

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université 08 Mai 45 Guelma Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de : Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'Etude
Pour l'obtention du diplôme de master
Biologie

Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes

***Contrôle microbiologique des eaux du
lac Oubeira (El-Taref)***

Présenté par :

- Layeb Nedjoua
- Saioudi Ahlem

Devant le jury composé de :

- Président : Pr. HOUHAMDI. M (Université de Guelma)
- Coencadreur : M^{me} BIDIOUI. S (M.A.A. Univ de Guelma)
- Promoteur : M^{me} YOUZMANE. R (M.A.A. Univ de Guelma)

Juin 2013

La pollution de l'eau est considérée comme le plus préoccupant des problèmes environnementaux et pourtant les causes de ce phénomène sont pour la plupart identifiées. En effet, pendant longtemps, des études ont affirmé que les eaux de surface étaient pures elles s'auto nettoient grâce aux bactéries aérobies et anaérobies.

La pollution microbiologique des eaux de surface par des agents pathogènes est un problème qui remonte très loin dans le temps. Au cours de ces dernières années, les maladies d'origine hydrique ont été responsables de vaste épidémies, liés d'une part à la consommation de la faune et d'autre part à la baignade [36].

L'Oubeïra est un lac endoréique d'eau douce de surface, permanent, situé dans un complexe de zones humides Algériennes, réservé par la convention de RAMSAR. Ces eaux qui font l'intérêt de notre étude, abritent une faune et une flore diversifiées, mais elles ne sont pas épargnées par la pollution surtout d'origine organique. Cette dernière présente une des principales causes de développement d'une flore microbienne importante. Cette biomasse microbienne qui se multiplie dans les eaux de surface est le point de départ d'une chaîne trophique au sein de laquelle on observe la multiplication de protozoaires, consommateurs de bactéries, mais aussi véhicules potentiels de microorganismes pathogènes.

Notre travail s'inscrit dans cette perspective, dont l'objectif est l'isolement et l'identification d'une microflore variée (Bactéries et champignons) existante dans les eaux du lac Oubeira.

1. Les eaux de surface

L'eau de surface désigne une eau, telle que le ruissellement, qui reste à la surface du sol et qui peut être stockée en étangs ou autres ouvrages de retenue. Elle résume la collecte de l'eau souterraine ou d'eau atmosphérique. L'eau de surface est de l'eau qui s'accumule sur le sol ou dans un cours d'eau, le lit d'une rivière, un lac, une zone humide, une mer ou un océan.

Par définition, les eaux de surface sont tirées des lacs, rivières, chutes d'eau et de la mer. Elles jouent le plus grand rôle de formation de l'hydrosphère sur Terre. Cette eau de surface est naturellement alimentée par les précipitations et naturellement perdue par l'évaporation et l'infiltration souterraine dans le sol. Bien qu'il existe d'autres sources d'eaux souterraines, tels que l'eau fossile et l'eau magmatique, les précipitations sont le principal apporteur d'eaux de surface et les eaux souterraines proviennent de cette façon est plutôt appelée eau météorique [7].

2. Description d'un lac

2.1. Les différentes parties des lacs

2.1.1. Zone littorale

La zone littorale est la bande peu profonde en bordure du lac dans laquelle se trouve la végétation enracinée, la zone littorale est appelée la zone limnique où la production primaire est assurée par les algues unicellulaire flottantes, aussi appelées phytoplancton [10].

2.1.2. Zone pélagique (sublittoral)

La zone sublittorale est une zone de changements : de la température, de l'oxygène, de la répartition des algues, c'est donc une zone où la densité de macro invertébrée se réduit [10].

2.1.3. Zone benthique (profonde)

C'est la zone profonde qui est peu diversifiée et regroupe surtout des larves de chironomes et des oligochètes de petite taille [10].

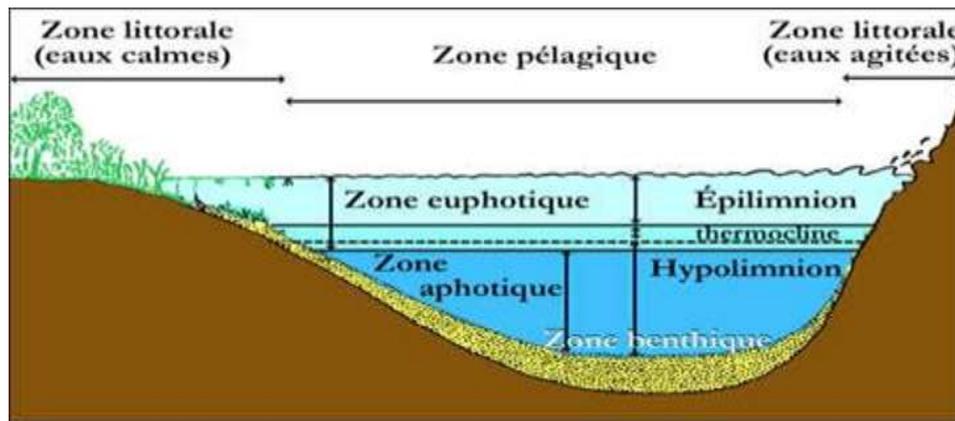


Fig.1 : les différentes parties d'un lac [10]

2.2. Stratification thermique

La stratification thermique d'un lac se définit comme étant la formation de couches d'eau distinctes superposées les unes sur les autres. La formation de ces couches est due à une différence de température entre les couches, ce qui entraîne une différence de densité de l'eau [3]. dont on peut citer les trois couches suivantes :

L'épilimnion : est la couche de surface la plus chaude où il y a abondance de lumière et où la productivité biologique est la plus importante. Le vent permet à cette couche de se mélanger ; ce qui engendre une homogénéisation de l'oxygène dissous et des autres éléments présents (ex.: phosphore). L'épaisseur de cette couche varie au cours de la saison [17].

Le métalimnion : est la couche intermédiaire. Dans cette couche d'eau, la température varie rapidement avec la profondeur. Elle est plus froide que l'épilimnion mais plus chaude que l'hypolimnion. La diminution de la température crée une barrière physique entre les couches d'eau liée à la différence de densité. L'oxygène peut y être encore abondant [17].

L'hypolimnion : est la couche froide inférieure faiblement éclairée où la température varie peu. L'oxygène dissous, introduit lors des brassages saisonniers, est utilisé entre autres pour la décomposition de la matière organique. Parfois, l'oxygène disparaît complètement de cette couche d'eau, phénomène que l'on appelle anoxie [17].

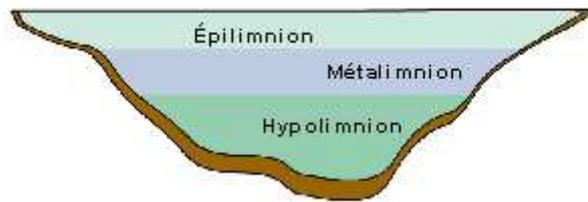


Fig 2 : Stratification thermique d'un lac [17].

2.3. Evolution d'un lac

Un lac présente généralement trois stades :

- **Stade oligotrophe**; c'est le stade « jeune » du lac. Ses eaux pures (faiblement minéralisées) et claires, peu nourricières, contiennent un petit nombre d'espèces végétales et animales qui sont essentiellement représentées par du plancton [23].
- **Stade mésotrophe** ; au cours du temps (plusieurs siècles), les eaux du lac reçoivent des apports en matières organique et minérale. Les espèces du zooplancton et phytoplancton se développent et permettent de nourrir des organismes de plus grande taille. Leurs cadavres s'accumulent sur le fond, décomposés par les bactéries, fournissent de la matière minérale qui, recyclée dans le milieu aquatique, contribue à enrichir l'eau. Cette activité bactérienne consomme de l'Oxygène et donc appauvrit les couches profondes du lac [23].
- **stade eutrophe** : l'enrichissement en matière organique se poursuivant, et du fait du déficit croissant en oxygène, la minéralisation devient plus lente : le lac se ferme progressivement. Ses bords, s'ils sont peu profonds, se trouvent envahis par la végétation, et à l'issue d'une période plus ou moins longue, il finit par se combler. Ce phénomène naturel, qu'on appelle eutrophisation, est bien souvent accéléré par des apports artificiels de nitrates et de phosphates qui stimulent le développement des végétaux (par exemple, même si ces dérivés s'amenuisent : lessivage d'engrais utilisé en agriculture, rejets des eaux usées industrielles et urbaines, etc...)[23].

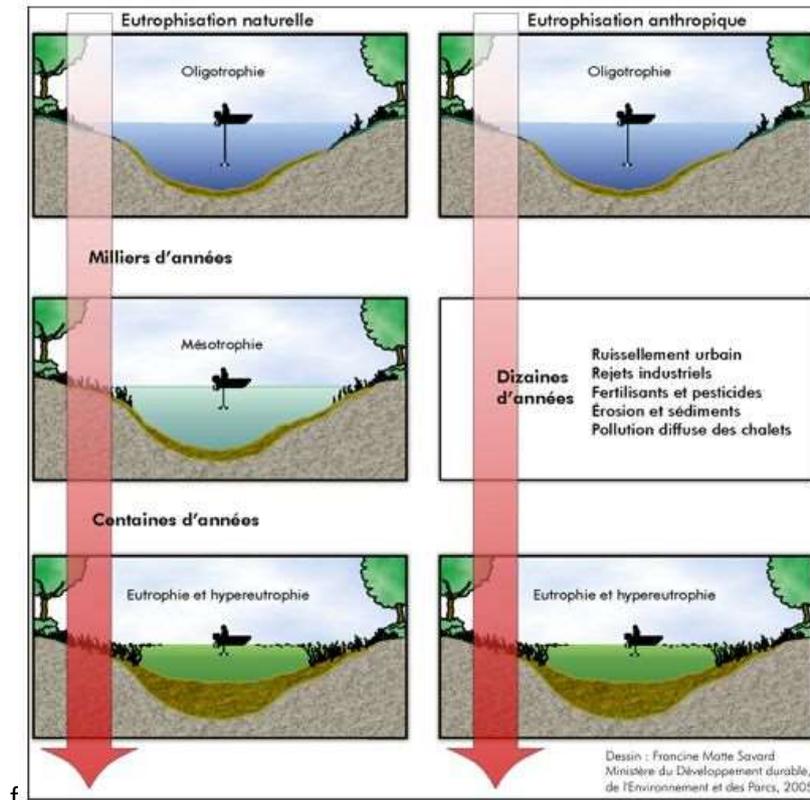


Fig 3 :Les différents stades d'un lac [23]

3. Propriétés physico-chimiques des lacs

Les paramètres physico-chimiques jouent un rôle important dans les processus biologiques, physiques et chimiques qui se déroulent dans le milieu aquatique. Par exemple, l'augmentation de la température d'un milieu aquatique conduit à la diminution de la solubilité d'oxygène et par conséquent l'augmentation de la demande en oxygène des espèces aquatiques notamment les poissons et les autres espèces qui sont source de nutriment pour les oiseaux aquatiques [18]. La valeur de chacun de ces paramètres du lac influencera la présence et l'abondance des organismes aquatiques ainsi que la santé générale de l'écosystème [21]. Plusieurs éléments peuvent provenir de sources naturelles ou anthropiques selon la provenance des eaux de surface, la nature géologique du milieu et les activités humaines pouvant s'y dérouler.

