereus* reached 340 CFU/100 μ L in wells, and 12×10^2 CFU/100 μ L in rainwater. The pH of wells fluctuated between 5.05 and 7.33 whereas that of rainwater varied from 6.12 to 6.88. Electrical conductivity values ranged from 111 to 885 μ S/cm in wells, and varied from 3 to 92 μ S/cm in rainwater. Both media contains nitrate, nitrogen ammonia, phosphate, dissolved CO₂ and O₂ and their concentration undergoes spatio-temporal variations. Correlations coefficients between meteorological/chemical parameters and the bacterial abundance dynamics undergoes spatial variation on one hand, and varied according to a given abiotic parameter and the bacterial species considered on the other hand. The relationships between the properties of the previous month's rainwater on the abundance dynamics of the microflora in sampled wells during the current month, referred to as a delayed impact, showed a various degrees of influence, suggesting that the properties of the sampled groundwater would mainly result from the interactions of the confounding factors, and not only due to the rainfall or rainwater properties.

Keywords: Rainwater, Wells, *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, Abundance Dynamics, Abiotic Factors

1. Introduction

The exponential population growth in several countries in the world coupled with their sometimes difficult economic conditions is causing difficulties in the supply of drinking water. Rainwater, often referred to as meteoric water, is thus increasingly used. As a means of water conservation, rainwater is collected and stored rainwater serves as a potential source of water for various beneficial purposes in many countries [1, 2]. The atmosphere is an important route for transporting and disseminating microorganisms over short and long distances, and they have impact in public health, meteorology and atmospheric chemistry [3]. Various particles suspended in the air and constituting aerosols can be contained in this water. The particle diameters in the air often ranged from 100 μm for the largest to less than 100 nm for the smallest [4].

Investigation on biological particles into atmospheric aerosols has been known as aerobiology, and the term "primary biological aerosol particles" has been defined to describe solid airborne particles derived from biological organisms, including microorganisms and fragments of biological materials [5]. Airborne biological particles as a whole are also denoted as bio-aerosols. They are a complex mixture consisting of different components, from simple organic molecules with dimensions in the nanometer range, through to viruses, bacteria, bacteria spores, fungal spores, mould spores and hyphae [6, 7]. According to Bowers *et al.* [8], bacteria and fungi are ubiquitous throughout the Earth's lower atmosphere where they often represent an important component of atmospheric aerosols with the potential to impact human health and atmospheric dynamics.

The role of *Bacillus* spores in the environment is to preserve and to propagate the genetic information contained within the bacterium. It is known that spore formation evolved as a mechanism for both spatial and temporal escape from local conditions unfavorable to rapid growth [9, 10]. They can be found in the air, in water or in the soil [11], and are known, among other things, to be the cause of many infections in humans. Besides food poisoning, these bacteria induces local and systemic infections, and the main described conditions are septicemia, endophthalmitis, pneumonia, endocarditis, meningitis and encephalitis, especially in immunosuppressed individuals such as neonates, resulting in the patient death in about 10% of cases [12-14].

It has been indicated that most viable airborne particles are spores which are to some extent suited for survival in such an environment for a limited period [3]. The study of the influence of abiotic factors on the distribution of airborne microbes often gives contradictory results. The degree of impact depends on the parameter concerned and on all of the other abiotic parameters (rainfall, temperature, sunshine, UV index, relative humidity, carbon dioxide concentration, dust levels, and airborne bacterial counts, surrounding landscapes, wind conditions, among others) which prevail in a given geographical space [3, 15].

Several studies have already been carried out on non-sporulating bacteria in groundwater in the equatorial region

of Cameroon (Central Africa). It appears that these waters harbor a varied bacterial microflora consisting among others of Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae with some strains being pathogen [16-18]. The abundance of these germs is influenced in part by meteorological factors, and in part by factors related to bacterial species [19-21]. Their sensitivity to antibiotics varies depending on the species or strain concerned [22, 23]. The recharge of this groundwater occurs with a delay of one month in relation to rainfall, time needed to saturate the soil layers upper groundwater table [16]. This period can sometimes be shortened in the case of shallow groundwater [24].

The transfer of bacteria-contaminants from the soil surface to the water table is influenced by the nature of the soil layers crossed [25-27]. The intrinsic properties of bacteria are also involved, and microbiological and chemical properties of this groundwater undergoes temporal variation when stored in households conditions [28]. If some data are thus available on the diversity and the abundance dynamics of non-sporulating bacteria and the mechanisms of their transfer into groundwater in the equatorial region of Cameroon, little information is however available concerning spores or sporulating bacteria, both in these underground aquatic biotopes and in the atmosphere.

The spore longevity and survival in the environment are due to many factors [29]. It is resistant to heat, (wet-heat resistance and dry-heat resistance), to desiccation, chemicals, UV radiation, γ -Radiation and to ultrahigh hydrostatic pressure. Its DNA repair protective mechanisms aims to prevent or dramatically slow the rate of formation of certain types of DNA damage or alter the type of damage formed in spore DNA. Its general DNA repair systems included the nucleotide excision and the recombination-mediated mechanisms [29].

The spores contained in the atmosphere are liable to be carried to the soil surface by rainfall. Few studies so far have been carried out on the diversity and abundance of sporulating bacteria in groundwater as well as in the rainwater of this geographic area. Little information is also available on the meteorological factors that can control their distribution and specific diversity. The present study aimed to assess the abundance dynamics of 2 spores forming bacteria *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* in the rainwater and groundwater in Yaounde and the impact of some abiotic parameters on this spore-forming bacteria abundance dynamics.

2. Material and Methods

2.1. Study Area and Sampling Sites

Yaounde is the capital of Cameroon. It is located 300 km from the Atlantic coast, between 3°5' North latitude and 11°31' East longitude. The climate is equatorial, characterized by the alternation of two dry seasons and two rainy seasons: a long dry season from December to mid-March, a short rainy season from mid-March to June, a short dry season from July to August and a long rainy season from September to November. The annual average temperature is 23.5°C, varying between 16 and 31°C

depending on the season, and 1650 mm of rainfalls per year [30]. The city's hydrographic network is very dense and essentially composed of the Mfoundi river and its tributaries.

Six wells points encoded W1-D5, W2-D5, W3-D3, W4-D3, W5-D6 and W6-D6 were chosen in 3 different administrative districts of Yaounde. Wells W1-D5 and W2-D5 were choose in N°5 district area, wells W3-D3 and W4-D3 in N°3 district area, and W5-D6 and W6-D6 in N°6 district area. At the same time, one station was installed in each of the 3 districts to collect rainwater. It was named R1-D5 in N°5 district area, R2-D3 in N°3 district area and R3-D6 in N°6 district area. The

location of each sampling wells and each station for rainwater collection is indicated in Figure 1. The geographic coordinates of each sampling site are indicated in Table 1.

The meteorological data during the sampling period have been downloaded from the NASA web site (<https://power.larc.nasa.gov/data.access.viewer/>). During this sampling period, the rainfall varied from 2.2 to 11.8 mm/day. The air temperature and the air relative humidity varied from 20.02 to 24.28°C and from 82.97 to 91.25% respectively. The insolation varied from 2.59 to 5.54 Kw-h/m²/day. The temporal variation of these data is presented in Figure 2.

