

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 : Biologie
Spécialité : Santé, Eau et Environnement

Thème

La qualité bactériologique de l'eau d'Oued El Hammam
(Hammam Ouled Ali)
Guelma

Présenté par :

- Ramdani Sarra.
- Sadouki Hanane.
- Yousfi Sana.

Devant le jury composé de :

Président : M. ATOUSSI Sadek (M.A.A)
Examineur : M. MERZOUG Abd elghani (M.A.A)
Encadreur : M. M. HOUHAMDI Moussa (Pr.)

Juin 2011

Sommaire

Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I : Description de la zone d'étude	3
1.1. Historique de Hammam Ouled Ali	3
1.2. Situation géographique de la région	3
1.3. Caractères géologique	5
1.4. Réseau hydrographique	7
1.5. Etude climatologique	7
1.5.1. Température	8
1.5.2. Humidité relative de l'air	9
1.5.3. Synthèse climatique	10
Chapitre II: Matériel et méthodes	13
2.1. Prélèvement et échantillonnage	13
2.1.1. Matériel de prélèvement	15
2.1.2. Méthode de prélèvement	15
2.1.3. Enregistrement et étiquetage des échantillons	15
2.1.4. Transport des prélèvements	15
2.2. Paramètres bactériologiques	16
2.2.1. Les coliformes	16
2.2.2. Coliformes fécaux	17
2.2.3. Coliformes totaux	17
2.2.4. Les streptocoques fécaux	17
2.2.5. Les staphylocoques	18
2.3. Matériel	18
2.4. Méthode d'analyse bactériologique	18

2.4.1. Evaluation des germes totaux (G.T)	18
2.4.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT) Avec identification d' <i>Escherichia coli</i>	19
2.4.3. Recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et <i>Escherichia coli</i>	20
2.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux	23
2.4.5. Les streptocoques fécaux	23
2.4.6. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfitoréducteurs (ASR)	25
2.4.7. Recherche des germes pathogènes	26
2.4.7.1. Recherche des <i>Salmonella</i> et de <i>Shigella</i>	26
2.4.7.2. Recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.4.7.3. Recherche des Vibrions cholériques	30
2.4.7.4. Recherche des <i>Staphylocoques</i>	30
2.5. Recherche de Levures	33
2.6. Identification	34
 Chapitre III : Résultats	 43
 3.1. Résultats de la recherche et du dénombrement des micro-organismes de l'eau.	 43
3.1.1. Recherche et dénombrement des témoins de contamination fécale	43
3.1.1.1. Coliformes	43
3.1.1.2. Streptocoques fécaux	44
3.1.1.3. Les Anaérobies sulfito-réducteurs(ASR)	45
3.1.2. Identification des souches bactériennes	46
3.1.2.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram	46
3.1.2.2. Résultats de l'identification biochimique	50
 Discussion et conclusion	 53
 Résumé	
Références bibliographiques	
Annexes	

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dieu tout puissant de Nous avoir donne la vitalité et le pouvoir pour concrétiser ce projet.

Nos vifs remerciement vont à notre encadreur Mr. Houhamdi Moussa à proposer et discuter le sujet, il nous beaucoup aidé par ses conseils et son expérience, son soutien et surtout sa patience.

Nous adressons également nos sincère remerciement à Mr Atoussi Sadek qui à bien voulu présidé le jury de se memoire.

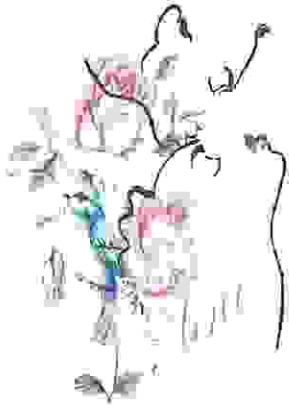
Notre gratitude va également Mr. Merzoug Abd Elghani, qui nous honore par sa participation de notre jury d'examinassions.

Nous tenons à exprime notre profonde gratitude au Chef de département Mlle. Ghazal N.

Touts les enseignants et les enseignantes du département de biologie qui ont contribue à notre formation durent les Cinq années.

Enfin, tout les étudiants de Master Santé, Eau et Environnement

(2010-2011) et tout ceux qui de pries et de loin partent à l'élaboration directe et /ou indirecte de ce modeste travail.



Dédicaces

Je dédie ce fruit de fin d'étude à la science.