4. Pollution des eaux des lacs

La pollution des eaux des lacs est un sérieux problème pour l'environnement qui remonte très loin dans le temps. À cause des différents rejets qui perturbent les conditions de vie et l'équilibre du milieu aquatique et compromet les utilisations de l'eau. Elles secrètent également des substances toxiques qui sont accumulés par les prédateurs (zooplancton, petits invertébrés...) et concentrés le long de la chaîne alimentaire [15].

4.1. Origine des pollutions

Selon leur origine, les polluants des eaux de surface se divisent en 04 grands groupes:

4.1.1. Les polluants chimiques

Ils comprennent les sels minéraux et les composés toxiques. Ce sont des polluants majeurs des cours d'eau par leur abondance et leurs effets biologiques.

a. Les sels minéraux

Les plus couramment rencontrés dans la pollution des eaux sont: les nitrates, les phosphates; les sulfates; les nitrites; les carbonates etc...[12]

b. Les composés toxiques

Ils sont soit minéraux, soit organiques.

- **Les composés toxiques minéraux**

Ce sont essentiellement:

-Les métaux lourds (mercure, plomb, zinc.)

-Les minéraux d'origine agricole (organochlorés, organophosphorés et organométalliques)

-Les minéraux d'origine industrielle [12].

- **Les polluants organiques toxiques**

Ce sont principalement les pesticides et les détergents. On désigne généralement sous le nom de pesticides, tous produits utilisés pour lutter contre les organismes qui portent atteinte à la santé publique ou s'attaquant à tous les stades et de toutes les manières aux ressources végétales ou animales nécessaires à l'alimentation humaine [12].

Les détergents sont des composés tensioactifs synthétiques dont la présence dans les eaux est due aux rejets d'effluents urbains et industriels. Chaque tensioactif a deux parties: hydrophile et lipophile [12]

4.1.2. Les polluants radioactifs

Il existe plusieurs types de rayonnements :

- Les rayons alpha
- Les rayons beta
- Les rayons gamma

4.1.3. Les polluants thermiques

Les rejets d'eau chaude peuvent provoquer une élévation anormale de température incompatible avec la survie et la prolifération des organismes, qui ont besoin d'une température élevée pour se développer [12].

4.1.4. Les polluants biologiques

Ils sont constitués d'origines libres et des agents pathogènes [12] :

a. les organismes libres

Parmi les organismes libres présents dans l'eau, ceux qui importent sont: le plancton et les macro-invertébrés. Les planctons, organismes vivant essentiellement en suspension dans l'eau, se composent de zooplancton et de phytoplancton. Les macro-invertébrés sont susceptibles de réduire l'efficacité des systèmes de traitement [12].

b. Les agents pathogènes

Ils comprennent: les virus, les bactéries, les parasites.

- **Les virus** : sont les plus préoccupants en matière de transmission par l'eau des maladies infectieuses. Ce sont essentiellement ceux qui se multiplient dans l'intestin ou entérovirus. Ils pénètrent essentiellement dans l'eau par les effluents des égouts ou la contamination directe par les matières fécales [12]
- **Les bactéries** : regroupent en général les coliformes, les streptocoques [12]

- **Les parasites :** c'est surtout le milieu physique et les caractéristiques physico-chimiques qui créent les conditions propices à la prolifération des vecteurs et hôtes intermédiaires des parasites. Les parasites les plus importants sont les protozoaires et les helminthes [12]

5. Agents pathogènes véhiculés par les eaux usées

Les principales maladies humaines qui peuvent être transmises par l'eau sont énumérées ci-dessous, avec indication de l'agent causal:

Tableau 1 : les principales maladies transmises par l'eau [1].

Agent étiologique	maladie
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra
<i>Escherichia coli</i>	Gastroentérite
<i>Salmonella typhi</i>	Fièvre typhoïde
<i>Shigella dysenteriae</i>	Shigellose
<i>Shigella boydii, Shigella sonnei</i>	Dysenterie bacillaire

6. Les solutions pour remédier à cette pollution

Le traitement des eaux usées a normalement pour but non seulement de stabiliser les matières putrescibles désagréables à la vue, mais aussi d'éliminer les agents pathogènes. De nombreux facteurs importants pour la lutte contre la transmission des maladies interviennent dans la conception des bassins de stabilisation d'eaux usées: connaissances des agents pathogènes possibles ; détection de certains agents particuliers ; cycle vital des organismes en cause ; mode de transmission d'un hôte à un autre ; survie dans les diverses installations de traitement physique, chimique ou biologique ; taux de réduction ; influence des opérations de traitement sur la transmission des maladies [6].

Il convient donc de lutter de manière individuelle mais aussi collective, dans la mesure du possible, à la source même de celle-ci :

- Réduire la dose de détergents (vaisselle, carrelage, agriculture)
- Diminuer les sources de pollutions

- Ne pas jeter des déchets dans l'eau .
- Utiliser de nouveaux procédés de traitement de l'eau plus sains comme l'ultrafiltration et la nano filtration (filtres constitués d'une membrane permettant d'extraire physiquement les micropolluants).

La lutte contre la pollution de l'eau n'est pas toujours évidente car les produits contaminants sont parfois difficile à détecter : enfouis au fond des océans, mélangés avec l'eau est donc invisible à l'œil nu...la qualité de l'eau dépend alors de la dissolution des polluants jusqu'à leur disparition totale. Il y a notamment des taxes à la pollution de l'eau, qui ont été mis en œuvre au niveau de la facture d'eau. Ces fonds sont ensuite redistribués sous forme d'aides financières aux collectivités locales, aux industriels et aux agriculteurs pour la réalisation de travaux de lutte contre la pollution [6].

7. Lac Oubeïra

Oubeïra est un lac endoréique d'eau douce d'origine naturelle occupant une superficie de 2.200 hectares de forme subcirculaire, il est situé au centre d'un bassin versant de 9.900 hectares, à 4 kilomètres à vol d'oiseau de la mer. Très important pour l'hivernage des oiseaux d'eau et, à un degré moindre, pour la nidification de quelques espèces rares. Ce lac est un bon exemple d'une zone humide représentative, rare et unique de type de zone humide naturelle de la région méditerranéenne se situant dans un complexe de zones humides qui viendrait en troisième position après ceux du Delta de l'Ebre, en Espagne et la Camargue en France [13].

7.1. Localisation géographique

Lac Oubeïra est situé à 3 Km à l'Ouest de la ville d'El-Kala, dans la Wilaya d'El-Tarf à l'extrême Nord-Est de l'Algérie. La grande ville la plus proche est Annaba à 70 Km à l'Ouest .l'Oubeira est situé près des lacs Mellah et Tonga [13].



Fig. 4 : localisation générale du lac Oubeïra [11]

7.2. Caractéristiques physiques

7.2.1. Géologiques, géomorphologiques et hydrologiques

L'Oubeïra est un lac d'eau douce, permanent. Il est en forme de cuvette à fond plus ou moins plat légèrement incliné vers le Nord, d'origine naturelle ayant une profondeur maximale de 4m, la profondeur moyenne étant de 1,24m. Cette première profondeur constitue le toit d'une couche de vase dont la profondeur moyenne est de 1,30m et une valeur maximale de 2,50m. Le fond de cette dernière constitue le substratum réel du lac avec une forme concave inclinée vers le sud-ouest. Le lac contient un volume de vase de 30.207.685,30m³, par contre son volume d'eau varie selon les saisons. En période estivale, il est de 22.031.078,80m³ avec une profondeur moyenne de 0,96m et en période hivernale un volume d'eau de 32.535.096,80m³ avec une profondeur moyenne de 1,24m. Le substrat est entièrement composé d'argile de Numidie datant de tertiaire, avec la présence tout autour du lac de dépôts récents du quaternaire. Les alluvions limoneuses du fond de vallée, datant du Quaternaire, sont localisées au Sud-Est du lac. Le bassin versant occupe une superficie de

9919,35ha. Le lac est alimenté par quatre oueds dont le plus important, l'oued Messida au Sud-Est, recueille les eaux de crues de l'oued El Kebir au nord d'El Tarf. [13].

7.2.2. Type de climat

Le lac Oubeïra, avec la région d'El Kala, se place dans l'étage subhumide à hiver chaud, avec des vents permanents à dominance Nord-Ouest. La pluviométrie annuelle moyenne est située entre 700 et 800 mm et s'étale essentiellement du début du mois d'octobre jusqu'à la fin mars. La région est caractérisée par deux saisons, l'une sèche de mai jusqu'à septembre et l'autre humide de septembre à avril. La température de l'eau varie de 8,8 à 15,2° au mois de janvier. La température moyenne de l'air, calculée sur une période de 28ans allant de 68/69 à 95/96 est de 17,50° avec 11,65° pour janvier le mois le plus froid et avec une moyenne de 25° en août qui est le mois le plus chaud. L'évaporation moyenne est de 74,15mm, avec un maximum de 152,08 mm et un minimum de 22,47 mm Les eaux du lac sont très turbides surtout en hiver (10 à 15 m au disque de Secchi en 1976) avec un PH variant entre 8 et 10,65 [29].

7.3. Caractéristiques écologiques

C'est le seul grand site du complexe humide de la région qui présente une organisation spatiale typique en ceintures de végétation (Hélophytes) avec une importante superficie colonisée par des herbiers flottants d'Hydrophytes. En été, les ceintures de végétation sont bien visibles et pratiquement ininterrompues tout autour du Lac et ont une largeur et une densité différentes selon les rives; les ceintures les plus larges (environ 400 m) sont formées essentiellement d'Hélophytes, *Phragmites australis*, *Typha angustifolia* et le Scirpe *Scirpus* sp.). Les herbiers flottants sont constitués par les Hydrophytes, Châtaigne d'eau *Trapa natans*, Myriophylle *Myriophyllum* sp. Potamots *Potamogeton* sp. Etc. Ces formations occupent la grande surface d'eau libre. Bien que considéré comme site d'hivernage par excellence, ce lac, malgré son couvert végétal limité aux bordures, est un lieu de nidification pour plusieurs espèces d'oiseaux d'eau telles que la poule d'eau *Gallinula chloropus*, le Blongios nain *Ixobrychus minutus*, la Marouette ponctuée *Morzana*, le Râle d'eau *Rallus aquaticus*, etc. C'est également le site d'alimentation pour des espèces qui nichent dans les autres zones humides de la région comme les canards, les Guifettes moustac et noire *Chlidonias hybrida* et *C. niger*, les Hérons pourpré et crabier *Ardea purpurea* et *Ardeola ralloides*, l'aigrette garzette *Egretta garzetta* et le garde-bœuf *Bubulcus ibis* et des limicoles). Ce site a fait l'objet d'un

empoissonnement en carpes chinoises qui a engendré une perturbation du milieu notamment par la disparition des herbiers [32].

7.4. Faune et flore remarquables

Oubeïra abrite plusieurs espèces aviaires, parmi lesquelles nous citons la Talève sultane *Porphyrioporphyrus*, l'Erismature à tête blanche *Oxyuraleucocephala*, le Fuligule nyroca *Aythya nyroca*, l'Ibis falcinelle *Plegadis falcinellus*, l'Oie cendrée *Anser anser*, le Flamant rose *Phoenicopterus ruber*, le grand cormoran *Phalacrocorax carbo*, le Blongios nain *Ixobrychus exilis*, et la Balbuzard pêcheur *Pandion haliaetus*, etc... [16].