Table 1. Geographic coordinates of sampling sites.

| Location of the sampling site and nature of the water sampled | | Geographic coordinates of the sampling site and total depth of well | | | |
|---|-----------------------------|---|--------------|--------------|----------------------|
| Location of the sampling site | Nature of the water sampled | Latitude | Longitude | Altitude (m) | Total well depth (m) |
| W1-SD5 | Wells | 03°54'19.9"N | 11°33'12.9"E | 692 | 9.5 |
| W2-SD5 | Wells | 03°54'18.0"N | 11°33'11.3"E | 707 | 17.3 |
| W3-SD3 | Wells | 03°51'14.4"N | 11°29'43.9"E | 728 | 11.5 |
| W4-SD3 | Wells | 03°51'04.2"N | 11°29'48.5"E | 725 | 5 |
| W5-SD6 | Wells | 03°50'31.0"N | 11°29'07.1"E | 711 | 20 |
| W6-SD6 | Wells | 03°50'31.5"N | 11°29'10.2"E | 720 | 17 |
| R1-SD5 | Rainwater | 03°50'31.5"N | 11°33'06.3"E | 729 | / |
| R2-SD3 | Rainwater | 03°51'04.2"N | 11°29'48.5"E | 725 | / |
| R3-SD6 | Rainwater | 03°50'31.0"N | 11°29'07.1"E | 711 | / |

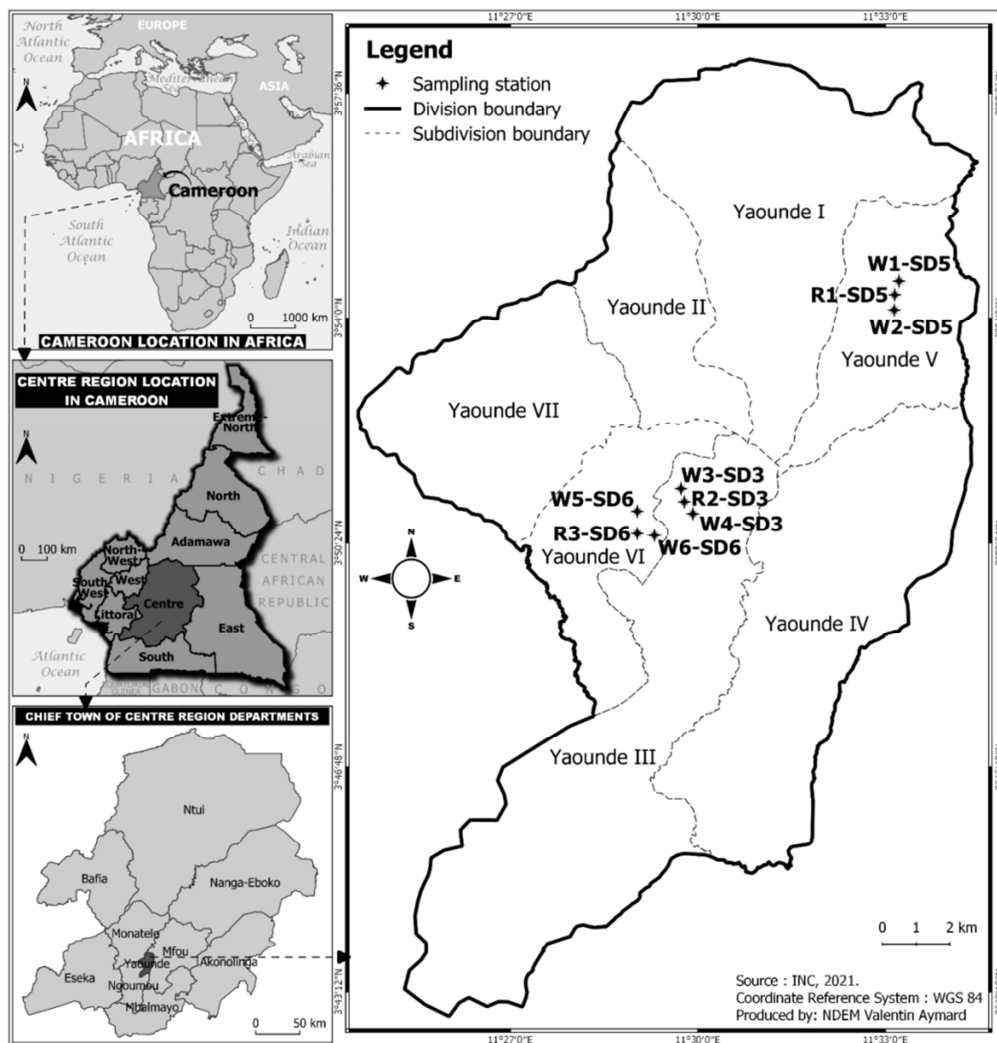


Figure 1. Sampling sites of the water samplings (National Institute of Cartography, Cameroon, 2020, modified).

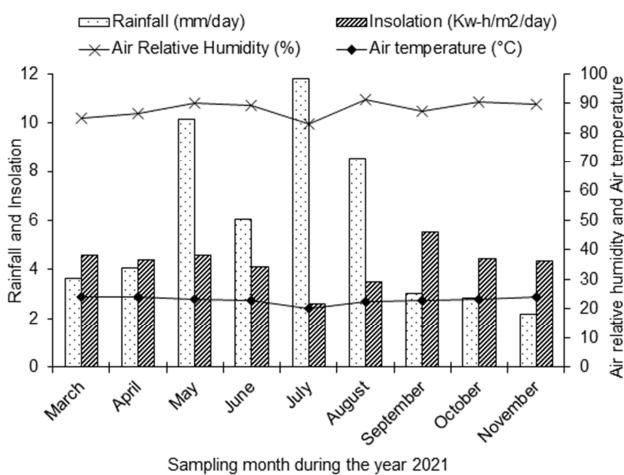


Figure 2. Temporal variation of rainfall, insolation, air relative humidity and air temperature during the sampling period.

2.2. Water Sampling

Rainwater and wells were analyzed once a month, from March to November 2021. Sample was collected once a month. During the short rainy season, it rains at least once a week, while during the short dry season it rains it rains 1 to 2 every 15 days. During the long rainy season, it rains 3 to 5 times a week.

Each rainwater sample was collected using an autoclaved glass container and placed in the yard of a specific dwelling. Said container was opened just when the rain started to fall. The collected water was poured into 2 vials: a sterile 500 mL glass vial and a clean 1 liter polyethylene vial. After the rain, they were then immediately transported in a refrigerated enclosure for the laboratory.

For each well chosen, the water sample was taken sterile using a sterile bucket attached to a rope. The collected water was poured into 2 vials: a sterile 500 mL glass vial and a clean 1L polyethylene vial. After taking this sample, the hydrological parameters of the well were measured using a graduated metal rope, also sterilized in an autoclave and connected to ballast at its end.

For the both rainwater and wells sample, the water temperature of each sample was measured *in situ*.

2.3. Laboratory Analysis

The physico-chemical parameters considered were the water temperature, the pH, electrical conductivity, water color, and concentration of dissolved CO₂, O₂, TDS (Total Dissolved Solids), nitrates, nitrogen ammonia and phosphate.

Bacteriological analyzes consisted of the isolation and counting of heterotrophic aerobic mesophilic bacteria (HAMB), *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. For the enumeration of HAMB, 100 µL of a diluted water sample was spread on standard agar culture medium contained in the Petri dishes. Each analysis was done in triplicate. The dishes were then incubated at laboratory temperature (24 ± 2°C) for 5 days.

Bacillus cereus was isolated on Mossel agar medium (Humeau laboratories) containing Polymyxin and the egg yolk added after autoclaving. *Bacillus thuringiensis* was isolated on Luria Bertani agar culture medium (Sigma-Aldrich) [31]. For that, 100 µl or a diluted water sample was analyzed, by the surface plating method. Petri dishes were then incubated at 36 ± 1°C for 24 hours. The morphological identification of the colonies considered the size and the outlines the color. *B. cereus* on Mossel agar medium formes colonies of around 5mm diameter, pink colour (mannitol negative) and typically surrounded by an opaque halo due to egg precipitation (lecithinase positive) [32, 33]. On Luria Bertali agar, the colonies of *B. thuringiensis* are white, with a diameter varying from 0.5 to 1 mm [32]. Biochemical identification was further performed using API 20^E system [32-34]. Each analysis was done in triplicate. For all bacteriological analyzes, the results were expressed in Colony Forming Units (CFU) per 100µL.

2.4. Data Analysis

The abundances of isolated bacteria were expressed in CFU/100µL of water sample. The relationships between the considered parameters were assessed using Spearman's correlation test. A comparison of cell abundances between different stations was made using the Kruskal Wallis test.

3. Results

3.1. Physico-chemical Parameters

The values of the physico-chemical parameters are presented in Figure 3. This shows a spatio-temporal fluctuation of the values of each parameter, whether in wells or in rainwater.

3.1.1. Physico-chemical Parameters in Wells

The pH fluctuated between 5.05 and 7.33. The lowest value was observed in wells W1-SD5 during July and the highest in wells W5-SD6 during August (Figure 3). The electrical conductivity values ranged from 111 to 885 µS/cm. The smallest value was recorded in the wells W2-SD5 during August and the highest in the wells W4-SD3 during September (Figure 3). Water temperature ranged from 24.1 to 26.9°C, with the highest value recorded in wells W5-SD6 during June and W4-SD3 during July (Figure 3).