A mes très chers parents :

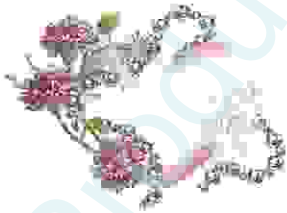
*A toi maman, la fleur de ma vie et le symbole de tendresse et du courage
qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite.*

*A toi papa, qui nous a toujours encouragés et institués a terminé mon
étude.*

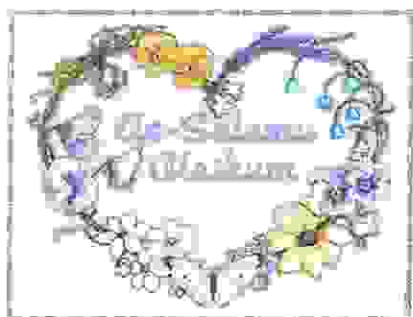
*Merci à mes proches pour m'avoir soutenu par leur présence dans les
bons comme dans les mauvais moments ; mes sœurs Kshawla, Oumayma,
mon frère Amer, mes cousines : Nesrine et Abir.*

*A mes merveilleuses amies : Hanouna, Souma, Meryeme, Bouchra et
Loubna.*

Je dédie ma grande famille.



Sara



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents et qui m'ont assuré un soutien inconditionnel sans lequel je n'aurais jamais pu terminer mes années d'études pour ces conseils et son encouragement.

Pour m'avoir donné la possibilité de faire ce que je voulais et à leur affection, leur patience et leur compréhension

Merci à mes proches pour m'avoir soutenu par leur présence dans les bons comme dans les mauvais moments: ma sœur ibtissem, ET mes frères; Sami, rida, wahid

Je voudrais aussi remercier toutes mes très chères Amies: souma, houda, Sara

Pour finir, Je voudrais aussi remercier plus spécialement à mon marie Nour Dine pour leur amour.



Hanane



Dédicaces

Je dédie ce travail à mes plus chers êtres au monde :

Ma mère et mon père pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien moral et matériel durant toutes les étapes de ma vie.

A mon deuxième père Mr : Houhamdi Moussa.

A mes chers frères: Khaled, Omar, Boubaker et Zakaria.

A mon chère oncle: Brahim et a sa famille.

A mes chères amies : Hanan, Sara, Wahiba, Biba, Houda.

A mes chères cousines : Salma, Rima, Marwa, Karima, Samah et Iman.

Et à tous qui me connaître bien.



Souma

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1.1	Situation géographique de la région	4
Figure 1.2	Photo satellite de la région	5
Figure 1.3	Carte représentant le réseau hydrographique d'Oued el Hammam	7
Figure 1-4	Courbe d'évaluation des températures de la région d'étude (Années 1994-2010)	9
Figure 1-5	Evaluation mensuelle des humidités relatives de la région d'étude (1994- 2010)	10
Figure 1.6	Diagramme pluvio-thermique de la région d'étude de Guelma (1994 – 2008)	11
Figure 1.7	Climagramme d'Emberger de la région Guelma (1994-2010)	12
Figure2-1	Carte représentant les sites de prélèvement dans l'Oued de Hammam Ouled Ali	14
Figure.2.2	Recherche et dénombrement des coliformes, des coliformes thermo tolérants	22
Figure.2.3	Recherche et dénombrement des <i>Streptocoques</i> fécaux	24
Figure 2.4	Préparation de l'inoculum	36
Figure 2.5	Galerie APi20E	37
Figure 2.6	Fiches des résultats de l'APi20E	37
Figure 2.7	Test d'oxydase	38
Figure 2.8	Test de citrate	39
Figure 2.9	Réaction d'indole négative	41
Figure 2.10	Réaction d'indole positive	41
Figure 3.1	Résultat de la recherche des coliformes	43
Figure 3.2	Estimations des coliformes / ml dans l'eau d'Oued El Hammam	44
Figure 3.3	Résultat de la recherche des streptocoques fécaux	44
Figure 3.4	Estimation des streptocoques fécaux / ml dans l'eau d'Oued El Hammam	45
Figure 3.5	Observation macroscopique des colonies	47
Figure 3.6	Observation microscopique des colonies	49
Figure 3.7	Résultats de quelques identifications biochimiques par API 20E	51
Figure 3.8	Résultats de quelques identifications biochimiques par galerie classique	52

Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau 1.1	Evaluation des températures mensuelles de la région d'étude (Années 1994-2010)	Annexe
Tableau 1.2	Evaluation mensuelle des humidités relatives (1994-2010)	Annexe
Tableau 2.1	Caractéristiques des points de prélèvement	13
Tableau 2.2	Nature et période du prélèvement	14
Tableau 2.3	Caractères d'identifications biochimiques de <i>Salmonella</i>	27
Tableau 2.4	Caractères d'identifications biochimiques de <i>Shigella</i>	28
Tableau 2.5	Caractéristiques d'identification des principales espèces de <i>Pseudomonas</i>	29
Tableau 2.6	Les principaux caractères biochimiques des staphylocoques isolés en microbiologie	33
Tableau 2-7	Tableau de lecture (Api 20F)	Annexe
Tableau 3.1	Evolution du nombre des coliformes	43
Tableau 3.2	Evolution du nombre des Streptocoques fécaux	44
Tableau 3.3	Résultat de la recherche des Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR).	45
Tableau 3.4	Les caractères macroscopiques des eaux d'Oued El Hammam	46
Tableau 3.5	Les caractères microscopiques de l'eau d'Oued El Hammam	48
Tableau 3.6	Résultats biochimiques de l'API 20 E	50
Tableau 3.7	Résultats biochimiques de la galerie classique	52

Liste des abréviations

ASR : Anaérobies sulfitoréducteurs

BCPL : Bouillon lactose au pourpre de bromocrésol.