Ce lac est le seul site algérien abritant la châtaigne d'eau *Trapa natans* et le nénuphar jaune, on note également le nénuphar blanc *Nymphaea alba*, le scirpe incliné *Scirpus inclinatus*, le *Sparganium erectum* et le Rubanier raneux *Zizania chalybeata* [13].

7.5. Valeurs sociales et culturelles

Lac Oubeïra est d'un intérêt social et culturel de par la Production halieutique, l'exploitation de l'eau pour l'agriculture autour du Lac (il s'agit surtout de cultures spéculatives telles que la culture d'arachides consommatrice d'eau), la présence d'un site archéologique (Mégalithique) au Sud-Est du Lac et l'éducation et la recherche scientifique (aspect paysager ouvert et présence de deux postes d'observation ornithologique) [25].

1. Analyse fongiques des eaux du lac Oubeïra

1.1. Caractères généraux

Les champignons sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire pourvus de véritables noyaux (avec membrane nucléaire, chromosomes et nucléole) dont les divisions impliquent des séquences mitotiques régulières. Les actinomycètes, qui sont un groupe de procaryotes parmi les bactéries, n'appartiennent donc pas aux champignons [11].

Ces derniers possèdent un appareil mitochondrial comme tous les eucaryotes, mais restent dépourvus de chloroplastes : ce sont donc, comme les animaux, des organismes hétérotrophes qui dépendent, pour leur nutrition carbonée, de la présence de matières organiques préformées. Toutefois, ils possèdent, comme les végétaux, une paroi cellulaire périphérique et, dans le cytoplasme, des vacuoles turgescents. Les myxomycètes, à structure de type plasmodial, nus et capables d'englober des proies, ne peuvent donc pas être maintenus au sein de l'ensemble des champignons [11].

1.2. Caractères morphologiques

La masse cytoplasmique est enfermée dans une structure pariétale rigide qui constitue le thalle (l'appareil végétatif).

L'appareil végétatif des champignons est un thalle, qui peut être unicellulaire (levures et « formes levures ») ou, le plus souvent, filamenteux (mycélium, dont la croissance est localisée aux apex) ; il n'existe pas de véritables tissus comme chez les plantes supérieures ou chez les animaux. Le mycélium n'est généralement pas cloisonné chez les « champignons inférieurs » (zygomycètes et gloméromycètes) : un nombre plus ou moins grand de noyaux cohabitent alors dans le cytoplasme commun. Chez les « champignons supérieurs » (ascomycètes et basidiomycètes), le mycélium est cloisonné mais, selon le degré de synchronisme entre les mitoses et la formation des cloisons, les articles peuvent être uninucléés ou plurinucléés. De plus, les cloisons qui se forment de la périphérie vers le centre, à la manière d'un diaphragme qui se ferme, peuvent laisser un pore central simple (ascomycètes et téliobasidiomycètes) ou de structure complexe (eubasidiomycètes). Les champignons n'ont donc pas l'organisation cellulaire typique que l'on observe habituellement chez les plantes ou chez les animaux [8].

1.3. Caractères cultureux

Dépourvus de chlorophylle, ils ne peuvent pas, comme les plantes, synthétiser leur matière organique à partir du CO₂ atmosphérique. Ils doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau et les substances organiques et minérales nécessaires à leurs propres synthèses ; ils sont hétérotrophes. Pour cela ils dégradent la matière organique complexe grâce à l'excrétion d'enzymes et d'acides puis ils en absorbent les composants digérés, tout ceci s'effectuant à travers la paroi perméable de leur appareil végétatif. Ils peuvent être saprophytes s'ils se développent sur de la matière organique inerte (c'est le cas des moisissures) ou parasites s'ils se développent sur du vivant. Certains sont symbiotiques car ils vivent en association à bénéfice réciproque avec d'autres organismes [8].

1.4. Reproduction

Les champignons se multiplient par des spores formées à partir du mycélium et qui sont des organes de résistance, sortes de graines microscopiques, servant à la propagation lorsqu'elles se détachent. Elles sont ensuite dispersées par les courants d'air, par l'eau de ruissellement ou en se collant sur des vecteurs : objets, plantes, animaux (insectes, acariens) ou l'homme. L'air et les surfaces de notre environnement extérieur et intérieur sont ainsi naturellement chargés de spores à l'état latent. En conditions favorables d'humidité les spores peuvent germer et redonner du mycélium qui pourra à son tour sporuler et recontaminer.

La reproduction peut être à caractère sexué et/ou asexué. Les deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon dit holomorphe [4].

1.4.1. Reproduction sexuée

Les champignons qui se reproduisent selon le mode sexué, sont les téléomorphes [4].

* Spores sexuées :

- Oospores
- Zygosporés
- Ascospores
- Basidiosporés

1.4.2. Reproduction asexuée

Les champignons qui se reproduisent selon le mode asexué sont les anamorphes, on parle de champignons imparfaits [4].

*Spores asexués :

- Conidiospores
- Sporangiospores
- Arthrospores

1.4.3. Les facteurs de croissance

a. Température

La plus part des champignons sont mésophiles avec des optimal de croissance de 25° à 35°C. En général, 25°C est une bonne température pour le développement de ces microorganismes. Quelques espèces sont thermo-tolérantes (20°-50°C), la température limites de développement est de 60°-62°C. Les thermophiles jouent un rôle important pour le compostage (température optimale de croissance supérieure à 45°C).

Les champignons thermo-tolérants peuvent aussi bien croitre à haute température et à 20°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple. Certaines espèces sont psychrophiles ou psychrotolérantes et se développent à des températures inférieures à 20°C [28].

b. pH

La grande majorité des champignons peut se développer dans une zone de ph de 4,5-8,0. Les optima se situent entre 5,5-7,7, cependant, les enzymes extracellulaires produites dans les milieux complexes peuvent avoir des optima de ph d'activité très différents (plus acides ou plus basiques), par exemple, certaines protéases fongiques ont des optima de ph 2,0-5,0.

Les champignons modifient souvent le ph du milieu par absorption sélectives et par production de CO₂ ou de NH₃ ou par production d'acides organiques.

S'ils existent des champignons acidophiles (croissance à des ph inférieurs à 4,5) ou acido-tolérants, il n'existe pas de vrais basophiles (au contraire des bactéries) [28].

c. L'aération

La majorité des champignons sont aérobies à l'exception de quelques espèces qui sont micro aérophiles (Allomyces). Cependant, de nombreuses moisissures et levures peuvent fermenter les glucides (fusarium oxysporum, mucor hiemalis, Aspergillus fumigatus)

Quelques espèces sont anaérobies strictes (neocallimastix frontalis, Piromonas) et colonisent des biotopes particuliers (rumen par exemple) [28].

d. L'eau

L'activité de l'eau est équivalente à l'humidité relative à l'équilibre qui varie de 0% à 100%, les limites de la disponibilité en eau pour que les champignons croissent sont 65%.

Les champignons représentent le groupe de micro-organismes qui possède les espèces les plus xérophiles. La synthèse des sucres alcools est un moyen pour les champignons de maintenir leur pression osmotique intracellulaire [28].

e. La lumière

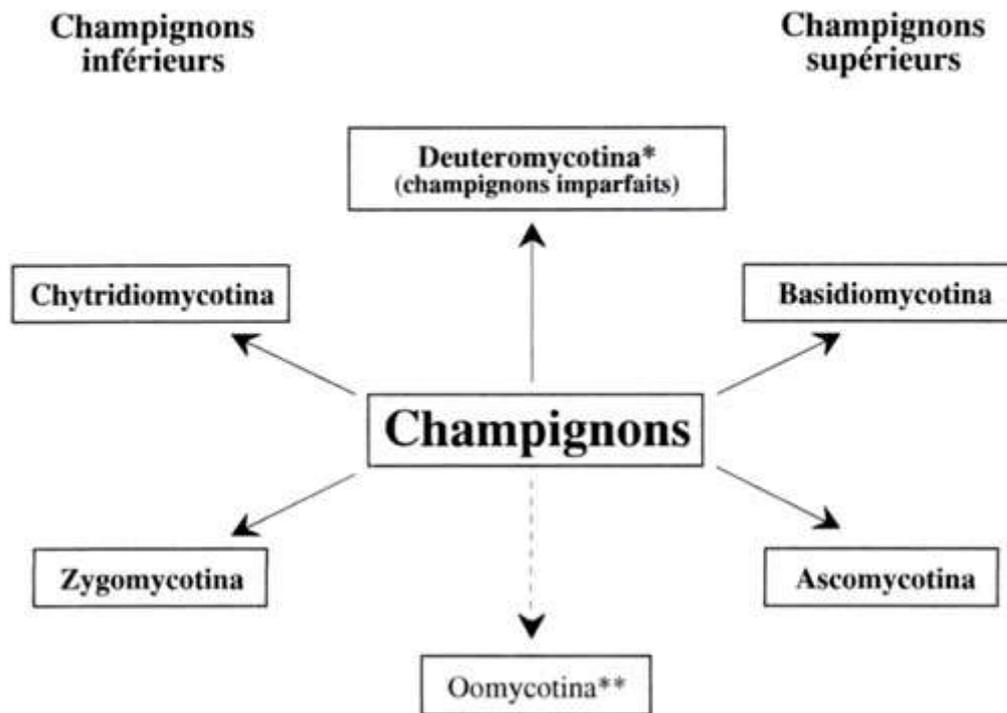
Beaucoup de champignons n'exigent pas de lumière pour sporuler. Chez Sphaerobolus stellatus, la lumière de longueur d'onde inférieure à 500nm déclenche le développement du sporophore pendant 8 premiers jours, mais pendant les 4-5 jours précédents la décharge sporale, la lumière de longueur d'onde supérieure à 550nm est inhibitrice. Les radiations rouges ou jaunes n'interrompent pas la sporulation alors que les radiations bleues sont inhibitrices [28].

1.5. Classification des champignons

Les classifications proposées sont multiples...Elles sont en constante évolution...

La classification de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (1970) modifiée par Kwon Chung et Bennett (1992), puis par de Hoog (1995), est la plus utilisée actuellement [8].

- Domaine : Eucaryotes
- Règne : Champignons
- Division : - Ascomycotina
(phylum) - Basidiomycotina
- Zygomycotina
- Chytridiomycotina
- (Deuteromycotina)



* Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification.

** Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais.

Fig 5 : Classification des champignons [8].

1.6. Identification des germes Aspergillus et Penicillium

1.6.1. Aspergillus

a. Les caractères morphologiques

Les Aspergillus sont des moisissures appartenant à la famille des Aspergillaceae, et à la classe des Ascomycètes [32]. Le thalle, hyalin, ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches [5].