Dissolved CO₂ values fluctuated between 3.52 and 31.68 mg/L. The highest value was recorded in wells W4-SD3 during May and the lowest in wells W2-SD5 during April and W5-SD6 during June (Figure 3). Dissolved oxygen concentrations fluctuated between 1.11 (registered in wells W4-SD3 during November) to 7 mg/L (registered in wells W5-SD6 during July) (Figure 3). TDS concentrations fluctuated between 52mg/L (in wells W1-SD5 during March) and 444 mg/L (in wells W4-SD3 during November) (Figure 3).

The water color sometimes reached 200 Pt-Co. This highest value was recorded in the wells W2-SD5 during November.

However, water of several wells was sometimes very clear for several months (Figure 3). The nitrate contents varied from 0.08 to 43.1 mg/L. The lowest value was recorded in wells W2-SD5 during September and the highest in wells W6-SD6 during April (Figure 3). The phosphate and nitrogen ammonia contents varied respectively from 0.09 to 7.32 mg/L and from 0 to 6.04 mg/L. For phosphates, the highest value was recorded in wells W2-SD5 during October and the lowest in wells W3-SD3 during March. For nitrogen ammonia, the lowest value was registered in wells W2-SD5 during June and the highest in wells W4-SD3 during May (Figure 3).

3.1.2. Physico-chemical Parameters of Rainwaters

The pH fluctuates from 6.12 to 6.88. The lowest value was observed at station R1-SD5 and the highest at station R2-SD3. All these 2 values were recorded during September (Figure 3). Electrical conductivity values varied from 3 μS/cm (recorded at station R1-SD5 during May) to 92 μS/cm (at R3-SD6 station during September) (Figure 3). The water temperature fluctuated between 22.1 and 29.7°C, with the lowest value recorded at station R2-SD3 during March and the highest

value at station R3-SD6 during April (Figure 3).

Dissolved CO₂ was rare during April at R2-SD3 station. Its highest concentration was 15.84 mg/L registered at station R3-SD6 during July (Figure 3). Dissolved oxygen concentrations fluctuated from 1.5 to 7.18 mg/L. The lowest value was noted at stations R1-SD5 during March and R2-SD3 during May; the highest value was recorded at station R3-SD6 during September (Figure 3). TDS concentrations varied from 3 mg/L (station R1-SD5 during May) to 46 mg/L (station R3-SD6 during April) (Figure 3).

The color of the water sometimes reached 83 Pt-Co. This value was recorded at station R3-SD6 during May. Water at station R1-SD5 was sometimes very clear (Figure 3). Nitrate concentrations varied from 0.1 mg/L (station R1-SD5 during September) to 15.6 mg/L (station R2-SD3 during June) (Figure 3). The phosphate and nitrogen ammonia contents varied respectively from 0.07 to 4.66 mg/L and from 0 to 2.01 mg/L. The highest value for phosphates was recorded at station R2-SD3 during April and the highest for nitrogen ammonia at station R3-SD6 during April (Figure 3).

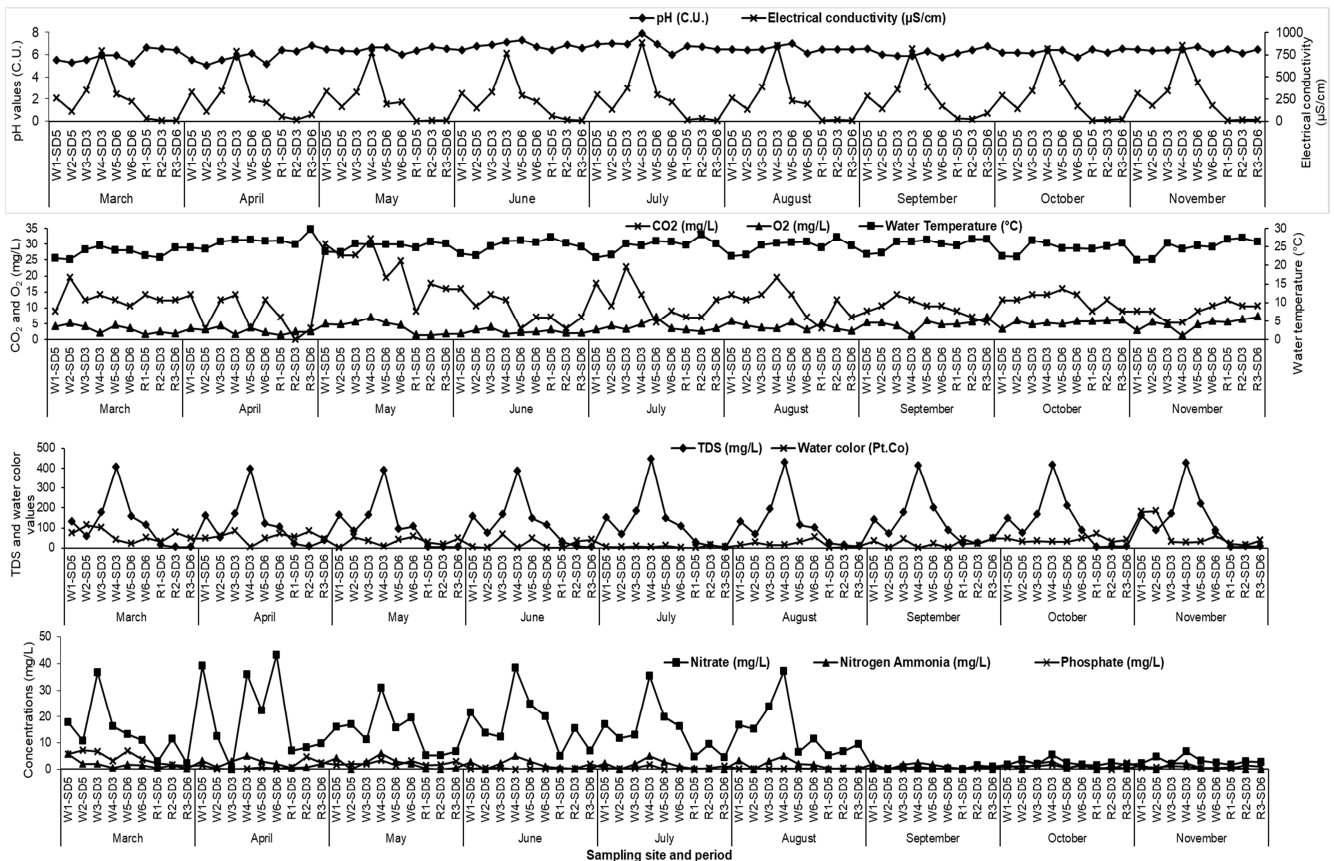


Figure 3. Variation of the abiotic parameters values in each wells and each rainwater sampled with respect to the sampling month.

3.2. Bacteriological Parameters

The variation in the abundance of heterotrophic aerobic mesophilic bacteria (HAMB) and *Bacillus* recorded in rainwater and wells is shown in Figure 4.

3.2.1. Bacteriological Parameters in Wells

In groundwater, HAMB abundances ranged from 1x10⁶ to 1x10⁸ CFU/100μL. The highest value was recorded in wells W2-SD5 during June (Figure 4), and the lowest in wells W4-SD3 during March (Figure 4). The abundances of *Bacillus thuringiensis* varied from 1 to 320 CFU/100μL. The

highest value was recorded in wells W3-SD3 during November (Figure 4) and the lowest in wells W2-SD5, W3-SD3, W4-SD3 and W5-SD6 (Figure 4). The abundances of *Bacillus cereus* reached 340 CFU/100 μ L. This was recorded in wells W4-SD3 during September. This bacterium was rare in wells W4-SD3 during October (Figure 4) and W5-SD6 during April (Figure 4).

3.2.2. Bacteriological Parameters in Rainwater

In rainwater, the abundances of HAMB varied from 9×10^6 to 196×10^6 CFU/100 μ L. The highest value was recorded at

station R3-SD6 (Figure 4), and the lowest at station R1-SD5 (Figure 4). Both values were recorded during May (Figure 4). Abundance of *Bacillus thuringiensis* varied from 30 to 730 CFU/100 μ L, and that of *B. cereus* varied from 10 to 12×10^2 CFU/100 μ L (Figure 4). For *B. thuringiensis* the highest abundance was recorded at station R1-SD5 during March (Figure 4) and the lowest at station R2-SD3 during June (Figure 4). For *B. cereus* the lowest abundance was observed at station R3-SD6 during March (Figure 4) and the highest at station R1-SD5 during April (Figure 4).

