

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie - Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

### Thème

---

**Evaluation de la qualité bactériologique des eaux de quelques zones humides  
de l'éco-complexe de Guerbès-Sanhadja (Wilaya de Skikda, Nord – Est  
algérien).**

---

**Présenté par : Meradi Safa.**

**Devant le jury composé de :**

**Présidente : Mme. Messiad R.**

**(M.A.A)**

**Université de Guelma**

**Examinatrice: Mme. Sansri S.**

**(M.A.A)**

**Université de Guelma**

**Encadreurs : Mr. Houhamdi M.**

**(Pr.)**

**Université de Guelma**

**Melle. Abdi Soumia.**

**Doctorante**

**Université de Souk Ahras**

**Juin 2015**



## *Remerciement*

*À mon grand dieu le bon, le miséricordieux qui m'a donné la foi, le courage et la volonté de mener ce travail à son terme.*

*Je tien à remercier Madame **Messiad R.** maître assistante au département de biologie, de m'avoir accordé le privilège de présider ce jury.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Madame **Sansri S.** Maître assistante au département de biologie pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et qu'elle trouve ici le témoignage de ma très haute considération.*

*Mes remerciement vont aussi à mon encadreur monsieur **Houhamdi Moussa**, en qui j'ai trouvé le guide, dont le don de soi en temps et attention n'ont d'égale que l'abnégation des maîtres, pour qui la transmission de leur savoir à leurs élèves est devenue un sacerdoce.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Mlle **ABDI SOUMIA**, doctorantes à l'Université de Souk Ahras, qui m'a fait l'honneur de m'encadrer et me guider avec patience et gentillesse tout au long de la réalisation de ce travail. Ses encouragements, sa disponibilité constante et surtout ses conseils très précieux et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Mes remerciements vont également à la doctorante Mlle **Rouaiguia Meriem**, pour ces aides précieuses.*

*J'exprime également mes remerciements les plus sincères à Monsieur Merzoug seyfeddine attaché de recherche au Centre National de Recherche en Biotechnologie à Constantine (CRBT).*

*Mes sincères remerciements vont à tous les enseignants du Département de Biologie de l'Université de Guelma surtout : Mr. Bousbiaa, Mr. Aïssaoui, Mr. Benada, Mr. Atoussi, Mr. Adrar et les responsables des laboratoires du Département surtout Mme. Houria, Asma, Houda et Bahia. Sans oublier tous les travailleurs de la bibliothèque.*

*Je remercie très cordialement mon oncle Zaïdi Mohamed pour son aide, ses conseils et surtout les encouragements et le soutien morale. Vraiment les mots ne suffisent pas pour te remercier.*

*Dans la vie, il y a trois facteurs : le talent, la chance, le travail. Avec deux de ces facteurs, on peut réussir. Mais l'idéal est de disposer de trois (De Bernard Werber).*



## Dédicace

*Merci à Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire, de réfléchir, d'avoir la force d'en croire en lui et surtout d'avoir la patience de persévérer jusqu'à la réalisation de mon rêve et de mon bonheur, tout en levant, mes mains vers le ciel et dire :*

*"Ya Kayoum "*

*Je dédie ce travail aux deux personnes les plus tendres au monde, qui ont veillé à ce que j'arrive la où j'en suis, qui m'ont apportés leur soutien, et qui ont été là jours et nuits pour que je réussis. Qu'Allah vous protège et vous garde pour moi mes chers parents.*

*Ma tendre et mon adorable maman Soumia et mon cher papa Ali. Je vous dédie ce travail pour vous exprimer mon immense et éternelle gratitude.*

*A mes chers frères :*

*Boubakeur, Mamine et Abd latif et sa femme Souad.*

*Merci pour votre soutien et vos sacrifices.*

*Merci d'être présents dans ma vie, Qu'Allah vous garde pour moi.*

*A celui qui aurait été fier de moi : mon grand père Layachi que je l'aime et à celle qui m'a donnée beaucoup d'amour ma grande mère Djamilia qui j'espère qu'elle soie au paradis. Les mots ne suffisent pas pour vous remercier.*

*A mes très adorables tentes que je considère mes sœurs : les belles jumelle Robila et Nada pour leurs conseils, leur soutien morale et leurs amour.*

*A tous mes oncles sans exception : Halim, nedjmi, Toufik, Mohamed et Zinou.*

*A ma grande mère Becha que dieu te garde. Et mes tentes.*

*A tous mes cousins et cousines : surtout Aicha.*

*Et une spéciale dédicace à mon encadreur Melle soumia, que je respecte énormément et que je considère comme un exemple de sérieux et de conscience scientifique.*

*A toute mes chères amies : Soumia, Meriem, Zaineb, Rabiaa, Amina, kelthoum, Hana, Salma, Nina, bouthayna, Amira, Refus, ccessilia et toute la promotion de 2015.*

*Affectueusement Safa.*

## Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

### Chapitre I : Généralité et description de la zone d'étude

<b>1. Les zones humides</b> .....	03
1.1. Qu'est ce qu'une zone humide ? .....	03
1.2. Pourquoi conserver les zones humides ? .....	03
1.3. Valeurs des zones humides.....	04
<b>2. Les zones humides en Algérie</b> .....	04
2.1. Importance internationale des zones humides algérienne.....	04
<b>3. Généralités sur le complexe des zones humides de Guerbes Sanhadja</b> .....	05
3.1. Caractéristiques physiques.....	06
3.1.1. Géologie et Pédologie.....	06
3.1.2. Hydrologie.....	06
3.2. Description des sites d'études.....	06
3.2.1. GaraetChichaya.....	06
3.2.2. Garaet Sidi Makhlouf.....	06
3.2.3. Garaet El Guelb.....	07
3.3. Situation administrative.....	09
3.4. Climatologie.....	09
3.4.1. Température.....	10
3.4.2. Les précipitations (Pluviométrie).....	10

3.4.3. L'humidité.....	10
3.4.4. Les vents.....	11
3.4.5. Synthèse climatique.....	11
3.4.5.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson.....	11
3.4.5.2. Quotient pluviométrique d'Emberger.....	12
3.5. Cadre biotique.....	13
3.5.1. La flore.....	13
3.5.2. La faune.....	14
3.6. Menaces agissent sur le site.....	14

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

<b>1. Stratégie d'échantillonnage.....</b>	<b>16</b>
1.1. Matériel de prélèvement.....	16
1.2. Méthode de prélèvement.....	17
1.3. Etiquetage des échantillons.....	17
1.4. Transport et conservation des échantillons.....	17
<b>2. Choix des stations de prélèvement.....</b>	<b>18</b>
<b>3. période de prélèvement.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Analyses effectuées.....</b>	<b>18</b>
4.1. Les analyse physico-chimique mesurés <i>in situ</i> .....	18
4.1.1. La température.....	18
4.1.2. Potentiel d'hydrogène (pH) .....	18
4.1.3. L'oxygène dissous.....	19
4.1.4. La conductivité.....	19

4.1.5. Mode opératoire des mesures <i>in situ</i> .....	19
4.2. Les analyses bactériologiques.....	19
4.2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux à 22°C et à 37°C.....	20
4.2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination fécale.....	22
4.2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermo- tolérants, avec identification d' <i>Escherichiacoli</i> en milieu liquide.....	22
4.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	25
4.2.2.3. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito- réducteurs (ASR).....	26
4.2.3. Recherche des germes pathogènes.....	28
4.2.3.1. Recherche des staphylocoques.....	28
4.2.3.2. Recherche de <i>Shigella</i> .....	30
4.2.3.3. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
4.2.3.4. Recherche de <i>Salmonella</i> .....	32
4.2.3.5. Recherche de <i>Vibrio cholérique</i> .....	33
<b>5. Identification des germes</b> .....	<b>35</b>
5.1. L'identification morphologique.....	35
5.1.1. Examen macroscopique des caractères cultureux.....	35
5.1.2. Examen microscopique.....	36
5.2. Identification biochimiques et enzymatiques.....	37
5.2.1. Caractères enzymatiques.....	37
5.2.2. Caractères biochimiques.....	38

### **Chapitre III :Résultats et discussion**

<b>1. Les paramètres physico-chimiques mesurés <i>in situ</i></b> .....	<b>45</b>
1.1. La température.....	45

1.2. Le pH.....	46
1.3. La conductivité .....	46
1.4. L'oxygène dissous.....	47
<b>2. Les analyses bactériologiques.....</b>	<b>48</b>
2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux.....	48
2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale.....	50
2.2.1. Coliformes totaux.....	50
2.2.2. Coliformes fécaux.....	52
2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	53
2.2.4. Le rapport coliformes fécaux/ streptocoques fécaux (CF/SF) .....	54
2.2.5. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR).....	55
2.3. Résultats d'identification des germes pathogènes.....	56
2.3.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram de différents germes isolés.....	56
2.3.2. Résultats de l'identification biochimique.....	58
Conclusion.....	65
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

± : Plus ou moins.

- : Résultat négatif.

+ : Résultat positif.

° : Degré.

< : Inférieure.

> : Supérieure.

% : Pourcent.

°C : Degré Celsius.

µl: Microlitre.

µs/cm: Micro siemens par centimètre.

ADH: Arginine DiHydrolase.

An : Année.

ASR: Anaérobies sulfito-réducteurs.

BCPL : Bouillon lactose au pourpre de bromocrésol.

BGN: Bacilles Gram négatifs.

BNEF : Bureau National d'Etudes Forestières.

CE: Collaboration Européenne.

CE : Conductivité électrique.

CF/ml : Coliforme fécaux par millilitre.

cm : Centimètre.

DES : Direction de l'environnement de Skikda.

DGF : Direction générale du foret.

E : Est.

E : Entérobactéries.

*E.coli* : *Escherichia coli*.

EPA : Eau peptonée alcaline.

etc. : Excitera.

Fe<sup>2+</sup>: Fer ferreux.

FeS : Sulfate de fer.

Fig. : Figure.

G. : Garaet.

g.l : Gramme par litre.

GNAB: Gélose nutritive alcaline de billé.

h : Heure.

H<sup>+</sup> : Hydrogène.

ha : Hectare.

IND : Indole.

K : Kelvin.

LDC : Lysine Décarboxylase.

m : Mètre.

Max : Maximum.

mg/l : Milligramme par litre.

Min : Minimum.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

Moy : Moyenne.

m/s : Mètre par seconde.

N : Nord.

NaCl: Chlorure de Sodium.

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> : Sulfite de sodium.

NE : Non entérobactéries.

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Nitrate.

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrite.

NPP : Nombre plus probable.

N°: Numéro.

ODC: Ornithine Décarboxylase.

OMS : Organisation mondial de santé.

P : Précipitation.

pH : potentiel Hydrogène.

S : Sud.

*S.aureus* : *Staphylococcus aureus*.

S/C : Simple concentration.

SFB: Bouillon Sélénite Cystéine.

SF/ml : Streptocoque fécaux par millilitre.

SS: *Salmonella-Shigella*.

Staph : Staphylocoque.

T : Température.

Tab: Tableau.

TDA: Tryptophane Décarboxylase.

TGEA : Tryptone – Glucose – Extrait de levure – Agar.

TSI: Triple Sugar Iron.

UFC : Unité formant colonie.

VF: Viande Foie.

VP : Voges Proskawer.

W : West.

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	Localisation de l'éco-complexe des zones humides de Guerbès-Senhadja.	<b>05</b>
<b>Figure 02</b>	Complexe des zones humides de Guerbès-Senhadja.	<b>07</b>
<b>Figure 03</b>	Garaet Chichaya.	<b>08</b>
<b>Figure 04</b>	Image satellitaire de Garaet Chichaya.	<b>08</b>
<b>Figure 05</b>	Garaet Sidi Makhlouf.	<b>08</b>
<b>Figure 06</b>	Image satellitaire de Garaet Sidi Makhlouf.	<b>08</b>
<b>Figure 07</b>	Garaet El-Guelb.	<b>08</b>
<b>Figure 08</b>	Image satellitaire de Garaet El-Guelb.	<b>08</b>
<b>Figure 09</b>	Diagramme pluviométrique de Bagnous et Gaussen.	<b>11</b>
<b>Figure 10</b>	Climagramme d'Emberger de la wilaya de Skikda (1997-2013).	<b>13</b>
<b>Figure 11</b>	Le pâturage à gauche à Garaet chichaya et à droite L'agriculture à Garaet El-Guelb.	<b>15</b>
<b>Figure 12</b>	Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à 37°C et 22 °C dans les eaux.	<b>21</b>
<b>Figure 13</b>	Protocole de recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux et <i>E.coli</i> dans les eaux.	<b>24</b>
<b>Figure 14</b>	Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux.	<b>26</b>
<b>Figure 15</b>	Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfite-réductrices dans les eaux.	<b>28</b>
<b>Figure 16</b>	Protocole de recherche des <i>Staphylococcus</i> , <i>Shigella</i> et <i>Pseudomonas</i> dans les eaux.	<b>31</b>
<b>Figure 17</b>	Protocole opératoire de la recherche de <i>Salmonella</i> dans l'eau.	<b>33</b>
<b>Figure 18</b>	Protocole de recherche et identification de <i>Vibrio</i> dans les eaux.	<b>35</b>
<b>Figure 19</b>	Test catalase.	<b>38</b>
<b>Figure 20</b>	Test coagulase.	<b>38</b>
<b>Figure 21</b>	Test oxydase.	<b>38</b>
<b>Figure 22</b>	Présentation de la galerie API 20 E.	<b>42</b>
<b>Figure 23</b>	Présentation de la galerie API 20 NE.	<b>43</b>
<b>Figure 24</b>	Présentation de la galerie API Staph.	<b>44</b>
<b>Figure 25</b>	Variation de la température de l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).	<b>45</b>
<b>Figure 26</b>	Variation du pH de l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).	<b>46</b>
<b>Figure 27</b>	Variation de la conductivité électrique de l'eau de nos sites d'étude (Mars-Avril 2015).	<b>47</b>
<b>Figure 28</b>	Variation de L'oxygène dissous de l'eau de nos sites d'étude (Mars-Avril 2015).	<b>48</b>
<b>Figure 29</b>	Estimation des germes totaux à 37°C dans l'eau de nos sites d'étude.	<b>49</b>

<b>Figure 30</b>	Estimation des germes totaux à 22°C dans l'eau de nos sites d'étude.	<b>50</b>
<b>Figure 31</b>	Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).	<b>51</b>
<b>Figure 32</b>	Estimation des coliformes fécaux/ml dans nos prélèvements (Mars – Avril 2015).	<b>52</b>
<b>Figure 33</b>	Estimation des Streptocoques fécaux/ml dans l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).	<b>53</b>
<b>Figure 34</b>	Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR/20ml).	<b>55</b>
<b>Figure 35</b>	Culture positive des ASR dans un tube de VF à gauche et aspect microscopique à droite montre des formes végétatives et sporulantes (entourées par un cercle rouge) des ASR (Grossissement ×100).	<b>56</b>
<b>Figure 36</b>	Aspect des colonies sur gélose Hectoèn.	<b>57</b>
<b>Figure 37</b>	Des Bacilles Gram (-) (Grossissement ×100).	<b>57</b>
<b>Figure 38</b>	Aspect des colonies sur gélose GNAB	<b>57</b>
<b>Figure 39</b>	Des Bacilles Gram (-) (Grossissement ×100).	<b>57</b>
<b>Figure 40</b>	Aspect des colonies sur gélose chapman.	<b>58</b>
<b>Figure 41</b>	Cocci à Gram positif en grappe de raisin (Grossissement ×100).	<b>58</b>
<b>Figure 42</b>	Aspect des colonies sur gélose cétrimide.	<b>59</b>
<b>Figure 43</b>	des Bacilles Gram (-) (Grossissement ×100).	<b>59</b>
<b>Figure 44</b>	Résultat de la Recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine dans les milieux King A et King B.	<b>60</b>
<b>Figure 45</b>	Résultats de quelques galeries biochimiques classiques.	<b>61</b>
<b>Figure 46</b>	Profil biochimique de la souche <i>Enterobacter aerogenes</i> .	<b>62</b>
<b>Figure 47</b>	Profil biochimique de la souche <i>Staphylococcus hominis</i> .	<b>62</b>
<b>Figure 48</b>	Profil biochimique de la souche <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> .	<b>62</b>
<b>Figure 49</b>	Profil biochimique de la souche <i>Serratia odorifera 1</i> .	<b>62</b>
<b>Figure 50</b>	Profil biochimique de la souche <i>Aeromonas hydrophila gr.1</i> .	<b>62</b>
<b>Figure 51</b>	Profil biochimique de la souche <i>Pseudomonas putida</i> .	<b>63</b>
<b>Figure 52</b>	Profil biochimique de la souche <i>Vibrio mimicus</i> .	<b>63</b>
<b>Figure 53</b>	Profil biochimique de la souche <i>Vibrio vulnificus</i> .	<b>63</b>
<b>Figure 54</b>	Profil biochimique de la souche <i>Citrobacter braakii</i> .	<b>63</b>

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>Tableau 01</b>	Données climatiques de la wilaya de Skikda (1997- 2013).	<b>09</b>
<b>Tableau 02</b>	Caractéristiques des points de prélèvements.	<b>Annexe 01</b>
<b>Tableau 03</b>	Nature et période de prélèvement.	<b>Annexe 01</b>
<b>Tableau 04</b>	Tableau de Mac GRADY.	<b>Annexe 02</b>
<b>Tableau 05</b>	Caractères d'identification biochimique de <i>Shigella</i> .	<b>Annexe 03</b>
<b>Tableau 06</b>	Tests enzymatiques effectués.	<b>37</b>
<b>Tableau 07</b>	Lecture de l'API 20 E.	<b>Annexe 04</b>
<b>Tableau 08</b>	Lecture de l'API 20 NE.	<b>Annexe 04</b>
<b>Tableau 09</b>	Lecture de l'API 20 Staph.	<b>Annexe 04</b>
<b>Tableau 10</b>	Evaluation de la température dans nos sites d'étude.	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 11</b>	Evaluation du pH dans nos sites d'étude.	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 12</b>	Evaluation de la conductivité électrique dans nos sites d'étude.	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 13</b>	Evaluation de l'oxygène dissous dans nos sites d'étude.	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 14</b>	Analyse descriptive des bactéries des eaux de nos sites d'étude (Mars 2015).	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 15</b>	Analyse descriptive des bactéries des eaux de nos sites d'étude (Avril 2015).	<b>Annexe 05</b>
<b>Tableau 16</b>	Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température.	<b>Annexe 06</b>
<b>Tableau 17</b>	La grille de la qualité des eaux des rivières selon la conductivité électrique.	<b>Annexe 06</b>
<b>Tableau 18</b>	La grille de la qualité des eaux en fonction de l'Oxygène dissous.	<b>Annexe 06</b>
<b>Tableau 19</b>	Origine de la pollution fécale selon le rapport CF/SF.	<b>54</b>
<b>Tableau 20</b>	Détermination du rapport coliformes fécaux/ streptocoques fécaux.	<b>54</b>
<b>Tableau 21</b>	Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de nos prélèvements.	<b>56</b>
<b>Tableau 22</b>	Résultats du profil biochimique des <i>Staphylococcus</i> isolés.	<b>58</b>
<b>Tableau 23</b>	Résultats du profil biochimique des <i>Pseudomonas</i> isolés.	<b>59</b>
<b>Tableau 24</b>	Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.	<b>60</b>
<b>Tableau 25</b>	Résultats de l'identification par les API systèmes (API 20 E, API 20 NE, API Staph).	<b>61</b>
<b>Tableau 26</b>	Répartition des espèces bactériennes isolées pendant les deux prélèvements entre les stations.	<b>64</b>

Les ressources en eau proviennent des eaux de surface et des eaux souterraines renouvelables et non renouvelables (**Harrat et Achour, 2010**), dont 97 % de l'eau de surface est salée ; les 3 % restant constituent les réserves d'eau douce de la planète (**Rejsek, 2002**). La protection de ces milieux naturels contre toute pollution urbaine ou industrielle est indispensable, pour conserver la bonne qualité des eaux (**CE, 2000**).

Les zones humides une de ces milieux naturels ; où l'eau est le principal facteur contrôlant la vie animale et végétale associée (**Metallaoui, 2010**). L'Algérie est riche en zones humides qui font partie des ressources les plus précieuses sur le plan de la diversité biologique et de la productivité naturelle, elles jouent un rôle important dans les processus vitaux, entretenant des cycles hydrologiques et accueillant une flore importante, des poissons et des oiseaux migrateurs (**Metallaoui, 2010**).

La convention sur les zones humides (plus connue sous le nom de convention de Ramsar), traité intergouvernemental qui a pour mission de conserver les zones humides, le reconnaît. En fait, devenir signataire de la convention sur les zones humides ne signifie pas que l'on s'engage à "protéger les zones humides" mais plutôt l'on entreprend de les utiliser rationnellement (**Boumezbeur, 2000**).

Parmi ces milieux, les plus connus à l'heure actuelle, sont ceux des complexes d'El Kala et de Guerbes-Sanhadja, considérés comme exceptionnels, constituant l'un des principaux réservoirs de la biodiversité du bassin méditerranéen. C'est d'ailleurs, quelques uns des lacs et marécages d'El Kala qui ont permis à l'Algérie d'adhérer à la Convention de Ramsar.

Le complexe de Guerbes Sanhadja site Ramsar depuis 02/02/2001, contient 31 sites humides (**Samraoui et De Belair 1997**), représentés ici par Garaet Sidi Makhlouf, Garaet Chichaya et Garaet El-Guelb.

Des substances susceptibles de contaminer les eaux sont extrêmement nombreuses et diverses en raison d'une part aux activités humaines multiples et d'autre part aux facteurs naturels qui peuvent en être la source, essentiellement des substances d'origine géologique, industriel et agricole (**Sayad, 2008**).

Ainsi, le contrôle de la qualité de l'eau joue un rôle important dans la santé publique car celle-ci est susceptible d'engendrer des altérations catastrophiques sur le sol, sur l'organisme humain et même de toucher à la santé de toute une population (**Roux, 1987**).

Vue cette importance majeure, nous avons essayé d'étudier et de déterminer la qualité bactériologiques ainsi que quelques paramètres physico-chimiques, des eaux de quelques plans d'eau du complexe de Guerbes Sanhadja l'un des sites classé sur la liste de Ramsar des zones humides d'importance internationale, et ceci dans le but d'apprécier l'évolution de sa qualité et son impact sur l'environnement et sur la santé publique.

Nous avons structuré notre démarche en trois chapitres interdépendants :

- Le premier chapitre, une étude bibliographique purement théorique rassemble d'une part des généralités sur les zones humides; ainsi une description détailler sur les plans d'eau ciblés par notre étude.
- Le deuxième chapitre, une étude expérimentale consacrée à la présentation du matériel et la méthodologie suivie pour la réalisation des analyses bactériologique et physico-chimiques effectuées durant ce travail.
- Le troisième chapitre, sous formes des tableaux et des graphes explique les différents résultats obtenus au cours de notre étude pratique, avec une discussion de ces résultats.

Nous terminons par une conclusion tirée à partir des résultats obtenus.

A l'échelle de la planète, les milieux humides sont aujourd'hui reconnus comme une catégorie particulière de systèmes écologiques ou écosystèmes qui se différencient par leurs caractéristiques et leurs propriétés des autres grandes catégories représentées par les écosystèmes terrestres et les écosystèmes aquatiques (**Barnaud *et al.*, 2007**).

## **1. Les zones humides**

### **1.1. Qu'est ce qu'une zone humide ?**

Une zone humide est une région où l'eau est le principal facteur qui contrôle le milieu naturel et la vie animale et végétale associée. Elle apparaît là où la nappe phréatique arrive près de la surface ou affleure ou encore, là où des eaux peu profondes recouvrent les terres (**Fustec, 2000**).

Au niveau international, la Convention de Ramsar du 2 février 1971, relative aux zones humides d'importance internationale, particulièrement comme habitat des oiseaux d'eau, est considérée comme zones humides :

« Des étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douce, saumâtre ou salée, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres».

La convention s'applique donc à des types d'habitats très variés : rivières et lacs, lagunes côtières, mangroves, tourbières et même récifs coralliens. Il existe aussi des zones humides artificielles telles que les bassins de pisciculture ou d'élevage de crevettes, les étangs agricoles, les terrains d'épandage et les canaux (**Fustec, 2000**).