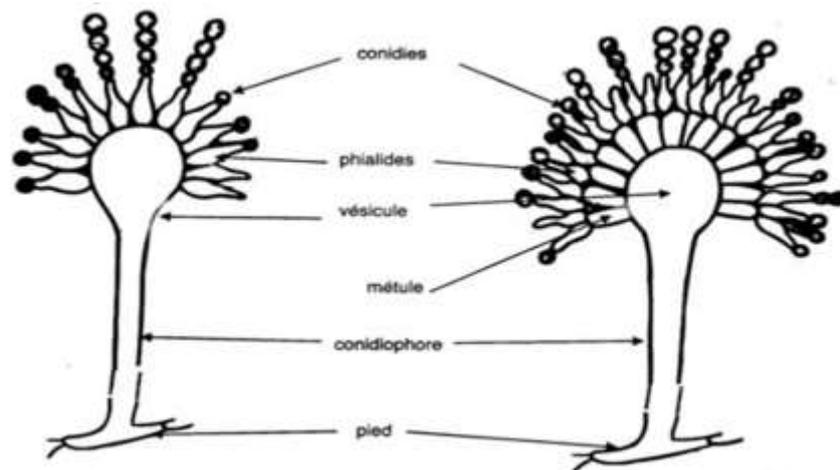


Fig 6 : Les caractères morphologiques des Aspergillus

b. Les caractères cultureux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud. Ils sont cependant en majorité inhibés par l'actidione. Après 24 à 28h de culture on peut observer des colonies plates, formées de courtes filaments aériens blancs. C'est suite à la maturation des structures conidiogènes (48 à 96h) que les colonies présentent leur teinte caractéristique : brune, jaune, verte, ou même noire selon les espèces. La couleur de la culture permet une orientation rapide du diagnostic d'espèces. Les *Aspergillus* se développent bien sur les milieux classiques de mycologie comme celui de Sabouraud. Mais nécessaire, leur fructification peut être stimulé par repiquage de la colonie sur une gélose ou sur milieu de Czapek qui constituent leurs milieux de référence. Enfin, les *Aspergillus* poussent à 22 à 25°C et 37° pour les espèces qui sont thermophiles [34].

c. Pouvoir pathogène

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques, obstructives, emphysènes, mucoviscidose) ou générales (corticostéroïdes pralorgées, hémopathies malignes chimiothérapies aplaisantes, SIDA...) [32].

1.6.2. Penicillium

a. Caractères morphologique

Ces champignons présentent un thalle vert ou plus rarement blanc dans la texture est souvent utilisée comme critère de différenciation.

Les conidiophores sont isolés ou groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés et terminés par un pénicille [34].

b. Caractères cultureux

Les Penicillium se développent rapidement et facilement sur les milieu de culture utilisés en routine (gélose et sabouraud) . Ils se développent à des températures modérées de l'ordre 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, habituellement blanc. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certains espèces jaune , orange, rose, ou rouge [14] .

c. Pouvoir pathogène

Ces champignons sont des contaminants fréquemment isolés au laboratoire. Par contre les penicilliums sont très rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parceque la température de croissance de la plupart dans espèces est inférieure à 30° C.

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires des espèces de penicillium sont responsables de kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe), d'onychomycose (infection des ongles) et parfois d'infections [32].

1.7. Effets utiles et nuisibles des champignons

1.7.1. Effets utiles

a. La fermentation

Les produits fermentés par les champignons sont utilisés dans la fabrication du pain et le brassage de l'alcool. Ces deux procédés augmentent la valeur du substrat mais contribuent faiblement dans sa valeur nutritionnelle [24].

b. Les symbioses

Les mycètes peuvent avoir des associations spécialisées, intimes et bénéfiques avec les plantes supérieures, les autres microbes et les animaux.

Ces associations peuvent être à l'extérieur de la cellule hôte, comme chez les ectomycorhizes et les lichens, ou à l'intérieur de la cellule comme chez les endomycorhizes et les mycètes endophytiques [24].

a. La décomposition

Les mycètes sont les principaux agents de dégradation des déchets végétaux dans l'environnement en décomposant les substrats en CO₂, H₂O et des biomasses mycéliennes, et en libérant d'autres nutriments dans la biosphère [24].

b. contrôle biologique

Les mycètes peuvent être utilisées pour contrôler la contamination par les insectes nuisibles, les mauvaises herbes et les maladies végétales en exploitant leurs propriétés naturelles d'antagonisme de compétitivité et de pathogénicité [24].

1.7.2. Effets nuisibles**a. Labio détérioration**

L'activité hydrolytique des mycètes dans certaines situations provoque des pertes économiques importantes. Les matériaux contenant de grandes quantités de cellulose de cuir d'hydrocarboné peuvent être dégradés par les mycètes à condition qu'il y ait assez d'eau [19].

c. Les maladies végétales

Les mycètes sont capables de provoquer des dégâts significatifs avant et même après la récolte [19].

b. Les maladies humaines et animales

Les mycètes peuvent provoquer des infections superficielles et profondes qui sont parfois mortelles pour les êtres humains et les animaux [19].

a. La mycotoxicose

L'ingestion de mycète ou de leurs produits métabolique secondaires de façons accidentelle ou volontaire peut provoquer une intoxication et éventuellement la mort chez l'homme et les animaux [19].

2. Analyse bactériologique des eaux des lacs

La pollution microbiologique des eaux de surface par des agents pathogènes est un problème qui remonte très loin dans le temps. Au cours de l'IXXe siècle, les maladies d'origine hydrique ont été responsables de vastes épidémies de dysenterie, fièvre typhoïde, choléra, entre autres, liés d'une part à la consommation de la faune et à la baignade (Hamid Bou Saab, 2007). La mauvaise qualité microbiologique de l'eau peut être induite par des activités anthropiques ou par des phénomènes naturels. Dans la plupart des cas, la pollution s'entend comme un dépassement aux normes, définies en fonction des usages de l'eau. Elle perturbe les conditions de vie et l'équilibre du milieu aquatique et compromet les utilisations de l'eau [21].

2.1. Les entérobacteriaceae

Les Enterobacteriaceae regroupent un grand nombre de genres généralement hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Les bactéries de cette famille sont des bacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles grâce à une ciliature péritriche, qui se développent aisément sur milieu ordinaire (non exigeants), fermentant le glucose avec ou sans production de gaz, elles sont dépourvus d'oxydase possédant une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae*, réduisant les nitrates en nitrites (exception *Erwinia*). Le contenu de leur génome, riche en G (gyanine) et C (cytosine) fait que l'ADN de ces bactéries a un poids moléculaire de 38 à 60 mol % ; ceci a permis de recenser de nouveaux genres et de nouvelles espèces qui ne sont pas pathogènes (*Rhanella*, *Tatumella*, *Xenorhabdu*,...) [6].

2.1.1. Escherichia coli

a. Caractères morphologiques et cultureux

Escherichia coli ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant, sur gélose ordinaire donne des colonies lisses, brillantes et homogènes [26].

b. Caractères antigéniques

Au sein de chaque genre, on individualise les espèces par l'étude des caractères biochimiques et antigéniques. Les entérobactéries possèdent toutes, des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O. Les espèces mobiles quant à elles renferment en plus des antigènes O, des antigènes H ou flagellaires : c'est le cas d'*E. Coli* [26].

c. Caractères biochimiques

E. coli possède une catalase mais est dépourvu d'oxydase. L'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres est réalisée à l'aide de micro-méthodes validées disponibles dans le commerce sous forme de galeries. Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille [26].

d. Pouvoir pathogène :

E.Coli est souvent responsable de gastro-entérites graves pouvant être mortelles dans certains cas à l'absence de traitement. IL est classé dans le groupe des entérobactéries pathogènes spécifiques avec les Shigellas, les Salmonelles qui sont responsables de dysenteries et fièvres typhoïdes graves [26].

2.1.2. Shigella**a. Caractères morphologiques et cultureux**

Les shigella sont des entérobactéries immobiles extrêmement proches de *Escherichia coli*. Bacilles à gram négatif, Aéro-anaérobie, cultive facilement sur milieux usuels. Il est nécessaire d'utiliser des milieux sélectifs (Hektoen, SS, DCL, XLD) pour inhiber la flore commensale. Il fautensemencer un milieu moyennement sélectif (Drigalski) et un milieu non sélectif. Les milieux au vert brillant sont trop inhibiteurs et ne doivent pas être utilisés pour l'isolement des *Shigella* [26].

b. Caractères antigéniques

Les *Shigella* sont classées en 4 espèces elles-mêmes divisés en sérotypes selon leurs caractères antigéniques.

* Groupe A : *S.dysenteriae*

Il en existe 10 sérotypes différents, dont le type 1 s'appelle le bacille de Shiga. Celui-ci produit aussi une exotoxine protéique qui provoque des troubles paralytiques chez les sujets atteints [33].

* Groupe B : *S.flexneri*

Il en existe 6 sérotypes qui sont responsables de 20 % des shigelloses observées en France.

* Groupe C : *S. boydii*

Il en existe 15 sérotypes qui sont très répandus en Afrique mais ne se rencontrent pas en France sauf s'il s'agit de cas importés.

* Groupe D : *S.sonnei*

c. Caractères biochimiques

- ne produisant pas de gaz lors de la fermentation du glucose ;

- ne dégradant pas le glucose

- ne possédant pas de lysine-décarboxylase. Ne fermentent pas le lactose. Elles n'ont pas d'uréase et ne produisent pas de gaz.

Les souches se différencient sur le plan biochimique par les caractères ONPG, mannitol, indole et ODC [26].

Tableau 02 : les caractères biochimiques des genres *Shigella* [26].

	B galactosidase	Mannitol	indole	ODC
<i>S.dysenteriae</i> sous-groupe A (10 sérotypes)	- ou +	-	- ou +	-
<i>S.flexneri</i> sous- groupe B (6sérotypes)	-	+	d	-
<i>S.boydii</i> sous- groupe C	-	+	- ou +	-

(15 sérotypes)				
<i>S.sonnei</i> sous-groupe D (1 sérotype)	D	+	-	+

d = variable pour un sérotype donné

Profil biochimique

Il se détermine sur une galerie pour entérobactéries, traditionnelle ou miniaturisée.

Il se caractérise par l'ensemble des caractères négatifs :

Tableau 03 : Profil biochimique des genres *Shigella* [26].

Uréase	-
Désaminase	-
Lysine-décarboxylase	-
H ₂ S	-
Acétoïne	-
Culture sur milieu au citrate de Simmons	Absence de culture
ONPG mannitol Indole ODC	varie selon le sérotype

d. Pouvoir pathogène

Les *Shigella* sont des bactéries strictement humaines, l'intestin de l'homme infecté constitue leur seul réservoir ; la porte d'entrée est la voie orale, c'est l'exemple type de «maladie des mains sales ». Douées d'un pouvoir invasif au niveau de l'épithélium colique et rectal, les *Shigella* déclenchent une recto-colite inflammatoire aiguë fébrile pouvant évoluer jusqu'à un syndrome dysentérique. La dose infectante est très faible (10 à 100 bactéries; la contamination au laboratoire n'est pas exceptionnelle) [26].

2.1.3. Salmonella

a. Caractères morphologiques et culturels

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif mobiles par une ciliature péritriche habituellement à l'exception de *Salmonella gallinarum pullorum*.

Les salmonelles se présentent sous la forme de petits bâtonnets rectilignes, droits, mesurant entre 1 et 3µm de long, sur 0,5µm de large. Elles sont acapsulées et asporulées.