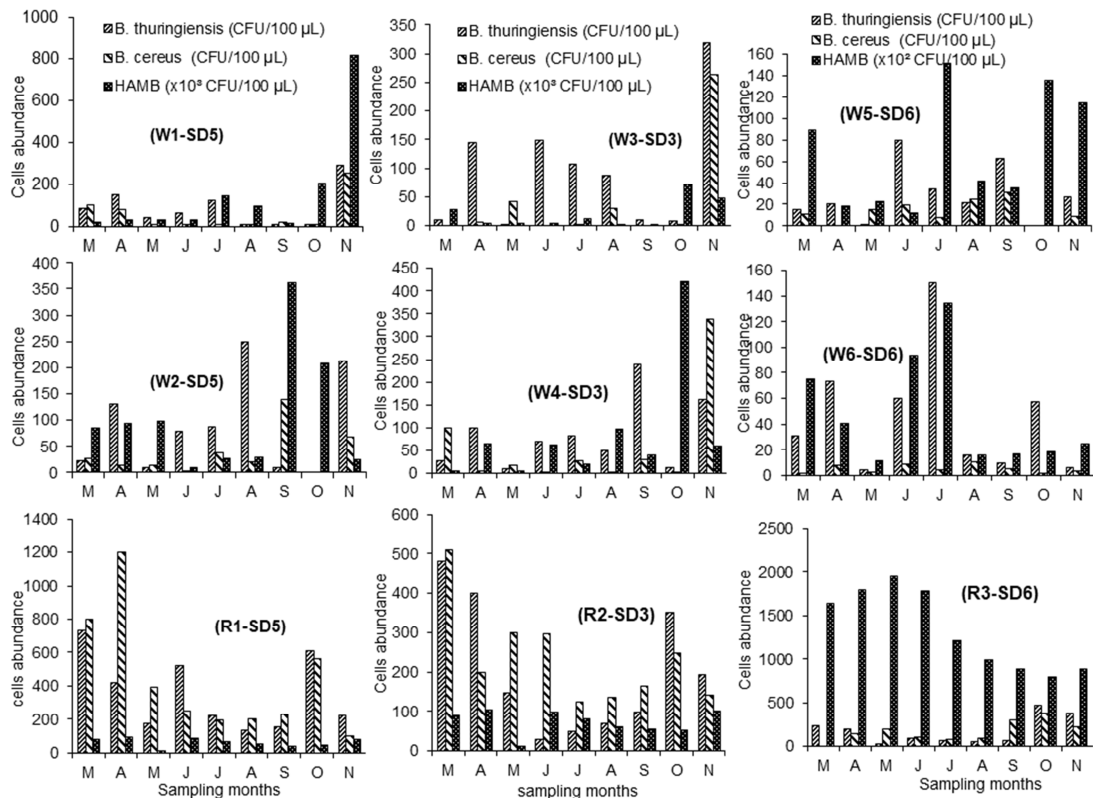


Figure 4. Variation of the bacterial abundance in each wells and each rainwater sampled with respect to the sampling month.

3.3. Correlations Amongst the Considered Parameters

The Spearman correlation coefficients have been calculated between the bacterial abundances and the abiotic parameters considered. The relationships between the parameters have then been classified into 4 categories: no significant correlation ($P > 0.1$), significant correlations ($P \leq 0.1$), high significant correlations ($P \leq 0.05$) and higher significant correlations ($P \leq 0.01$). This has been done with wells as wells as with rainwater collected data.

3.3.1. Correlation Coefficients Between Bacterial Abundances in Wells and Wells Physicochemical/Meteorological Parameters

The 2 well water points of each subdivision were assumed to belong to the same underground watershed. Sampling was then assumed to be carried out twice a month, for the entire duration of the study. The number of samples was thus 18. This aimed to assess the impact of some meteorological and

abiotic parameters of wells on the abundance dynamics of the bacteria contained in these wells. The Spearman correlation coefficients were then calculated are shown in Table 2.

It can be noted that in SD3, the content in dissolved CO_2 , dissolved O_2 and phosphates as well as the insolation negatively impact the abundance of *B. thuringiensis* ($P \leq 0.1$). The abundance of this bacteria species is also negatively impacted in SD5 by the content in dissolved O_2 ($P \leq 0.05$), and in SD6 by dissolved CO_2 , phosphates and the air relative humidity ($P \leq 0.05$) (Table 2). The water temperature is positively correlated with this cells abundance in SD6. The *B. cereus* abundance is negatively impacted by the content in dissolved CO_2 in SD5 ($P \leq 0.1$) and phosphates in SD6 ($P \leq 0.1$), and it is positively correlated with water pH in SD6 ($P \leq 0.05$). The HAMB's abundance is significantly impacted by the water electrical conductivity, and the content in TDS and nitrogen ammonia ($P \leq 0.05$) in SD3 and SD5, although the positive or negative role of the abiotic parameter on the bacterial abundance varies with respect to the sampling site (Table 2).

Table 2. Spearman correlation coefficients between bacterial abundances in wells and wells physicochemical/meteorological parameters in each considers subdivision.

| Abiotic parameters considered | Sub-divisions (SD) and bacteria considered | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|------------------|---------|-------------------------|------------------|-----------|-------------------------|------------------|----------|
| | SD3 | | | SD5 | | | SD6 | | |
| | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB |
| Water T° | -0.030 | -0.200 | 0.045 | -0.057 | -0.054 | -0.088 | 0.469** | 0.312 | -0.061 |
| Water pH | 0.141 | -0.004 | 0.278 | -0.011 | -0.272 | -0.248 | 0.044 | 0.538** | 0.224 |
| Dissolved CO ₂ | -0.533** | -0.265 | -0.109 | -0.039 | -0.442* | -0.018 | -0.491** | -0.074 | -0.249 |
| Dissolved O ₂ | -0.407* | 0.009 | 0.246 | -0.488** | -0.059 | -0.092 | -0.312 | 0.057 | 0.006 |
| Nitrates | -0.237 | -0.205 | 0.060 | 0.234 | -0.170 | -0.224 | 0.345 | 0.020 | 0.014 |
| Phosphates | -0.409* | 0.248 | 0.213 | -0.146 | 0.159 | 0.021 | -0.512** | -0.444* | -0.286 |
| TDS | 0.176 | 0.274 | 0.456** | 0.004 | -0.054 | -0.498** | 0.125 | 0.250 | 0.372 |
| Nitrogen ammonia | -0.015 | 0.130 | 0.456** | -0.059 | 0.037 | -0.603*** | 0.170 | 0.264 | -0.313 |
| Water Color | -0.319 | -0.262 | -0.285 | 0.273 | 0.403* | 0.171 | -0.202 | -0.271 | -0.331 |
| Elec. conductivity | 0.157 | 0.280 | 0.448* | -0.017 | -0.086 | -0.487** | 0.138 | 0.274 | 0.410* |
| Rainfall | -0.164 | -0.092 | -0.305 | 0.006 | -0.368 | -0.127 | 0.166 | 0.239 | 0.137 |
| Air relative humidity | -0.207 | 0.083 | 0.380 | -0.197 | -0.356 | 0.195 | -0.481** | 0.121 | -0.153 |
| Air T° | -0.083 | 0.208 | 0.135 | 0.305 | 0.401* | 0.222 | -0.245 | -0.351 | -0.278 |
| Insolation | -0.405* | -0.025 | -0.214 | -0.382 | 0.306 | -0.004 | -0.344 | -0.125 | -0.485** |

ddl=17; ***, $P \leq 0.01$; **, $P \leq 0.05$; *, $P \leq 0.1$; Water T°= water temperature; Air T°= air temperature; Elec. conductivity= electrical conductivity.

3.3.2. Correlation Coefficients Between Bacterial Abundances in Rainwater and Rainwater Physicochemical/Meteorological Parameters

The Spearman correlation coefficients have then calculated between the bacterial abundances registered during the 9 months in rainwater and the abiotic parameters considered. This aimed to evaluate the impact of some meteorological and abiotic parameters of rainwater on the abundance dynamics of the bacteria contained in this rainwater. The Spearman correlation coefficients calculated are shown in Table 3.