### **1.2. Pourquoi conserver les zones humides ?**

Un caractère essentiel pour les zones humides est la disponibilité de l'eau, qui est contrôlé par le cycle hydrologique. Une zone humide est une dépression naturelle et la mise en eau de la zone humide est fonction d'un équilibre entre les entrées (précipitation, nappe d'eau souterraines) et les sorties (évaporation) d'eau. Les zones humides ont un rôle multidimensionnel et elles contribuent au maintien et à l'amélioration de la qualité de l'eau en agissant comme un filtre épurateur, filtre physique, car elles favorisent les dépôts de

sédiments et plusieurs espèces bactériennes qui jouent un rôle essentiel dans la dégradation des éléments et des substances toxiques en milieu aquatique (**Ledant *et al.*, 1981**).

Les zones humides constituent également un lieu propice de la diversité biologique. Cette dernière est fonction de la variabilité des conditions hydriques de ces milieux. Les zones humides jouent également un rôle essentiel dans l'alimentation et la reproduction de plusieurs espèces animales (oiseaux, micro- et macro-invertébrées...etc.). Elles peuvent être considérées comme une source d'eau pour différentes utilisations (eau potable pour la consommation humaine, activités agricoles et industrielles) et, finalement, un rôle essentiel des zones humides est leur contribution dans la création et la régulation des microclimats (**Boukhssaim, 2009**).

### **1.3. Valeurs des zones humides**

Les zones humides rendent des services économiques très importants, par exemple : alimentation en eau (quantité et qualité) ; pêcheries (plus des deux tiers des poissons pêchés dans le monde dépendent du bon état des zones humides côtières et intérieures) ; agriculture, grâce au renouvellement des nappes phréatiques et la rétention des matières nutritives dans les plaines d'inondation ; production de bois d'œuvre ; ressources énergétiques telles que la tourbe et la litière ; flore et faune sauvages ; transports ; activités récréatives et tourisme (**Allali, 2004**).

## **2. Les zones humides en Algérie**

La position géographique de l'Algérie, sa configuration physique et la diversité de son climat lui confèrent une importante richesse de zones humides. Sa configuration physique s'est traduite globalement par une zonation latitudinale caractérisée par l'existence de plusieurs types de climats sur lesquels l'influence méditerranéenne s'atténue au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la mer. Cette diversité de climat a engendré une grande diversité d'écosystèmes de zones humides (**Metallaoui, 2010**).

### **2.1. Importance internationale des zones humides algérienne**

L'Autorité de la Convention de Ramsar en Algérie, la Direction Générale des Forêts, a classé 26 sites sur la Liste de la Convention de Ramsar des zones humides d'importance

internationale. Deux en 1982, dix en 2001 et 13 en 2003. Si l'on compte les seize nouveaux sites dont le classement est prévu en 2004, le nombre de zones humides internationales en Algérie atteindrait 42 avec une superficie de près de 3 millions d'hectares, soit 50% de la superficie totale estimée des zones humides en Algérie (Boumezbeur, 2004). Dix huit autres sites sont proposés pour classement et normalement l'Algérie comptera d'ici la fin 2011 une soixantaine de zones humides classées (Metallaoui, 2010) ; ce qui fait de l'Algérie le deuxième pays africain en ex-æquo avec la Tanzanie et le septième au monde selon la superficie, classé Ramsar (D.G.F, 2001).

### 3. Généralités sur le complexe des zones humides de Guerbes Sanhadja

L'éco-complexe de zones humides de Guerbes-Sanhadja ( $36^{\circ} 46'-37^{\circ} 1' N$ ,  $7^{\circ} 8'-7^{\circ}25' E$ ) est limité au nord-est par le massif de l'Edough, au nord-ouest par le massif du Filfila, au sud-ouest par le massif de Boumaïza et il s'étend au sud-est jusqu'à proximité du lac Fetzara (Fig. 1). La superficie du complexe des zones humides est de 42100 ha et la surface de la zone humide proprement dite avoisine 20000 ha (Toubal *et al.*, 2014).

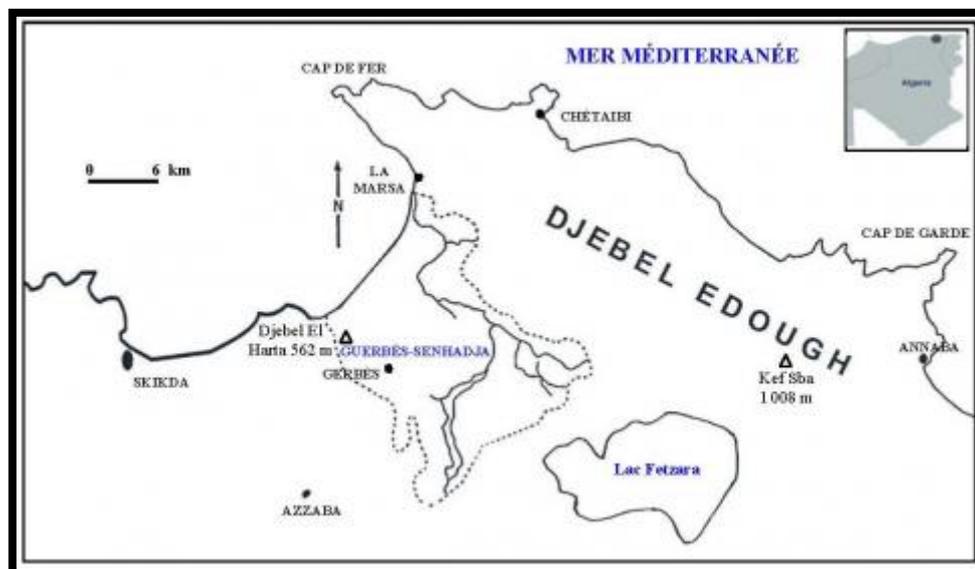


Figure 01 : Localisation de l'éco-complexe des zones humides de Guerbès-Senhadja (Toubal *et al.*, 2014).

### 3.1. Caractéristiques physiques

#### 3.1.1. Géologie et Pédologie

Les sols peu évolués sont d'apports éoliens associés à des sols peu évolués d'apports alluviaux. On trouve aussi quelques sols bruns, parfois lessivés. La majorité des sols sont situés en zone relativement plane, quoique de texture variable ils sont favorables à une mise en valeur intensive ou semi-intensive. Mais ils présentent des contraintes relatives aux dépôts éoliens généralement instables et pauvres chimiquement (**Boumezbeur, 2002**).

#### 3.1.2. Hydrologie

Le réseau hydrologique est essentiellement constitué de 2 grands oueds: l'Oued El Kebir et l'Oued Magroune. Le premier est l'un des plus importants aussi bien en longueur qu'en volume, sa largeur varie entre 20 et 50 m. Il débouche sur la plage de la Marsa en Mer Méditerranée. Huit autres oueds de moindre importance complètent le réseau hydrologique de la plaine. Trois bassins versants départagent cette zone (**Boumezbeur, 2002**).

### 3.2. Description des sites d'études

#### 3.2.1. Garaet Chichaya

Ce marais occupe une surface d'environ 50 ha. Orienté Nord-Ouest-Sud-Est. En Nord-Ouest, alimenté par les eaux dunaires souterraines et les dépressions ouvertes vers le Sud-Est, près de la plaine alluviale de Oued El-Kebir. Il y a une continuité avec Garaet Sidi Makhoulf (**Fig. 03**). Le substratum est constitué, au Nord-Ouest par le sable dunaire mélangé avec la tourbe. Ce sol est remplacé au Sud-Est par une boue argileuse de la plaine. Le Nord-Ouest est entièrement occupé par l'aulne, plus ou moins fixé en dune. Au Sud-Est, le marais suit une petite pente vers l'eau libre, temporaire ou non, selon la pluviosité annuelle et la pression du pompage de l'eau (**Metallaoui, 2010**).

#### 3.2.2. Garaet Sidi Makhoulf

Elle occupe une superficie d'environ 50 ha d'eau douce permanente menacée par l'avancement des dunes ceinturée du côté Nord d'aulne glutineux (**DES, 2013**). Le substratum

et la situation géomorphologique de la Garaet sont identiques à ceux de Garaet Chichaya. Toutes les deux constituent une unité simple, orienté du Nord-Ouest au Sud-Est vers la plaine alluviale (Fig. 05) (Samraoui et De Belair, 1997).

### 3.2.3. Garaet El Guelb

C'est une dépression de 15 hectares marécageuse dans la vallée d'Oued Essegghir. Nous notons la présence de quelques espèces végétales comme *Callitriche stagnalis*, *Alisma plantago aquatica*, et *Cyperus longus* mais dominées par le *Scirpus lacustris*. Sur le plan avifaunistique, nous notons la présence du Grèbe castagneux, du Héron cendré, du Héron garde-bœuf de la Cigogne blanche et de la Foulque macroule. Cette Garaet est un autre site de reproduction pour plusieurs espèces aviennes (Fig. 07) (Atoussi, 2014).

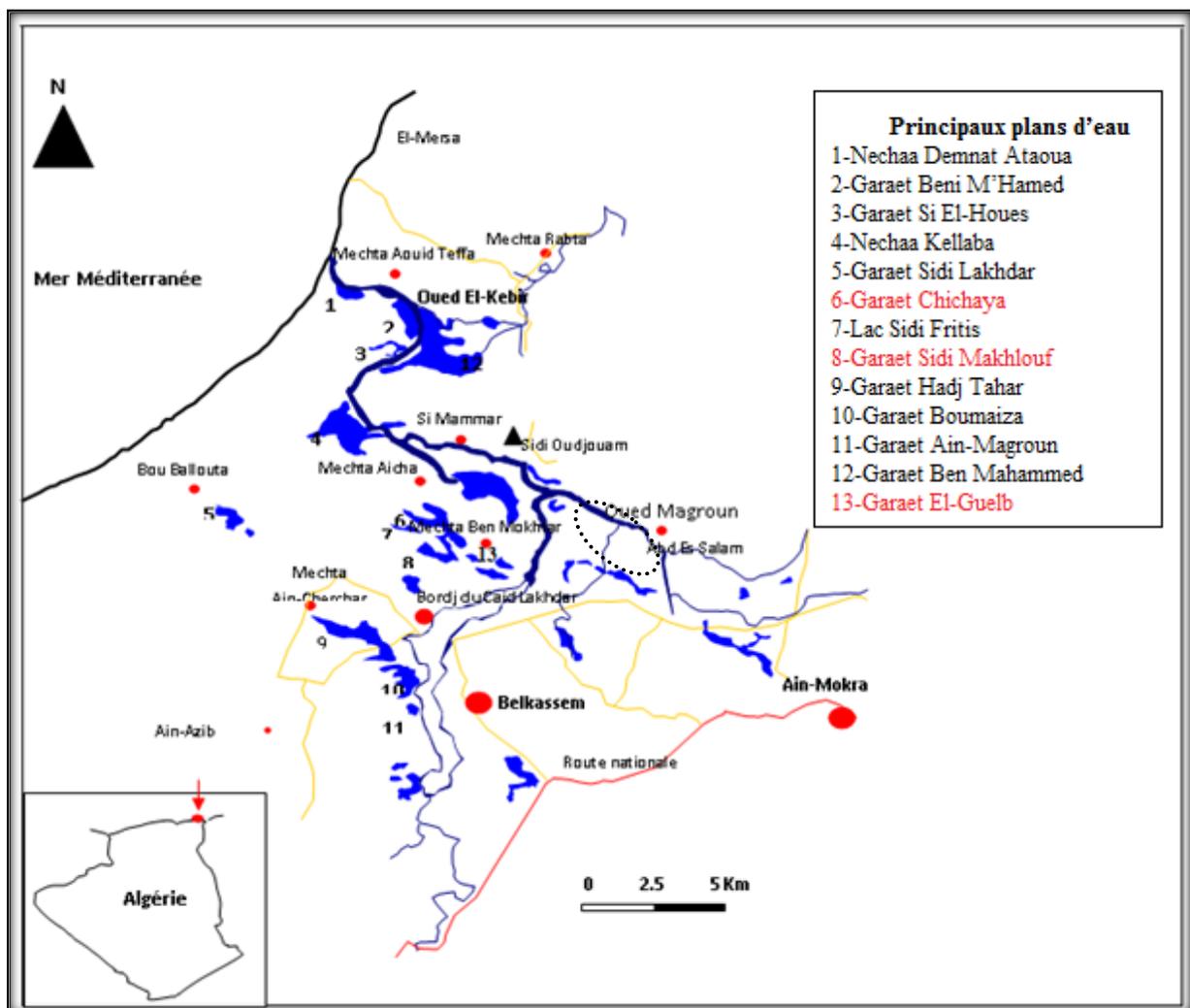


Figure 02: Complexe des zones humides de Guerbes-Sanhadja (Metallaoui, 2010).



**Figure 03: Garaet Chichaya (photo prise par Meradi safa le 15/04/2015).**



**Figure 04: Image satellitaire de Garaet Chichaya (Google Earth. 2013).**



**Figure 05: Garaet Sidi Makhlouf (photo prise par Meradi Safa le 15/04/2015).**



**Figure 06: Image satellitaire de Garaet Sidi Makhlouf (Google Earth. 2013).**



**Figure 07: Garaet El-Guelb (photo prise Meradi Safa le 15/04/2015).**



**Figure 08: Image satellitaire de Garaet El-Guelb (Google Earth. 2013).**

### 3.3. Situation administrative

Administrativement, le complexe des zones humides de la plaine de Guerbes Sanhadja est partagé par les communes de Ben Azzouz, El Marsa, et Djendel (wilaya de Skikda) jusqu'aux limites de la communes de Berrahal, dans la wilaya de Annaba (DES, 2013).

### 3.4. Climatologie

Les facteurs climatiques jouent un rôle déterminant dans le régime des cours d'eau, et dans l'alimentation éventuelle des nappes souterraines (Soltner, 1999). Il a une influence directe sur la faune et la flore (Samraoui et De Belair, 1997).

Le complexe de zones humides de Guerbes-Sanhadja est caractérisé par un climat méditerranéen (Samraoui et De Belair, 1997), caractérisé par une pluviométrie abondante pendant la saison humide et les mois froids et par une sécheresse pendant l'été (Ozenda, 1982). Nous avons récoltés les données du tableau ci-dessous auprès de la station météorologique de la wilaya de Skikda qui s'étalent sur 16 ans (1997 à 2013).

**Tableau 01 : Données climatiques de la wilaya de Skikda (1997- 2013) (in Merzoug, 2015).**

	Température			Précipitation (mm)	Humidité (%)	Vitesse du vent Moy
	T° Min	T° Max	T° Moy			
<b>Janvier</b>	8,91	16,92	12,70	119	71,8	3,4
<b>Février</b>	9,50	16,76	13,69	96,7	68,8	3,5
<b>Mars</b>	11,11	18,41	15,35	65,3	67,7	3,5
<b>Avril</b>	12	21,57	17,35	52,2	68,3	3,1
<b>Mai</b>	16,68	24,07	20,63	46,3	69,7	2,8
<b>Juin</b>	19,32	26,83	23,36	13,01	68,1	2,9
<b>Juillet</b>	21,72	27,34	24,62	1,1	68,2	3,1
<b>Août</b>	22,11	29,36	25,72	9,4	67,4	2,9
<b>Septembre</b>	20,09	26,74	23,1	52	69,3	2,9
<b>Octobre</b>	17,10	25,06	20,99	63,7	67,7	3,2
<b>Novembre</b>	12,74	20,62	16,48	103,8	69,6	3,7
<b>Décembre</b>	10,07	16,58	14,08	119,5	69,07	4,1

### 3.4.1. Température

La température est un facteur climatique très important qui réagit directement, en interaction avec les autres facteurs météorologiques (précipitation, humidité, etc.), le développement de la végétation et le phénomène de l'évapotranspiration (**Belabed, 2010**).

A partir des données présentées dans le tableau ci-dessus, nous constatons que les moyennes mensuelles les plus élevées sont observées essentiellement pendant la période estivale (juin à septembre) dont le mois le plus chaud est le mois d'août avec une température maximale de 29,36°C. Par contre, les températures les plus basses sont observées pendant la période d'hiver (décembre à mars) dont le mois de janvier est le mois le plus froid avec une température minimale de 8,91°C.

### 3.4.2. Les précipitations (Pluviométrie)

Le terme de précipitation désigne tout type d'eau qui tombe du ciel, sous forme liquide ou solide. Cela inclut la pluie, la neige, la grêle (**Dajoz, 2000**).

La région de l'extrême Nord - Est de l'Algérie compte parmi les plus abondamment arrosées (1300 mm/an) (**BNEF, 1985**). D'après les données climatiques, La précipitation annuelle dans la région de Skikda équivaut à 742 mm/an ; où décembre est le mois le plus pluvieux avec une pluviométrie moyenne de 119,5 mm, et le mois de juillet est le mois le plus sec avec une précipitation moyenne de 1.1 mm (**Tab. 01**).

### 3.4.3. L'humidité

L'hygrométrie est élevée et pratiquement constante le long de l'année. Nous notons un maximum au cours du mois de janvier avec une valeur de 71,8 % et un minimum de 67,4 % pendant le mois d'août (**Tab. 01**). Ceci est probablement dû aux formations marécageuses et lacustres de la région ; ainsi sa proximité de la mer et à sa couverture forestière importante et diversifiée (**Metallaoui, 2010**).

### 3.4.4. Les vents

Le vent est un élément important dans la détermination du régime pluvieux, de l'évaporation et par conséquent du climat (Gueroui, 2015).

La région de Skikda est très exposée aux vents. La vitesse moyenne maximale des vents qui soufflent sur cette dernière est enregistrée durant le mois de décembre avec une valeur de 4.1 m/s. La valeur moyenne minimale est enregistrée en mois de mai avec 2,8 m/s (Tab. 01).

### 3.4.5. Synthèse climatique

#### 3.4.5.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен

Le digramme pluviométrique de **Bagnouls** et **Gausсен** nous permet de mettre en évidence la période sèche de notre zone d'étude. Il est tracé avec deux axes d'ordonnées où les valeurs de la pluviométrie sont portées à une échelle double de celle des températures (Bagnouls et Gausсен, 1957).

La représentation graphique de ce diagramme (Fig. 09) ; montre deux périodes l'une humide avec une pluviosité abondante durant l'hiver s'étend du mois d'octobre jusqu'aux mois d'avril, et l'autre sèche durant l'été s'étale sur cinq mois (mai à septembre).

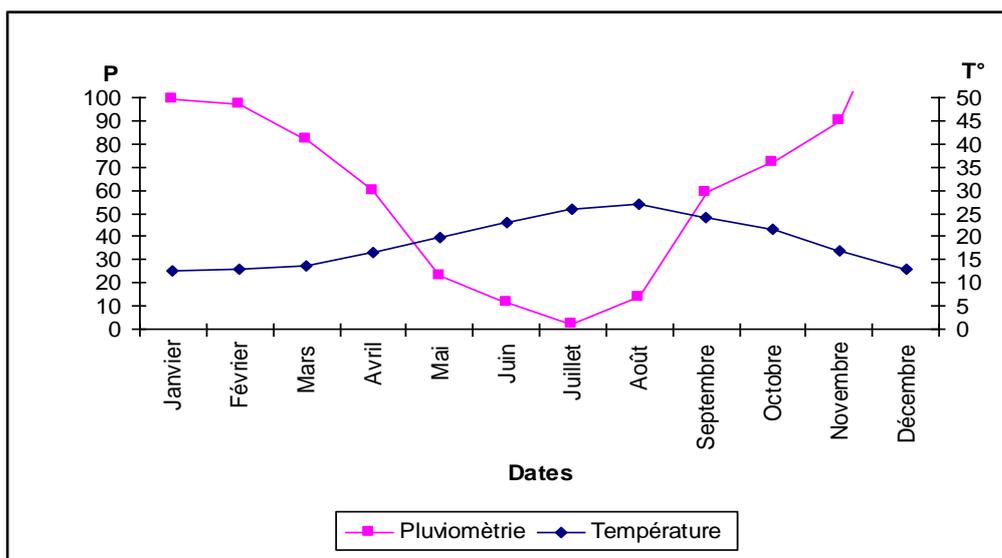


Figure 09 : Diagramme pluviométrique de Bagnouls et Gausсен.

### 3.4.5.2. Quotient pluviométrique d'Emberger

Cet indice nous aide à définir les 5 types de climat méditerranéen du plus aride jusqu'à celui de haute montagne (**Emberger, 1955**). Il se base sur le régime des précipitations et des températures et il s'exprime selon la formule suivante :

$$Q_2 = \frac{1\ 000 \cdot P}{\left[ \frac{M + m}{2} \right] (M - m)}$$

- ❖  $Q_2$ : quotient pluviométrique d'Emberger.
- ❖  $P$  = Précipitation annuelle moyenne (mm).
- ❖  $M$  = Températures des maxima du mois le plus chaud ( $^{\circ}K$ ).
- ❖  $m$  = Températures des minima du mois le plus froid ( $^{\circ}K$ ).

Les températures sont exprimées en degrés absolus [ $T(^{\circ}K) = T(^{\circ}C) + 273.2$ ]

Le calcul du  $Q_2$  quotient pluviométrique d'Emberger donne la valeur 124,17 indique que la région de Skikda appartient à l'étage bioclimatique de végétation subhumide à hiver chaud (**Fig. 10**).

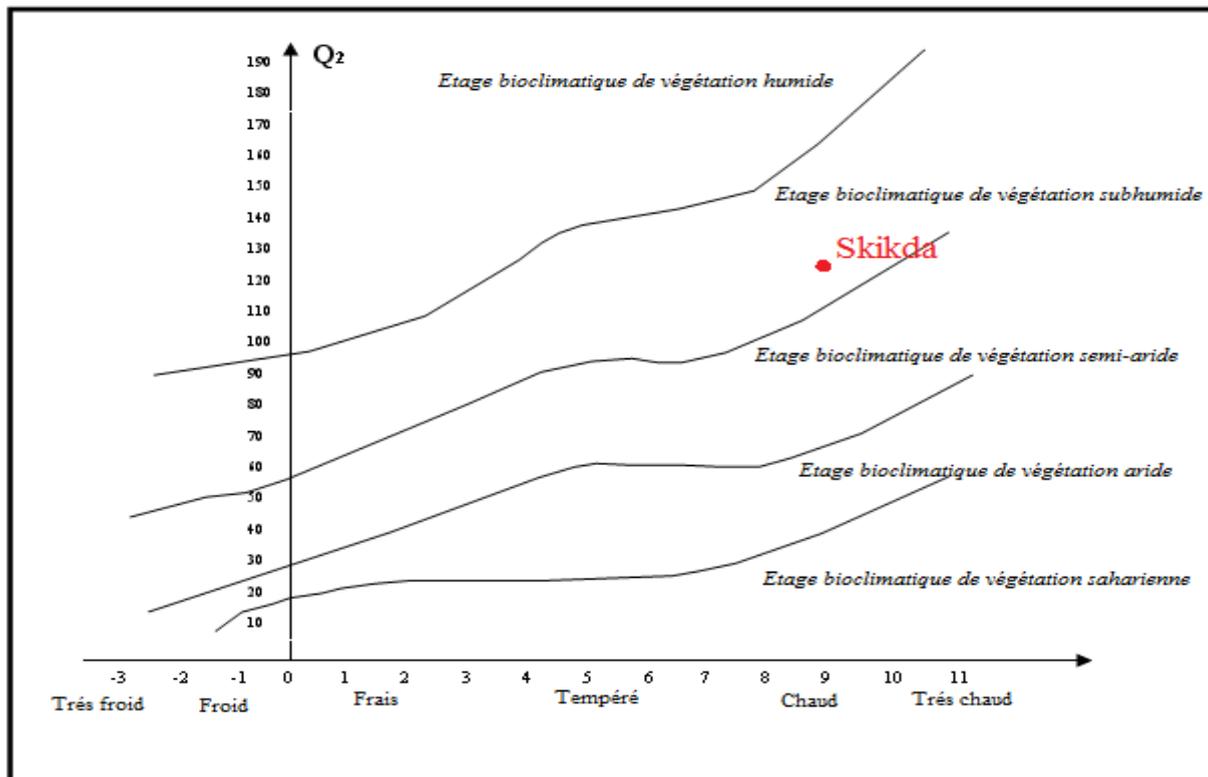


Figure 10: Climagramme d'Emberger de la wilaya de Skikda (1997-2013).

### 3.5. Cadre biotique

Le complexe de Guerbes-Sanhadja est un écosystème d'eau douce intérieure, rare dans le bassin méditerranéen, extrêmement riche en biodiversité et abrite un grand nombre de plantes, de poissons, d'oiseaux, de mammifères, de reptiles et d'insectes (DES, 2013).