Les salmonelles cultivent facilement sur milieu ordinaire. La température optimale de culture varie entre 35 et 37°C] 8 à 48 heures. Elles sont aérobies anaérobies facultatifs (A.A.f.). Habituellement, les colonies sont rondes, lisses, transparentes sur gélose; cependant, il est observé chez certains sérovars des colonies naines: c'est le cas de *Salmonella typhisuis*, de *Salmonella abortusovis*. Les colonies muqueuses peuvent également se rencontrer dans les milieux de culture [20].

Dans les infections urinaires, il est possible d'observer des colonies rugueuses sur milieu de culture solide. Sur milieu liquide, les colonies S (lisses) donnent un trouble homogène, avec des ondes moirées lorsqu'on agite le tube alors que les colonies R (rugueuses) donnent une culture granuleuse avec des agglutinats spontanés formant un dépôt dans le fond du tube [20].

b. Caractères antigéniques

Les salmonelles possèdent 3 types d'antigènes d'intérêt diagnostique.

- **Antigènes somatiques (AgO)**

Ces antigènes O constituent un élément fondamental pour l'identification des sérovars.

Leur étude a été réalisée chez le lapin par l'utilisation d'antisérum

Les facteurs antigéniques O sont classés en deux groupes:

- les facteurs O majeurs

Ils permettent la classification des souches en groupe;

- les facteurs O accessoires

Ils n'affectent pas la classification en groupe, certains sont liés à un facteur caractéristique de groupe et d'autres résultent de la modification du polysaccharide [35].

- **Antigènes d'enveloppe**

La seule spécificité de cet antigène est appelée Vi et n'existe que chez trois sérovars : *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi C* et *Salmonella dublin*. L'antigène Vi peut masquer l'AgO et rendre inagglutinable [35].

- **Antigènes flagellaires (AgH)**

Les flagelles sont constitués de flagelline polymérisée. La composition constante en acide aminé pour un type antigénique fait la spécificité. Cet antigène est utilisé dans la classification et le diagnostic des salmonelles [35].

c. Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques prennent de répartir les salmonelles en 5 sous-genres.

Le sous-genre 1 renferme la majorité des salmonelles isolées chez l'homme.

- **Action sur les hydrates de carbone**

Les salmonelles fermentent le glucose avec production de gaz (sauf *Salmonella typhi*), fermentent le mannitol, le sorbitol, le dulcitol.

Les salmonelles sont inactives sur le lactose, le saccharose, l'adonitol et la salicine [35].

- **Action sur les protides**

Absence de production d'indole et de liquéfaction de la gélatine.

Il y a une production de lysine décarboxylase (LOC), d'ornithine décarboxylase (OOC) sauf respectivement *Salmonella paratyphi A* et *Salmonella typhi*.

Les salmonelles ne produisent pas d'uréase, d'oxydase et de désaminase [35].

- **Autres caractères biochimiques**

Les salmonelles cultivent sur le milieu au citrate de sodium sauf *Salmonella paratyphi A* et *Salmonella typhi* et elles produisent de l'hydrogène sulfuré sauf *Salmonella pilrattyphi A*.

Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles réduisent les nitrates en nitrites [35].

d. Pouvoir pathogène

Il est différent pour les salmonelles majeures (que l'on ne trouve que chez l'homme) et les salmonelles mineures (ubiquistes).

Salmonella majeures : *Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi*, respectivement responsables des fièvres typhoïdes et paratyphoïdiques. La transmission se fait par les selles des malades. Après infection, l'hémoculture se positive avant la coproculture (passage dans le sang, puis retour dans l'intestin grêle).

Salmonella mineures : Salmonella, responsables de gastroentérites (bactéries entéropathogènes invasives). Ces germes sont portés par l'homme et l'animal. Les salmonelles mineures sont impliquées dans 30 à 60 % des infections alimentaires. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission [35].

2.2. les Pseudomonadaceae

Les bactéries de la famille des Pseudomonadaceae sont des bacilles Gram négatifs à oxydase + donc capable d'oxyder la NN diméthylparaphénylène-diamine réduite et incolore en un dérivé semi-quinonique rose violacé. Cette famille comporte une espèce type qui est *Pseudomonas aeruginosa* mais on trouve d'autre espèce comme *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida* [3].

Les autres espèces de ce groupe sont :

- * les genres des alcaligènes de la famille des alcaligenaceae
- * *Flavobacterium* de la famille des flavobacteriaceae
- * *Xanthomonas* de la famille des Xanthomonadaceae
- * *Stenotrophomonas* de la famille des Xanthomonadaceae

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* :

a. Caractères morphologiques et culturels :

Bacille long et fin de 1-3 μ de long sur 0,5-1 μ de large. *Pseudomonas aeruginosa* est anciennement appelé bacille pyocyanique du fait de sa capacité à donner un pus de couleur bleu-vert. Il est mobile de type polaire avec un seul cil (monotriche) [3].

C'est une bactérie non exigeante qui en culture sur milieu gélosé élabore des pigments notamment :

- la pyocyanique (de couleur bleu -vert) pathognomonique
- des pigments jaune pâle ou jaune orangé non spécifiques [2].

b. Caractères antigéniques :

Il possède des antigènes O et H, qui permettent de distinguer différents types. Les antigènes O somatiques, permettant de distinguer 16 groupes différents, numérotés de 1 à 16, qui permettent de classer environ 95 % des souches rencontrées pour le genre *Pseudomonas*.

Les antigènes O:1 à O:11 sont les plus fréquents ; le sérotype O:12 présente la particularité d'être le plus résistant aux antibiotiques et est le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales.

- Les antigènes H flagellaires : il en existe également plusieurs types. Présents chez les formes mobiles des bactéries à Gram négatif, ils sont de nature protéique et possèdent des propriétés opposées à celles des antigènes O [3].

c. Caractères biochimiques :

Pseudomonas aeruginosa est un germe catalase négative mais oxydase positive.

Tableau 04 : caractères biochimiques de *P.aeruginosa* [3, 2]

TESTS	AD H	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	L D C	O D C	U R E	N I T R O G E N	C O L O N Y	L A P S	V E R M O U R	E S T R O L E S
RESUL TATS	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-

d. Pouvoir pathogène :

L'émergence de cette bactérie à l'heure actuelle est liée à sa grande fréquence dans les infections nosocomiales; mais surtout du fait de sa multi résistance aux antibiotiques. C'est ce qui est à l'origine de la difficulté de son isolement et de son identification [2].

La virulence de *Pseudomonas* est en grande partie liée à la présence de lime. IL est également responsable de cystites, de plaie, de septicémies, de diverses suppurations, d'infections génitales etc. [3].

2.3. Les micrococcaceae

Aujourd'hui, la famille des Micrococaceae a été rédefinie en excluant les coques Gram + catalase + de faible GC %, groupés en amas ou courtes chaînettes essentiellement les *Staphylococcus*. La famille des Micrococcaceae est composée de 4 genres dont le genre *Staphylococcus*. Les bactéries du genre *Staphylococcus* (plusieurs dizaines d'espèces) sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux et résistent facilement dans l'environnement [27].

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

a. Caractères morphologiques et culturels

Ceux sont des Cocci à Gram positif, se présentant en amas ou en diplocoques. Ils sont immobiles, non sporulés, parfois in vivo, présentent une capsule. Dans les produits pathologiques on les rencontre le plus souvent groupés en grappes de raisin, d'où leur nom. [27]

- 1 : température optimale de croissance : 37°C, mais acceptent les variations de 10 à 45°C.
- 2 : atmosphère utilisée habituellement, avec exigences d'environnement gazeux et en aéro-anaérobie facultatif.
- 3 : particularités culturelles identifiées :
 - croissance en présence de fortes concentrations salines
 - certaines souches produisent un pigment jaune-orange [27].

b. Caractères antigéniques

- Protéine A jouant le rôle d'adhésine
- Protéine de liaison au collagène de type I, II, IV
- Protéine de liaison à la fibronectine
- Protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor)
- Capsule (exopolysaccharides)
- Lipopolysaccharide A [30].

c. Caractères biochimiques

- Catalase (+)
- Staphylocoagulase (+)
- DNase (DésoxyrubeNucléASE) (+)
- Gélatinase (+)
- Phosphatase acide (+)
- Fibrinolysine (+)
- ADH (arginine dihydrolase) (+), mais en moins de 76 heures
- Fermente la plupart des sucres
- La xylose n'est jamais fermentée
- Oxydase (-) [30].

d. Pouvoir pathogène

S. aureus est responsable d'infections diverses et variées:

- Infections cutanées: simple furoncle ou anthrax, érysipèle, ou staphylococcie maligne aiguë de la face.
- Infections osseuses: ostéomyélite aiguë ou chronique.
- Infections pulmonaires: abcès du poumon ou pneumopathies bulleuses.
- Infections rénales: infections urinaires, abcès du rein ou phlegmon péri-néphrétique [31].

1. Site du prélèvement

Les différents constituants du lac Oubeira ne sont pas homogènes pour toutes les régions de l'écosystème, pour cela, le lac doit être divisé en 6 sites pour augmenter la chance d'avoir des colonies de champignons et connaître la quantité moyenne des différents composants tel que les sels minéraux, le PH, la distribution des micro-organismes...etc.



Site 1



Site 2



Site 3



Site 4



Site 5



Site 6

Site de prélèvement à partir du lac Oubeira

2. Prélèvement des échantillons

L'échantillonnage est un problème délicat en raison d'une distribution hétérogène des micro-organismes dans les milieux aquatiques. L'analyse de l'eau a pour but de fournir une identification qualitative et quantitative, et de préciser les propriétés hydrodynamiques des systèmes observés. Dans des flacons en verre, stérilisation au four pasteur pendant 30 minutes à 180°C pour éliminer toute infection microbienne, on prélève 6 échantillons de chaque site étudié. L'ouverture et la fermeture des flacons se fait dans l'eau à une profondeur de 25 à 30 cm du lac de manière à éviter de remplir totalement les flacons.

Les flacons d'échantillonnage doivent être hermétiquement fermés et conservés dans une glacière à 4°C. Il est important que le travail analytique soit réalisé immédiatement ou le

plus tôt possible après l'échantillonnage, de manière à éviter les modifications de la composition chimique due au dégazage et aux réactions photolytiques ou microbiennes.

Identification fongique

3. Préparation des milieux de culture

Trois catégories de milieu peuvent être distingués pour l'identification des moisissures :

- Milieu czapek simple et concentré permet de différencier sur les boîtes ensemencées les germes l'acidité de ce milieu permet en outre d'éliminer les bactéries.
- Milieu sabouraud est utilisé pour l'isolement et la culture des levures et des moisissures.

Les différents constituants des milieux sont pesés à l'aide d'une balance et mis dans un bécher gradué en complétant le volume jusqu'à 1000 ml avec l'eau distillée.

Ensuite ; on agit une agitation pendant 20 mn à l'aide d'un agitateur pour homogénéiser les constituants et on verse le milieu liquide dans des flacons stériles en verre.

4. Stérilisation des milieux

La stérilisation destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu, est réalisée dans un autoclave par la vapeur d'eau sous pression, à haute température, elle est habituellement pratiquée à 120°C pendant 20 minutes.