It appears that the water pH and the dissolved CO₂ are positively correlated ($P \leq 0.1$) with the dynamics abundance of *B. thuringiensis* at the station R1-SD5. At the station R2-SD3, the abundance variations of this bacteria species are negatively correlated ($P \leq 0.1$) with the water temperature, pH and electrical conductivity. However, phosphates, air temperature and insolation are positively correlated with this bacterial abundance dynamics ($P \leq 0.1$). At station R3-SD6, the profile of the abundance of this bacterium is strongly and negatively correlated ($P \leq 0.01$) with rainfall (Table 3).

Table 3. Spearman correlation coefficients between bacterial abundances in rainwater and rainwaters physicochemical/meteorological parameters at each collection's station in each considers subdivision.

| Abiotic parameters considered | Rainwater collection's station and bacteria considered | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|------------------|--------|-------------------------|------------------|---------|-------------------------|------------------|---------|
| | R2-SD3 | | | R1-SD5 | | | R3-SD6 | | |
| | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB |
| Water T° | -0.683** | -0.850*** | -0.017 | -0.268 | -0.367 | 0.450 | 0.172 | 0.686** | 0.159 |
| Water pH | -0.577* | 0.259 | -0.075 | 0.601* | -0.151 | 0.251 | 0.038 | 0.577* | 0.460 |
| Dissolved CO ₂ | 0.238 | 0.298 | -0.064 | 0.563* | 0.138 | -0.138 | -0.114 | -0.269 | -0.092 |
| Dissolved O ₂ | 0.117 | -0.600* | -0.083 | 0.232 | -0.521 | -0.261 | 0.336 | 0.577* | -0.385 |
| Nitrates | -0.183 | 0.233 | 0.533 | -0.504 | 0.276 | 0.343 | -0.368 | -0.417 | 0.717** |
| Phosphates | 0.617* | 0.283 | 0.450 | 0.385 | 0.700** | 0.067 | 0.084 | 0.201 | 0.485 |
| TDS | -0.471 | -0.723** | -0.084 | -0.160 | -0.142 | 0.268 | 0.256 | 0.498 | -0.236 |
| Nitrogen ammonia | 0.450 | 0.250 | -0.083 | -0.151 | 0.050 | 0.695** | -0.131 | -0.287 | 0.523 |
| Water Color | 0.519 | 0.686** | 0.310 | 0.017 | 0.678** | -0.119 | -0.101 | 0.326 | 0.059 |
| Elec. conductivity | -0.571* | -0.790*** | 0.084 | -0.025 | 0.351 | 0.628* | 0.324 | 0.561* | -0.310 |
| Rainfall | -0.533 | -0.133 | -0.100 | -0.268 | -0.067 | -0.083 | -0.787*** | -0.600* | 0.683** |
| Air rel. humidity | -0.100 | 0.000 | -0.467 | -0.142 | -0.133 | -0.467 | -0.092 | 0.483 | 0 |
| Air T° | 0.850*** | 0.667** | 0.400 | 0.218 | 0.617* | 0.400 | 0.519 | 0.033 | -0.183 |
| Insolation | 0.583* | 0.633** | -0.317 | 0.126 | 0.517 | -0.033 | 0.134 | 0.400 | -0.283 |

ddl=8; ***, $P \leq 0.01$; **, $P \leq 0.05$; *, $P \leq 0.1$; Water T°= water temperature; Air T°= air temperature; Elec. conductivity= electrical conductivity; Air rel. Humidity= Air relative humidity.

For the bacterium *B. cereus*, its abundance dynamics is negatively correlated ($P \leq 0.1$) with dissolved O₂, TDS, water electrical conductivity and the air temperature, at the station

R2-SD3, and with rainfall at the station R3-SD6 ($P \leq 0.1$). This bacterial abundance's variation is strongly and positively correlated ($P \leq 0.01$) with the water color, the air temperature

and the insolation at R2-SD3, with the phosphates concentration, water color and air insolation ($P \leq 0.1$) at R1-SD5, and with water temperature, pH, dissolved O₂ and electrical conductivity ($P \leq 0.1$) at R3-SD6 (Table 3).

The abundance dynamics of the HAMB is positively impacted ($P \leq 0.1$) by the color and electrical conductivity of the water at station R1-SD5, and nitrate concentration and rainfall ($P \leq 0.1$) in station R3-SD6 (Table 3).

3.3.3. Delay Correlations Between Groundwater and Rainwater Data

The water from the 2 wells in each borough was assumed to belong to the same underground watershed. In this way, the average values of each parameter analyzed were calculated for each underground watershed. It was indicated that a period of one month is necessary in the study area, to observe the impact of rainwater on the piezometric height of a water table [16, 24]. Correlation coefficients were thus calculated between the current month's data collected in groundwater and the previous month's data collected in rainwater. These correlations have thus been qualified as correlations with delay. The number of samples considered thus was 8. This aimed to assess the impact of some meteorological parameters and as well as some biotic and abiotic properties of rainwater on the

dynamics of abundance of the bacteria considered in well water. The results are presented in Table 4.

It appears that the pH of rainwater positively impacts the abundances of *B. thuringiensis* and *B. cereus* in the waters of the W-SD5 underground watershed ($P \leq 0.05$) (Table 4); similarly, the abundances of *B. thuringiensis* in rainwater positively impact that of *B. thuringiensis* in the waters of the underground watershed in the same district ($P \leq 0.01$). It is also noted that dissolved CO₂, phosphates, air temperature and the abundances of *B. cereus* in rainwater are positively and significantly correlated with the abundances of HAMB in the waters of the W-SD5 underground watershed ($P \leq 0.1$) (Table 4). The abundances of HAMB in the waters of the underground watershed W-SD3 are significantly and negatively impacted by the rainfall of the previous month ($P \leq 0.05$) (Table 4). In the waters of the W-SD6 underground watershed, the dissolved oxygen and electrical conductivity of rainwater are negatively and significantly related to the abundances of *B. thuringiensis* ($P \leq 0.1$). On the other hand, the nitrate contents of rainwater and rainfall are positively and significantly linked to the abundances of *B. cereus* in the waters of this W-SD6 underground watershed ($P \leq 0.1$). Insolation is negatively related to the abundances of this bacterium in this underground watershed ($P \leq 0.05$) (Table 4).

Table 4. Correlation coefficients between the current month's data collected in underground water (W) and the previous month's data collected in rainwater, in each district.

| Rainwater parameters | Underground water in each sub-division and bacteria considered | | | | | | | | |
|---------------------------|--|------------------|---------|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|
| | W-SD3 | | | W-SD5 | | | W-SD6 | | |
| | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB | <i>B. thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB |
| pH (UC) | -0.084 | -0.470 | -0.299 | 0.690** | 0.690** | -0.119 | -0.357 | -0.323 | 0.119 |
| Dissolved CO ₂ | 0.540 | -0.420 | -0.393 | 0.476 | -0.125 | 0.601* | 0.410 | 0.224 | 0.193 |
| Dissolved O ₂ | 0.143 | 0.479 | 0.500 | 0.000 | 0.054 | -0.181 | -0.611* | -0.120 | 0.275 |
| Nitrates | 0.119 | 0.120 | -0.238 | -0.252 | -0.084 | -0.084 | 0.048 | 0.647* | -0.452 |
| Phosphates | -0.476 | -0.383 | -0.548 | 0.524 | 0.238 | 0.619* | -0.084 | 0.066 | 0.000 |
| Nitrogen ammonia | 0.095 | 0.084 | 0.310 | -0.335 | -0.108 | -0.252 | 0.157 | 0.133 | -0.506 |
| Elec. conductivity | -0.563 | 0.247 | 0.228 | -0.335 | -0.228 | -0.455 | -0.778** | -0.265 | -0.383 |
| <i>B. thuringiensis</i> | 0.095 | 0.048 | -0.119 | 0.810*** | 0.476 | 0.119 | -0.395 | -0.542 | -0.036 |
| <i>B. cereus</i> | -0.286 | -0.359 | -0.095 | 0.310 | 0.071 | 0.643* | -0.286 | -0.287 | 0.095 |
| HAMB | -0.214 | 0.347 | -0.048 | 0.024 | 0.214 | -0.357 | 0.381 | 0.228 | -0.214 |
| Rainfall | -0.167 | -0.204 | -0.595* | -0.095 | -0.214 | -0.405 | 0.310 | 0.790** | 0.095 |
| Air rel. Humidity | 0.571 | -0.012 | -0.119 | -0.167 | 0.381 | 0.095 | 0.190 | 0.240 | -0.167 |
| Air T° | 0.095 | -0.096 | -0.143 | 0.033 | 0.000 | 0.595* | 0.048 | -0.419 | -0.500 |
| Insolation | -0.190 | -0.539 | 0.190 | -0.024 | -0.357 | 0.500 | 0.119 | -0.790** | -0.119 |

ddl=7; ***: $P \leq 0.01$; **: $P \leq 0.05$; *: $P \leq 0.1$; Air T°= air temperature; Elec. conductivity= electrical conductivity; Air rel. Humidity= Air relative humidity.