Le caractère remarquable de la flore et la faune de cette région à pour origine la diversité morphologique et son emplacement dans un carrefour bioclimatique entraînant une richesse élevée de la biodiversité (Boumezbeur, 2000).

#### 3.5.1. La flore

La diversité biologique du complexe de Gerbes Sanhadja se résume à sa grande richesse floristique (Samraoui et De Belair, 1997). 234 espèces ont été recensées au niveau du lacs de complexe de Guerbes Sanhadja dont 145 taxons inféodés aux zones humides cela représente plus de 14 % de la flore du nord de l'Algérie (1800 espèces). Les espèces méditerranéennes représentent les 1/3 des plantes observées. Les espèces cosmopolites ne

représentent que 14,4 % alors que les Euro-méditerranéennes occupent 9,2 %. Parmi les 234 espèces recensées 19 sont rares et rarissime (DGF, 2001).

(Samraoui et De Belair, 1997) ont été recensées au niveau de Garaet Chichaya plus de 50 espèces végétales parmi lesquelles nous trouvons des hydrophytes comme *Ceratophyllum demersum*, *Lemna gibba*, *Myriophyllum spicatum*. La végétation de Garaet Sidi Makhlouf est dominé par *Glyceria fluitans* et *Rorripia amphibia*.

### 3.5.2. La faune

La plaine de Guerbes est le site de nidification de deux espèces très rares l'Erismure à tête blanche (*Oxyura leucocephala*) et le Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) et probablement, d'une troisième, la Sarcelle marbrée. Sans oublier la Poule sultane, la Foulque macroule, le Grèbe huppé et castagneux, la Poule d'eau et autre passereaux paludicoles (Boumezbeur, 2002).

Le complexe de zones humides de la plaine de Guerbes-Sanhadja est un lieu de migration et d'hivernage pour les oiseaux d'eau et source d'alimentation de l'anguille et d'autres espèces marines comme le mulot, le barbeau...etc. (DGF, 2001).

Garaet Chichaya est principalement fréquenté par la Cigogne blanche, la Gallinule poule d'eau, le Busard des roseaux et la Foulque macroule (Metallaoui, 2010).

L'avifaune remarquable à Garaet Sidi Makhlouf est représentée par le Fuligule nyroca (*Aythya nyroca*) qui probablement se reproduit quand le site ne s'assèche pas rapidement. La Poule sultane (*Porphyrio porphyrio*) le Fuligule milouin (*Aythya ferina*), la poule d'eau (*Gallinula chloropus*), ainsi que d'autres oiseaux aquatiques (Samraoui et De Belair, 1997).

### 3.6. Menaces agissent sur le site

L'extension anarchique de l'agriculture et l'utilisation excessive de produits phytosanitaires, ajoutés aux rejets d'eau usées de la Daïra de Ben Azzouz et des villages situés en amont sont des menaces connues à l'heure actuelle que ce soit pour le site lui même ou à sa proximité (Fig. 11). L'eau des Garaets est souvent utilisée pour irriguer des cultures dès le mois d'avril. Ce qui influe considérablement le niveau d'eau des Garaets à cause du croisement de la période d'irrigation et la saison sèche de ces sites (Atoussi, 2008). Le

défrichement des terres forestières se pratique à grande échelle pour laisser place à des cultures saisonnières très prisées dans la région (pastèque, melon, tomate et poivron). Ceci provoque inexorablement l'érosion éolienne qui, compte tenu de la texture sableuse des sols, peut entraîner l'ensablement de toute la zone, y compris lacs et dépressions. Par ailleurs, compte tenu de l'existence de sables (de dunes continentales), des extractions anarchiques et parfois illicites sont opérées. Ceci risque, à long terme, de provoquer la déstabilisation d'une partie de la zone et provoquer des modifications du site (Boumezbeur, 2002).

La région d'étude est très connue aussi comme une zone d'élevage particulièrement pour les ovins et bovins qui pâturent la végétation autour des berges des lacs. Les troupeaux pénètrent aussi à l'intérieur des plans d'eau ayant pour effet un grand dérangement des populations d'oiseaux d'eau et causent surtout la destruction des nids (Merzoug, 2015).

La diversité avifaunistique de nos sites d'étude attire de nombreux chasseurs et braconniers pendant et hors saison de chasse.



**Figure 11: Pâturage à gauche à Garaet chichaya et à droite L'agriculture à Garaet El-Guelb (Photo prise par Meradi Safa le 15/04/2015).**

L'appréciation de la qualité des eaux de surface se base sur la mesure des paramètres physico-chimiques ainsi que sur des analyses microbiologiques : population bactérienne totale, le dénombrement et la recherche des germes tests de contamination fécale, la présence ou l'absence de microorganismes pathogènes (**Rejsek, 2002**).

Cependant, la chaîne prélèvement – échantillonnage – conservation – analyse doit être cohérente afin de maintenir l'intégrité de l'eau à étudier (**Alain et Roger, 2004**).

## 1. Stratégie d'échantillonnage

Le prélèvement consiste en la ponction d'une certaine quantité d'eau en un point et un temps précis ; tandis que l'échantillonnage réfère au fractionnement du prélèvement en plusieurs échantillons distincts (**Normand, 2007**) ; cet étape est très importante, car la qualité du rapport final rédigé par un laboratoire et l'interprétation sera influencée par la qualité de l'échantillon prélevé (**Lightfoot, 2002**).

L'objectif est d'obtenir un échantillon aussi représentatif que possible de l'eau à examiner, sans contaminer ni modifier l'échantillon (**Rodier et al., 2009**).

### 1.1. Matériel de prélèvement

Le prélèvement destiné à l'analyse microbiologique de l'eau doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse (**Guiraud, 1998**). Il faut utiliser de préférence des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon à vis métallique d'une contenance de 250ml, stérile pour faciliter le prélèvement et éviter tout type de contamination (**Derwich et al., 2008**).

Les flacons en verre sont lavés et rincés avec de l'eau distillé. Après séchage. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 5 minutes). Les bouchons sont aussi lavés, rincés de même manière, séchés, et stérilisés dans les mêmes conditions que les flacons (**Rodier et al., 2005**).

Pour éviter les risques de contamination, les flacons d'échantillonnage ne doivent être ouverts qu'au moment du prélèvement. Une fois l'échantillon est prélevé, les flacons doivent être fermés hermétiquement jusqu'au moment de l'analyse (**Rodier et al., 2009**).

## 1.2. Méthode de prélèvement

Les flacons stériles sont prolongés à une distance qui varie de 25 à 30 cm de la surface assez loin des bords, ainsi que des obstacles naturels. Les flacons sont ouverts sous l'eau et sont remplis, ensuite le bouchon est également placé sous l'eau de telle façon qu'il n'y est bulle d'air et qu'il ne soit pas éjecté au cours du transport (**Rodier et al., 1996**).

Le flacon ne doit pas être rempli entièrement. En effet, laisser un petit volume d'air à la surface pour faciliter l'agitation de l'eau avant son analyse (**Merzoug, 2009**).

## 1.3. Etiquetage des échantillons

Pour faciliter le travail et l'exploitation des résultats tout en évitant les erreurs, et pour éviter toute confusion il est essentiel que les échantillons soient clairement étiquetés immédiatement avant les prélèvements et que les étiquettes soient lisibles et non détachables. Dans ces derniers on doit noter avec précision :

- Référence d'échantillon (l'origine de prélèvement).
- Date et heure de prélèvement.
- L'ordre de prélèvement.
- Conditions météorologiques.
- Un numéro et toutes circonstances anormales (**Rodier et al., 1996**).

## 1.4. Transport et conservation des échantillons

La teneur initial des germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon après le prélèvement, c'est pour cela que toutes analyse doit être effectuée le plus rapidement possible (**Rodier et al., 2009**).

Si la durée du transport dépasse 1 heure, et si la température extérieure est supérieure à 10 °C, les prélèvements seront transportés dans des glacières dont la température doit être comprise entre 4 et 6 °C (**Abdi et al., 2013**). Il est donc admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas excéder 24 heures (**Rodier et al., 2009**).

Après la prise d'essai, il est recommandé de placer le reste du prélèvement non utilisé au réfrigérateur (**Rodier et al., 2009**).

## 2. Choix des stations de prélèvement

Pour mieux évaluer la qualité bactériologique des eaux de quelques zones humides du complexe de Guerbes-Sanhadja ; l'un des principaux réservoirs de la biodiversité du bassin méditerranéen, nous avons choisis trois sites ; deux stations de prélèvements dans chaque site qui sont localisés dans Garaet Chichaya ; Garaet Sidi Makhoulf et Garaet Guelb. Ces points de prélèvements sont détaillés dans le tableau 02 (**Annexe 01**).

## 3. Période de prélèvement

Pour aboutir au travail présenté, des sorties mensuelles ont été organisées durant la période d'étude (Mars 2015 - Avril 2015) (**Tab.03**) (**Annexe 01**).

La totalité de nos analyses bactériologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'université 08 Mai 1945 de Guelma.

## 4. Analyses effectuées

### 4.1. Les analyses physico-chimiques mesurées *in situ*

Les paramètres étudiés sont le pH (potentiel d'Hydrogène), la conductivité, la température, l'oxygène dissous (**Normand, 2007**). Ils permettent une première estimation de la qualité du plan d'eau.

#### 4.1.1. La température

La température est un facteur écologique important du milieu. Il est important de connaître la température de l'eau avec précision. En effet, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz (**Normand, 2007**); et dans l'activité métabolique des organismes aquatiques est donc également accélérée lorsque la température de l'eau s'accroît (**IBGE, 2005**).

#### 4.1.2. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est une mesure de l'acidité de l'eau c'est-à-dire de la concentration en ions d'hydrogène (H<sup>+</sup>). L'échelle des pH s'étend en pratique de 0 (très acide) à 14 (très alcalin) ; la valeur médiane 7 correspond à une solution neutre (**IBGE, 2005**).

### 4.1.3. L'oxygène dissous

Parmi les gaz dissous, l'oxygène est celui qui joue le rôle le plus important pour la qualité biotique des eaux, indispensable à la respiration des organismes, il facilite la dégradation des matières organiques détritiques et l'accomplissement des cycles biochimiques. L'oxygène présent dans l'eau est le résultat des échanges entre l'atmosphère et la surface de l'eau ainsi que l'activité photosynthétique des phytoplanctons (**Ait Kaci et Hamdi, 2008**). Sa solubilité en fonction de la température (**Rodier et al., 1996**).

### 4.1.4. La conductivité

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant électrique entre deux électrodes. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau ; elle est plus importante lorsque la température est élevée (**Normand, 2007**).

### 4.1.5. Mode opératoire des mesures *in situ*

Le pH, la température, la conductivité électrique, l'oxygène dissous sont mesurés sur site à l'aide d'un multi-paramètre de terrain de type WTW 1970 i comme suit :

- Vérifier l'étalonnage de l'appareil suivant la procédure ci jointe.
- Plonger l'électrode dans l'eau et attendre 10 à 15 secondes.
- Enregistrer la valeur du CE, pH, l'oxygène dissous et la température jusqu'au la stabilisation de celle-ci.
- Bien rincer l'électrode après chaque usage et le conserve toujours dans l'eau déminéralisée (**Allalqua et Boutmedjet, 2013**).

## 4.2. Les analyses bactériologiques

L'objectif de l'analyse bactériologique d'une eau n'est pas d'effectuer un inventaire de toutes les espèces présentes, mais de rechercher soit celles qui sont susceptibles d'être pathogène, soit celles qui sont indicatrice d'une contamination fécale (**Rodier et al., 2009**).

Le choix des méthodes d'examen microbiologique des eaux dépendra de la nature de l'échantillon mais aussi de la sensibilité et de la précision souhaitées (**Rodier et al., 1984**).

#### 4.2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux à 22°C et à 37°C

Cet examen vise à dénombrer non spécifiquement le plus grand nombre de micro-organismes, en particulier de bactéries se développant dans les conditions aérobies habituelles de culture (**Rodier *et al.*, 2009**). La culture se réalise à deux températures différentes afin de cibler à la fois les microorganismes à tendance psychrophiles soit à 22°C et ceux mésophiles soit 37°C (**Rejsek, 2002**).

##### ❖ Principe

Il s'agit d'une technique de comptage des micro-organismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillon ou de ces dilution dans un milieu gélosé (**Rodier *et al.*, 2009**).

##### ❖ Mode opératoire

- Prélever stérilement, 1ml de l'échantillon d'eau à analyser, et des dilutions décimales  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ , et le déposer dans le fond de trois boites de pétries vides, numérotées et préparées à cet usage (**Merzoug, 2009**).

- Couler dans chaque boite, 19 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à  $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Agiter doucement par un mouvement circulaire pour assurer un mélange homogène de l'eau et de la gélose, sans faire des bulles et sans mouiller les bords de la boite. Le milieu doit être coulé 10 minutes au plus tard après répartition de l'eau à analyser (**Rodier *et al.*, 2009**).

##### ❖ Incubation

La moitié des boites est incubé, aussitôt après solidification, dans une étuve à  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durant 44 ( $\pm 4$ ) heures. L'autre est placé dans une enceinte maintenue à une température de  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  durant 68 ( $\pm 4$ ) heures, conserver les boites à l'obscurité, couvercle en bas (**Fig.12**) (**Rodier *et al.*, 2009**).

##### ❖ Lecture

Examiner les boites dès que possible après la période d'incubation, sinon les conserver à  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  pendant 48 heures au maximum (**Rodier *et al.*, 2009**). Rejeter les boites présentant une croissance confluyente (**Rejsek, 2002**).

Les colonies de micro-organismes revivifiables apparaissent en masse sous forme lenticulaires et bien distinctes. Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies (Lebres, 2002).

Calculer ensuite la valeur du nombre  $\underline{N}$ , de microorganismes revivifiables à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  à part et celle du nombre  $\underline{N}$  de microorganismes revivifiables à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  à part, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d}$$

Où :

$\Sigma c$  : est la somme des colonies dénombrées sur deux boîtes de dilutions successives retenues.

$d$  : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs après la virgule. Le résultat final de microorganismes revivifiables dénombrés à  $22^\circ\text{C}$  et à  $37^\circ\text{C}$  par ml d'eau est noté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$  où  $x$  est la puissance appropriée de 10 (Labres et Mouffok, 2008).

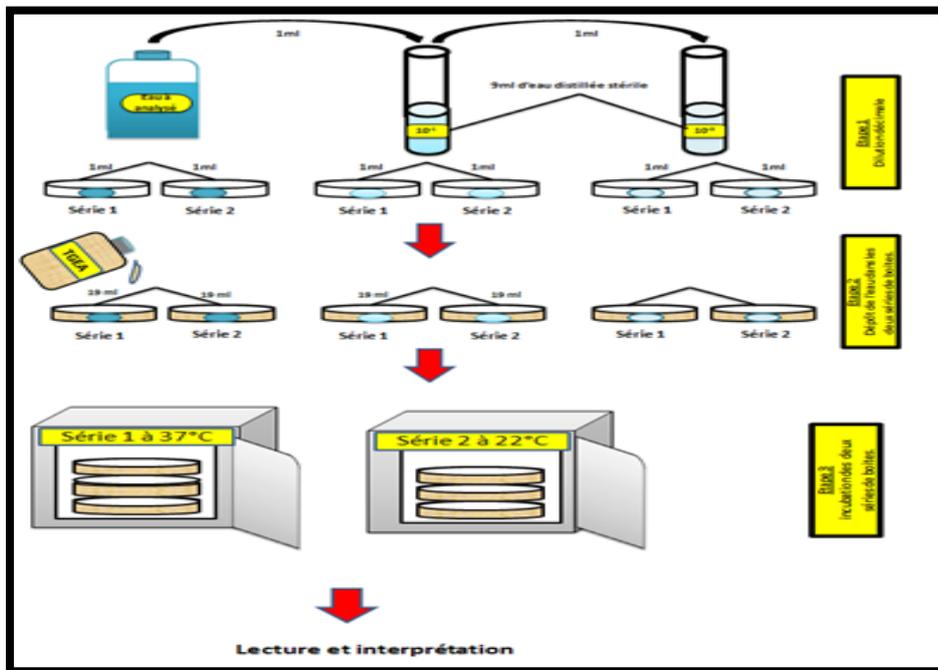


Figure 12 : Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à  $37^\circ\text{C}$  et  $22^\circ\text{C}$  dans les eaux.

## 4.2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination fécale

### 4.2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes thermo-tolérants, avec identification d'*Escherichia coli* en milieu liquide

Le terme « coliforme » correspond à des organismes en bâtonnets, non sporulés, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capable de croître en présence de sels biliaires (Rodier *et al.*, 2009), capable de fermenter le lactose avec production d'acide et gaz en 24 à 48 heures à une température comprise entre 36 et 37 °C (Carbonnelle *et al.*, 1998).

Les coliformes fécaux ou coliformes thermo-tolérants, sous groupe des coliformes totaux, présentent les mêmes propriétés (caractéristique des coliformes). Capable de fermenter le lactose à une température de 44.5 °C (Gueddah, 2003 ; Rodier *et al.*, 2009), et qui donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyle (Roux, 2003). L'indicateur le plus utile pour estimer la pollution fécale est la bactérie *Escherichia coli* (Bazine et Bourenane, 2011).

#### Principe

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification d'*E. coli* ont été effectués par la méthode de nombre le plus probable (NPP). Elle se fait en deux étapes consécutives : le test de présomption réservé à la recherche des coliformes, et le test de confirmations : réservé à la recherche des coliformes fécaux et thermo-tolérants et d'*E. coli* à partir des tubes positifs du test de présomption (Rouaiguia et Cheriet, 2010).

#### Test de présomption

#### Mode opératoire

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes nous avons réalisés cinq dilutions décimales successives ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques (Fig.13) (Rejsek, 2002).

- Nous prenons les tubes de BCPL (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol simple concentration) muni d'une cloche de Durham.

- Prélever 1ml d'eau à analyser à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et la porter dans le premier tube de la série contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ .

- Nous prélevons 1ml de la dilution 1/10 précédente et l'ajouter à un tube contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ .
- Transférer 1ml de la dilution  $10^{-2}$  dans un tube contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution  $10^{-3}$ .
- Refaire la technique pour 2 autres tubes de BCPL afin d'obtenir 5 tubes de BCPL. Et refaire pour 2 autres séries (**Delarras, 2008**).
- L'incubation se fait à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

### Lecture

Procéder à une première lecture après cette incubation. Seront considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10<sup>ème</sup> de la hauteur de la cloche).
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (la fermentation du lactose se manifeste par la production d'acide entraînant le virage du bromocrésol pourpre au jaune).

On retient le nombre caractéristique constitué par les trois chiffres écrit dans l'ordre des dilutions croissantes en commençant par le nombre correspondant à la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

Ce nombre caractéristique obtenu correspond d'après la table de Mac Grady (**Tab.04**) (**Annexe 02**) ; au nombre de bactéries présentes (NPP) dans le prélèvement correspondant à la plus faible dilution prise en compte. Le calcul de concentration cellulaire dans la suspension initiale se fait en tenant compte des dilutions effectuées (**Leclerc *et al.*, 1983**).

### Test de confirmation

Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie est basé sur la recherche de coliformes thermo-tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli* (**Degremont, 2005**).

- Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée ou une pipette pasteur dans le (ou les) milieu (x) de confirmation (**Degremont, 2005 ; Rodier *et al.*, 2009**). Comme milieu de

confirmation, on à utilisé dans le premier prélèvement : le milieu eau peptonée exempte d'indole et pour le deuxième prélèvement : le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham (Labres et Mouffok, 2008). Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum (Degremont, 2005).

### ✚ Incubation

L'incubation se fait cette fois-ci à 44°C pendant 24 à 48 heures (Labres et Mouffok, 2008).

### ✚ Lecture

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant :

- Un dégagement gazeux et un trouble dans le tube du milieu Schubert.
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs dans le tube de l'eau peptonée exempte d'indole (Degremont, 2005).

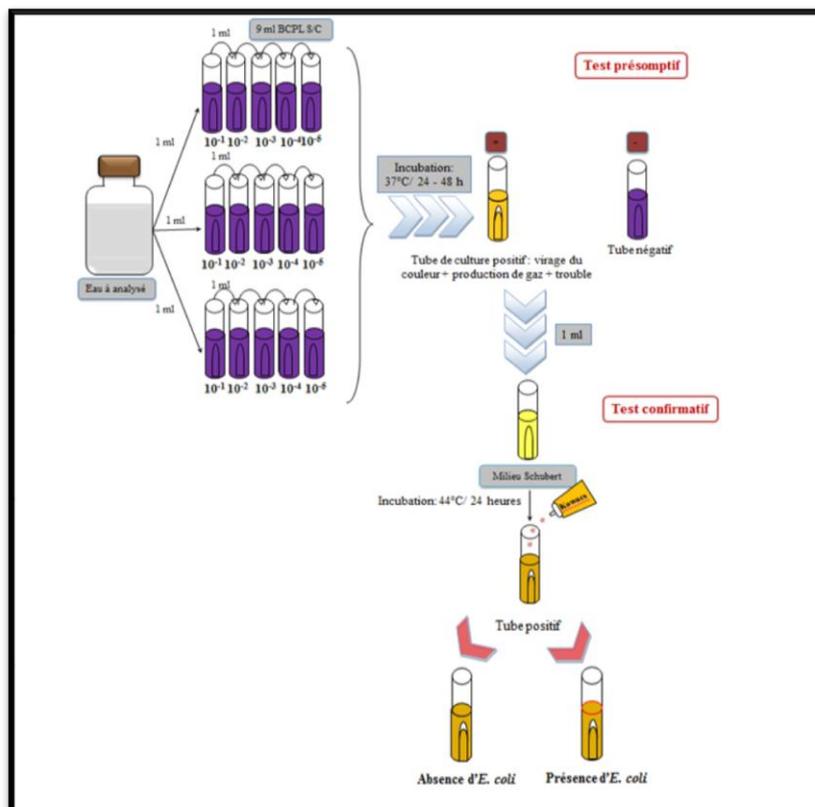


Figure 13: Protocole de recherche et dénombrement des coliformes totaux, fécaux et *E. coli* dans les eaux.

#### 4.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Les streptocoques du groupe D ne possèdent pas de catalase mais possèdent l'antigène du groupe D, sont des coques à Gram (+), formant quand ils sont cultivés en milieu liquide des diplocoques et/ou des chainettes, immobile, anaérobie facultatif, et non sporulant. Ces streptocoques du groupe D sont généralement pris globalement en compte comme des témoins de pollution fécale, car tous ont un habitat fécal (**Gillespie et Hawkey, 2006**).

Les milieux utilisés sont :

- Le milieu de Rothe qui contient comme agent sélectif l'azide de sodium (inhibiteur de la flore secondaire Gram négatif).
- Le milieu de Litsky-Eva qui renferme en plus de l'azide de sodium une faible concentration de cristal violet qui freine le développement des bactéries Gram positif (**Degremont, 2005**).

##### ▣ L'étape présomptive

##### + Mode opératoire

- A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement 1 ml dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ .
- Prélèvement 1ml de tube précédent  $10^{-1}$  et mettre dans le seconde tube Rothe pour avoir la dilution  $10^{-2}$ .
- Transférer 1ml de la dilution  $10^{-2}$  dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C, pour obtenir la dilution  $10^{-3}$ .
- Refaire la technique 5 fois pour avoir 5 tubes de Rothe, et refaire 2 autres séries.
- L'incubation se fait à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48 heures (**Fig.14**).

##### + Lecture

Seront considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien (**Rejsek, 2002; Délarras, 2008**).

##### ▣ L'étape confirmative

##### + Mode opératoire

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des streptocoques du groupe (D) éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclé dans un tube contenant le milieu Eva-Litsky, bien mélangé le milieu et l'inoculum (Rejsek, 2002).

#### ✚ Incubation

L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures (Delarras, 2008).

#### ✚ Lecture

Seront considérés comme positifs les tubes présentant à la fois:

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond de tube.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (Tab.04) (Annexe 02) (Lebres, 2006).