5. Mise en culture

5.1. La dilution

Elle consiste à réaliser une suspension du produit à analyser suivie d'une série de dilution au 1/10 pour ensemencer un milieu de culture approprié. Après incubation chaque thalle observé provient de développement d'un germe présent dans la suspension de départ. La technique de la dilution est une technique utilisée pour diminuer la charge fongique dans la suspension mère, s'effectue devant la flamme et dans des tubes à essai stériles contenant 9ml d'eau distillée. Ensuite, à partir de l'échantillon mère, on prélève à l'aide d'une pipette graduée 1ml et on le met dans le premier tube, et à partir de ce dernier 10^{-1} on prend 1ml et on l'introduit dans le deuxième tube 10^{-2} .

Refera la technique jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} .

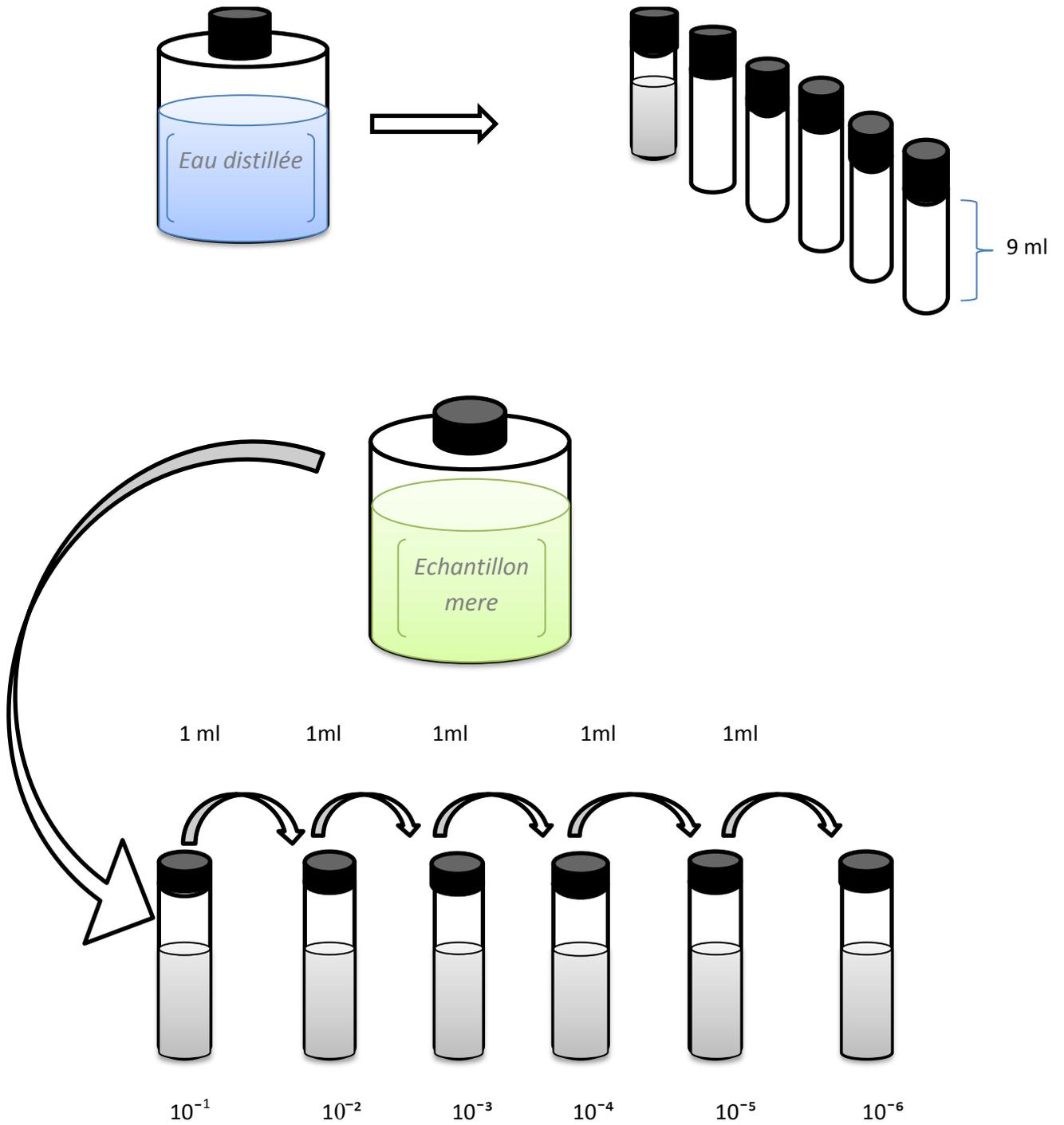


Fig 7 : Préparation des dilutions

5.2. L'ensemencement

Il existe une méthode d'ensemencement :

- L'ensemencement dans la masse consiste à couler le milieu dans les boîtes enfermant au préalable l'inoculum (1ml une dilution 1/10 par exemple), et à homogénéiser soigneusement l'ensemble.
- L'ensemencement en surface est réalisé par étalement d'un inoculum sur le milieu gélose refroidi. Dans le cas des moisissures les résultats sont aussi bons qu'avec l'ensemencement dans la masse.

Après la dilution de la suspension mère, on passe à l'ensemencement des boîtes de pétri.

A partir de la dilution 10^{-3} , on prélève 1ml et on la diviserait en 2 gouttes sur les deux côtés de la boîte de pétri, ensuite à l'aide d'une pipette de pasteur un raté sur le bec de bunsen et on ensemence par un mouvement de rotation de la boîte de pétri.

6. L'incubation

Après l'ensemencement, les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve à deux températures : 37°C pour les boîtes qui contiennent le milieu de Czapek concentré ; 28°C pour les milieux qui contiennent Czapek simple et Sabouraud.

7. Coloration

Le plus souvent, l'observation microscopique des moisissures ne requiert aucune coloration.

Les colorants peuvent améliorer les qualités de contraste pour mettre en relief certains détails de la structure (ornementation des spores, cloisonnement des hyphes, etc...). le colorant utilisé est le bleu de méthylène.

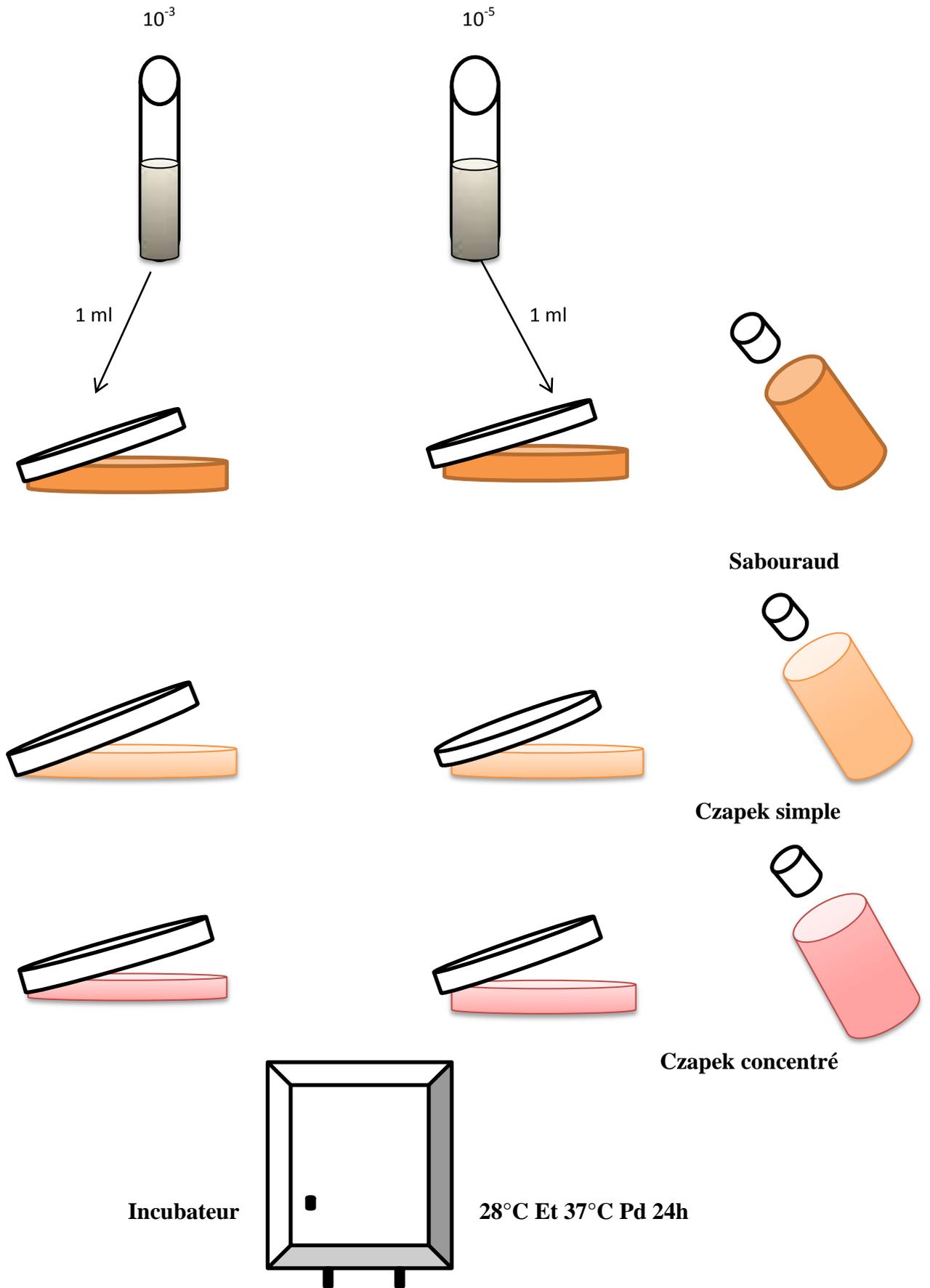


Fig 8 : Protocol du travail

8. Lecture

8.1. Critères d'identification

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques, rarement à des propriétés biochimiques, elle nécessite souvent l'utilisation des milieux standards favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier.

8.1.1. Caractères cultureux

- Texture du thalle (velouté, laineux, etc...)
- Couleur du thalle (pigmentation du mycélium, couleur conidies)
- Couleur du Rivers de la culture et présence d'un pigment diffusé.

8.1.2. Caractères morphologiques

- Etude microscopique de mycélium : absence ou présence des cloisons colorés, ornementation des thallospores.
- Nature des organes différenciés : zygospores, cipothécies, cléistothiques, périthèces, sporocystes, acervutes, pyenictes, sporodochies, corémies, conidiophores, sclérotés.
- Etude microscopiques des organes différenciés et de leur contenus : forme, couleur, dimension, texture de parois, ornementation.

II. Identification bactériologique

1. Recherche des coliformes totaux et fécaux :

1.1. Test de présomption

Les coliformes ont la particularité de fermenter le lactose avec dégagement de gaz. Le développement des coliformes totaux acidifie le milieu qui se traduit par un virage de l'indicateur coloré. En outre, une production de gaz apparaît dans les cloches renversées.

- **Principe:**

La colimétrie est l'ensemble des méthodes permettant la recherche et le dénombrement des coliformes, qui indique une contamination fécale.

- **Mode opératoire :**

Après l'homogénéisation des échantillons, nous avons réalisé six dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) dont ces dernières sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.

*Prendre les tubes de BLBVB (bouillon lactose bilié vert brillant, simple) munis 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 9ml de BLBVB, pour obtenir la dilution 1/10.