°C : Degré Celsius

CF : Coliformes fécaux

CT : Coliformes totaux

D/C : Double concentration

Fig : Figure

g/l : Gramme par litre

GN : Gélose nutritive

h : Heures

IND : Indole

LDC : Lysine déshydrogénase

Mg : milligramme

ml : millilitre

n ° : numéro

NPP : Nombre le plus probable

OMS : Organisation mondiale de santé

ONPG: Ortho-Nitrophényle-B-D-Galactosidase

P : Précipitations moyennes annuelles

pH: Potentielle Hydrogène

Q₂ : Quotient pluviométrique

R : Résistante

RM : Rouge de méthyle

S : Sensible

S/C : Simple concentration

SF : Streptocoque fécaux

FeS : sulfure de fer

T : Température

Tab : Tableau

TDA : Tryptophane décarboxylase.

TSI : Triple Sagar Iron

UFC : Unité formant colonie

VF : Viande Foie

VP : Voges Proskawer

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced with ScanTOPDF

L'eau est une molécule originale, un composé vital, une vésicule fatale, un enjeu mondial ou une question de chimie banale?

L'eau est répandue partout sur terre, et répartie de manière inégale sous des formes différentes : les glaciers, les rivières, les lacs et les réservoirs naturels, les eaux souterraines, l'eau de mer, l'eau fossile, l'eau virtuelle. Tous ces états de l'eau, que l'on retrouve au cours de son cycle, sont abordés par l'auteur en lien avec les interactions naturelles et les besoins humains.

L'eau est tout à la fois: une originalité physique, une curiosité chimique, et par la même un véhicule de pollution, et peut être est souillée, polluée ou contient des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, parasites) en fonction de l'intensité de la pollution et qui sont responsables de plusieurs maladies hydrique transmissibles.

La pollution des eaux de surfaces à différentes origines principalement est issus de différentes activités humaines que ce soit domestiques et/ou industrielles demeurent un problème de santé publique. Le contrôle biologique de ces eaux est cependant devenu important car il peut dans certains cas éviter de grandes catastrophes. Ce contrôle est basé principalement sur des dénombrements microbiens des différents écosystèmes aquatiques associé à la recherche des indicateurs de pollution fécale et des bactéries pathogènes. Ce problème a été sérieusement signalé ces dernières années et demande des solutions immédiates et efficaces, pour cela nous avons essayé d'étudier et déterminer la qualité microbiologique d'un système aquatique Oued El'Hammam a proximité de la région Hammam Ouled Ali, dont d'objectif principal est étudié la qualité bactériologique de l'eau avec la recherche d'éventuels présence de germes test de contamination fécale (dénombrement et recherche de coliformes, coliformes fécaux, streptocoques fécaux avec identification de la microflore existante) et des bactéries pathogènes existantes.

Notre travail est une permettant de donner un bilan des connaissances sur l'état du milieu. Nous avons organisé notre méthodologie en trois chapitres interdépendants :

-Le premier chapitre présente le domaine d'étude, la situation géographique de l'aire d'étude (Oued de Hammam Ouled Ali.)

-Le second chapitre présente le matériel et les techniques de recherche pour la réalisation de ce travail.

-Le troisième chapitre expose les résultats descriptifs issus des analyses de nature bactériologique.

Enfin, une conclusion clôture le mémoire.

Chapitre I

Description de la zone d'étude

Produced With Scantopdf

1.1. Historique de Hammam Ouled Ali :

Le village Hammam Ouled Ali situé par les romains, est fondé en 1964 sur le nom de village Ben Bella, le vieux village situé sur le côté ouest de la route n°168. Puis en 1974 sous l'égide du gouvernement à l'époque: Le village a été associé aux groupes agricoles socialistes.

1.2. Situation géographique de la région:

La région de Hammam Ouled Ali est située dans l'axe de la partie nord de la route de wilaya n°168, qui relie le chemin de montage de la nationale n° 80 à Hammam Bradaa , et donc à la route nationale n° 21 , qui relie Annaba a Guelma; Sa zone d'assemblage est de 25 hectares.

Elle est limitée par :

- Au Nord: commune de BOUATI MAHMOUD
- Au Sud: commune de HELIOPOLIS
- A l'Ouest: commune d'ELFEDJOUJ
- A l'Est: commune de NECHMEYA
- Au Sud-est: commune de GUALAT BOUSBAA.

Ses coordonnées géographiques sont comprises entre 7°34.30.09 "E et 36°34.09"N élevé: 366m.