3.3.4. Spearman Correlation Coefficients Between the Bacterial Abundances and the Abiotic Parameters at the Whole Rainwater Collection's Stations

The 3 rainwater collection's stations were assumed to belong to the same geographical area. Sampling was then assumed to be carried out 3 times a month, for the entire duration of the study. The number of samples was thus 27. The Spearman correlation coefficients were then calculated and are shown in Table 5. For the whole rainwater

collection's stations, the abundance dynamics of *B. thuringiensis* is negatively impacted ($P \leq 0.1$) by water temperature, nitrates and rainfall, and a positive impact ($P \leq 0.01$) by air temperature. The variations of the abundance of *B. cereus* are positively impacted ($P \leq 0.1$) by water color, air temperature and insolation. For HAMB, nitrates and phosphates have a positive impact ($P \leq 0.05$) on their abundance, while the air relative humidity has a negative impact ($P \leq 0.1$) (Table 5).

Table 5. Spearman correlation coefficients between the bacterial abundances and the abiotic parameters considered registered at the whole rainwater collection's stations.

| Abiotic parameters considered | Bacteria considered | | |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------|---------|
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>B. cereus</i> | HAMB |
| Water T° | -0.339* | -0.265 | 0.119 |
| Water pH | -0.162 | 0.103 | 0.172 |
| Dissolved CO ₂ | 0.197 | 0.016 | -0.126 |
| Dissolved O ₂ | 0.219 | -0.119 | -0.210 |
| Nitrates | -0.355* | -0.080 | 0.412** |
| Phosphates | 0.221 | 0.147 | 0.454** |
| TDS | -0.070 | 0.068 | -0.067 |
| Nitrogen ammonia | 0.112 | -0.018 | 0.197 |
| Water Color | 0.177 | 0.393** | 0.316 |
| Elec. conductivity | -0.029 | 0.219 | 0.033 |
| Rainfall | -0.497*** | -0.218 | 0.051 |
| Air relative humidity | -0.061 | 0.104 | -0.333* |
| Air T° | 0.481** | 0.336* | 0.289 |
| Insolation | 0.268 | 0.466* | -0.157 |

ddl=26; ***: $P \leq 0.01$; **: $P \leq 0.05$; *: $P \leq 0.1$; Water T°= water temperature; Air T°= air temperature; Elec. conductivity= electrical conductivity.

4. Discussion

It is noted that rain and well water sampled harbors HAMB and specially *B. thuringiensis* and *B. cereus* which are spores forming bacteria. Microorganisms found in rainwater should be contained in aerosols. According to Tignat-Perrier *et al.* [3], airborne microbial communities appear to be the result of large inputs from nearby sources with possible low and diluted inputs from distant sources. Most airborne micro-organisms would be carried with particle size fractions higher than 10 μm aerodynamic diameters. Temporal stability in the composition of airborne microbial communities is mainly explained by the diversity and evenness of the surrounding landscapes and the wind direction variability over time [3]. Cheol Cho and Jang [2], analysed ATP content in bacterial fraction of the rainwater and the result suggested that the rainwater bacteria were metabolically active. Rainwater bacteria isolated showed potentials of fast growth.

In this study, it has been noted that bacterial abundance undergoes spatio-temporal variations in both media. Airborne bacterial communities seem to be in permanent change and this change is according to location and land-use around sampling point [35], and a complex set of environmental factors, including changes in atmospheric conditions and shifts in the relative importance of available microbial sources, may act to control its composition [8]. Temporal shifts in microbial community composition could sometimes be related to the different origin of air masses [36-38], but this seems possible only when air masses at the same location originated from clearly different environments. The spatio-temporal variation of the bacterial composition of rainwater samples has also been noted by Cheol Cho and Jang [2] and they suggested that it could be attributed to a local phenomenon and the spatial variability of aerosolized gamma-bacteria captured by rain which is seasonally dependent.

Variation of the rainwater bacterial abundance noted in this study could be link to diel cycle environmental factors. Gusareva *et al.* [39] noted in fact that the airborne microbial

organisms followed a clear diel cycle, possibly driven by environmental factors. Interday taxonomic diversity exceeded day-to-day and month-to-month variation. Some specific fungal and bacterial species can be strongly correlated with temperature, humidity, and CO₂ concentration, making them suitable biomarkers for studying the bioaerosol dynamics of the atmosphere [39].

It has been noted in this study that pH of wells fluctuated between 5.05 and 7.33 whereas that of rainwater varied from 6.12 to 6.88. Electrical conductivity values ranged from 111 to 885 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in wells, and varied from 3 to 92 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in rainwater. Both media contains nitrate, nitrogen ammonia, phosphate, dissolved CO₂ and O₂ and their concentration undergoes spatio-temporal variations. Other authors indicated that the aerosol contains H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, HSO₄²⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, CH₃SO₃⁻ [40-42]. The gas-phase species that can partition to the particle phase include H₂SO₄, CH₃SO₃H (methanesulfonic acid), HNO₃, HCl, NH₃, and any number of secondary organic, and their concentrations undergoes spatio-temporal variation [40-42].

The hydrogen ion activity in aqueous aerosols affects the partitioning of total nitrate and total ammonium between the gas and aerosol phases [42]. In the atmosphere, the acidity of condensed phases (aerosol particles, cloud water, and fog droplets) governs the phase partitioning of semivolatile gases such as HNO₃, NH₃, HCl, and organic acids and bases as well as chemical reaction rates [42]. It has implications for the atmospheric lifetime of pollutants and deposition. Changes in acidity also affect the number of chromophores contained within aerosol and their efficiency in absorbing sunlight in the near-UV range, and acidity-induced changes in aerosol contribute to the formation of droplets in warm and mixed-phase clouds [42-44].

Dust supplies the majority of the total phosphorus of aerosols and air particulate contain in phosphorus increase exponentially with daily temperature [45, 46]. The temperature and precipitation pattern dependence indicate a possible climate change influence on the aerosol phosphorus [46].

It has been noted in this study that some meteorological such as insolation, air temperature and rainfall, and some chemical parameters such as water temperature, water pH, dissolved CO₂, dissolved O₂, TDS, nitrogen ammonia, nitrate, phosphates, and electrical conductivity significantly impact bacterial abundance in rainwater although this varies with respect to the bacteria. It is indicated that air temperature and relative humidity are most often the factors that significantly shaped the microbial communities [47, 48]. The effects of relative humidity are more complex, and varies with environmental conditions. At higher temperatures, air can hold more water vapour, and the relationship is roughly exponential-air at high temperatures can hold much more water vapour than air at lower temperatures [49, 50]. When the organisms are dry-disseminated they tended to absorb water from the environment (i.e. they partially rehydrated), and when wet-disseminated, the opposite occurred, i.e. they desiccated [50]. Air temperature and relative humidity also affects virus survival, as they can affect the state of viral proteins (including enzymes) and the virus genome (RNA or DNA) [50].

Working on spores of *Bacillus subtilis* exposed to a series of stratosphere simulations, Smith *et al.* [51] noted that the stratosphere can be a critical barrier to long-distance microbial dispersal and cell survival in the upper atmosphere may be constrained by UV irradiation.

About the groundwater bacterial abundance, some authors indicated that microorganisms retrieved at ground level are not significantly different from those found at relatively higher elevation (238 m), thus suggesting the occurrence of a wide atmospheric mixing [52]. Brillard *et al.* [11] investigated the rain and groundwater closely linked to the *B. cereus*. They noted the presence of this bacteria species primarily as spores, in all of the tested compartments. During rain events, leachates collected after transfer through the soil eventually reached the groundwater and were loaded with *B. cereus*. In groundwater samples, newly introduced spores of a *B. cereus* strain were able to germinate, and vegetative cells arising from this event were detected for up to 50 days [11].