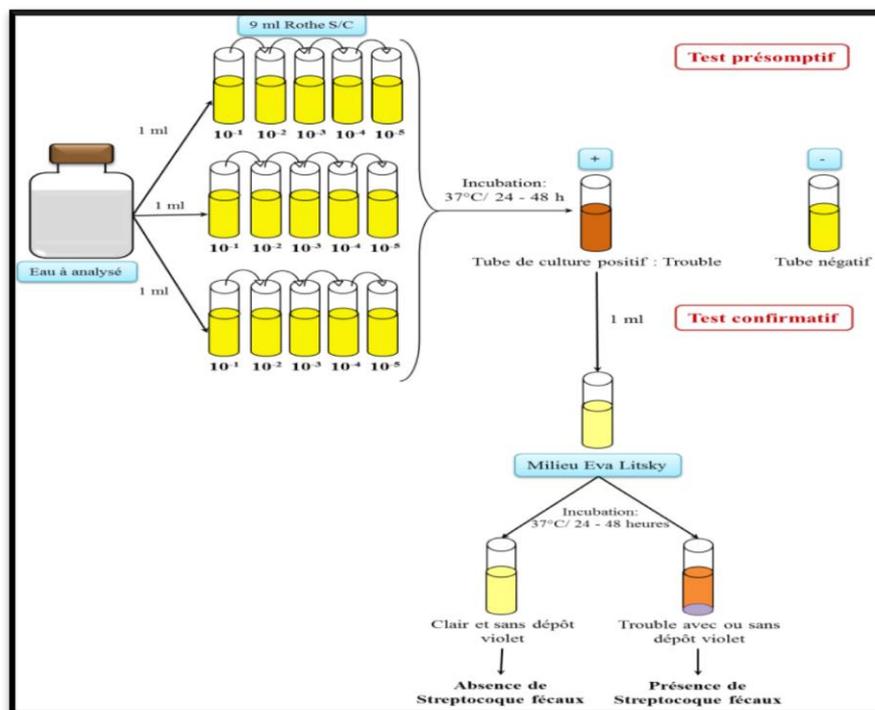


Figure 14 : Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux.

#### 4.2.2.3. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfite-réducteurs (ASR)

Cette recherche concerne les bactéries anaérobies strictes, parmi ces bactéries figure le genre *Clostridium* (Rejsek, 2002), il s'agit de bacille Gram (+) presque toujours mobile ; acquièrent une structure spéciale appelée endospore ou spore ; très résistante dans l'environnement (Pilet *et al.*, 1987 ; Rejsek, 2002) ; se développant en 24 à 48 heures à une température de  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (Lebres et Mouffok, 2008).

Les ASR sont ainsi dénommé car ils sont capable de réduire les sulfites de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) présents dans le milieu de culture en sulfures : ceux-ci se combine avec un sel de fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pour donner du sulfure de fer noir ( $\text{FeS}$ ) (**Dellarras et Trébaol, 2003**). Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne (**Rejsek, 2002**).

#### ❖ Principe

En basant sur le fait que ce groupe de bactéries est caractérisé par la résistance de leur spores et par équipement enzymatique réduisant plus ou moins activement les sulfites en sulfures, la recherche de ces bactéries est réalisée après destruction des formes végétatives par chauffage à  $80^\circ\text{C}$  pendant 5 à 10 mn. Ensuite l'échantillon est incorporé à un milieu de base fondu additionné de sulfite de sodium et d'alun de fer permettent la mise en évidence l'action sulfito-réductrices (**Halassi, 2009**). L'incorporation se fait dans un tube et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air (**Rodier et al., 1984**).

#### ❖ Mode opératoire

- ✓ A partir de l'eau à analyser, prendre environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de  $80^\circ\text{C}$  pendant 8 à 10 minutes, a fin de tuer toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes (**Fig.15**) (**Halassi, 2009**).
- ✓ Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.
- ✓ Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.
- ✓ Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à  $47\pm 1^\circ\text{C}$ , Additionnée au contenu, 1ml de la solution du sulfite de sodium et 04 gouttes d'une solution d'alun de fer par tube (**Halassi, 2009 ; Rodier et al., 2009**).
- ✓ Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène (**Lebres et Mouffok, 2008**).
- ✓ Refroidir les tubes de l'eau de robinet (**Halassi, 2009**).
- ✓ Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ (**Lebres et Mouffok, 2008**).

#### ❖ Incubation

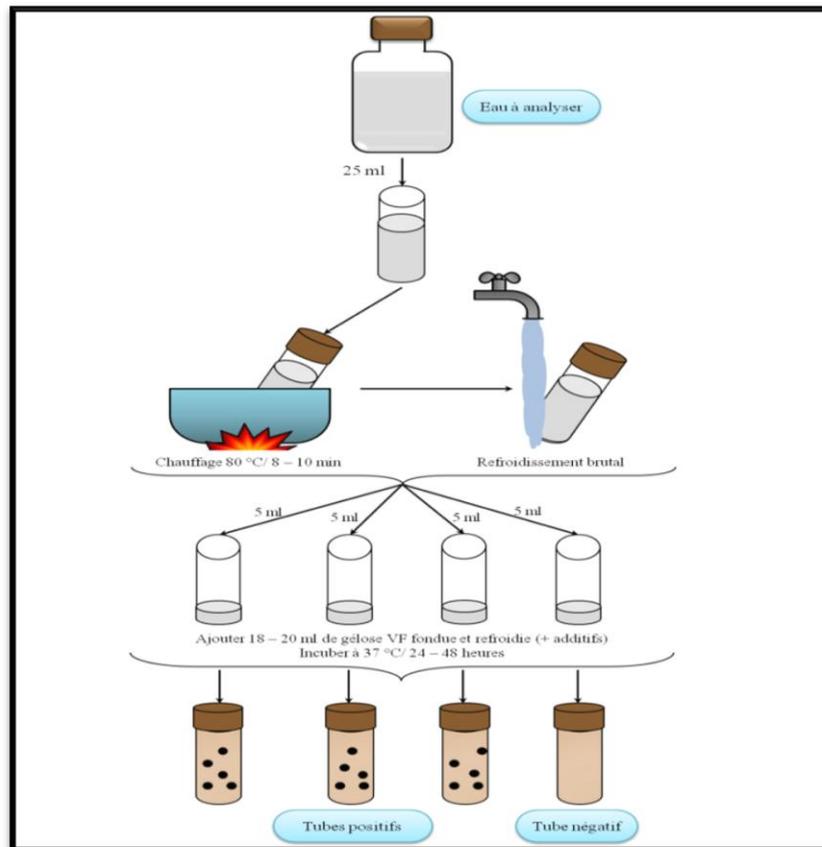
L'incubation à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 heures (**Lebres et Mouffok, 2008**).

#### ❖ Lecture

Considérer comme résultant d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir (**Abdi et al., 2013**).

La première lecture doit absolument être faite à 16 heures car très souvent les colonies des ASR sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant ainsi l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse sera à refaire en utilisant des dilutions décimales de  $10^{-1}$  voire  $10^{-2}$ , la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière à 48 heures (**Bazine et Bourenane, 2011**).

Dénombrer toutes colonies noires de 0,5 mm de diamètre, poussant en masse et rapporter le nombre total des colonies dans les quatre tubes à 20 ml d'eau à analyser (**Labres et Mouffok, 2008**).



**Figure 15 : Protocole de recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans les eaux.**

### 4.2.3. Recherche des germes pathogènes

#### 4.2.3.1. Recherche des staphylocoques

On entend par staphylocoques à coagulase positive, les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  sur un milieu sélectif Chapman au mannitol qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75g.l) (**Pechère *et al.*, 1982 ; Carbonnelle *et al.*, 1988 ; Labres et Mouffok, 2008**).

➤ **Principe**

Le milieu de Chapman est caractérisé par sa forte concentration en chlorure de sodium (NaCl) ce qui permet un isolement sélectif des staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, « le rouge de phénol », autour des colonies (**Rodier *et al.*, 2009**).

➤ **Mode opératoire**

On prépare les boîtes pétrie avec le milieu Chapman (**Rodier *et al.*, 1996**). A partir de la solution mère, on porte aseptiquement 0.1ml (2 gouttes) dans les boîtes de Pétri qu'on étale à l'aide d'une anse de platine stérile (**Fig.16**).

➤ **Incubation**

L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures (**Ait Kaci et Hamdi, 2008**).

➤ **Lecture et interprétation**

Après la période d'incubation spécifiée, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *S. aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc (**Ait Kaci et Hamdi, 2008 ; Rodier *et al.*, 2009**).

➤ **Identification**

A fin de mieux caractériser le profil biochimique et morphologique des staphylocoques des réactions spéciales au genre sont mis en œuvre :

- Coloration de Gram.
- Test de catalase.
- Oxydase.
- Mannitol.
- Recherche de coagulase libre (**Ait Kaci et Hamdi, 2008**).

#### 4.2.3.2. Recherche de *Shigella*

Les *Shigella* sont des bactéries strictement humaines. Ce sont des bacilles Gram (-), aéro-anaérobies facultatifs, fermentent le glucose sans gaz, possédant une nitrate réductase et sont oxydase (-) (**Berche et al., 1988**). Elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif ; éliminées par les selles et dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps (**Carbonnelle et al., 1988 ; Pechère et al., 1982**).

- **Mode opératoire**

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 0.1 ml et l'on étale à la surface de Gélose Mac Conkey, Gélose *Salmonella Shigella* (Gélose SS), et Gélose Hectoën, par la méthode des quatre quadrants, puis les incubent à  $36 \pm 2$  °C pendant 18 à 24 h (**Fig.16**).

- **Identification**

Après un examen macroscopique et microscopique des colonies suspectés ; ils se déterminent par l'identification sur une galerie classique ou miniaturisée pour *Enterobacteriaceae* avec laquelle elles se différencient par un ensemble de caractères négatifs (**Abdi et al., 2013**), qui sont résumés dans le tableau ci-après (**Tab. 05**) (**Annexe 03**).

#### 4.2.3.3. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

On entend par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie qui se présente sous forme de bacille à Gram négatif (BGN) possédant l'enzyme oxydase et capable de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide. *Pseudomonas aeruginosa*, est également une bactérie hautement pathogène et résistante à plusieurs antibiotiques. C'est une bactérie lactose négative, autrement dit dépourvue d'enzymes dégradant le lactose (**Labres et Mouffok, 2008; Pechère et al., 1982 ; Pilet, 1987**).

- **Principe**

Un milieu sélectif, spécifique de la culture de *Pseudomonas aeruginosa*, est ensemencé en surface. Les colonies sont dénombrées directement et éventuellement confirmées par subcultures sur milieux d'identification (**Rodier et al., 2009**).

### § Mode opératoire

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 0.1 ml et l'on étale à la surface de gélose Cétrimide, par la méthode des quatre quadrants, puis les incubent à  $36 \pm 2$  °C pendant 18 à 24 h (Fig.16).

### § Identification

Considérer comme colonie caractéristique toute colonie présentant une fluorescence. Du fait de la sélectivité du milieu cétrimide, on peut suspecter les colonies présentes d'être *Pseudomonas*. Dans tous les cas, il faudra réaliser une identification de l'espèce (Rejsek, 2002). Il est possible de procéder aux recherches suivantes :

- Un examen microscopique après coloration de Gram. Il permet de s'assurer que les colonies ne contiennent que des bacilles à Gram négatif, non sporulés.
- Un examen direct entre lame et lamelle. Il permet de constater la mobilité des germes de type polaire (Rodier *et al.*, 2009).
- Recherche de la pyocyanine : pigment bleu caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue intense des milieux de culture, sa production est favorisée sur milieu de King A.
- Recherche de la pyoverdine : présente une teinte vert fluorescent est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de King B (Lebres et Mouffok, 2008).

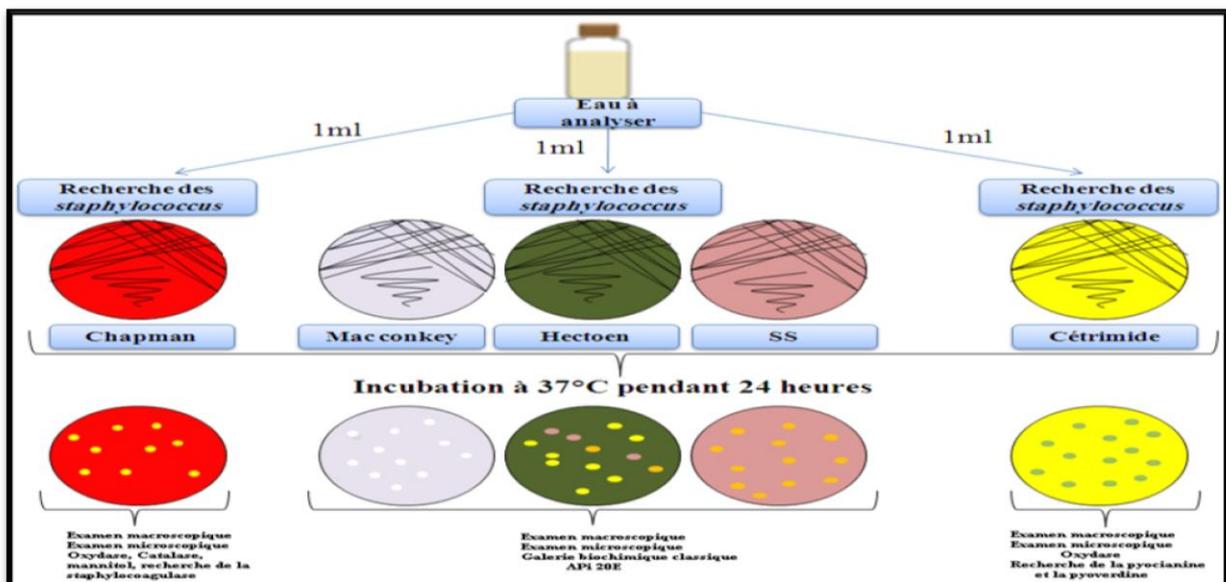


Figure 16: Protocole de recherche des *Staphylococcus*, *Shigella* et *Pseudomonas* dans les eaux.

#### 4.2.3.4. Recherche de *Salmonella*

Les *Salmonella* sont des bacilles Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, mobiles, asporulées, catalase (+), oxydase (-), réduisant les nitrates en nitrites, fermentant le glucose avec production de gaz mais ne fermentent pas le lactose. Elles ne produisent pas d'uréases, de désaminases, de gélatinases ni d'indole. En revanche la plupart des souches produisent de l'hydrogène sulfuré et une lysine décarboxylase (**Buchanan *et al.*, 1974 ; Leminor et Veron, 1989**).

##### ▪ Principe

La recherche dans l'eau doit habituellement inclure une phase de pré-enrichissement, de sélection puis de confirmation.

La méthode de recherche de ces micro-organismes découle de deux données: d'une part leur présence en nombre relativement faible dans les eaux ainsi que leur difficulté d'y survivre ; d'autre part l'existence habituelle d'un nombre important de germes d'accompagnement, d'origine fécale (coliformes, streptocoques) ou non (*Pseudomonas*, *Achromobacter*...etc.). Ces germes, plus nombreux, entrent en compétition avec les salmonelles éventuellement présentes qui sont alors inhibées. Ces constatations entraînent l'obligation d'utiliser des milieux d'enrichissements sélectifs, dans le but d'inhiber le développement des autres bactéries (**Rodier *et al.*, 2009**).

##### ▪ Mode opératoire

###### *Jour 1 : Premier enrichissement*

Introduire 1 ml de l'échantillon d'eau dans 10 ml de Sélénite Cystéine (SFB) (**Ait Hamlet, 1998**), puis incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**Lebres, 2002**).

###### *Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement*

Ce tube fera l'objet :

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu SFB en tubes à raison de 1 ml.
- D'autre part, d'un isolement sur les géloses Hectoën, SS et Mac Conkey (**Lebres, 2002**).

**Jour 3 : Lecture des boîtes et identification**

- D'une part, le tube de Sélénite fera l'objet d'un deuxième isolement ;
- D'autre part, les boîtes des géloses Hektoen SS et Mac Conkey subira une lecture (**Lebres, 2002**).

- **Identification morphologique et biochimique**

- Etat frais et coloration de Gram (bacilles Gram négatifs) ;
- Ensemencement d'un tube de TSI qui sera incubé à 37°C, 24 h ;
- Ensemencement : \* Soit d'une galerie biochimique classique (ONPG, Oxydase, LDC, ODC, ADH, Urée, TDA, VP, RM ...),  
\* Ou d'une galerie biochimique API 20 E (**Fig. 17**) (**Lebres, 2002**).

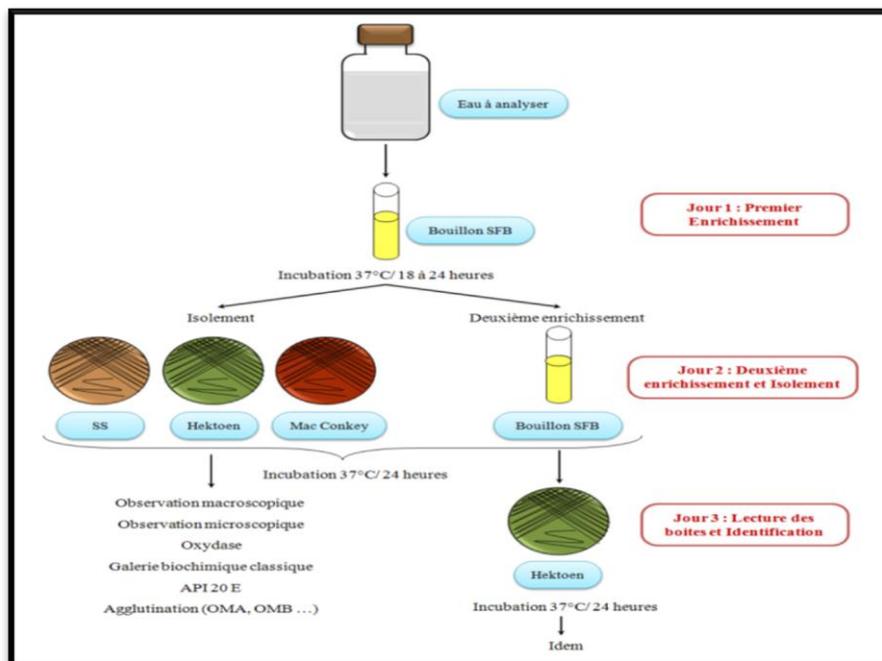


Figure 17: Protocole opératoire de la recherche de *Salmonella* dans l'eau.

#### 4.2.3.5. Recherche de *Vibrio cholérique*

Le vibron cholérique est un germe aéro-anaérobie facultatif, oxydase (+), sa croissance est favorisée par un pH neutre ou alcalin (pH 9-10), une température comprise entre 20 et 40°C avec un optimum entre 30 et 37°C et par une concentration d'NaCl comprise entre 1-3% (**Leminor et Veron, 1989**). Très mobile grâce à une ciliature polaire, le plus souvent monotriche, et fermente le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S (**Pechère et al., 1982**).

## ✚ Mode opératoire

### *Jour 1 : Premier enrichissement*

Le premier enrichissement s'effectue dans des tubes portés 10 ml de milieu eau peptonée alcaline (EPA), Ce dernier sera par la suite incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures, comme l'indique le schéma (**Fig. 18**) (**Lebres, 2002**).

### *Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement*

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu EPA en tubes à raison de 1 ml ;
- D'autre part, d'un isolement sur gélose GNAB. Dans les deux cas l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures (**Lebres et Mouffok, 2008**).

### *Jour 3 : Lecture des boîtes et identification*

- D'une part, le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur GNAB 2; qui sera incubé à son tour à  $36 \pm 2^\circ \text{C}$  pendant 24 heures ;
- D'autre part, les boîtes de gélose GNAB 1 subiront une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses et transparentes caractéristiques (**Lebres et Mouffok; 2008**).

## ✚ Identification morphologique et biochimique

Sur GNAB, les colonies sont rondes, plates, bord réguliers, surface lisse brillantes, translucides sous forme de goutte de rosée (**Patrick et al., 2009**).

Une identification morphologique et biochimique basée essentiellement sur :

- Etat frais et coloration de Gram.
- Oxydase (+).
- Ensemencement d'une galerie biochimique classique ou bien galerie API 20 NE.

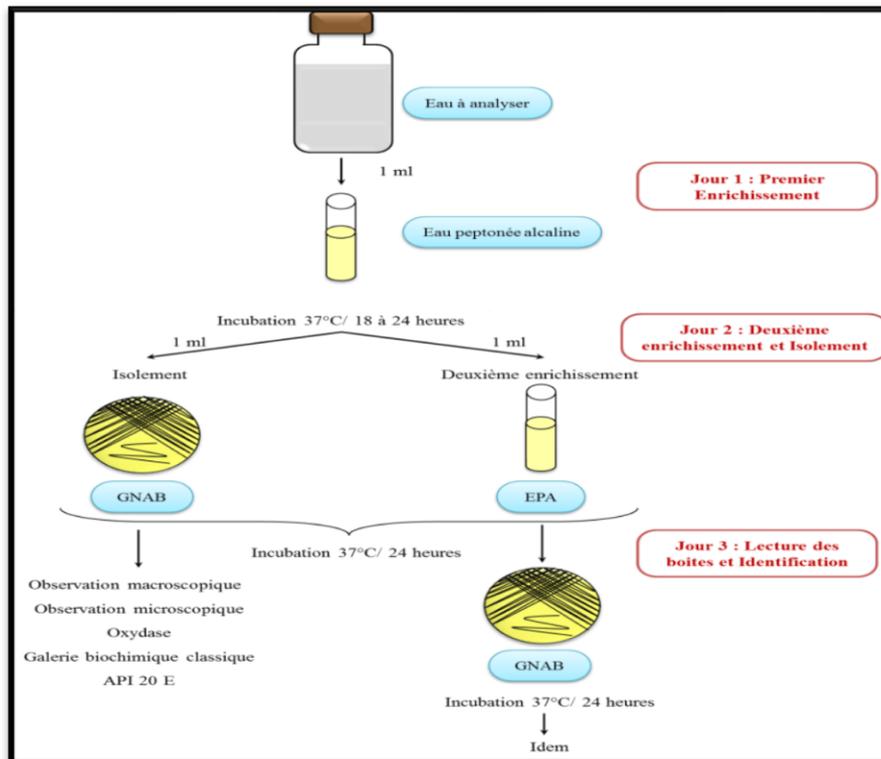


Figure 18 : Protocole de recherche et identification de *Vibrio* dans les eaux.

## 5. Identification des germes

L'identification des souches bactériennes isolées de nos eaux s'est basée sur l'étude morphologique (macroscopique et microscopique) et la recherche de certains caractères biochimiques.

### 5.1. L'identification morphologique

#### 5.1.1. Examen macroscopique des caractères cultureux

Pour l'examen macroscopique des bactéries, les souches doivent être cultivées sur un milieu gélosé solide en boîte de Pétri. L'aspect des colonies dépend du milieu et de l'incubation (Temps et température) (Delarras, 2007). Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées (Rouaiguia et Cheriet, 2010). Observer à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire les colonies développées sur les milieux gélosés et noter les caractéristiques suivantes :

- La taille : colonies petites (< 1 mm), moyennes (1,5 à 3 mm), grosses (> 3 mm) ;
- La forme : Bombée, plate, ombiliquée, surélevée ;
- Le contour : à bords circulaire, irrégulières et parfois envahissantes, déchiquetées et parfois envahissantes ;

- Élévation de la colonie : convexe, légèrement convexe, plate ;
- L'opacité : opaque, translucide, transparente ;
- Pigmentation (**Delarras, 2007**).

### 5.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais) ou bien après coloration de l'échantillon ou encore après réaction d'immunofluorescence (**Denis et al., 2007**).

#### ✚ L'examen direct (Etat frais)

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool (**Denis et al., 2007**). Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupements, leur abondance et leur mobilité (**Delarras, 2007**). Observer au microscope optique à l'objectif  $\times 40$  (**Carbonnelle et al., 1988**).

#### ✚ Coloration de Gram

L'examen microscopique après une coloration de Gram nécessite au départ une préparation d'un frottis, une colonie bien isolée d'une culture en milieu solide sera prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau distillée stérile. L'observation se fait à l'objectif  $\times 100$ . Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères : leur forme (bacille, cocci, ...etc.) et leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif. Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consiste à :

- 1- Fixer de frottis.
- 2- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet. Laisser agir 1 minute.
- 3- Rejeter le colorant. Laver à l'eau.
- 4- Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir 1.30 minute.
- 5- Rejeter le Lugol. Laver à l'eau.
- 6- Décolorer à l'alcool 95° pendant 10 secondes.
- 7- Rincer à l'eau courante.
- 8- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute.
- 9- Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres (**Degremont, 1998**).