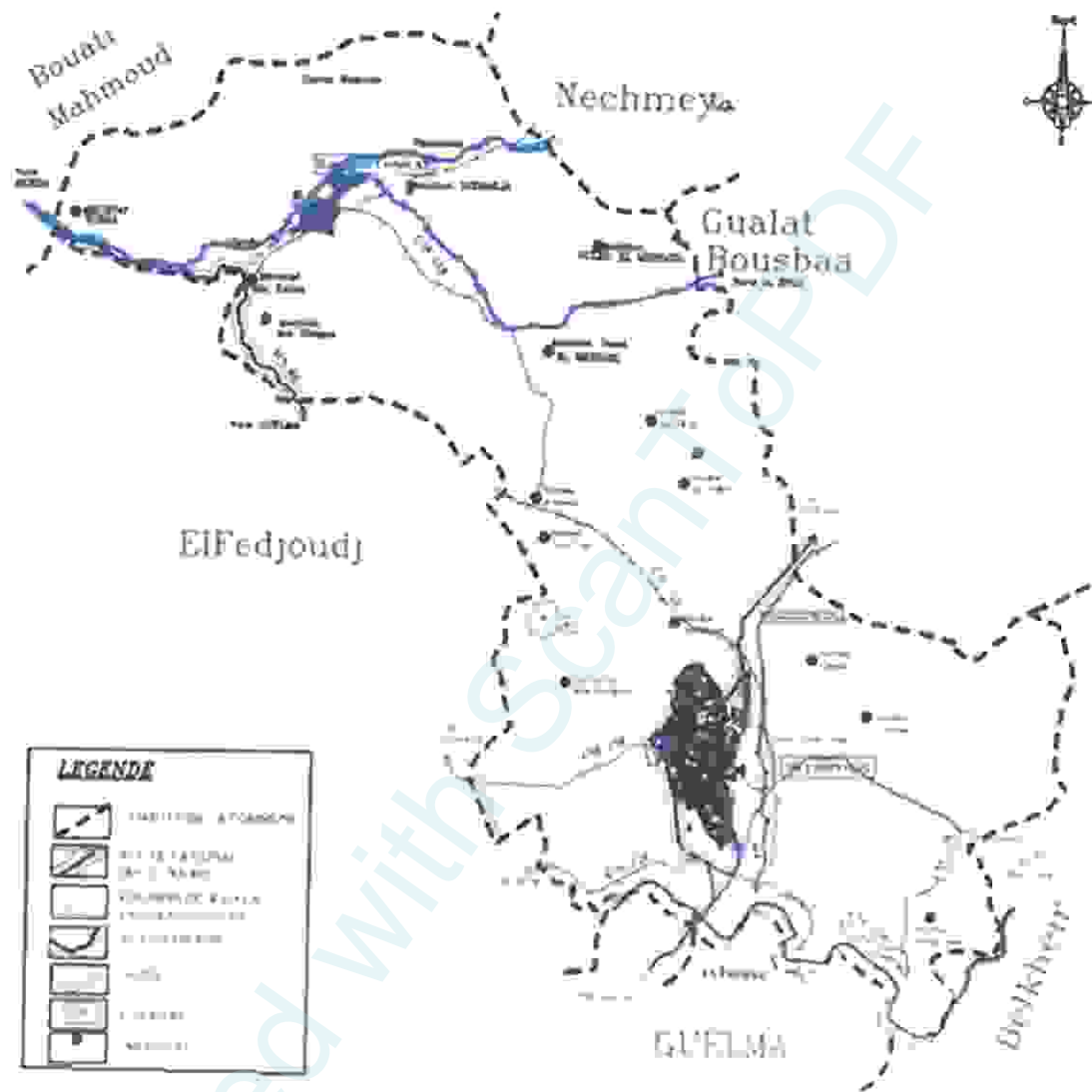


Fig. 1.1 ; Situation géographique de la région (P.D. A.U)