*Prélever 1ml de la dilution 1/10 et l'ajouter à un autre tube de BLBVB pour obtenir la dilution 10^{-2} .

*Refaire la technique pour 03 autres tubes de BLBVB, afin d'obtenir 5 tubes de BLBVB et refaire pour deux autres séries.

Incuber à 37°C pendant 24 h.

- **Lecture**

virage de la couleur au jaune avec le trouble et production de gaz.

*Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série pour déterminer le nombre de coliformes

*Ce dernier est déterminé avec la table de Mac Grady (voir annex).

2.2. Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la recherche de coliformes thermo tolérants parmi lesquels la présence d'*Escherichia coli*.

- **Mode opératoire :**

*Les tubes de BLBVB trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'un anse de platine dans tube contenant le milieu eau Peptonée (l'indole par exemple).

*Mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait cette fois-ci à 44°C pendant 24 heures.

- **Lecture :**

*Présence d'anneau rouge en surface indique production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.

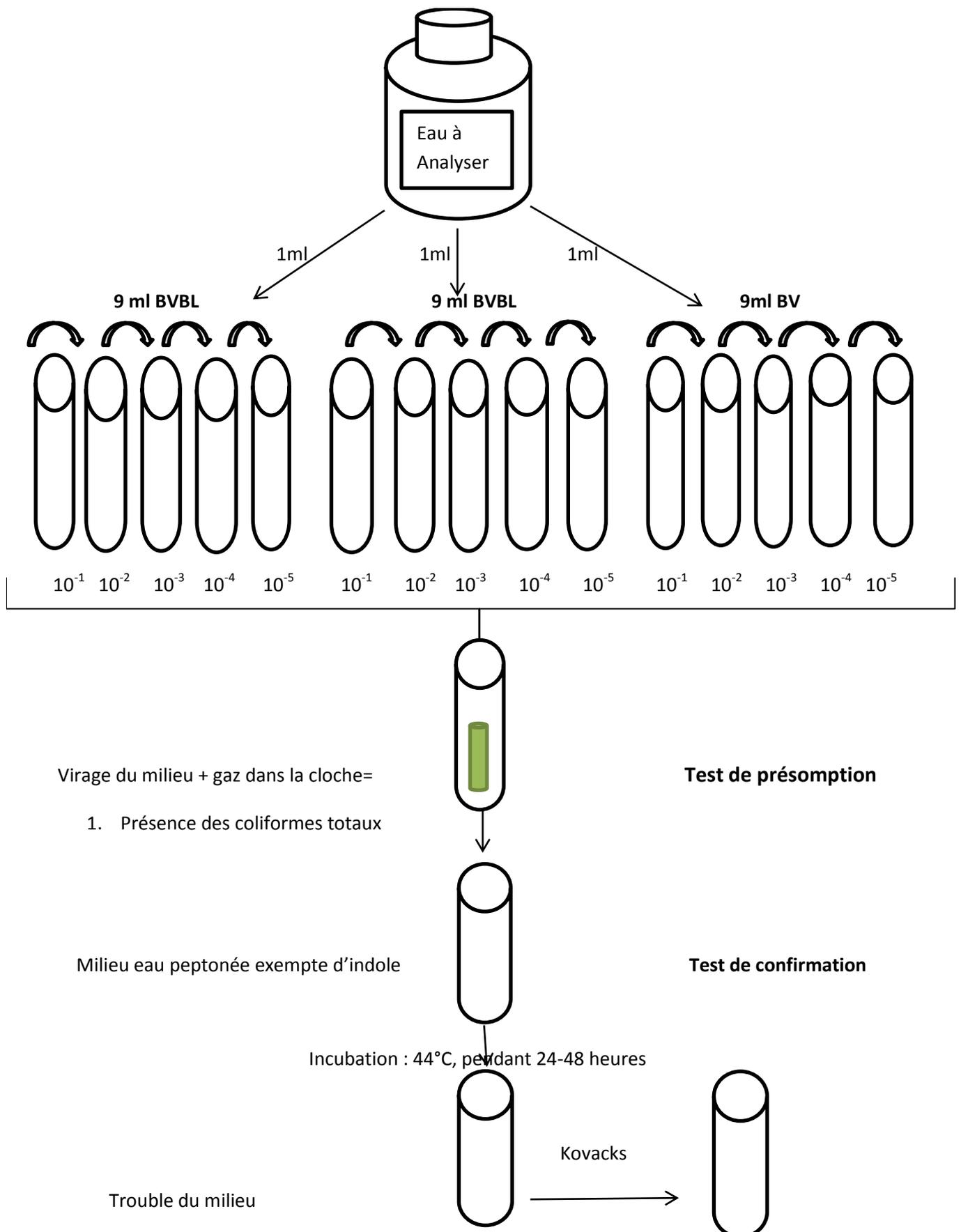


Fig 9 : Recherche des coliformes totaux

2. Recherche des streptocoques fécaux

La recherche nécessite l'utilisation un milieu Roth et un autre de confirmation de l'Eva Litsky en cas d'obtention d'un résultat positif dans le premier test.

2. Recherche des streptocoques fécaux

*A partir de l'eau à analyser, prélevé 1ml dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C pour obtenir la dilution 10^{-1} .

*Nous avons prélevé 1 ml de tube 10^{-1} et mètre dans le seconde tube Rothe pour avoir la dilution 10^{-2} .

*Prélever 1 ml de la dilution 10^{-2} dans un autre tube de milieu Rothe contenant 9 ml, pour avoir la dilution 10^{-3} .

*Refaire la technique 5 fois pour obtenir la dilution 10^{-5} , et répété la technique 2 autres séries.

*L'incubation se fait à 37° c pendant 24 heures.

- **Lecture :**

Les tubes positifs présentant un trouble donc il y a une activité biologique .

2.2. Test de confirmation

Le test de confirmation est spécifique pour la confirmation des streptocoques.

*Prélevé à l'aide d'un once bouclé le tube de Rothe positif et le plus dilue dans tube contenant le milieu Eva-Litsky, mélangé bien le milieu.

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

- **Lecture :**

*Les tubes de milieu Rothe présentant un trouble microbien sont considérés comme positifs.

*Présence d'une pastille violette au fond de tube indique la présence des streptocoques.

3. Etude des caractères biochimiques

3.1. La galerie Api20E

La galerie Api20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés.

- **Principe :**

La galerie Api20E 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 virage de couleur spontané ou révélé par l'addition de réactifs.

- **Technique :**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

*Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir avec de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide

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

*Remplir uniquement les tubes des autres tests.

*Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur Cupule d'huile de paraffine.

*Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture :**

Les Réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

*Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2 après 10 minute a minimum l'apparition d'une couleur rose franche ou rouge qui indique une réaction positive.

*Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncé indique une réaction positive

*Test IND : ajouter une goutte de réactif Kovacks. Au bout de 2 min un anneau rouge apparait qui indique que la réaction est positive.

*La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique Api20E.

3.2. La galerie classique

3.2.1. Recherches de l'acétone

Le milieu Clark et lubs permet la dégradation de l'acétone à partir d'une hydro carboné. L'ensemencement se fait largement et l'incubation se fait à «37°C pendant 24heures.

a. Test VP (Voges-Proskauer)

*Ajouter 10 gouttes d'alpha nophthol et le même volume de coude concentré.

*Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et après l'incubation.

- **Lecture :**

*Le milieu devient rose le VP+.

*Le milieu devient incolore VP-.

b. Test RM (Rouge de Méthyle)

•Ajouter 3 à 4 gouttes de méthyle.

- **Lecture :**

*Teinte rouge ; RM acidophile

*Teinte jaune : RM basidophile .

3.2.2. L'utilisation de Citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

*L'ensemencement réalisé à l'anse, à partir d'une culture pure, ensemencé à la surface de milieu Citrate de Simmons avec une piqure centrale et strie, l'incubation à 37°C.

- **Lecture :**

*Virage de milieu en bleu vert dit que le citrate est utilisé.

*Milieu vert : l'absence de citrate [4] .

3.2.3. L'utilisation de mannitol mobilité

Ce milieu est semi solide par la présence d'une concentration de rouge de phénol.

*Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur.

*Mettre à l'étuve 24h à 37°C.

- **Lecture :**

Le virage de couleur vers jaune c.-à-d. il ya une fermentation de mannitol ce qui traduit l'utilisation de 2 acides.

*Milieu rouge : mannitol+.

3.2.4. Utilisation de TSI

Ce milieu permet la fermentation du glucose, du saccharose, du lactose ; la production de H₂S et la production du gaz.

*L'ensemencement avec une piqure centrale.

*L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. [4]

- **Résultat :**

*Virage de la couleur vers le jaune : dégradation d'hydrate de carbone, positif.

*Formation des zones noire H₂S+.

3.2.5. Utilisation de bouillon nitrate

Ce milieu permet la réduction des nitrates en nitrites, et l'utilisation d'enzyme nitrate reductase.

*L'ensemencement sur le milieu nitrate.

*L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. [4]

- **Lecture :**

*Anneau rouge : nitrate+.

*L'absence de l'anneau rouge : nitrate-.

4. Tests complémentaires :

4.1. Test de catalase

- **Principe :**

Cette enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit par certaines réactions cellulaires et très toxique, l'une des enzymes chargée d'éponger l'eau oxygénée par la dismutation (PELMONT, 1993).

La réaction catalysée est la suivante :
$$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$$

- **Technique :**

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever un fragment d'une colonie bactérienne isolée et le mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame propre et séchée.

- **Lecture :**

*Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase (+).

*Pas de bulles : catalase (-).

4.2. Test d'oxydase

- **Principe :**

Cette enzyme intervient dans divers couples d'oxydoréduction

- **Technique :**

*Déposer un disque pré-imprégné de réactif N diméthyl paraphénylène diamine (disque oxydase) sur une lame propre.

*Imbiber le disque d'une goutte d'eau distillée stérile.

*Déposer au-dessus une parcelle de culture à l'aide d'une pipette Pasteur.

*Homogénéisation la colonie avec le disque.

- **Lecture :**

Une coloration violette de disque : Les germes possèdent l'enzyme oxydase → type respiratoire d'une bactérie aérobie.

Pas de modification de la couleur de disque : les germes ne possèdent pas d'oxydase →

Type respiratoire d'une bactérie anaérobie.

4.3. La recherche d'enzyme l'ortho-nitro-phénol-galactosidase (ONPG)

- **Principe :**

L'ONPG est un disque scindé par l'enzyme en libérant de l'ortho-nitro-phénol-galactosidase, composé soluble jaune.

- **Technique :**

*Réaliser une suspension bactérienne.

*Ajouter un disque imprégné dans la suspension.

*Incuber 30 min à 37°C.

- **Lecture :**

*Coloration jaune : éclatement des cellules ; la libération de l'enzyme β galactosidase.

*L'absence d'une coloration : l'absence d'une libération de l'enzyme.

-Analyse microbiologique

1. Identification fongique

Notre analyse nous a permis d'identifier les espèces fongiques suivantes :

1.1. *Aspergillus.niger*

a. Caractères cultureux

A une température de 28°C, on remarque une croissance rapide de 2-3 jours sur le milieu sabouraud, les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanchâtre au début puis deviennent jaunes, enfin en stade de maturité elles deviennent noires. Les revers des colonies sont incolores.