Après ce traitement, les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet, et les bactéries Gram négatif sont colorées en rose (Carbonnelle *et al.*, 1988 ; Prescott *et al.*, 2003 ; Mamadou, 2005 ; Boukrouma, 2008).

## 5.2. Identification biochimiques et enzymatiques

### 5.2.1. Caractères enzymatiques

L'ensemble des tests enzymatiques effectués sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 06 : Tests enzymatiques effectués.**

Test	Principe	Mode opératoire	Résultats
<b>Test catalase</b>	La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'oxygène ou l'eau oxygénée (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en eau et en oxygène gazeux (Carbonnelle <i>et al.</i> , 1988). Cette enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies facultative.	Prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on introduit ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. (Carbonnelle <i>et al.</i> , 1988).	Si un dégagement de bulles de gaz (oxygène) apparaît, le test est dit positif. Qui signe la présence de l'enzyme catalase (Fig.19) (Carbonnelle <i>et al.</i> , 1988).
<b>Test oxydase</b>	Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'un cytochrome oxydase (Denis <i>et al.</i> , 2007).	La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque (Lebres, 2004).	Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet (Fig.21) (Lebres, 2004).
<b>Test à la coagulase libre</b>	Ce test a pour but de mettre en évidence la pathogénécité d'un staphylocoque. Elle se détecte (par le test en tube) par sa capacité à coaguler (c'est-à-dire former un caillot) du plasma contenant un anticoagulant comme le citrate, l'oxalate ou l'héparine. L'anticoagulant est nécessaire parce que, sans lui, le plasma coagulerait spontanément (Singleton, 2005).	Après incubation, prendre aseptiquement une demi-colonie dans un tube stérile à hémolyse contenu 0,3 ml de plasma de lapin (ou de l'homme), et incubé de nouveau à 36 ± 2 °C pendant 2 à 6 h. Examiner la coagulation du plasma de lapin sinon ré-incuber et examiner de nouveau à 20 ± 4 heures.	Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initialement occupé par le liquide (Fig.20) (Labres et Mouffok, 2008; Pechère <i>et al.</i> , 1982).

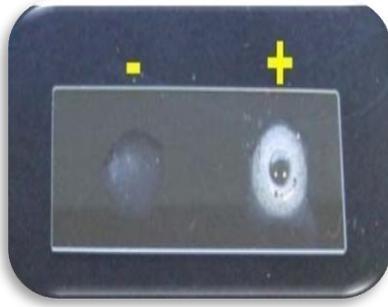


Figure 19: Test catalase.

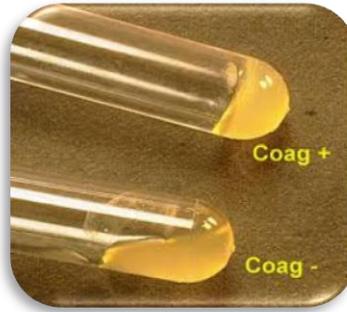


Figure 20: Test coagulase.



Figure 21: Test oxydase.

### 5.2.2. Caractères biochimiques

#### ▣ La galerie classique

L'identification et la classification des espèces par une galerie classique est basée essentiellement sur l'étude des caractères suivants :

#### ✚ Test de Citrate de Simmons

La pente du milieu est ensemencée par strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C. (**Raggam, 2010**). Après 24 heures, s'il y a une culture avec une alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu), la bactérie est de Citrate positive. S'il ya pas de culture et la couleur du milieu inchangée, la bactérie est de citrate négatif (**Carbonnelle et al., 1988**).

#### ✚ Le mannitol-mobilité

##### ♣ Principe

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

Ce milieu permet simultanément d'établir la mobilité éventuelle des bactéries matérialisée par leur diffusion autour de la pique centrale d'ensemencement du milieu (**Halassi, 2009**).

##### ♣ Procédure

Ensemencer le milieu par pique centrale à l'aide d'une anse de platine pointue à partir des boîtes d'isolement et incubé à 37°C pendant 24 heures (**Halassi, 2009**).

La fermentation du mannitol entraîne le virage au jaune du milieu:

- Si le germe est très mobile, il se développe le long de la piqûre la masse microbienne envahit tout le tube.

- S'il est peu mobile, il se développe le long de la piqûre et se réduit à de petites ramifications. Enfin, s'il est immobile, il se développe seulement dans la trace de la piqûre qui demeure fine et nette (Carbonnelle *et al.*, 1988 ; Sayad, 2008).

### ✚ Etude de la dégradation du glucose, saccharose et lactose en milieu TSI

#### ♣ Principe

Le milieu TSI est utilisé pour l'identification rapide des Entérobactéries et qui permet de mettre en évidence la dégradation du glucose, du lactose, du saccharose, la production éventuelle du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et la production de gaz (CO<sub>2</sub>) (Bugnicourt, 1983).

#### ♣ Procédure

Nous avons ensemencé le milieu TSI à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. Nous avons incubé les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 heures. La lecture est réalisée après 24 heures (Halassi, 2009).

#### ♣ Lecture

Ce milieu est composé d'un culot et une pente, et contient le rouge de méthyle comme un indicateur de pH. Si les bactéries utilisent le glucose, le culot se colore en jaune, alors que si elles utilisent le saccharose et le lactose c'est la pente qui se colore en jaune. La production du gaz se traduit par la formation de bulles de gaz ou soulèvement de la gélose alors que la production d'H<sub>2</sub>S se traduit par un noircissement du milieu (Halassi, 2009).

### ✚ Test de l'Urée-Indole

La recherche de l'uréase consiste à constater l'alcalinisation d'un milieu contenant de l'urée d'où l'utilisation de milieu urée-indole (Merzoug, 2009).

Ensemencer un milieu urée – indole avec une suspension bactérienne. Incuber 18 à 24 heures à 37 °C (Euzéby, 2007). L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rouge violacée du milieu (Uréase positive). Si le milieu persiste orange, cela indique un test négatif (Denis *et al.*, 2007).

### ✚ Test de l'eau peptonée exempte d'indole

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seules les bactéries indologues permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole.

Nous ensemençons un tube d'eau peptonée exempte d'indole. Après 24 h d'incubation à 37 °C, nous ajoutons quelques gouttes de réactif de Kovacs.

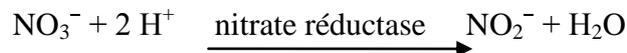
La lecture de l'indole est immédiate :

- Réaction indole positive : anneau rouge ou rose.
- Réaction indole négative : anneau brunâtre (**Carbonnelle et al., 1988**).

### ✚ Test de réduction du nitrate

#### ♣ Principe

Certaines bactéries peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons, c'est la respiration nitrate. La nitrate réductase est une enzyme catalyse la réduction des nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) suivant la réaction suivante (**Delarras, 2000**) :



#### ♣ Procédure

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

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

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

- Si le milieu reste incolore, on a deux éventualités :

- Les nitrates ont d'abord été réduits en nitrites mais la réduction s'est poursuivie.

- Ou les nitrates n'ont pas été réduits en nitrites et se trouvent donc dans le bouillon nitrate. Dans ce dernier cas, nous provoquons la réduction chimique en ajoutant de la poudre de zinc si la couleur apparaît, la bactérie est dite nitrate réductase négative (**Halassi, 2009**).

### Recherche de l'acétone

Le milieu Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose. L'ensemencement se fait largement et l'incubation se fait à une température optimale pendant 24 heures.

- **Test VP (Voges-Proskauer)**

- Ajouter 2 à 3 gouttes de VP1 et VP2,

- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre quelque minute à une heure. Le milieu devient rouge (VP+), ou bien devient jaune (VP-) (**Lebres, 2004 ; Boukrouma, 2008**).

### La Galerie API 20E

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

#### ➤ **Principe**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Fig.22**).

#### ➤ **Mode opératoire**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Remplir tubes et cupules des tests : |CIT |, |VP |, |GEL|, avec la suspension bactérienne.

- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

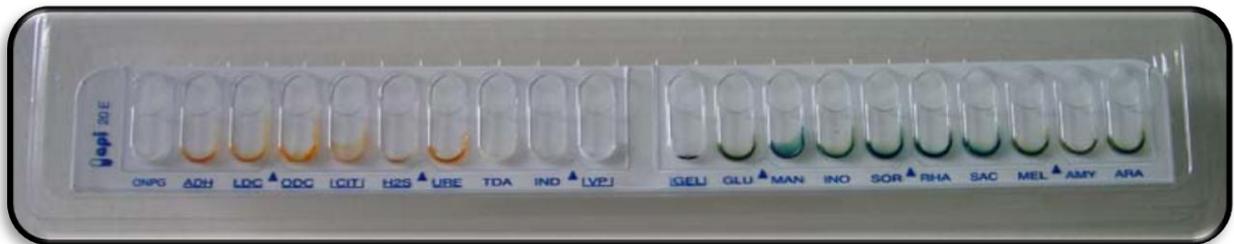
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

➤ **Lecture**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kovacks. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive (Aouissi *et al.*, 2007 ; Merzoug, 2009 ; Rouaiguia et Cheriet, 2010).
- La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20 (Tab.07) (Annexe 04).



**Figure 22 : Présentation de la galerie API 20 E.**

▣ **La galerie API 20 NE**

❖ **Principe**

La galerie API 20 NE se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes (Fig. 23) contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

❖ **Technique**

✓ **Préparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

## ✓ Préparation de l'inoculum

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile

## ✓ Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.
- Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule aux Medium. Homogénéiser.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE.
- Incuber 24 heures à 30°C (Merzoug, 2009).

## ❖ Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats (Tab.08) (Annexe 04).

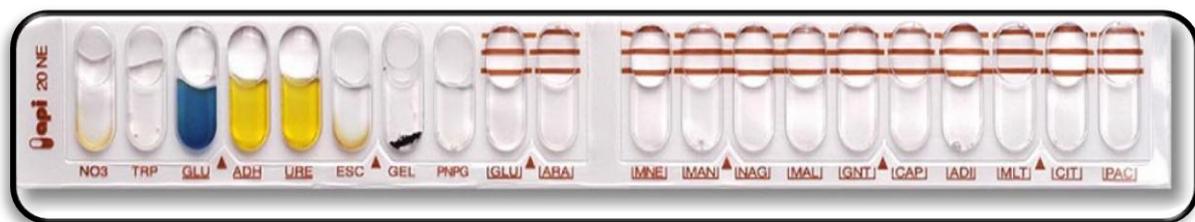


Figure 23 : Présentation de la galerie API 20 NE.

▣ La galerie API Staph

## ❖ principe

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans un API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Fig.24).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

**❖ Technique**

## ✓ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Sortir la galerie de son emballage individuel. Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

## ✓ Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule d'API Staph Medium.

## ✓ Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en évitant la formation de bulles.
- Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.
- Incuber 24 heures à 37 °C (**Bazine et Bourenane, 2011**).

**❖ Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats (**Tab.09**) (**Annexe 04**).



**Figure 24 : Présentation de la galerie API Staph.**

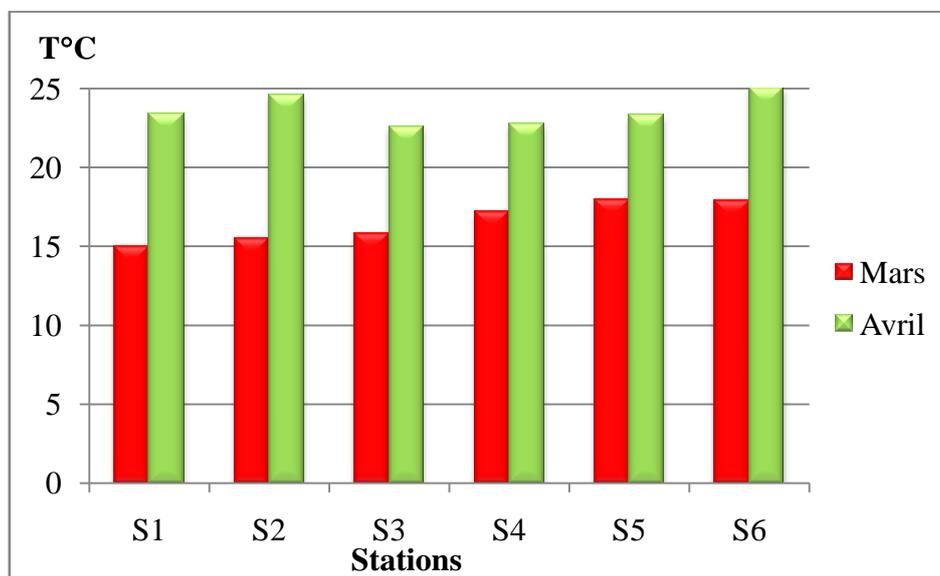
Les résultats des analyses bactériologiques et physico-chimiques des échantillons d'eau prélevés durant les deux mois de mars et avril sont résumés dans les tableaux (**Annexe 05**) et les différents diagrammes au dessous suivis d'une interprétation.

## 1. les paramètres physico-chimiques mesurés *in situ*

### 1.1. La température

Le fonctionnement biologique d'un milieu aquatique est étroitement lié à la température de l'air et de l'énergie solaire (**Merabet, 2011**).

Les valeurs de la température de l'eau mesurées dans les différents sites sont représentées dans la figure 25.



**Figure 25 : Variation de la température de l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).**

D'après les résultats, au mois de mars on a enregistré une valeur minimale de 15°C à la station S1 (Garaet Chichaya), et une valeur maximale de 25°C au mois d'avril à la station S6 (Garaet El-Guelb). Ces variations sont directement liées au jour et à l'heure du prélèvement effectué.

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température (**Monod, 1989**) (**Tab. 16**) (**Annexe 06**) notre eau est de qualité moyenne, normale à bonne.

## 1.2. Le pH

Le pH des eaux naturelles est lié à la nature des terrains traversés, mais il peut être aussi influencé par d'autres facteurs tels que la température.

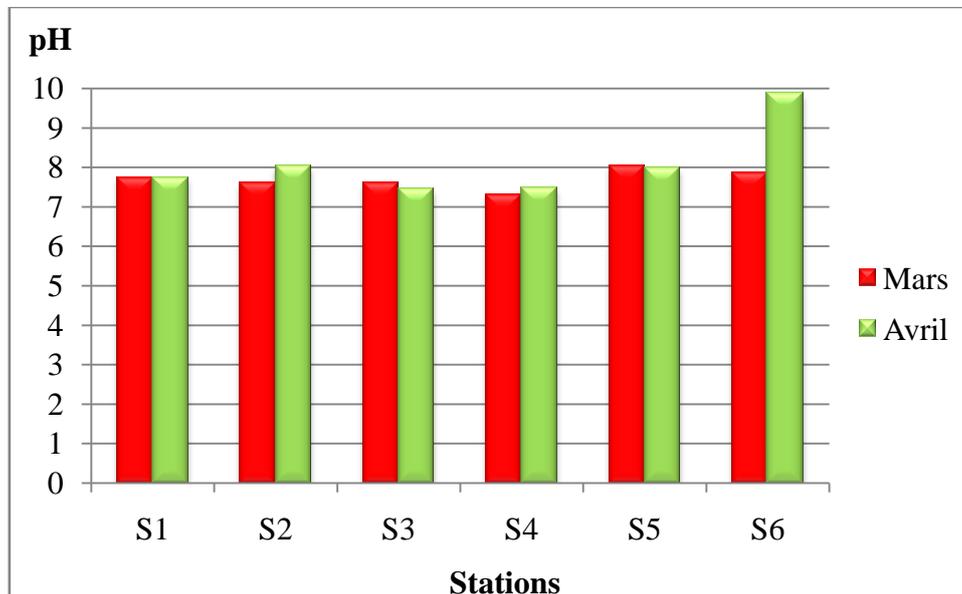


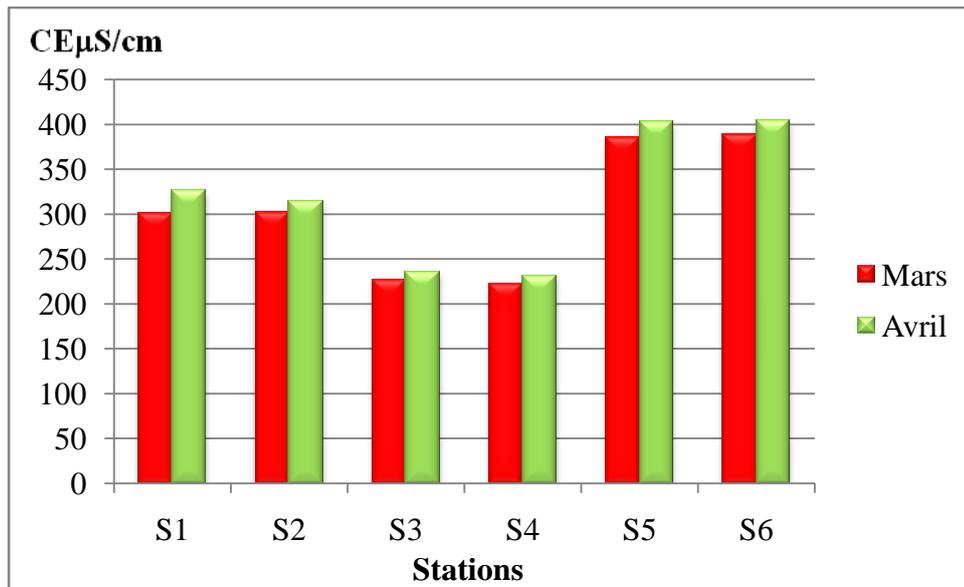
Figure 26 : Variation du pH de l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).

Le pH des eaux échantillonnées est plus au moins neutre avec des valeurs qui oscillent entre 7 et 8 enregistrées à la majorité des stations. Ces valeurs présentent une neutralité approchée qui favorisent le développement et la croissance des microorganismes, ce qui est le cas majoritaire des eaux de surface (Merzoug, 2015).

Une valeur de (9,88) a été enregistrée à la station S6 qui présente un pH légèrement alcalin. Selon Savary (2010) Cette élévation peut être expliquée par la forte production végétale ce qui est le cas dans cette station (Garaet El-Guelb), ainsi que la nature calcaire des terrains traversés par les eaux et elle dépend aussi de la conductivité ; les eaux les plus minéralisées ont un pH élevé (Rodier *et al.*, 2009).

## 1.3. La conductivité

La mesure de la conductivité permet d'évaluer approximativement la minéralisation globale dans l'eau.



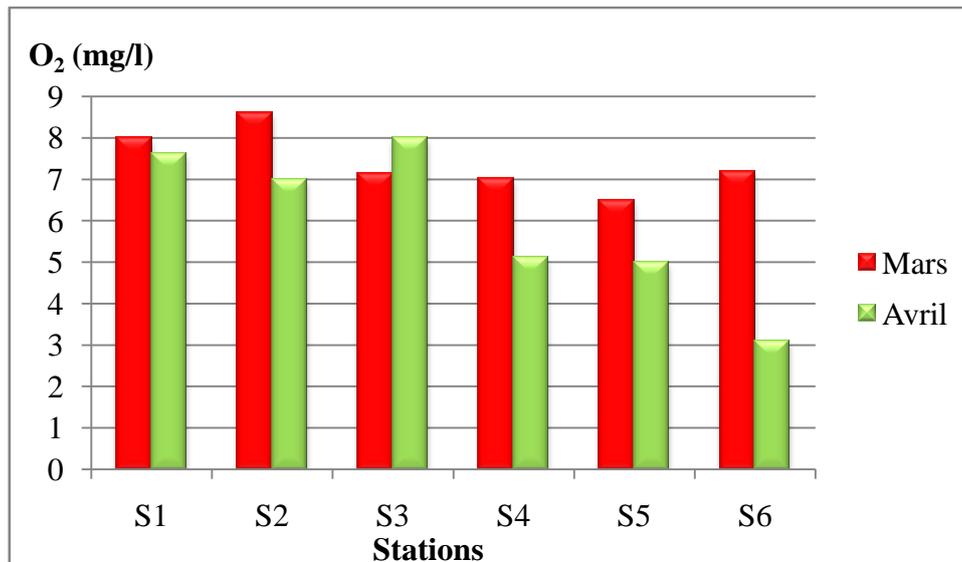
**Figure 27 : Variation de la conductivité électrique de l'eau de nos sites d'étude (Mars-Avril 2015).**

Pour nos échantillons les valeurs de la conductivité électrique sont entre 222 et 390  $\mu\text{S}/\text{cm}$  durant le mois de mars, et entre 232 et 404  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour le mois d'avril (**Fig. 27**). Selon ces résultats les valeurs les plus élevées sont rencontrées durant le mois d'avril; cette forte minéralisation est due à l'augmentation de la température qui entraîne l'évaporation de l'eau et donc l'augmentation de la salinité de l'eau ; ainsi que lessivage des terrains agricoles autours de ces stations provoque un accroissement de la conductivité.

Si l'on se réfère à la grille d'appréciation de la qualité des eaux en fonction de la conductivité (**Monod, 1989**) (**Tab. 17**) (**Annexe 06**), la qualité des eaux de ces zones humides est bonne.

#### 1.4. L'oxygène dissous

La présence de l'oxygène dans les eaux joue un rôle primordial dans le maintien de la vie aquatique, et donc dans les phénomènes d'autoépuration et de la photosynthèse. Le dioxygène constitue un excellent indicateur du fonctionnement du plan d'eau (**Sayad, 2008**).



**Figure 28 : Variation de L'oxygène dissous de l'eau de nos sites d'étude (Mars-Avril 2015).**

En examinant le graphe illustré par la figure au dessus, nous observons que la valeur maximale 8,6 mg/l (86%) a été enregistrés à la station S2 en mois de mars, et de même la valeur minimale 3.1 mg/l (31%) a été enregistrés à la station S6 (G. El-Guelb). Cette diminution ne peut s'expliquer que par l'abondance de la matière organique proviennent généralement des rejets animal et même aussi les activités agricoles autour ce site, L'O<sub>2</sub> dissous étant consommé par les microorganismes pour dégrader cette dernière. En effet plus la température de l'eau est élevées, plus la concentration d'oxygène dissous dans l'eau n'aura tendance à diminuer.

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de l'oxygène dissous, (Monod, 1989) (Tab. 18) (Annexe 06). La qualité des eaux de nos zones humides est de mauvaise à bonne.

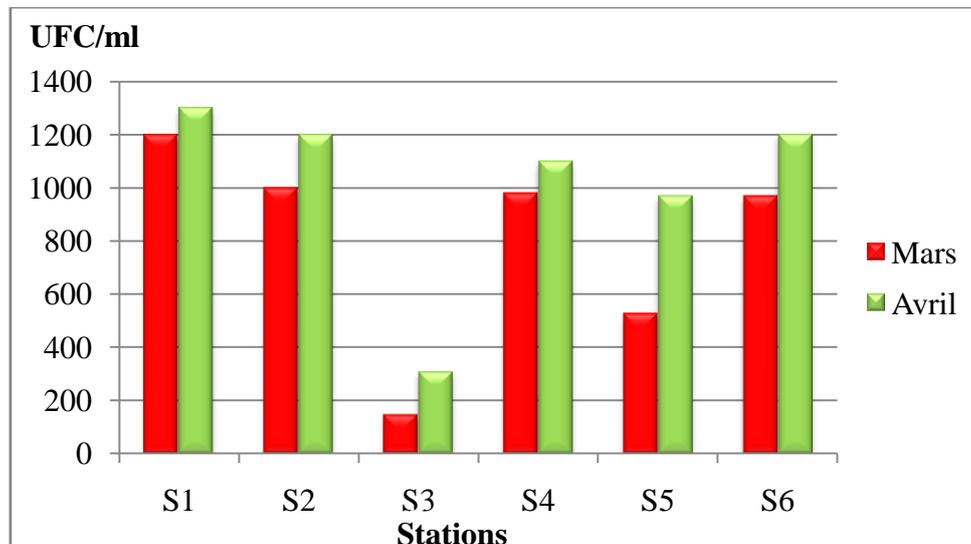
## 2. Les analyses bactériologiques

Les résultats des analyses bactériologiques effectuées, présentent une grande diversité bactérienne de point de vue quantitative et qualitative.