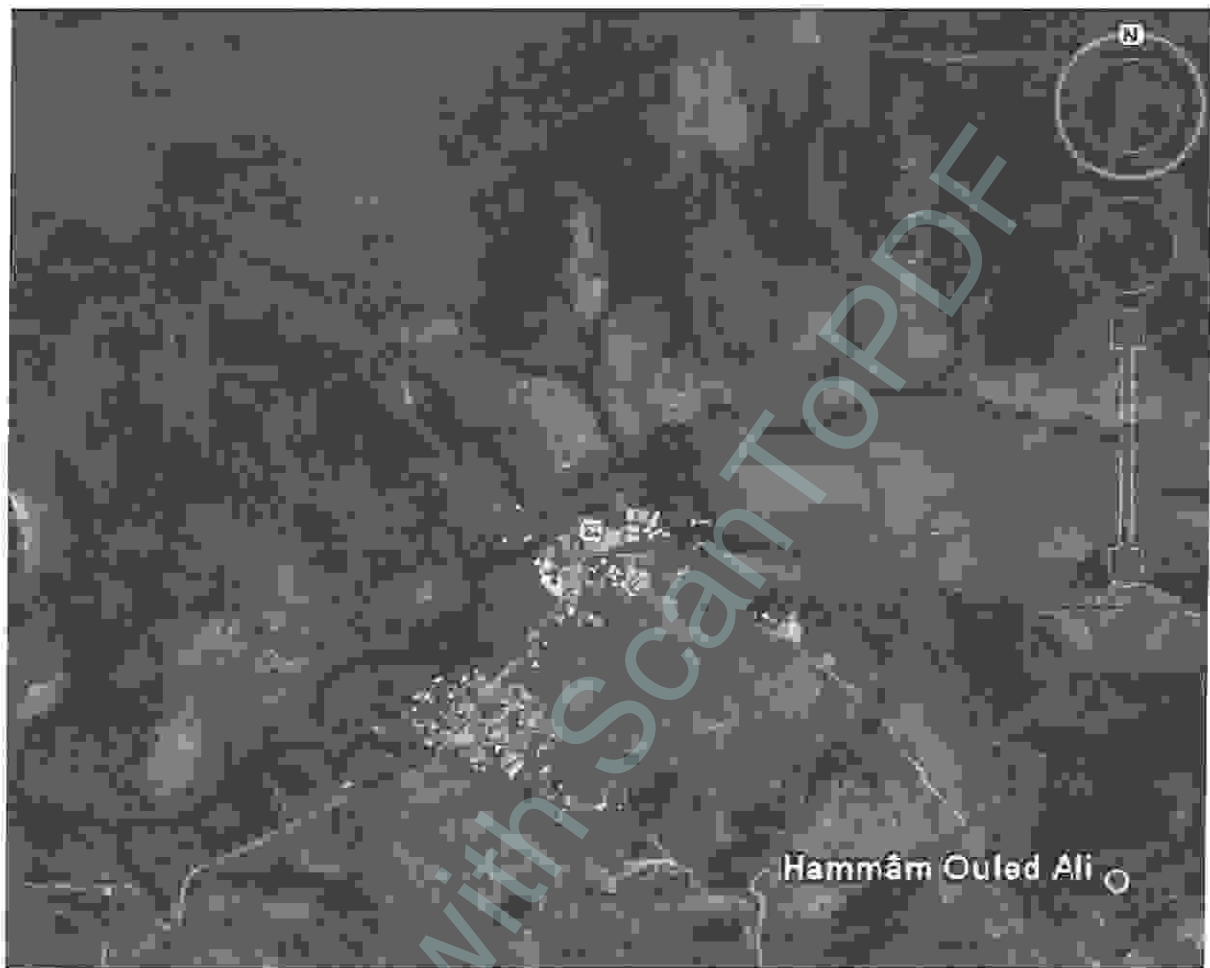


Fig. 1.2 : Photo satellite de la région (Google Earth 2011).

1.3. Caractères géologique:

La géologie de la région est composée de couche de calcaires et d'argiles de couleur jaune et rouge. Le sol est formé de :

- boue ou de gravier cristallisé de mal porosité
- Argile jaune
- Sable
- Calcaire
- Les dépôts de quaternaire terme l'argile de sable et de gravier, de sable et d'argile.

‡ Valeur agricole :

Le bureau national des études pour le développement rural (BNEDER) a classé la valeur agronomique des terres de la commune en catégories regroupant plusieurs variantes de milieux physiques à savoir : la lithologie, les pentes, l'épaisseur du sol, la nature du sol, la stabilité du terrain. Pour établir une classification des sols en fonction de leurs altitudes culturales. Le croisement de ces variantes a donné la synthèse suivante :

- 1- Très hautes potentialités agricoles
- 2- Haute potentialités agricoles
- 3- Moyennes potentialités agricoles
- 4- Faibles potentialités agricoles
- 5- Médiocre potentialités agricole.

D'après l'analyse on constate que la surface agricole utile dans la commune représente 53,57% de la surface totale de la commune. Quant à la surface agricole totale, elle représente 67,34% de la surface totale de la commune (P.D.A.U).

1.4. Réseau hydrographique :

Le réseau hydrographique est l'ensemble des cours d'eau, affluents, et sous affluents, permanents ou temporaires, par lequel s'écoulent toutes les eaux de ruissellement et convergent vers un seul point de vidange du sous bassin versant. (Ghodban, 2009).

Le canal Oued El Hammam présente une altitude égale à 218m et une distance de 31.530km jusqu'à l'ouvrage de la digue du barrage Zit Emba. Le réseau hydrographique est schématisé dans la figure (Fig.1.3).