It has been stated that the impact of rainwater properties on those of groundwater is significant after a period of a few weeks to a month, although depending on the depth of the water table [16, 24]. This is sometimes referred to as a delayed impact. But in the present study, the significant impact of rainwater microbiological and chemical parameters on the biotic properties of groundwater varies from one parameter to another. The impact of several rainwater parameters on the dynamics of groundwater microflora would be drowned in what Elias *et al.* [53] qualified as confounding factors. This would include cells anatomy physiology, soil structure and chemical properties.

5. Conclusion

The abundances of *B. cereus* and *B. thurengiensis* in analysed water samples undergo spatio-temporal variations. In rain and well water, the degrees of correlation between meteorological or chemical factors and the dynamics of bacterial abundance

varied according to the abiotic parameter and the bacterial species considered. The relationships between the meteorological data and the properties of the previous month's rainwater on the abundance dynamics of the microflora in the well waters of the current month showed a diversity of degrees of impact. This would mean that even if the rainwater feeds the groundwater, the general properties of this groundwater would result from the interactions of the confounding factors. Due to the presence of these 2 bacteria species, the use of these waters presents short-term health risks for local populations.

References

- [1] Ahmed, W., Huygens, F., Goonetilleke, A. & Gardner, T. (2008). Real-Time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (17): 5490-5496. Doi: 10.1128/AEM.00331-08.
- [2] Cheol Cho, B. & Jang, G. I. (2014). Active and diverse rainwater bacteria collected at an inland site in spring and summer 2011. *Atmospheric Environment*, 94: 409-416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.05.048>
- [3] Tignat-Perrier, R., Dommergue, A., Thollot, A., Keuschnig, C., Magand, O., Vogel, T. M. & Larose, C. (2019). Global airborne microbial communities controlled by surrounding landscapes and wind conditions. *Scientific Reports*, 9: 14441. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51073-4>
- [4] Lafond, A. (2020). Air pollution and particle Size. <https://foobot.io/guides/air-pollution-particle-size.php> (Accessed on 17th december 2020).
- [5] Després, V. R., Huffman, J. A., Burrows, S. M., Hoose, C., Safatov, A. S., Buryak, G., Fröhlich-Nowoisky, J., Elbert, W., Andreae, M. O., Pöschl, U. & Jaenicke, R. (2012). Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 64, 15598. <https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.15598>
- [6] Clauss, M. (2015). Particle size distribution of airborne micro-organisms in the environment - A review. *Applied Agriculture and Forestry Research*, 2 (65): 77-100. Doi: 10.3220/LBF1444216736000.
- [7] Deacon, J. (2020). The microbial world: Airborne microorganisms. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/airborne.htm>. (Accessed on 16th December 2020).
- [8] Bowers, R. M., Clements, N., Emerson, J. B., Wiedinmyer, C., Hannigan, M. P. & Fierer, N. (2013). Seasonal variability in bacterial and fungal diversity of the near-surface atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 47: 12097-12106. <http://dx.doi.org/10.1021/es402970s>
- [9] Nicholson, W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 410-416.
- [10] Nicholson, W. L., Schuerger, A. C. & Setlow, P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571: 249-264.

- [11] Brillard, J., Dupont, C. M. S., Berge, O., Dargaignaratz, C., Oriol-Gagnier, S., Doussan, C., Broussolle, V., Gillon, M., Clavel, T. & Bérard, A. (2014). The water cycle, a potential source of the bacterial pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*, Article ID 356928. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/356928>
- [12] Glasset, B., Herbin, S., Granier, S. A., Cavalié, L., Lafeuille, E., Guérin, C., Ruimy, R., Casagrande-Magne, F., Levast, M., Chautemps, N., Decousser, J.-W., Belotti, L., Pelloux, I., Robert, J., Brisabois, A. & Ramarao, N. (2018). *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS ONE*, 13 (5), e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>
- [13] Ishida, R., Ueda, K., Kitano, T., Yamamoto, T., Mizutani, Y., Tsutsumi, Y., Imoto, K. & Yamamori, Y. (2019). Fatal community-acquired *Bacillus cereus* pneumonia in an immunocompetent adult man: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 19: 197. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3836-3>
- [14] Fernandez-Chapa, D., Ramirez-Villalobos, J. & Galan-Wong, L. (2019). Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. *Intech Open books*. Doi: 10.5772/intechopen.85756.
- [15] Cho, E.-M., Hong, H. J., Park, S. H., Yoon, D. K., Goung, S. J. N & Lee, C. M. (2019). Distribution and influencing factors of airborne bacteria in public facilities used by pollution-sensitive population: A meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16, 1483. Doi: 10.3390/ijerph16091483.
- [16] Nola, M., Njiné, T., Djuikom, E. & Sikati Foko V. (2000). Bacteria indicators dynamics in wells as influenced by well depth and well water column thickness, in Yaounde (Cameroon). *African Journal of Science and Technology*, 1 (2): 82-91.
- [17] Nola, M., Njiné, T., Sikati Foko, V. & Djuikom, E. (2001). Distribution de *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila* dans les eaux de la nappe phréatique superficielle en zone équatoriale au Cameroun et relations avec quelques paramètres chimiques du milieu. *Revue des Sciences de l'Eau*, 14 (1): 35-53.
- [18] Nola, M., Njiné, T., Djuikom, E. & Sikati Foko, V. (2002). Faecal coliforms and faecal streptococci community in the underground water in an equatorial area in Cameroon (Central Africa): The importance of some environmental chemical factors. *Water Research*, 36 (13): 3289-3297. Doi: 10.1016/S0043-1354(02)00024-6.
- [19] Nola, M., Eheth, J. S., Mounsang, M. L., Karia K., Kemka, N., Zébazé Togouet, S. H., Chihib, N. E., Krier, F., Servais, P., Hornez, J.-P. & Njiné, T. (2009). Daily evolution of the abundance of Enterobacteriaceae in wells, in the equatorial region of Cameroon (Central Africa): The hierarchical order of some predominant factors. *Cahiers de l'ASEES*, 14: 75-84.
- [20] Nola, M., Noah Ewoti, O. V., Nougang, M. E., Mounsang, L. M., Chihib, N.-E., Krier, F., Hornez, J.-P. & Njiné, T. (2012). The growth of *Escherichia coli* in soil layers separating the soil surface from the underground water table, in Central Africa: The hierarchical influence of the soil chemical characteristics. *Research Journal of Environment and Earth Sciences*, 4 (2): 196-206.
- [21] Nola, M., Eheth, J. S., Nougang, M. E., Mounsang, L. M., Noah Ewoti, O. V., Krier, F., Chihib, N.-E., Servais, P., Hornez, J.-P. & Njiné, T. (2012). Assessment of *in situ* abundance dynamics of Enterobacteria and other heterotrophic bacteria in groundwater in the equatorial region of Central Africa. *Water SA*, 38 (5): 737-745. <http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v37i4.18>
- [22] Eheth, J. S., Lontsi Djimeli, C. Nana, P. A., Tamsa Arfao, A., Noah Ewoti, O. V., Mounsang, L. M., Bricheux, G., Sime-Ngando, T. & Nola, M. (2019). Less effect of wells physicochemical properties on the antimicrobial susceptibility *Pseudomonas aeruginosa* isolated in equatorial region of Central Africa. *Applied Water Science* 9 (30). <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0909-9>
- [23] Manouere Njoya, A., Poutoum Yogne, Y., Eheth, J. S., Mouafo Tamnou, E. B., Metsopkeng, C. S., Noah Ewoti, O. V., Tamsa Arfao, A., Mounsang, L. M., Nana, P. A., Chinche Belengfé, S., Masseret, E., Sime-Ngando, T. & Nola, M. (2021). Antibiotic susceptibility of four Enterobacteriaceae strains (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei*) isolated from wastewater, surface water and groundwater in the equatorial zone of Cameroon (Central Africa). *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 11 (01): 120-137. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.11.1.0303>
- [24] Sugiwama, A., Masuda, S., Nagaosa, K., Tsujimura, M. & Kato, K. (2016). Tracking the direct impact of rainfall on groundwater at Mt. Fuji by multiple analyses including microbial DNA. *Biogeosciences Discuss*. <https://doi.org/10.5194/bg-2016-78>
- [25] Nola, M., Njiné, T., Boutin, C., Servais, P., Messouli, M., Monkiedje, A., Zebaze Togouet, S. H. & Kemka, N. (2005). Sorption kinetics of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp on two soil layers associated with a groundwater table in Yaounde, Cameroon (Central Africa). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2 (3): 447-455.
- [26] Nola, M., Njiné, T., Kemka, N., Zebaze Togouet, S. H., Foto Menbohan, S., Monkiedje, A., Servais, P., Messouli, M. & Boutin, C. (2006). Retention of staphylococci and total coliforms during wastewater percolation through equatorial soil in Central Africa: The role of the soil column near soil surface and that closely above groundwater table. *Water, Air and Soil Pollution*, 171 (1-4): 253-271. Doi: 10.1007/s11270-005-9039-0.
- [27] Nola, M., Noah Ewoti, O. V., Nougang, M., Krier, F., Chihib, N.-E., Hornez, J.-P. & Njiné, T. (2011). Assessment of the hierarchical involvement of chemical characteristics of soil layer particles during bacterial retention in Central Africa. *International Journal of Environment and Pollution*, 46 (3-4): 178-198.
- [28] Nola, M., Djarmaila, E., Kemka, N., Chihib, N.-E., Zébazé Togouet, S. H., Krier, F., Servais, P., Hornez, J.-P. & Njiné, T. (2010). Assessment of the future of heterotrophic aerobic bacteria and electrical conductivity in groundwater samples stored in households conditions at different temperatures, in the equatorial region of Central Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (20): 2055-2066.
- [29] Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. F. & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 548-572.
- [30] Abossolo, S. A., Amougou, J. A., Tchindjang, M., Mena, M. S. & Batha, R. A. S. (2015). Analyse des précipitations annuelles à la station de Yaoundé de 1895 à 2006. *Afrique science*, 11 (2): 183-194.
- [31] Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T. & Jaoua, S. (2018). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and *cry* gene content. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, article 708. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>