### 2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux

Bien que la présence de bactéries revivifiables en grande quantité n'ait aucune valeur indicative, leur dénombrement doit être régulièrement effectué car une évolution importante,

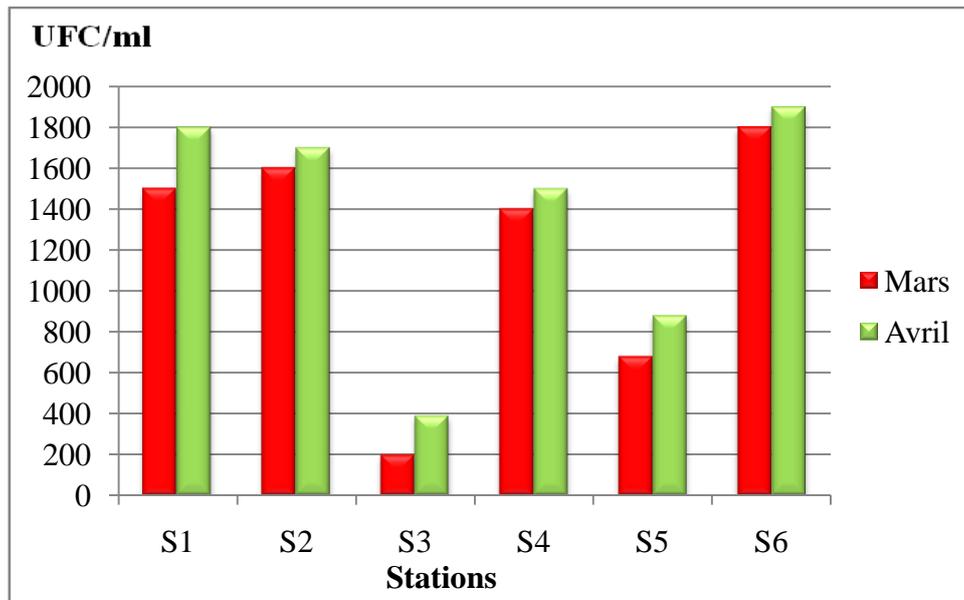
peut être représentative d'un apport contaminant (matière organique par exemple) (Bouchaala, 2010).



**Figure 29 : Estimation des germes totaux à 37°C dans l'eau de nos sites d'étude.**

Selon le graphique ci-dessus on remarque la présence des germes totaux à 37°C dans toutes les stations pendant le mois de mars et avril avec des effectifs plus ou moins variables, où les valeurs les plus élevées sont notées en mois d'avril avec un maximum de  $1,3 \times 10^3$  UFC/ml (S1 G. Chichaya). Ainsi que, les valeurs les plus faibles caractérisent le mois de mars avec un minimum de  $1,5 \times 10^2$  UFC/ml (S3 G. Sidi Makhoulf).

Les mêmes constatations sont notées pour la flore à 22°C, nous observons que le nombre est encore plus important notamment dans les stations 1, 2, 6 (G. Chichaya et G. El-Guelb respectivement). La valeur maximale est notée en mois d'avril au niveau de la station S6 avec  $1,9 \times 10^3$  UFC/ml. La valeur minimale est de  $2,0 \times 10^2$  UFC/ml dénombrée dans la station S3 pendant le mois de mars (Fig.30).



**Figure 30 : Estimation des germes totaux à 22°C dans l'eau de nos sites d'étude.**

D'une manière générale, le dénombrement de la flore totale est plus élevé pendant le 2<sup>ème</sup> prélèvement par rapport au 1<sup>er</sup> et à la température de 22 °C en comparant à 37 °C. Cela se traduit par l'influence de la température sur la croissance de ces microorganismes.

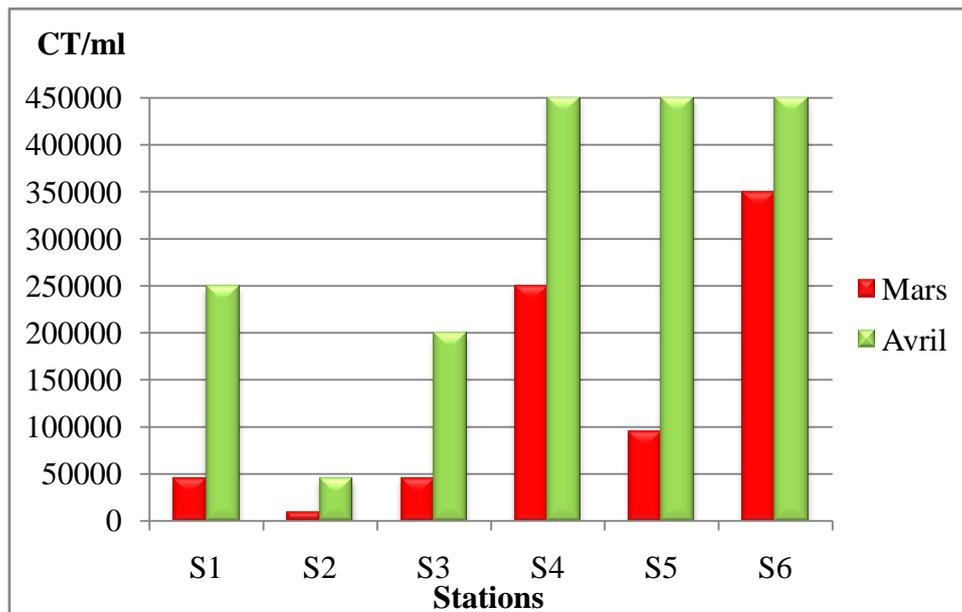
Les bactéries revivifiables ne sont pas forcément d'origine fécale mais ont également une origine environnementale. Elles fournissent quelques informations ; comme la prolifération de la flore dans une eau riche en matière organique. Ces bactéries se développent principalement à des températures basses (**Rodier *et al.*, 2009**).

## **2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale**

Le dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale reste la seule approche opérationnelle de contrôle de la qualité microbiologique des eaux.

### **2.2.1. Coliformes totaux**

Les résultats du dénombrement des coliformes totaux sont résumés dans les tableaux 14 et 15 (**Annexe 05**).



**Figure 31 : Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).**

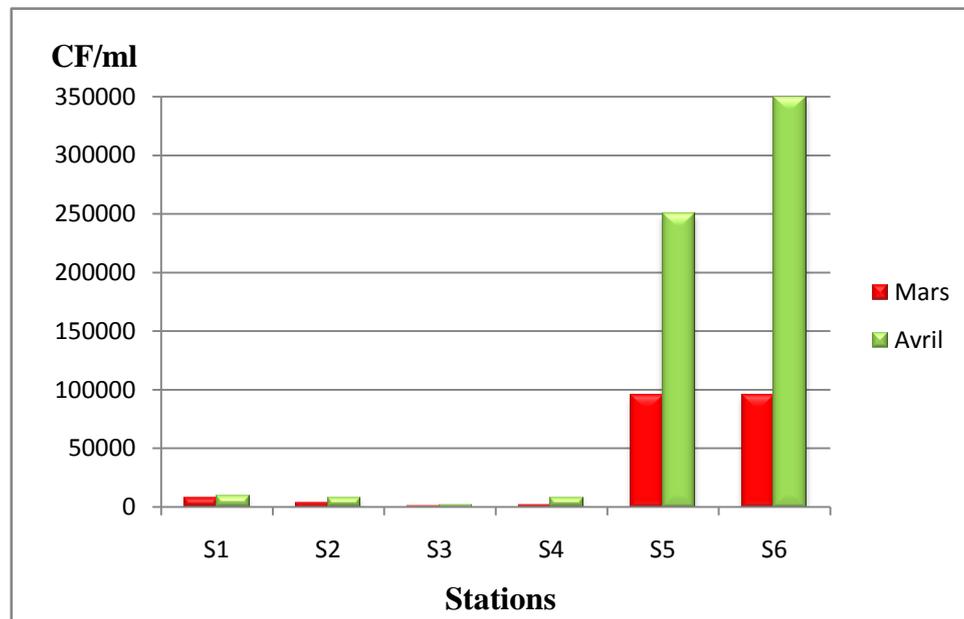
Les densités de ces bactéries subissent d'amples fluctuations spatio-temporelles. D'après le graphique ci-dessus, on observe que le nombre des coliformes totaux atteint sa valeur maximale au niveau des stations 4, 5 et 6 (Sidi Makhoulouf et El-Guelb) pendant le mois d'avril, Selon **Abdi *et al.*, (2013)** les fortes concentration de ces germes sont traduites par la présence des déjections animal (des oiseaux d'eau, et des animaux domestique...etc.), des décharges domestiques et des déchets de certains habitats situés au voisinage de ces sites. En outre, la température de l'eau favorisante ainsi que la disponibilité des nutriments conduisant à la prolifération de ces germes. Ces derniers sont beaucoup plus nombreux pendant le mois d'avril par rapport à celui de mars cela peut être expliqué par la diminution de niveau d'eau.

Dans la station 2, une chute du nombre des coliformes totaux se traduit par une dispersion et une sédimentation des bactéries, un pouvoir autoépurateur potentiel se fait par des plantes comme le roseau, une prédation par des protozoaires, une lyse induite par des virus bactériophages et une compétition avec les flores autochtones.

Pour les eaux d'irrigation la valeur limite des coliformes totaux ne doit pas dépassée 1000 CT/ml pour les cultures consommées crus (**Ouanouki *et al.*, 2009**).

### 2.2.2. Coliformes fécaux

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux sont résumés dans les tableaux 14 et 15 (Annexe 05).



**Figure 32 : Estimation des coliformes fécaux/ml dans nos prélèvements (Mars – Avril 2015).**

D'après le graphique d'évaluation du nombre des coliformes fécaux, on observe que la valeur maximale est de  $3,5 \times 10^5$  CF/ml notée dans la station S6 pendant le mois d'avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée dans la station S3 pendant le mois de mars et elle est de  $9,5 \times 10^2$  CF/ml.

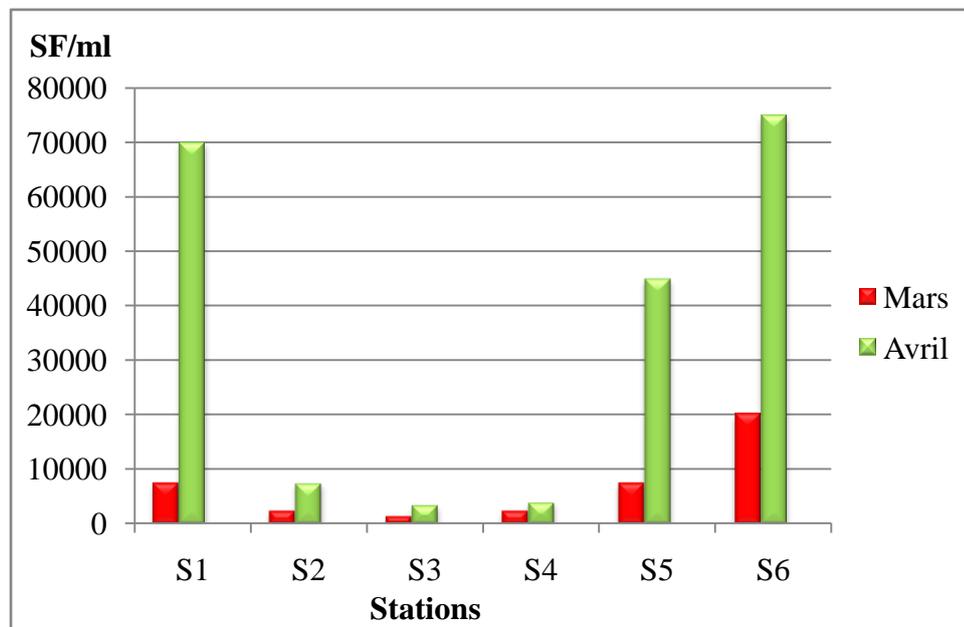
Ces résultats sont expliqués par la présence d'une contamination provenant principalement des déchets fécaux ; plus probablement d'origine humaine (déchets domestique) et animal entre autre les oiseaux d'eau, ainsi que les effluents d'élevage.

La présence de coliformes fécaux dans l'eau signifie une contamination récente du milieu aquatique par la matière fécale humain ou d'animaux à sang chaud (le cas pour toutes les stations).

Globalement tous les chiffres obtenus sont supérieurs à la norme. Pour les eaux d'irrigation la valeur limite des coliformes fécaux ne doit pas dépassée 1000 CF/ml pour les cultures consommées crus (Ouanouki *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont considérés comme des indicateurs spécifiques de contamination fécale. Ils se multiplient rarement dans l'environnement et résistent mieux aux conditions défavorables que les coliformes (Gantzer *et al.*, 1998).



**Figure 33: Estimation des Streptocoques fécaux/ml dans l'eau de nos sites d'étude (Mars – Avril 2015).**

Le graphique des streptocoques D nous montre que la station S6 est cependant le point qui renferme le nombre le plus élevé avec une valeur maximale de  $7,5 \times 10^4$  SF/ml pendant le mois d'avril, tandis que la valeur minimale ( $1,5 \times 10^3$  SF/ml) est enregistrée à la station S3 pendant le mois de mars (Fig. 33).

D'après l'OMS, les streptocoques fécaux sont en grande partie d'origine humaine. Cependant, certaines bactéries de ce groupe proviennent également de fèces animales, ou se rencontrent même sur les végétaux. Ils sont néanmoins considérés comme indicateurs d'une pollution fécale, et leur principal intérêt réside dans le fait qu'ils soient résistants.

Le nombre de streptocoques fécaux est directement lié à la quantité de matière fécale se trouvant dans l'eau. Cet enrichissement est principalement dû au lessivage des terres agricoles avoisinantes chargées d'énormes quantités de fumier, aux rejets domestiques des agglomérations rurales, et à l'élevage d'ovin et bovin.

Les valeurs obtenues sont supérieures à celles citées pour les eaux potables et pour l'irrigation (1000 SF/ 100 ml) (Ouanouki *et al.*, 2009).

#### 2.2.4. Le rapport coliformes fécaux/ streptocoques fécaux (CF/SF)

Le rapport (CF/SF) a été utilisé en 1969 par Geldreich et Kenner ou une valeur supérieur à 4 (CF/SF > 4) indique une origine humaine, tandis qu'une valeur plus petite que 0,7 (CF/SF < 0,7) montre une origine animale de la pollution (Gueroui, 2015) (Tab. 19).

**Tableau 19: Origine de la pollution fécale selon le rapport CF/SF (Borrego et Romero, 1982).**

Rapport (CF/SF)	Source de contamination
$R < 0,7$	Principalement ou entièrement d'origine animale
$0,7 < R < 1$	Mixte à prédominance animale
$1 < R < 2$	Origine incertaine
$2 < R < 4$	Mixte à prédominance humaine
$R > 4$	Source exclusivement humaine

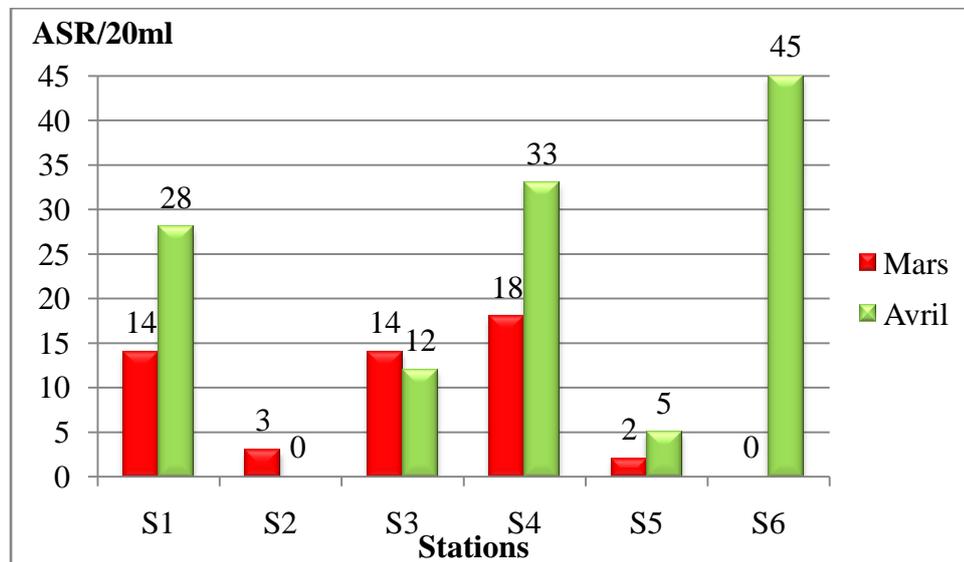
L'analyse du tableau 20 montre que les échantillons analysés des stations S5 et S6 ont un rapport CF/SF supérieur à 4. Ceci explique bien que l'origine de la contamination des eaux de Garaet El-Guelb est strictement humaine. D'autre part, les stations S1, S2 et S4 montre une contamination d'origine incertaine pendant le mois de mars et avril. Les stations S1, S3 et S4 présentent une contamination d'origine animale en mois de mars et d'avril.

**Tableau 20: Détermination du rapport coliformes fécaux/ streptocoques fécaux.**

Mois Stations	Mars	Avril
S1	1	0,12
S2	1,4	1
S3	0,63	0,46
S4	0,6	1,88
S5	12,67	5,56
S6	4,75	4,67

### 2.2.5 Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR)

Les tableaux 14 et 15 (**Annexe 05**) récapitulent les résultats de dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) durant notre période d'étude.

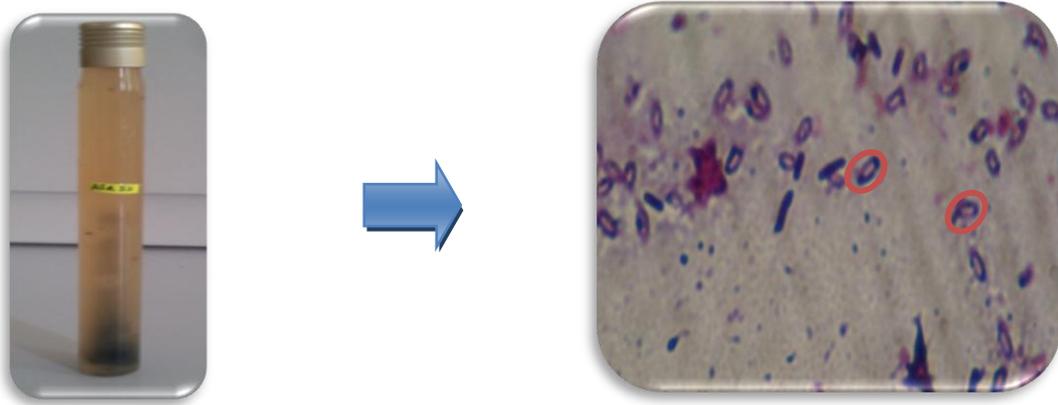


**Figure 34 : Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR/20ml).**

Les anaérobies sulfito-réductrices sont souvent considérés comme des indices de contamination ancienne. Les formes sporulantes, beaucoup plus résistante que les formes exclusivement végétatives, permettrait ainsi de déceler une pollution fécale ancienne, bien que ça ne puisse pas être toujours le cas, car les *clostridium* sulfito-réductrices peuvent avoir une origine tellurique. Elles sont responsables des maladies graves telles que le botulisme et le tétanos ; c'est pour cette raison que la recherche de ces derniers est très essentielle dans le cadre de détermination qualitative d'eau.

Les résultats obtenus montrent des fluctuations irrégulières entre les saisons et les stations avec un maximum noté au mois d'avril à la station S6 avec 45 ASR/20ml (**Fig. 34**).

A fin d'identifier ces bactéries, on a pris un tube positif qui fera l'objet d'une coloration de Gram ; l'observation microscopique révèle la présence des bacilles Gram positif sous deux formes : végétatif et sporulantes (**Fig. 35**).



**Figure 35 : Culture positive des ASR dans un tube de VF à gauche et aspect microscopique à droite montre des formes végétatives et sporulantes (entourées par un cercle rouge) des ASR (Grossissement  $\times 100$ ).**

### 2.3. Résultats d'identification des germes pathogènes

#### 2.3.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram de différents germes isolés

**Tableau 21: Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées à partir de nos prélèvements.**

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
<b>Chapman</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies grandes, pigmentées en jaunes, opaques, lisse à contours réguliers, entourées d'un halo jaune (<b>Fig.40</b>).</li> <li>- Colonies petites, bombé, jaunes dorés, translucides, rondes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cocci, Gram positif, regroupés en diplocoques, tétrades et chainettes.</li> <li>- Cocci, Gram positif, regroupés en grappes de raisin (<b>Fig.41</b>).</li> </ul>
<b>GNAB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies petites, rondes, plates, bord réguliers, lisse (<b>Fig.38</b>).</li> <li>- Colonies moyennes, blanchâtres, rondes, lisse, transparentes.</li> <li>- Colonies grandes à contours irréguliers, étoilés, jaune, opaque.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilles droits ou incurvés, Gram négatif, isolés (<b>Fig.39</b>).</li> <li>- Cocci, Gram négatifs, isolés ou bien regroupés en amas.</li> </ul>
<b>Cétrimide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies petites, rondes, fluorescentes (<b>fig.42</b>).</li> <li>- Colonies de taille moyenne, rondes, blanchâtres, opaques.</li> <li>- colonies petites, translucides, bombé, ronde, crémeuses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilles, Gram négatif, en amas ou en streptobacilles (<b>fig.43</b>).</li> <li>- Bacilles, Gram négatif, isolé.</li> </ul>

<p><b>SS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies moyenne, blanches avec centre foncés, plates, translucides, irrégulières</li> <li>- Colonies grande, marrons, ronde, opaque, muqueuse, irrégulières.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilles, Gram négatif.</li> <li>- Bacilles, Gram négatif, regroupés en amas.</li> </ul>
<p><b>Hectoèn</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies verdâtres avec centre foncé, bossue, circulaire, ondulés, rigoureuse (<b>Fig.36</b>).</li> <li>- Colonies petites rouges à contours irréguliers, muqueuses.</li> <li>- Colonies grande marron, bombés, opaque.</li> <li>- Colonies petites, pigmenté en noire, plates.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacilles, Gram négatif, isolée ou regroupés (<b>Fig. 37</b>).</li> <li>- Bacilles, Gram négatif, isolée.</li> </ul>



Figure 36: Aspect des colonies sur gélose Hectoèn (Station 6).



Figure 37: Des Bacilles Gram (-) (Grossissement ×100).



Figure 38: Aspect des colonies sur gélose GNAB (Station 1).

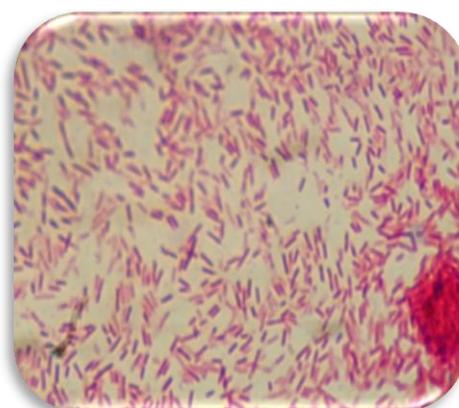


Figure 39 : Des Bacilles Gram (-) (Grossissement ×100).

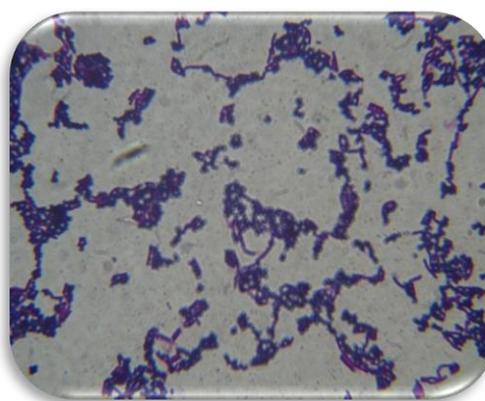
### 2.3.2. Résultats de l'identification biochimique

#### ➤ Profil biochimique des *staphylococcus*

L'aspect macroscopique et microscopique (coloration de Gram) des colonies isolées sur milieu Chapman sont présentées dans les figures suivantes :



**Figure 40: Aspect des colonies sur gélose chapman (Station 01).**



**Figure 41 : Cocci à Gram positif en grappe de raisin (Grossissement x100).**

Les résultats de différents tests effectués pour l'identification des *staphylococcus* nous ont permis d'identifier deux espèces différentes considérés comme non pathogènes et qui sont résumés dans le tableaux suivant :

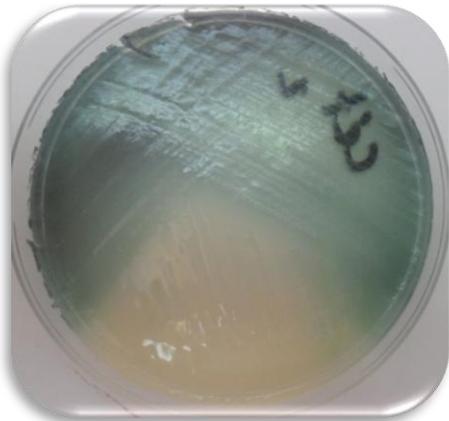
**Tableau 22: Résultats du profil biochimique des *Staphylococcus* isolés.**

	Station 1,2,5,6	Station 4
<b>Oxydase</b>	-	-
<b>Catalase</b>	+	+
<b>Mannitol</b>	+	-
<b>Staphylocoagulase</b>	-	-
<b>Espèces trouvées</b>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.epidermidis</i>

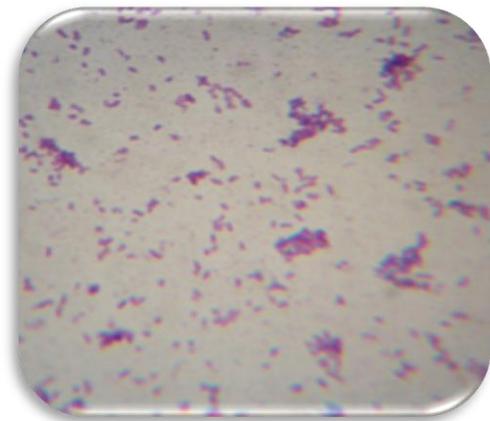
#### ➤ Profil biochimique des *Pseudomonas*

La présence de ces germes dans l'eau signifie souvent une présence de matière organique anormale dans l'eau (Savary, 2010).