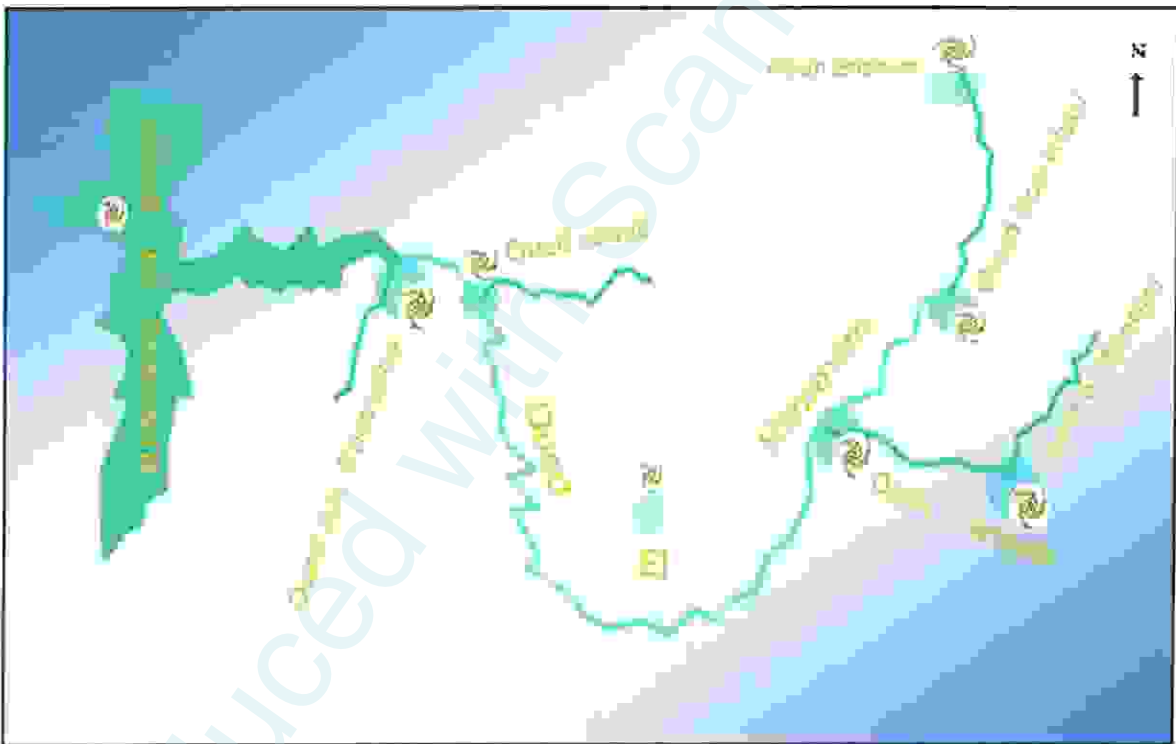


Fig. 1.3: Carte représentant le réseau hydrographique d'Oued el Hammam.

1.5. Etude climatologique :

Le climat est un facteur abiotique important dans l'étude de la typologie et la fonction d'un milieu. La région de Guelma est caractérisée par un climat continental avec des hivers froids et pluvieux, de type humide et subhumide. Des étés très chauds et secs, quelques nuages

orageux rompent la monotonie du temps, accompagnés d'averses de grêle et de fortes précipitations brèves et locales, alterne souvent avec des chaleurs brûlantes qui peuvent se manifester de manière violente même en Juillet et début Août.

Les caractéristiques climatiques (La température et l'Humidité relative) de la zone d'étude sont obtenues à partir des données de la station météorologique de Guelma pour une période s'étalant de 1994 à 2010.

1.5.1. Température :

Les températures sont variables d'une saison à l'autre avec des amplitudes parfois très importantes. Les moyennes des semestres froids (nov - avr.) et chauds (mai - oct.) sont respectivement 12,10 et 22,70°C. Les données statistiques dont nous avons fait état sont consignées dans le tableau 1-1 (Annexe) donne pour chaque mois de l'année les températures suivantes :

- ⬇ Tm moyenne de tous les maxima du mois.
- ⬆ T° moyenne de tous les minima du mois.
- ⬇ M moyennes annuelles des températures.

Elle donne les valeurs pour le mois le plus chaud et le mois le plus froid. Les résultats d'observations faites pendant 17 ans (1994-2010).

La figure 1.4 nous donne l'évolution de la température en 1994 à 2010 selon les différents mois de l'année. Cette figure montre que :

La température moyenne annuelle est de 17,83 C°. On note que la température moyenne mensuelle la plus élevée est celle du mois d'août (27,51°C) alors que la température la plus basse est celle du mois de janvier (9,82 °C).