Fig11: Sabouraud 28°C (recto)

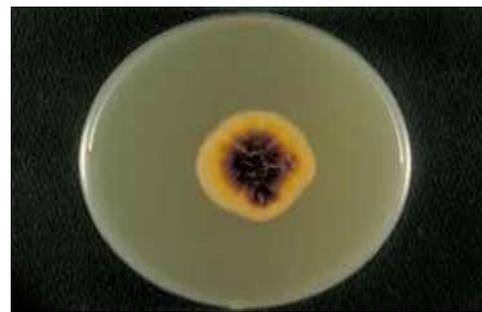


Fig11: Sabouraud 28°C (verso)



Fig12 : *Aspergillus. Niger* (X100)

b.Morphologie microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées, radiées sont disposées en plusieurs colonnes.

1.2. *Penicillium chrysogenum*

a. Caractères cultureux

A 28°C dans le milieu Czapek simple les colonies présentent un diamètre qui atteint 2,8 à 3,6 cm pendant 7 jours. Le reverse est d'une couleur blanchâtre qui dérive vers les jaunes.



Fig13: Czapek simple 28°C (recto)



Fig13: Czapek simple 28°C (verso)



Fig14: *Penicillium chrysogenum* (X100)

b. Aspect microscopique

Les conidies ellipsoïdales, se forme de longues chaines irrégulières.

1.3. *Aspergillus Candidus*

a. Caractères cultureux

A une température de 37°, les colonies présentent une croissance lente de 5 à 7 jours, elles sont blanchâtre au début puis deviennent jaune pâle.



Fig15: CzapeK concentré 37°C (recto)



fig15 : CzapeK concentré 37°C(verso)

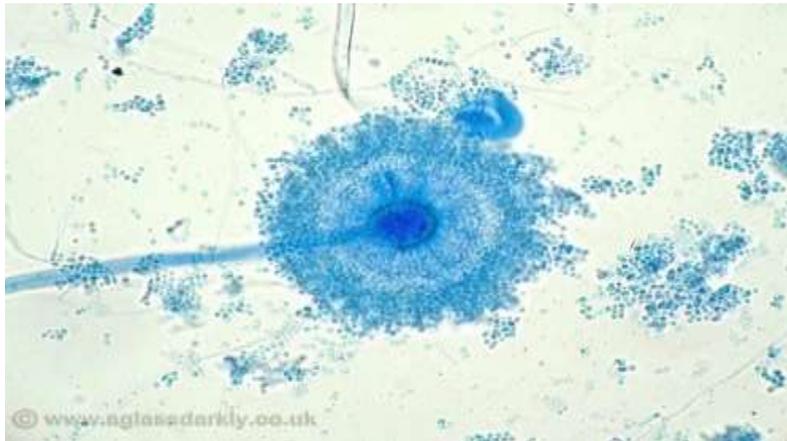


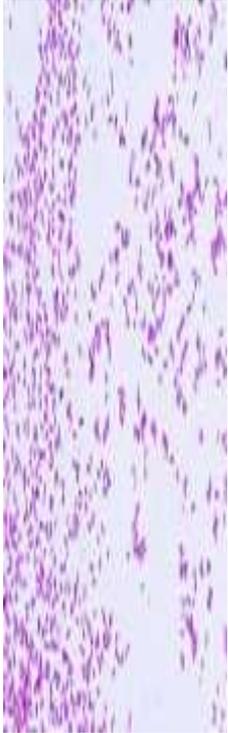
Fig16 : *Aspergillus Candidus* (X 100)

b. Aspect morphologique

Les conidies globuleuses sont lisses, avec une tête aspergillaire bisériée.

2. Analyse Bactériologique

2.1. Le milieu GN

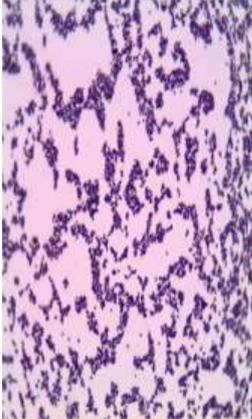
Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Galerie Biochimique	Test Complémentaire	L'espèce
 	 <p>Ce sont des coccobacilles à Gram négatif</p>	<p>-B. nitrate +</p>  <p>-Permet la réduction de nitrate en nitrite par l'enzyme nitrate réductase.</p> <p>-Mannitol -</p>  <p>-Formation des 2 acides (Acétique et forique).</p> <p>-TSI -</p> <p>-pas de formation des zones noires.</p> <p>-Citrate de simmonce +</p>  <p>-Le citrate est une source d'énergie au lieu le carbone.</p> <p>- RM +</p>	<p>- Catalase +</p>  <p>-Permet la différentiation entre streptocoque et staphylocoque.</p> <p>-Oxydase -</p>  <p>-Permet de déterminer le type respiratoire des bactéries.</p> <p>-ONPG +</p>  <p>-Permet l'éclatement des cellules et libération de l'enzyme β galactosidase.</p>	<p><i>E. Coli</i></p>

		 <p>-Permet la dégradation de l'acétone à partir d'une molécule hydro carboné. -API 20</p>  <p>-Système miniature permet déterminé plus les caractères au lieu d'utilise la galerie classique.</p>		
--	--	--	--	--

L'observation des colonies sur le milieu GN après leur incubation à 37°C durant 24 heures à démontré que ces colonies sont de Gram négatif.

Les résultats des tests, galerie biochimique et test complémentaire révèlent la présence massive d'*E. Coli* appartenant à la famille des entérobacteriacea.

2.2. Le milieu Chapman

Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Galerie biochimique	Galerie biochimique	L'espèce
	 <p>Se sont des coques gram positifs</p>	<p>-B.nitrate -</p>  <p>-L'absence de la réduction de nitrate en nitrite.</p> <p>-Mannitol +</p>  <p>-Fermentation de mannitol ce qui traduit l'utilisation de 2 acides forique et acétique.</p> <p>-TSI +</p> <p>-Permet la dégradation d'hydrate de carbone et formation des zones noire.</p> <p>-Citrate de Simmons +</p>  <p>-Le citrate est un source d'énergie au lieu le</p>	<p>-Catalase -</p> <p>-L'absence de dégagement gazeux</p> <p>-Oxydase +</p>  <p>-Permet de déterminer le type respiratoire des bactéries.</p> <p>-ONPG +</p>  <p>-Permet l'éclatement des cellules et libération de l'enzyme β galactosidase.</p>	<p><i>S. aureus</i></p>

		carbone. - RM -  -L'absence de dégradation de l'acétone donc basidophile.		
--	--	---	--	--

Le milieu Chapman est caractérisé par sa forte concentration en chlorure de sodium ce qui permet un isolement sélectif des staphylocoques. La plus part des colonies, observables sur le milieu de Chapman après une incubation de 24 heures à 37°C, sont des Gram positifs.

Les résultats des tests, galerie biochimique et test complémentaire révèlent la présence massive de *S. aureus* appartiennent à la famille des micrococcaceae.

2.3. Dénombrement des coliformes (C) totaux et fécaux :

La recherche et le dénombrement de l'ensemble des coliformes, sans préjuger de leur appartenance taxonomique et de leur origine, est capital pour la vérification de l'efficacité d'un traitement d'un désinfectant mais il est d'un intérêt nuancé pour déceler une contamination d'origine fécale.

Par manque de moyens, le dénombrement de l'ensemble des coliformes et des streptocoques fécaux n'a pas pu être exercé sur tous les sites. Cela nous a permis néanmoins de faire le calcul sur le site 1.

L'évolution du nombre de l'ensemble des coliformes dans les eaux du lac Oubeïra est présentée dans le tableau suivant :

Tableau5 : nombre des coliformes totaux et fécaux

Stations	Coliformes (NPP/10ml)
S₁	300,0 CF et CT/ml

2.4. Dénombrement des streptocoques fécaux (SF) :

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contamination récente par la matière fécale des animaux. Les résultats de dénombrements de ces derniers réalisés sur le site1 sont présents dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Nombre de streptocoques fécaux

Stations	SF (NPP/10ml)
S1	200,0 SF/ml

Ces résultats, représentent une démarche de départ vers d'autres analyses qui peuvent compléter notre étude et remettre en question le pouvoir pathogène de ces germes sur la santé public et la pollution des eaux de surface.

Conclusion et perspectives

Ce présent travail a pour objectif d'identifier les germes existants dans les eaux du lac Oubeïra.

Bien que notre étude ne soit pas exhaustive dans la mesure où elle n'a pas concerné le dénombrement des germes existants dans ces eaux. Cela nous a permis néanmoins de présenter un état des lieux de la zone d'étude en faisant ressortir certains résultats. La synthèse de ces derniers nous a permis :

L'identification de deux flores microbiennes importantes appartenant à la famille des entérobacteriaceae (*E. coli*) cette espèce est souvent responsable des gastro-entérites graves pouvant être mortelles dans certains cas à l'absence de traitement. Et la famille des micrococcaceae (*S. aureus*) qui est responsable dans ce cas-là des infections cutanées. Et également d'une microflore fongique de type (*A.niger, A.candidus, P.chrysegenum*). ces dernières peuvent être pathogènes ou saprophytes .

La pollution microbiologique des lacs reste un problème majeur pour l'environnement et la santé publique. Devant cette menace, les pouvoirs publics ne doivent pas rester inactifs puisque les efforts et les idées d'action dans ce domaine ne manquent pas : on parle à titre d'exemple d'instaurer des contrôles systématiques (mensuels, voire journalière) des eaux des lacs avec des résultats rendu publics.

Des efforts au niveau de recherche considérables pourraient être menés au niveau de l'analyse microbiologique pour la prévention des réactions du milieu avec la flore microbienne préexistante.

Résumé

Notre étude a pour objectif d'isoler et d'identifier la flore microbienne existante dans les eaux du lac Oubeira. Nos résultats ont révélé la présence des bactéries appartenant aux deux familles : Entérobactéries (*E- coli*) et micrococaceas (*S aureus*). Les résultats ont démontré ainsi la présence d'une flore fongique (*A.niger, A.candidus, P.chrysegenum*).

Ces germes identifiés peuvent exercer un pouvoir pathogène ou saprophyte.

Mots clés : Lac Oubeira, microflore, bactéries, identification fongique.

Abstract :

The present Study , is aims to isolate and identify microbial flora, existed in the waters of lake Oubeira .

Our results revealed the presence of bacteria delenging to Enterobacteriaceae(*E.coli*)and Micrococaceae(*S.aureus*) families. Also the presence of sungal flora (*A. niger, A.dandidus, P.chrysegenum*) was demonstrated by our microbiological analysis . These germs identified couled be pathogenic or saprophietes.

Keyword : Lake Oubeira, fungul identification, bacteria, microbial flora.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى عزل و التعرف على مختلف الكائنات المجهرية المتواجدة بمياه بحيرة اوبيرا نتائج هذه الدراسة اثبتت تواجد كما اثبتت تواجد فطريات (*S.aureus*) و Micrococaceae (*E. Coli*) عشائر بكتيرية تنضم الى عائلة

(*A. niger ,A. Candidus , Chrysegenum. P*) مجهرية

هذه الكائنات الدقيقة المتعرف عليها قادرة ان تكون ممرضة او متعايشة

كلمات مفتاحية : بحيرة اوبيرة, فطريات مجهرية, بكتيريا