- [32] Kibdani, M. (2017). Identification des souches locales de *Bacillus thuringiensis* en vue d'une lutte biologique contre *Ceratitits capitata* et autres pathogènes de l'oranger *Citrus sinensis*. Thèse Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université ABOU BAKER BELKAID de TLEMCEM, Algérie.
- [33] Koua Abea, M., Bomo Assanvo, J., Sanogo, M. & Koffi, K. M. (2018). Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biology and Chemical Science*, 12 (5): 2284-2293.
- [34] Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T., (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- [35] Bowers, R. M., McLetchie, S., Knight, R. & Fierer, N. (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of the potential source environments. *ISME J.*, 5: 601–612. Doi: 10.1038/ismej.2010.167.
- [36] Jeon, E. M., Kim, H. J., Jung, K., Kim, J. H., Kim, M. Y., Kim, Y. P. & Ka, J. O. (2011). Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed my molecular analyses. *Atmos. Environ.*, 45: 4313-4321. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.11.054.
- [37] Zweifel, U. L., Hagström, A., Holmfeldt, K., Thyraug, R., Geels, C., Frohn, L. M., Skjoth, C. A. & Karlson, U. G. (2012). High bacterial 16SrRNA gene diversity above the atmospheric boundary layer. *Aerobiologia* 28: 481-498. Doi: 10.1007/s10453-012-9250-6.
- [38] Gandolfi, I., Bertolini, V., Ambrosini, R., Bestetti, G. & Franzetti, A. (2013). Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97: 4727-4736. Doi: 10.1007/s00253-013-4901-2.
- [39] Gusareva, E. S., Acerbi, E., Lau, K. J. X., Luhung, I., Premkrishnan, B. N. V., Kolundzija, S., Purbojati, R. W., Wong, A., Houghton, J. N. I., Miller, D., Gaultier, N. E., Heinle, C. E., Clare, M. E., Kodengil Vettath, V., Kee, C., Lim, S. B. Y., Chénard, C., Phung, W. J., Kavita, K., Kushwaha, Poh Nee, Putra, A., Panicker, D., Yanqing, K., Zhei Hwee, Y., Sachin, R., Lohar, Mikinori, K., Lim Kima, H., Liang Yang, Akira Uchida, Drautz-Moses, D. I., Junqueira, A. C. M. & Schuster, S. C. (2019). Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *PNAS*, 116 (46): 23299-23308. <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1908493116/-/DCSupplemental>
- [40] Jacobson, M. Z., Kaufman, Y. J. & Rudich, Y. (2007). Examining feedbacks of aerosols to urban climate with a model that treats 3- D clouds with aerosol inclusions. *J. Geophys. Res.-Atmos.*, 112, D24205. <https://doi.org/10.1029/2007JD008922>
- [41] Zaveri, R. A., Easter, R. C., Fast, J. D. & Peters, L. K. (2008). Model for simulating aerosol interactions and chemistry (MOSAIC). *J. Geophys. Res.-Atmos.*, 113, D13204. <https://doi.org/10.1029/2007jd008782>
- [42] Pye, H. O. T., Nenes, A., Alexander, B., Ault, A. P., Barth, M. C., Clegg, S. L., Collett, J. L., Fahey, K. M., Hennigan, C. J., Herrmann, H., Kanakidou, M., Kelly, J. T., Ku, I. T., McNeill, V. F., Riemer, N., Schaefer, T., Shi, G., Tilgner, A., Walker, J. T., Wang, T., Weber, R., Xing, J., Zaveri, R. A. & Zuend, A. (2020). The acidity of atmospheric particles and clouds. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 20: 4809-4888. <https://doi.org/10.5194/acp-20-4809-2020>
- [43] Teich, M., van Pinxteren, D., Wang, M., Kecorius, S., Wang, Z., Müller, T., Mocnik, G. & Herrmann, H. (2017). Contributions of nitrated aromatic compounds to the light absorption of watersoluble and particulate brown carbon in different atmospheric environments in Germany and China. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17: 1653-1672. <https://doi.org/10.5194/acp-17-1653-2017>
- [44] Phillips, S. M., Bellcross, A. D. & Smith, G. D. (2017). Light absorption by brown carbon in the southeastern United States is pH-dependent. *Environ. Sci. Technol.*, 51: 6782-6790. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01116>
- [45] Barkley, A. E., Prospero, J. M., Mahowald, N., Hamilton, S. S., Pependorf, K. J., Oehlert, A. M., Pourmand, A., Gatineau, A., Panechou-Pulcherie, K., Blackwelder, P. & Gaston, C. J. (2019). African biomass burning is a substantial source of phosphorus deposition to the Amazon, Tropical Atlantic Ocean, and Southern Ocean. *PNAS*, 116 (33): 16216-16221. <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1906091116/-/DCSupplemental>
- [46] Furdul, V., Duric, M., Eskande, H. & Stacey, N. (2022). Temporal trends of phosphorus in urban atmospheric aerosols. *Canadian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1139/cjc-2021-0220>
- [47] Maron, P. A., Mougél, C., Lejon, D. P. H., Carvalho, E., Bizet, K., Marck, G., Cubito, N., Lemanceau, P. & Ranjard, L. (2006). Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area. *Atmos. Environ.*, 40: 8074-8080. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.08.047.
- [48] Bowers, R. M., McCubbin, I. B., Hallar, A. G. & Fierer, N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmos. Environ.*, 50: 41-49. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.01.005.
- [49] Shaman, J. & Kohn, M. (2009). Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106: 3243-3248. Doi: 10.1073/pnas.0806852106.
- [50] Tang, J. W. (2009). The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface*, 6: S737-S746. Doi: 10.1098/rsif.2009.0227.focus.
- [51] Smith, D. J., Griffin, D. W., McPeters, R. D., Ward, P. D. & Schuerger, A. C. (2011). Microbial survival in the stratosphere and implications for global dispersal. *Aerobiologia*, 27: 319-332. Doi: 10.1007/s10453-011-9203-5.
- [52] Li, K., Dong, S., Wu, Y. & Yao, M. (2010). Comparison of the biological content of air samples collected at ground level and at higher elevation. *Aerobiologia* 26: 233-244. Doi: 10.1007/s10453-010-9159-x.
- [53] Elias, M., Faria, R., Gompert, Z. & Hendry, A. (2012). Factors influencing progress toward ecological speciation. *Ecological Speciation*, Article ID 235010. <https://doi.org/10.1155/2012/235010>