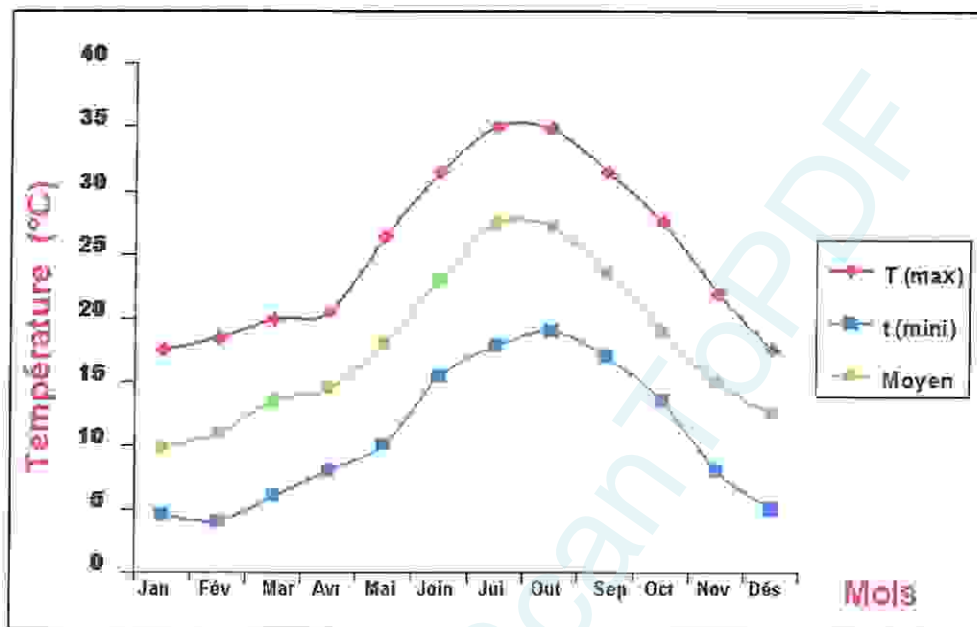


Fig. 1.4 : Courbe d'évaluation des températures de la région d'étude
(Années 1994-2010)

1.5.2. Humidité relative de l'air :

On distingue deux variantes d'humidité :

1- L'humidité absolue :

C'est la masse de vapeur d'eau contenu dans un mètre cube d'air. Elle est exprimée en gramme par mètre cube.

2- L'humidité relative :

C'est l'état plus ou moins proche de la condensation de la vapeur d'eau dans l'atmosphère, elle est exprimée en pourcentage.

Les données récoltées sont enregistrées dans le tableau 1-2 (Annexe).

La moyenne de l'humidité relative dans la période allant de l'année 1994 jusqu'à l'année 2010 est de l'ordre de 68.66%. Le maximum est enregistré au mois le plus froid (janvier 76.58%) et le minimum en le mois le plus chaud (juillet 55.04%).

L'humidité semble évoluer en sens inverse de la température et subir l'influence du vent. En effet, plus les températures sont élevées et plus les vents deviennent forts, plus les humidités relatives diminuent de façon marquée (Fig. 1-5). (Reggam, 2010).

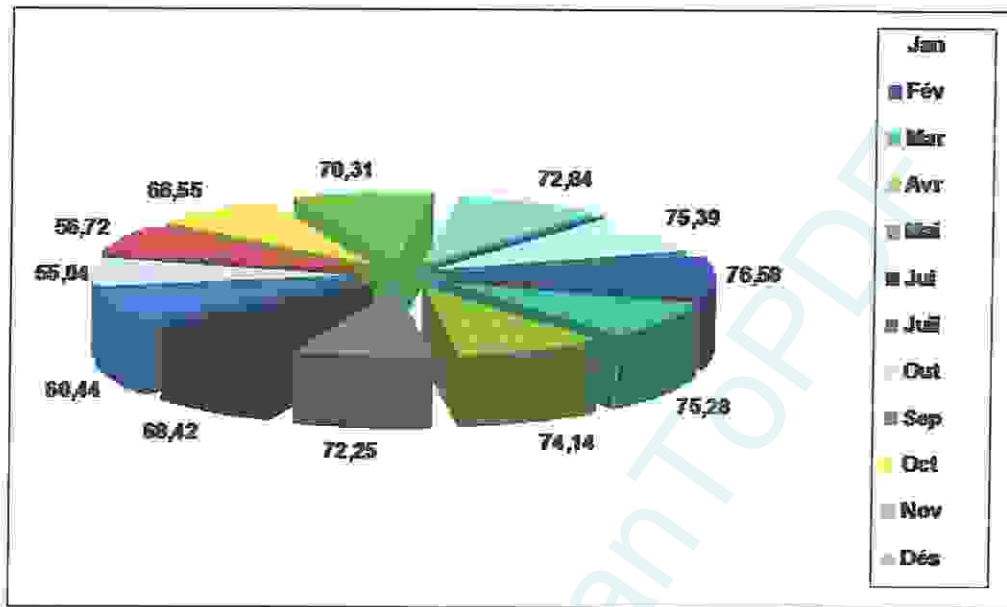


Fig. 1.5 : Evaluation mensuelle des humidités relatives de la région d'étude (1994- 2010)

1.5.3. Synthèse climatique :

A. Diagramme Ombrothermique de Gaussen et Bagnouls :

Selon Bagnouls et Gaussen, une période sèche est due au croisements des température et des précipitations. Cette relation permet d'établir un graphc pluviomé quel les températures sont portées à une échelle double des précipitations: (Fig.1.6).

D'après ce diagramme établi à partir données des températures et des précipitations de la station de Guelma, on peut distinguer deux périodes;

- La première froide et humide qui s'étale sur 8 mois, du mois d'octobre jusqu'au mois de mai.
- La seconde chaude et sèche qui s'étale sur 4 mois, du mois de juin jusqu'au mois de septembre.