L'aspect macroscopique et microscopique (coloration de Gram) des colonies isolées sur milieu cétrimide sont présentées dans les figures suivantes :



**Figure 42 : Aspect des colonies sur gélose cétrimide.**

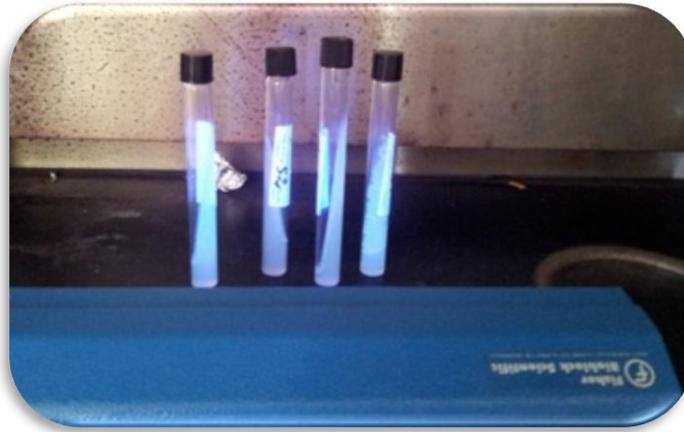


**Figure 43 : Des Bacilles Gram (-) (Grossissement  $\times 100$ ).**

Les résultats de différents tests effectués pour l'identification des *Pseudomonas* sont résumés dans le tableaux et la figure ci-dessous.

**Tableau 23: Résultats du profil biochimique des *Pseudomonas* isolés.**

	Station 1	Station 2	Station 5, 6
<b>Oxydase</b>	+	+	+
<b>mobilité</b>	+	+	+
<b>King A</b>	-	-	-
<b>King B</b>	+	+	-
<b>Nitrate</b>	+	-	+
<b>Citrate de Simmons</b>	+	+	+
<b>Espèces trouvées</b>	<i>P.fluoresces</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.stutzeri</i>



**Figure 44: Résultat de la Recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine dans les milieux King A et King B.**

- **Identification par la galerie biochimique classique**

Les espèces bactériennes identifiées par la galerie biochimique classique sont résumées dans le tableau et la figure ci-dessous.

**Tableau 24: Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.**

Milieu de culture	Espèce bactériennes identifiées
<b>Hektoën</b>	<i>Serratia odorifera 1</i>
	<i>Aeromonas hydrophila gr.2</i>
	<i>Citrobacter koseri</i>
	<i>E.coli</i>
	<i>Serratia ficaria</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>Milieu SS</b>	<i>Citrobacter brakii</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Raouetella ornithinolytica</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>

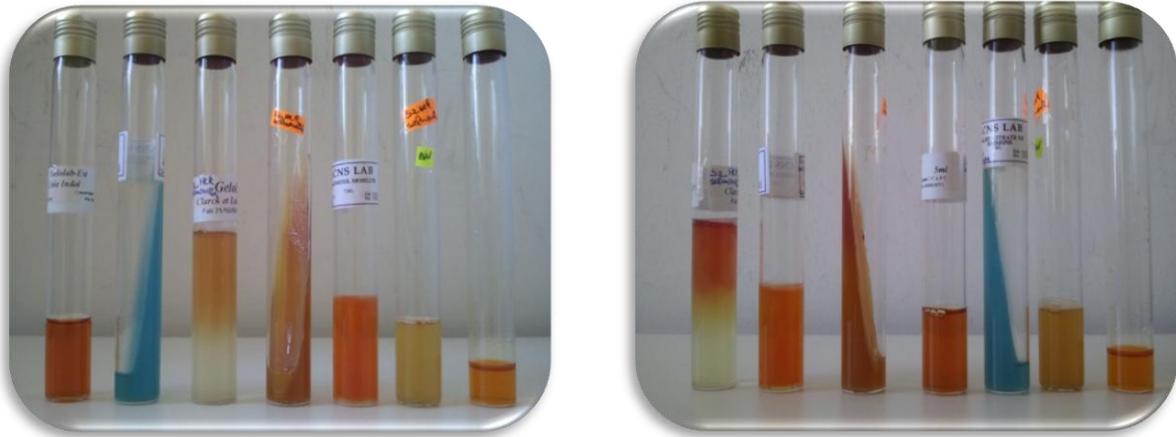


Figure 45: Résultats de quelques galeries biochimiques classiques.

- Identification par les API systèmes

L'étude biochimique réalisée par trois types de systèmes bioMérieux (API 20 E, API 20 NE, API Staph) nous a permis d'identifier 10 espèces bactériennes (Tab.25).

Tableau 25: Résultats de l'identification par les API systèmes (API 20 E, API 20 NE, API Staph).

API système	Milieux de culture	Espèce identifiées
API 20E.	Héktoèn	<i>Enterobacter aerogenes</i>
		<i>Citrobacter braakii</i>
		<i>Serratia odorifera 1</i>
		<i>Vibrio mimicus</i>
	SS	<i>Serratia odorifera 1</i>
API 20 Staph.	Chapman	<i>Aeromonas hydrophila gr.1</i>
API 20 NE.	GNAB	<i>Staphylococcus hominis</i>
		<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
	Cétrimide	<i>Vibrio vulnificus</i>
		<i>Pseudomonas putida</i>



Figure 46 : Profil biochimique de la souche *Enterobacter aerogenes*.



Figure 47 : Profil biochimique de la souche *Staphylococcus hominis*.



Figure 48: Profil biochimique de la souche *Aeromonas hydrophila/caviae*.



Figure 49: Profil biochimique de la souche *Serratia odorifera 1*.



Figure 50: Profil biochimique de la souche *Aeromonas hydrophila gr.1*.



Figure 51: Profil biochimique de la souche *Pseudomonas putida*.



Figure 52: Profil biochimique de la souche *Vibrio mimicus*.



Figure 53: Profil biochimique de la souche *Vibrio vulnificus*.



Figure 54: Profil biochimique de la souche *Citrobacter braakii*.

Tableau 26: Répartition des espèces bactériennes isolées pendant les deux prélèvements entre les stations.

Espèces bactériennes	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<i>Serratia odorifera 1</i>		×		×		×
<i>Citrobacter koseri</i>		×				
<i>Aeromonas hydrophila gr.2</i>						×
<i>E.coli</i>	×	×	×	×	×	×
<i>Serratia ficaria</i>						×
<i>Proteus mirabilis</i>			×			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					×	
<i>Raouetella ornithinolytica</i>					×	
<i>Klebsiella oxytoca</i>			×			
<i>Enterobacter aerogenes</i>			×			
<i>Citrobacter braakii</i>			×		×	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				×		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	×	×			×	×
<i>Staphylococcus hominis</i>			×			
<i>Vibrio mimicus</i>	×					
<i>Vibrio vulnificus</i>						×
<i>Aeromonas hydrophila gr.1</i>		×				
<i>Pseudomonas putida</i>	×					
<i>Pseudomonas stutzeri</i>					×	×

Le problème de la pollution des eaux présente sans aucun doute, un des aspects les plus inquiétants de la dégradation de milieu naturel. Cette pollution cause une diminution de cette disponibilité de ressources naturelles irremplaçables (Aouissi, 2007).

Dans ce contexte ; notre étude a été portée sur les analyses bactériologiques ainsi que quelques paramètres physico-chimiques mesurés *in situ* des eaux de quelques zones humides du complexe de Guerbes-Sanhadja (Skikda, Nord Est algérien) (Garaet Sidi Makhoulf, Garaet Chichaya et Garaet El-Guelb) situées dans la plaine littorale algérienne d'une superficie de 42000 ha.

La région d'étude obéit à un climat méditerranéen, subhumide caractérisée par deux saisons distinctes, l'une sèche-chaude et l'autre humide avec pluviosité abondante. Les températures moyennes oscillent entre 18,41°C durant le mois de mars et 21,57°C pendant le mois d'avril. Elle reçoit une précipitation moyenne de 61,83 mm dont une grande partie est ruisselés.

L'examen de la qualité bactériologique des eaux de nos sites d'étude réalisée durant les mois de mars et avril montre une contamination fécale importante. Les dénombrements bactériens basés sur la recherche de la flore aérobie mésophile totale, coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux et les anaérobies sulfite-réducteurs ont révélé que les teneurs en germes indicateurs de contamination fécale dépassent celle fixée par les normes algériennes des eaux de surface. L'identification des germes pathogènes en utilisant des différentes techniques biochimiques, a montré l'existence de 19 espèces différentes ce qui constitue un risque sanitaire.

L'origine de cette contamination fécale est due aux effluents urbains situés à proximité de certaines stations, le lessivage des terres agricoles, l'élevage intensif ainsi que la présence d'un nombre important des oiseaux qui abritent ces écosystèmes.

En ce qui concerne les mesures physico-chimiques *in situ*, nous constatons que la qualité de nos eaux est bonne à passable.

Enfin, nous pouvons conclure que l'eau de ces zones humides est légèrement polluée.

En perspective, nous suggérons qu'il serait judicieux d'élaborer un programme de surveillance de ces zones humides d'importance floristique et faunistique par un suivi permanent sur des périodes annuelles.

Le problème de pollution demeure posé. A cet effet, des études complémentaires doivent s'imposer pour résoudre ce problème.

- L'installation d'un réseau des collectes et d'évacuation des eaux usées, allant de faire des analyses chimiques périodiques permettent de mieux cerner ce problème afin de préserver ce patrimoine biologique du risque de l'eutrophisation.
- Mener une campagne de sensibilisation sur les zones humides.
- Planter des végétaux spécialement adaptés aux rives afin de créer un véritable bouclier anti-polluant et empêche le réchauffement de l'eau.
- Utiliser rationnellement les engrais et les pesticides agricoles et diminuer l'utilisation de polluants eutrophisants dès l'amont du bassin versant.

- 📖 **Abdellioui S., Boukhdim A. et Hamzaoui H. (2012):** Qualité microbiologique d'un écosystème lotique cas de l'Oued El Kebir Ouest (Skikda, Nord – Est algérien). Mémoire de Master. Université 08 mai 1945 de Guelma. 88p.
- 📖 **Abdi S. Razkallah Z. et Zerari A. (2013) :** Etude de la qualité bactériologique des eaux de quelques zones humides du complexe de Guerbes-Sanhadja (Wilaya de Skikda). Mémoire de Master. Université 08 mai 1945 de Guelma. 65p.
- 📖 **Ait Hamlet S. (1998) :** Contribution à l'étude de la qualité de huites Oueds de la wilaya d'El Taref: aspects microbiologiques et écologiques. Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar d'Annaba. Algérie. 150 p.
- 📖 **Ait Kaci S. et Hamdi M.S. (2008) :** Contribution à l'étude des paramètres physico-chimiques et bactériologiques de l'embouchure de l'oued "Béni-Messous". DEUA en science de la mer. (I.N.S.M.A.L). 45p.
- 📖 **Alain A. et Roger K. (2004) :** Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses. *Quae*, 336p.
- 📖 **Allalguia A. et Boutmedjet S. (2013) :** Étude comparative des qualités physicochimiques et bactériologiques des eaux des barrages Ain Dalia et Foum EL Khanga, région de Souk Ahras. Mémoire de Master. Université de Souk Ahras. 109p.
- 📖 **Allali A. (2004) :** Contribution à la cartographie de la qualité physico-chimique et biologique de l'eau des zones humides de la Numidie. Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar d'Annaba. 111p.
- 📖 **Aouissi A., Fouzari A. et Meziane N. (2007) :** Qualité bactériologique de l'eau d'Oued Seybouse. Mémoire d'ingénieur. Université 8 mai 1945 Guelma. 57p.
- 📖 **Atoussi S. (2008) :** Ecologie des canards plongeurs dans la Garaet Hadj Tahar (Ben Azouz, Skikda). Mémoire de Magister. Université 8 mai 1945 de Guelma. 68p.
- 📖 **Atoussi S. (2014) :** Etude des rythmes d'activité diurne des Fuligules Hivernants dans la Garaet Hadj Tahar (Skikda, Nord-est Algérien). Université 8 mai 1945 de Guelma. Thèse de doctorat. 67p.

- 📖 **Bagnouls F. et Gaussen H. (1957) :** Les climats biologiques et leurs classifications. Annales de Géographie. France. Vol. 66. N° 355. p 193-220.
- 📖 **Barnaud G. et Fustec E. (2007) :** Conserver les zones humides : pourquoi ? Comment ? *Quae*. 296p.
- 📖 **Bazine N. et Bourenane A. (2011) :** Evaluation de la qualité bactériologique des eaux de l'Oued Messida (Parc National d'EL Kala, W. d'EL Taref). Université 08 mai 1945 de Guelma. 18- 49p.
- 📖 **Belabed B. (2010) :** La pollution par les métaux lourds dans la région d'Annaba source de contamination des écosystèmes aquatiques. Mémoire de Doctorat en sciences de la mer. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 176p.
- 📖 **Berche P., Gaillard J-L. et Simouet M. (1988) :** Bactériologie, Les Bactéries Des Infections Humaines. *Flammarion Médecine Sciences*. 660p.
- 📖 **Borrego A.F. et Romero P. (1982):** Study of microbiological pollution of a Malaga littoral area II. Relationship between fecal coliforms and fecal streptococci. VIè journée étude pollutions, Cannes, France, 561-569p.
- 📖 **Bouchaala L. (2010) :** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued Zenati (Guelma). Mémoire de Magister. Université de 08 Mai 1945 de Guelma. Algérie. 135p.
- 📖 **Boukrouma N. (2008) :** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel: cas de la retenue collinaire d'Ain Fakroune (W. d'Oum El-Bouaghi). Mémoire de Magister. Université 8 mai 1945 de Guelma. 64p.
- 📖 **Boulkhssaim M. (2009) :** Ecologie du tadorne dans les zones humides des hautes plaines de l'Est Algérien. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. 134p.
- 📖 **Boumezbeur A. (2000) :** Atlas des zones humides algériennes. DGF. 68p.
- 📖 **Boumezbeur A. (2002) :** Atlas des zones humides algériennes. DGF. 55p.

- 📖 **Boumezbeur A. (2004)** : Atlas des zones humide Algérienne d'importance internationale. DGF.107p.
- 📖 **Bouregois C-M. et Leveau J-Y. (1980)** : Technique D'analyse Et De Contrôle Dans Les Industries Agro-alimentaire. T<sub>3</sub>. *Apria*. 331p.
- 📖 **Buchanan R-E. et Gibbons N.E. (1974)** : Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> edition. *Williams & Wilkins*. 1246p.
- 📖 **Bugnicourt M. (1983)** : Dictionnaire de microbiologie générale : La vie racontée par les bactéries. *Edition Ellipses*. 699p.
- 📖 **Bureau national des études forestières (BNEF), (1985)** : Etude du parc national d'El Kala. Schéma directeur d'aménagement. Algérie. 86p.
- 📖 **Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A. (1988)** : Bactériologie médicale techniques usuelles. *Méd. Mal. Inf. France*. 251p.
- 📖 **Collaboration Européenne (2008)**.
- 📖 **Dajoz R. (2000)** : Précis d'écologie: Cours et exercices résolus. 7<sup>ème</sup> édition. *Dunod*, Paris. 613p.
- 📖 **Degremont (1998)** : Mémento technique de l'eau 8<sup>ème</sup> édition. *Tec et Doc*. Paris 986p.
- 📖 **Degremont (2005)** : Mémento technique de l'eau. 10<sup>ème</sup> édition. *Tec et Doc*. Paris 144-173p.
- 📖 **Delarras C. (2000)** : Microbiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique. *Gaëtan morin*. 117p.
- 📖 **Delarras C. et Trébaol B. (2003)** : Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation - prélèvements - analyses. *Lavoisier : Tec & Doc*. Paris. 476p.
- 📖 **Delarras C. (2007)** : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. *Lavoisier : Tec & Doc*. Paris. 463 p.
- 📖 **Delarras C. (2008)** : surveillance sanitaire Et Microbiologique des eaux : Règlementation-Prélèvements-Analyses. *TEC & DOC*. 269p.

- 📖 **Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. (2007) :** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. *Elsevier Masson*. 573 p.
- 📖 **Derwich E., Beziane Z., Benaabidate L. et Belghyti D. (2008):** Evaluation de la qualité des eaux de surface des oueds Fès et Sebou utilisées en agriculture maraichère au Maroc. *Larhyss Journal*. (7). 59-77p.
- 📖 **D.E.S. (2013).** Direction de l'environnement de skikda.
- 📖 **D.G.F. (2001) :** Atlas des zones humides algériennes d'importance internationale. 56p.
- 📖 **Djebaili S. (1984) :** Steppe algérienne, phytosociologie et écologie. O.P.U. Alger. 171p.
- 📖 **Emberger L. (1955) :** Une classification biogéographique des climats. *Rev. Trac. Bot. Géol. Zool. Fase. Sci.* Montpellier. France. 343p.
- 📖 **Euzéby J. P. (2007) :** Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. France. 20p.
- 📖 **Fustec É. et Lefeuvre J-C. (2000) :** Fonctions et valeurs des zones humides. Volume 8. 426 : 279-280p.
- 📖 **Gantzer C., Lucena F., Schwartzbord L. et J. (1998) :** Virologie. Volume 2, N° 2. 117p.
- 📖 **Gillespie S. H. et Hawkey P. M. (2006):** Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2<sup>nd</sup> edition. *John Wiley & Sons*. England. 620p.
- 📖 **Gueddah D. (2003) :** Évaluation de la pollution industrielle et urbaine dans la région de Skikda : impact sur l'écosystème marin côtier. Université Badji Mokhtar d'Annaba. 114p.
- 📖 **Gueroui Y. (2015) :** Caractérisation hydrochimique et bactériologique des eaux souterraines de l'aquifère superficiel de la plaine de Tamlouka (Nord-Est Algérien). Thèse de doctorat. Université 08 Mai 1945 de Guelma. Algérie. 161p.
- 📖 **Guiraud J. P. (1998):** Microbiologie alimentaire. *Dunod*. France. 652p.

- 📖 **Halassi I. (2009)** : Degré de contamination du Lac des Oiseaux et contribution à l'étude du pouvoir auto épurateur de l'eau : Isolement et étude de *Bdellovibrio bacteriovorus*. Mémoire de Master. Université 08 Mai 1945 de Guelma. 135p.
- 📖 **Harrat N. et Achour S. (2010)** : Pollution physicochimique des eaux de barrage de la région d'El Tarf, impact sur la chloration. *Larhyss Journal*. N° 08. 54 p.
- 📖 **Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement (2005)** : Qualité physico-chimique des eaux de surface: cadre général. 16p.
- 📖 **Lebres E. (2002)** : Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments (Microbiologie des eaux, des boissons et des produits de la mer). Institut Pasteur d'Algérie. 34p.
- 📖 **Lebres E. (2004)** : Identification biochimique des micro-organismes, Institut Pasteur d'Algérie.
- 📖 **Lebres E. (2006)** : Manuel des travaux pratique : analyse des eaux, Institut Pasteur d'Algérie. 60p.
- 📖 **Lebres et Mouffok F. (2008)** : Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. 53p.
- 📖 **Leclerc H. et coll. (1983)** : Microbiologie générale. *Doin* .369 p
- 📖 **Ledant, J.P., Jacobs, J.P., Jacobs, P., Malher, F., Ochando, B. et Roché, J. (1981)** : Mise à jour de l'avifaune algérienne. *Gerfault*, 71: 295-398.
- 📖 **Leminor L. et Veron M. (1989)** : Bactériologie Médicale. Flammarion Médecine Sciences. 845p.
- 📖 **Lightfoot N. F. (2002)** : Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. 387p.
- 📖 **Mamadou L-N. (2005)** : Impacts des eaux usées sur l'évolution chimique et microbiologique des sols : étude de cas à Pikine (Dakar-Sénégal). Diplôme

d'étude supérieure en sciences naturel de l'environnement. Université de Badji Mokhtar, Annaba, 120p.

📖 **Merzoug S. (2009)** : Etude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'écosystème lacustre Garaet Hadj-Taher (benazzouz, Wilaya Skikda). Mémoire de Magister. Université 08 mai 1945 de Guelma. 119p.

📖 **Merzoug S. (2015)** : Structure du Fuligule nyroca *Aythya nyroca* dans les zones humides du littoral Est de l'Algérie : Statut et description des habitats. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. 101p.

📖 **Merabet S. (2011)** : Etude comparative de deux systèmes aquatiques dans le Sahara septentrional (Chott Merouane et Ain El Beida), environnement et signes de dégradation. Thèse de Magister en Biologie. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 171p.

📖 **Metallaoui S. (2010)** : Ecologie de l'avifaune aquatique hivernante dans Garaet Hadj-Tahar (Numidie occidentale, Nord-Est de l'Algérie). Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. Université Badji Mokhtar d'Annaba. 120p.

📖 **Monod T., (1989)**. Méharées géographiques (N.A.N.I) normes Algérienne et normes international (2002). *France loisir*. 233p.

📖 **Normand M. (2007)** : Application de la spectrophotométrie ultraviolette à la caractérisation d'eaux naturelles du Québec. Mémoire en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M.env.).135p.

📖 **Ouanouki B., Abdellaoui N. et Ait Abdallah N. (2009)**: Application in agriculture of treated wasterwater and sludge from a treatment station. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 27. N° 4. France. 602 - 619 p.

📖 **Ozenda P. (1982)** : Les végétaux dans la biosphère. *Doin*. Paris, 431p.

📖 **Patrick R., Murray K., Rosenthal S. et Michael A. P. (2009)**: Medical Microbiology. 6<sup>th</sup> edition. *Mosby Elsevier*. Canada. 960 p.

📖 **Pechère J. C., Acar J., Grenier B. et Nihoul E. (1982)** : Reconnaître, comprendre et traité les infections. 4<sup>ème</sup> édition. Edisem ST-Hyacinthe. *Québec*. Canada. 509 p.

- 📖 **Pilet C., Bourdon J. L., Toma B., Marchal N., Balbastre C. et Person J. M. (1987) :** Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne. *Doin*. France. 371p.
- 📖 **Prescott H. (2003) :** Microbiologie. *De Book & Larciens*. 842p.
- 📖 **Regam A. (2010) :** Evaluation de la Qualité Physico – Chimique et Bactériologiques des Eaux Potables : Cas de la Station de Traitement de Hammam Debagh–Guelma. Mémoire de Master. Université de 08 Mai 1945 Guelma. 75p.
- 📖 **Rejsek F. (2002) :** Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358p.
- 📖 **Rodier J., Bournaud M., Broutin J-P., Geoffray Ch., Kovacsik G., Laporte J., Pattee E., Plissier M., Rodi L. et Vial J. (1984) :** l'analyse de l'eau : eau naturelles, eau résiduaires, eaux de mer. 7<sup>ème</sup> édition. *Dunod*. Paris.1365p.
- 📖 **Rodier J., Bazin C., Broutin J-P., Chambon P., Champsaur H. et Rodi L. (1996) :** L'analyse de l'eau : eau naturelles, eau résiduaires, eaux de mer. 8<sup>ème</sup> édition. *Dunod*. Paris.1365p.
- 📖 **Rodier Jean et coll. (2005) :** l'analyse de l'eau : eau naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8<sup>ème</sup> édition. *Dunod*. Paris. 749-847p.
- 📖 **Rodier J., Legube B., Marlet N., et coll. (2009) :** L'Analyse de l'eau. 9<sup>ème</sup> édition. *Dunod*. Paris. 1579p.
- 📖 **Rouaiguia M. et Cheriet M. (2010):** Qualité microbiologique des eaux de Oued Messida (Wilaya d'El-Taraf). Mémoire de master. Université 8 mai 1945 de Guelma. 78p.
- 📖 **Roux. (1987):** Office international de l'eau. L'analyse biologique de l'eau. *TEC&DOC*. Paris. 229p.
- 📖 **Roux. (2003) :** TP de microbiologie : Analyses de l'eau. *IUP SIAL*. Université de Paris. 12p.
- 📖 **Samraoui B. et De Belair G. (1997) :** The Guerbes-Sanhadja wetlands: Part I. *Overview*. *Ecologie*. 28: 233-250p.

- 📖 **Savary P. (2010)** : Guide des analyses de la qualité de l'eau. *Voiron Cedex*. Bresson. 264p.
- 📖 **Sayad L. (2008)** : Qualité physicochimique et bactériologique des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux. Mémoire de Magister. Université d'Annaba. 118p.
- 📖 **Singleton P. (1999)**: Bacteria in Biology. Biotechnology and Medicine. 4<sup>th</sup> edition. John Wiley and Sons. *Chichester*. Etat Unis. 233p.
- 📖 **Singleton P. (2005)** : Bactériologie. *Dunod*. 6<sup>ème</sup> édition. Paris. France. 542p.
- 📖 **Soltner D. (1999)** : Les Bases De La Production Végétale. Sciences & Techniques Agricoles, Tome 2. France. 396p.
- 📖 **Toubal et Boumaza O. (1986)** : Phytoécologie, biogéographie et dynamique des principaux groupements végétaux du massif de l'Edough (Algérie Nord - Orientale). Thèse de Doctorat. Université des sciences et technologie méditerranéenne de Grenoble. 110p.
- 📖 **Toubal O., Boussehaba A., Toubal A. et Samraoui B. (2014)** : Biodiversité méditerranéenne et changements globaux : cas du complexe de zones humides de Guerbès-Senhadja (Algérie). *Physio-Géo*.19p.

### Webographie

- 📖 **Google earth, (2013)**. Europa Technologies. Tele Atlas. [www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)

Date de consultation : 05/05/2015 à 15:56

La pollution des eaux est une notion qui est en constante évolution. Elle constitue aujourd'hui une véritable menace pour l'environnement et bien sur pour la santé de l'homme.

Guebès-Senhadja est un complexe des zones humides d'importance majeure qui constitue un réservoir de biodiversité faunistique et floristique ce qui a fait qu'il soit inscrit dans la liste de la convention de RAMSAR qui vise à protéger ce type d'écosystème. Ces zones humides sont représentées ici par Garaet Chichaya, Garaet Sidi Makhlouf et Garaet El-Guelb.

Au cours de notre étude réalisée pendant les deux mois (Mars et Avril) le dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale a montré des concentrations plus ou moins élevées en coliformes et en streptocoques fécaux, ainsi que la présence de quelques germes pathogènes (*Serratia*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*... etc.) à la majorité des stations.

Enfin, on constate que ces écosystèmes sont largement pollués et cela due surtout à l'élevage intensif, l'agriculture ainsi que la présence d'énorme nombre d'oiseaux d'eau dans ces sites. Donc il serait important de ne pas exploiter l'eau de ces sites afin de maintenir son équilibre, aussi d'éloigner les zones de pâturage à des endroits qui ne cause pas des dangers et des perturbations environnementales.

**Mots clés :** Complexe de Guerbes-Sanhadja, zones humides, contamination fécale, germe pathogène, pollution.

The water pollution is a concept, which is in constant evolution. Today it constitutes a true threat for the environment and well on the health of the man.

Guebès-Senhadja it is a complex of wetlands, it is the major importance which consists of biodiversity fauna and floristry which make him registered in the list of the Ramsar Convention, which aims to protect such ecosystems. This wetlands represented here by Garaet Chichaya, Garaet Sidi Makhlouf and Garaet El-Guelb.

In our study for two months (March and April) the enumeration of fecal contamination indicators showed concentrations higher on coliform and fecal streptococci and the presence of some pathogens (*Serratia*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*...etc..) at most stations.

Finally, we note that these ecosystems are highly polluted and this especially due to intensive farming, agriculture and the presence of huge numbers of waterfowl in these sites. So, don't use the water of these sites for making a balance, also away from grazing areas to places that do not cause hazards and environmental disturbances

**Keywords:** Complex Guebès-Senhadja, wetlands, fecal contamination, pathogen, pollution.

إن تلوث المياه هو مفهوم دائم التطور. أصبح يشكل في يومنا هذا خطرا حقيقيا يهدد البيئة ومن ثمة صحة الإنسان.

قرباز صنهاجة هو مجمع للمناطق الرطبة ذات أهمية بالغة لكونه يشكل موطنًا للتنوع البيولوجي الحيواني و النباتي حيث تم تسجيله في قائمة اتفاقية رامسار، التي تهدف إلى حماية هذه النظم الايكولوجية. ه ذه المناطق الرطبة ممثلة هن بقو عة شيشاية، قرعة سيدي مخلوف وقرعة القلب.

خلال دراستنا الممتدة لشهرين (مارس وأفريل) اظهر عد مؤشرات التلوث الهوازي الذي اجري، تركيزات عالية من القولونيات البرازية والعقديات، ووجود مسببات الأمراض (السرآتية، المكورات العنقودية، الغازية، ... الخ) في جميع المحطات.

وأخيرا نستخلص أن هذه النظم الإيكولوجية تعاني من تلوث كبير و يرجع ه ذا خصوصا إلى الرعي المكثف، الزراعة والأعداد الهائلة للطيور المائية الموجودة في ه ذه المواقع. لذلك يبقى عدم استغلال مياه ه ذه البحيرات و تخصيص أماكن للرعي من أهم الحلول لاجتناب كل الاضطرابات البيئية.

**الكلمات المفتاحية :** مجمع قرباز صنهاجة، المناطق الرطبة، الأراضي الرطبة، التلوث البرازي، الجراثيم الممرضة، التلوث.

Tableau 03: Nature et période de prélèvement.

Site	Station	Périodes des prélèvements	Heures	Nature de prélèvement	Les analyses effectuées
Chichaya	S1	14/03/2015	10h 20	Eau	Bactériologique et physicochimique
	S2		11h 00		
Sidi makhlouf	S3		11h 35		
	S4		12h 00		
El Guelb	S5		12h 35		
	S6		13h 10		
Chichaya	S1	15/04/2015	12h 00		
	S2		12h 40		
Sidi makhlouf	S3		13h 00		
	S4		13h 17		
El Guelb	S5		13h 58		
	S6		14h 25		

Tableau 02: caractéristique des points de prélèvements.

Stations		Coordonnées géographiques	Distance	Profondeur	superficie
Chichaya	1	X : 36°53'48,34 N Y : 7°18'08,87 E Z : 10 m	1,5 m	110 cm	50 ha
	2	X : 36°53'47,82 N Y : 7°18'12 ,18 E Z : 11 m	10 m	70 cm	
Sidi Makhlouf	3	X : 36°53'06,45 N Y : 7°18° 18,67 E Z : 14 m	3 m	105 cm	50 ha
	4	X : 36° 53'03,88 N Y : 7°18' 20 ; 02 E Z : 14 m	7 m	87 cm	
El Guelb	5	X : 36° 53'07,48 N Y : 7°18° 27,25 E Z : 13 m	3 m	95 cm	15 ha
	6	X : 36° 53'03,62 N Y : 7°18° 35,06 E Z : 11 m	4 m	78 cm	

Tableau 04 : Tableau de Mac GRADY (Mouffok, 2001).

<i>3 tubes par dilution</i>					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

**Tableau 05: Caractères d'identification biochimique de *Shigella* (Sayad, 2008).**

<b>Milieu</b>	<b>Tests</b>	<b><i>Shigella</i></b>
<b>TSI</b>	Glucose	+
	Lactose	-
	Saccharose	-
	H <sub>2</sub> S	-
	Gaz	-
<b>Mannitol – mobilité</b>	Mobilité	-
<b>Urée – indole</b>	Uréase	-
	TDA	-
<b>Citrate de Simmons</b>	Citrate	-

Tableau 07: Lecture de l'API 20 E.

Tests	Composants	QTE (mg/cup.)	Réactifs / Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- $\beta$ Dgalactopyranoside	0,223	$\beta$ -galactosidase (Ortho NitroPhényl- $\beta$ DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
CIT	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H <sub>2</sub> S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat	
				jaune	marron- rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incolore / rose pâle	rose / rouge
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation oxydation(GLUcose)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitrol)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitrol)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitrol)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAMnrose)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Tableau 08: Lecture de l'API 20 NE.

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO <sub>3</sub>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 5 mn</b>	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	<b>ZN / 5 mn</b>	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	<b>TRP / 3-5 mn</b>	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose Fermentation	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βDgalactopyranoside	β-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-pphenylène diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

Tableau 09: Lecture de l'API 20 Staph.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				Négatif	Positif
<b>0</b>	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
<b>GLU</b>	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge	jaune
<b>FRU</b>	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
<b>MNE</b>	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
<b>MAL</b>	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
<b>LAC</b>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
<b>TRE</b>	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
<b>MAN</b>	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
<b>XLT</b>	Xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
<b>MEL</b>	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
<b>NIT</b>	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</b>	
				incolore-rose pâle	rouge
<b>PAL</b>	$\beta$ -naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<b>ZYM A + ZYM B / 10 min</b>	
				jaune	violet
<b>VP</b>	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<b>VP 1 + VP 2 / 10 min</b>	
				incolore-rose pâle	violet-rose
<b>RAF</b>	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	rouge	jaune
<b>XYL</b>	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
<b>SAC</b>	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
<b>MDG</b>	méthyl- $\alpha$ Dglucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl- $\alpha$ DGlucopyranoside)		
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<b>ADH</b>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<b>URE</b>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

**Tableau 10: Evaluation de la température dans nos sites d'étude.**

	Station1	Station2	Station3	Station4	Station5	Station6
<b>Mars</b>	15°C	15.5°C	15.8°C	17.2°C	18°C	17.9°C
<b>Avril</b>	23.4°C	24.6°C	22.6°C	22.8°C	23.3°C	25°C

**Tableau 11: Evaluation du pH dans nos sites d'étude.**

	Station1	Station2	Station3	Station4	Station5	Station6
<b>Mars</b>	7.74	7.60	7.60	7.31	8.03	7.86
<b>Avril</b>	7.74	8.02	7.44	7.48	7.97	9.88

**Tableau 12: Evaluation de la conductivité électrique dans nos sites d'étude.**

	Station1	Station2	Station3	Station4	Station5	Station6
<b>Mars</b>	301µS/cm	302µS/cm	227µS/cm	222µS/cm	385µS/cm	390µS/cm
<b>Avril</b>	326µS/cm	315µS/cm	236µS/cm	232µS/cm	403µS/cm	404µS/cm

**Tableau 13: Evaluation de l'oxygène dissous dans nos sites d'étude.**

	Station1	Station2	Station3	Station4	Station5	Station6
<b>Mars</b>	8 mg/l	8.60 mg/l	7.14 mg/l	7.02 mg/l	6.5 mg/l	7.2 mg/l
<b>Avril</b>	7.63 mg/l	7.01 mg/l	8 mg/l	5.12 mg/l	5 mg/l	3.1 mg/l

**Tableau 14: analyse descriptive des bactéries des eaux de nos sites d'étude (Mars 2015).**

	GT (22°C)	GT (37°C)	CT	CF	SF	ASR
<b>Station 1</b>	1500	1200	45000	7500	7500	14
<b>Station 2</b>	1600	1000	9500	3500	2500	3
<b>Station 3</b>	200	150	45000	950	1500	14
<b>Station 4</b>	1400	980	250000	1500	2500	18
<b>Station 5</b>	680	530	95000	95000	7500	2
<b>Station 6</b>	1800	970	350000	95000	20000	-

**Tableau 15: analyse descriptive des bactéries des eaux de nos sites d'étude (Avril 2015).**

	<b>GT (22°C)</b>	<b>GT (37°C)</b>	<b>CT</b>	<b>CF</b>	<b>SF</b>	<b>ASR</b>
<b>Station 1</b>	1800	1300	250000	9000	70000	28
<b>Station 2</b>	1700	1200	45000	7500	7500	-
<b>Station 3</b>	390	310	200000	1600	3500	12
<b>Station 4</b>	1500	1100	450000	7500	4000	33
<b>Station 5</b>	880	970	450000	250000	45000	5
<b>Station 6</b>	1900	1200	450000	350000	75000	45

**Tableau 16 : Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température (Monod, 1989).**

Température	Qualité	Classe
<20°C	Normale	1A
20°C-22°C	Bonne	1B
22°C-25°C	Moyenne	2
25°C-30°C	Médiocre	3
>30°C	Mauvaise	4

**Tableau 17: La grille de la qualité des eaux des rivières selon la conductivité électrique (Monod, 1989).**

Conductivité électrique CE20°C (µS/cm)	Qualité des eaux	Classe
CE20°C < 400	Bonne	1A
400 < CE20°C < 750	Bonne	1B
750 < CE20°C < 1500	passable	2
1500 < CE20°C < 3000	médiocre	3

**Tableau 18: La grille de la qualité des eaux en fonction de l'Oxygène dissous (Monod, 1989).**

Oxygène dissous (mg/l) Oxygène de saturation (%)	Qualité des eaux	classe
> 7 mg/l → >90%	Normale	1A
entre 5 et 7mg/l 70% à 90%	Bonne	1B
entre 3 et 5 mg/l 50% à 70%	Moyenne	2
< 3mg/l < 50%	Médiocre	3

## Milieux utilisés

### [M1]- Eau peptonée exempte d'indole : pH = 7.2

Peptone exempte d'indole aquatique .....	10 g/l
Chlorure de sodium aquatique.....	5 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [M2]- Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol S/C (BCPL) : pH = 6.9

Peptone .....	5 g/l
Extrait de viande .....	5 g/l
Lactose .....	5 g/l
Pourpre de bromocrésol .....	0.025 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [M3]- Milieu de Rothe S/C : pH = 6.8

Tryptone .....	20 g/l
Glucose .....	5 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l
Phosphate bi potassique .....	2.7 g/l
Phosphate mono potassique .....	2.7 g/l
Acide de sodium .....	0.2g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [M4]- Milieu Schubert : pH = 7.4

Tryptophane .....	0.4 g/l
Acide glutamique .....	0.4 g/l
Sulfate de magnésium .....	1.4 g/l
Sulfate d'ammonium .....	0,4 g/l
Citrate de sodium .....	0,5 g/l
Chlorure de sodium .....	4,0 g/l
Peptone .....	20,0 g/l
Mannitol .....	1.5 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### [M5]- Milieu de litsky : pH = 6.8

Peptone .....	20 g/l
Glucose .....	5 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l
Phosphate bi potassique .....	2.7 g/l
Azothvate de sodium .....	0.3 g/l
Ethyle- vliote .....	5 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M6]- Bouillon nitrate : pH = 7.2**

Infusion cœur-cerveille.....	25.0 g/l
Nitrate de sodium .....	10.0 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M7]- Clark et Lubs (Bouillon) : pH = 7.5**

Peptone .....	5.0 g/l
Glucose .....	5.0 g/l
Hydrogénophosphate de potassium .....	5.0 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M8]- Eau Peptonée Alcaline (EPA) : pH = 8.6**

Peptone .....	20 g/l
Sodium chlorure .....	30 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M09]- Gélose tryptone- glucose- extract agar (TGEA): pH = 7**

Tryptone .....	5 g/l
Glucose.....	1 g/l
Extrait de levure .....	2.5 g/l
Gélose.....	15 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M10]- Chapman: pH = 7. 5**

Peptone bactériologique .....	10 g/l
Extrait de viande de bœuf .....	1 g/l
Chlorure de sodium .....	75 g/l
Mannitol .....	10 g/l
Rouge de phénol .....	0.025 g/l
Agar .....	15 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M11]- Mac conkey: pH = 7.1**

Peptone bactériologique .....	20 g/l
Sels biliaires .....	1.5 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l
Lactose .....	10 g/l
Rouge neutre .....	0.03 g/l
Cristal violet .....	0.001 g/l
Agar .....	15 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M12]- Gélose viande foie (VF) : pH = 7.1**

Peptone pepsique de viande et de foie .....	30 g/l
Glucose.....	2 g/l
Peptone de gélatine.....	16.0 g/l
Peptone de caséine .....	10.0 g/l
Bromure de tétradonium (cétrimide) .....	0.2 g/l
Acide nalidixique .....	15.0 mg/l
Sulfate de potassium.....	10.0 g/l
Chlorure de magnésium .....	1.4 g/l
Agar .....	10 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M13]- Milieu Hektoen : pH = 7.5**

Peptone pepsique de viande .....	12 g/l
Extrait de levure .....	3 g/l
Sels biliaires .....	9 g/l
Lactose .....	12 g/l
Saccharose .....	12 g/l
Salicine .....	2 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l
Hyposulfite de sodium .....	5 g/l
Citrate de fer ammoniacal .....	1.5 g/l
Bleu de bromothymol.....	0.0064 g/l
Fushine acide.....	0.04 g/l
Gélose .....	14 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M14]- Gélose *Salmonella-Shigella* (SS) : pH = 7**

Extrait de viande de bœuf .....	5 g/l
Bio-polytone.....	5 g/l
Sels biliaires .....	8.5 g/l
Lactose .....	10 g/l
Citrate de sodium .....	8.5 g/l
Thiosulfate de sodium .....	8.5 g/l
Citrate ferrique .....	1 g/l
Vert brillant.....	0.330 mg/l
Rouge neutre .....	0.025 g/l
Agar.....	13.5 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M15]- Gélose Cétrimide : pH = 7,1**

Peptone de gélatine .....	16 g/l
Peptone de caséine .....	10 g/l
Bromure de tétradonium (cétrimide) .....	0.2 g/l
Acide nalidixique .....	15 mg/l
Sulfate de potassium.....	10 g/l
Chlorure de magnésium .....	1.4 g/l

Agar ..... 10 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

**[M16]-Gélose GNAB : pH = 8.6**

Peptone ..... 10 g/l  
Extrait de viande ..... 3 g/l  
Chlorure de sodium ..... 5 g/l  
Bile de bœuf ..... 2 g/l  
Agar ..... 8.6 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

**[M17]- King A: pH = 7.2**

Peptone dite "A" ..... 200 g/l  
Glycérol ..... 10 g/l  
Sulfate de potassium ..... 10 g/l  
Chlorure de magnésium ..... 1.4 g/l  
Agar ..... 12 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

**[M18]- King B: pH = 7. 2**

Peptone dite "B" ..... 20 g/l  
Glycérol ..... 10 g/l  
Hydrogénophosphate de potassium ..... 1.5 g/l  
Sulfate de magnésium heptahydraté ..... 1.5 g/l  
Agar ..... 12 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

**[M19]- Citrate de Simmons : pH = 7.1**

Citrate de sodium ..... 1 g/l  
Bleu de bromothymol ..... 0.08 g/l  
Chlorure de sodium ..... 5 g/l  
Sulfate de magnésium ..... 0.2 g/l  
Hydrogénophosphate de potassium ..... 1 g/l  
Dihydrogénophosphate d'ammonium ..... 1 g/l  
Agar ..... 15 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

**[M20]- TSI (gélose glucose – lactose – saccharose - H<sub>2</sub>S): pH = 7**

Peptone ..... 15 g/l  
Extrait de viande ..... 3 g/l  
Extrait de levure ..... 3 g/l  
Peptone pepsique de viande ..... 5 g/l  
Glucose ..... 1 g/l  
Lactose ..... 10 g/l  
Saccharose ..... 10 g/l  
Rouge de phénol ..... 0.024 g/l

Chlorure de sodium .....	5 g/l
Sulfate de fer II (Pasteur) .....	0.2 g/l
Thiosulfate de sodium .....	0.3 g/l
Agar .....	11 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M21]- Milieu mannitol-mobilité : pH = 7.4**

Peptone trypsique de viande .....	20 g/l
Mannitol .....	2 g/l
KNO <sub>3</sub> .....	1 g/l
Rouge de phénol 1% .....	4 ml
Agar .....	4 g/l
Eau distillée .....	1000 ml

**[M22]- Milieu SFB**

Formule approximative par litre

Digestion pancréatique de caséine.....	5,0 g/l
Lactose.....	4,0 g/l
Sélénite de sodium.....	4,0 g/l
Phosphate de sodium.....	10,0 g/l

**[M23]- Milieu Urée-Indole :pH final : 6.7 + /-0.2 à 25°C**

En grammes par litre d'eau

L-Tryptophane .....	3,00g/l
Phosphate monopotassique .....	1,00g/l
Phosphate dipotassique .....	1,00g/l
Chlorure de sodium .....	5,00g/l
Urée .....	20,00g/l
Rouge de Phénol à 1% .....	2,50 ml
Alcool à 95% .....	10,00 m

## Réactifs utilisés

**[R1]- Réactif de Voges Proskauer (VP):** Pour la recherche de l'acétoïne.

### VP1:

Hydroxyde de potassium ..... 40 g  
Eau distillée ..... 100 ml

### VP2:

Alpha naphthol ..... 6 g  
Ethanol ..... 100 ml

**[R2]- Réactif de Kowacks :** La mise en évidence de la production d'indole.

Paradiméthylaminobenzaldéhyde..... 5 g  
Alcoolamylique ..... 75 ml  
HCl pur ..... 25 ml

**[R3]-Réactif TDA :** pour la recherche de tryptophane désaminase.

Perchlorure de fer..... 3.4 g  
Eau distillée.....100ml

## Les colorants utilisés

### **[C1]- Violet de gentiane**

Violet de gentiane ..... 1 g/l  
Ethanol à 90% ..... 10 ml/l  
Phénol ..... 2 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

### **[C2]- Lugol**

Iode ..... 1 g/l  
Iodure de potassium ..... 2 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml

### **[C3]- Fushine**

Fushine basique ..... 1 g/l  
Alcool éthylique ..... 100 ml/l  
Phénol ..... 5 g/l  
Eau distillée ..... 1000 ml



Meradi Safa



MEMOIRE Pour l'obtention d'un Diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

**Evaluation de la qualité bactériologique des eaux des zones humides de l'éco-complexe de Guerbès-Sanhadja (Wilaya de Skikda, Nord – Est algérien).**

# RESUME

La pollution des eaux est une notion qui est en constante évolution. Elle constitue aujourd'hui une véritable menace pour l'environnement et bien sûr pour la santé de l'homme.

Guerbès-Senhadja est un complexe des zones humides d'importance majeure qui constitue un réservoir de biodiversité faunistique et floristique ce qui a fait qu'il soit inscrit dans la liste de la convention de RAMSAR qui vise à protéger ce type d'écosystème. Ces zones humides sont représentées ici par Garaet Chichaya, Garaet Sidi Makhlouf et Garaet El-Guelb.

Au cours de notre étude réalisée pendant les deux mois (Mars et Avril) le dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale a montré des concentrations plus ou moins élevées en coliformes et en streptocoques fécaux, ainsi que la présence de quelques germes pathogènes (*Serratia*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*... etc.) à la majorité des stations.

Enfin, on constate que ces écosystèmes sont largement pollués et cela due surtout à l'élevage intensif, l'agriculture ainsi que la présence d'énorme nombre d'oiseaux d'eau dans ces sites. Donc il serait important de ne pas exploiter l'eau de ces sites afin de maintenir son équilibre, aussi d'éloigner les zones de pâturage à des endroits qui ne cause pas des dangers et des perturbations environnementales.

**Mots clés :** Complexe de Guerbès-Sanhadja, zones humides, contamination fécale, germe pathogène, pollution.

## MEMBRES DU JURY :

Présidente	: Mme. Messiad R.	(M.A.A)	Université de Guelma
Promoteurs	: Mr. Houhamdi M.	(Pr.)	Université de Guelma
	Melle. Abdi Soumia.	Doctorante	Université de Souk Ahras
Examinatrice:	Mme. Sansri S.	(M.A.A)	Université de Guelma