La détermination de cette période est d'une grande importance pour la connaissance de la période déficitaire en eau. (Aouissi, 2010)

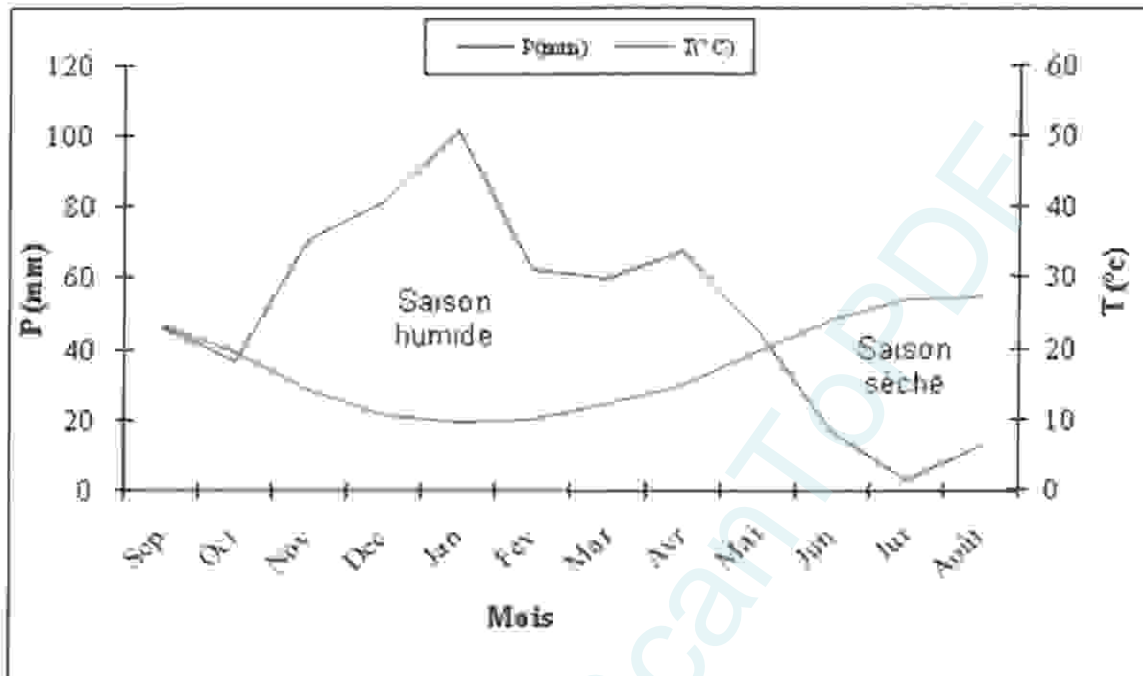


Fig. 1.6: Diagramme pluvio-thermique de la région d'étude de Guelma (1994 – 2008)
(Aouissi, 2010)

B. Quotient pluviométrique d'EMBERGER:

Ce diagramme ou quotient pluviométrique est une représentation graphique issue d'une formule où la valeur des précipitations en mm, divisée par une expression de la T° en degré Kelvin, cette expression est choisie en fonction de la vie du végétal, cette formule s'écrit comme suit :

$$Q2 = [2000 P / M2 - m2]$$

Cette formule peut s'écrire selon Stewart (1969) qui a transformé le quotient d'Emberger pour le climat méditerranéen et a obtenu la formule suivante :

$$Q2 = 3,43 \times [P / M - m]$$

Où

M : moyenne des maxima du mois le plus chaud.

m : moyenne des minimum du mois le plus froid.

M et m sont exprimés dans l'expression de Stewart en ° Celsius.

M et m s'expriment en degré Celsius, Emberger a mentionné qu'un climat ne peut être caractérisé si à la valeur de Q2 ne vient pas s'ajouter celle de « m ». Les stations météorologiques de même Q2 peuvent être différenciées par leurs valeurs de « m ».

Le Q2 nous a permis de localiser nos stations météorologiques sur le Climagramme d'Emberger. Cet auteur a mis au point un zonage du bioclimat méditerranéen du plus sec vers le plus humide en combinant les données climatologiques et celles de la végétation.

On distingue le plus souvent les étages bioclimatiques saharien, aride, semi-aride, sub-humide et humide.

Le Climagramme d'Emberger permet de connaître l'étage bioclimatique de la région d'étude (Guelma).

- En abscisse la moyenne des minima du mois le plus froid.
- En ordonnées le quotient pluviométrique (Q2) d'Emberger.

$P = 617.58 \text{ mm}$

$M = 37.44^\circ\text{C} = 310.44 \text{ }^\circ\text{K}$

$m = 3.49^\circ\text{C} = 276.49 \text{ }^\circ\text{K}$

L'indice Q2 calculé par la formule $Q2 = 3,43 \times [P / M - m]$ est égal à 64.40.

L'emplacement de cet indice sur le Climagramme d'Emberger, nous a permis de situer Guelma dans l'étage bioclimatique semi-aride à hivers frais (Fig. 1.7). (Reggam, 2010).

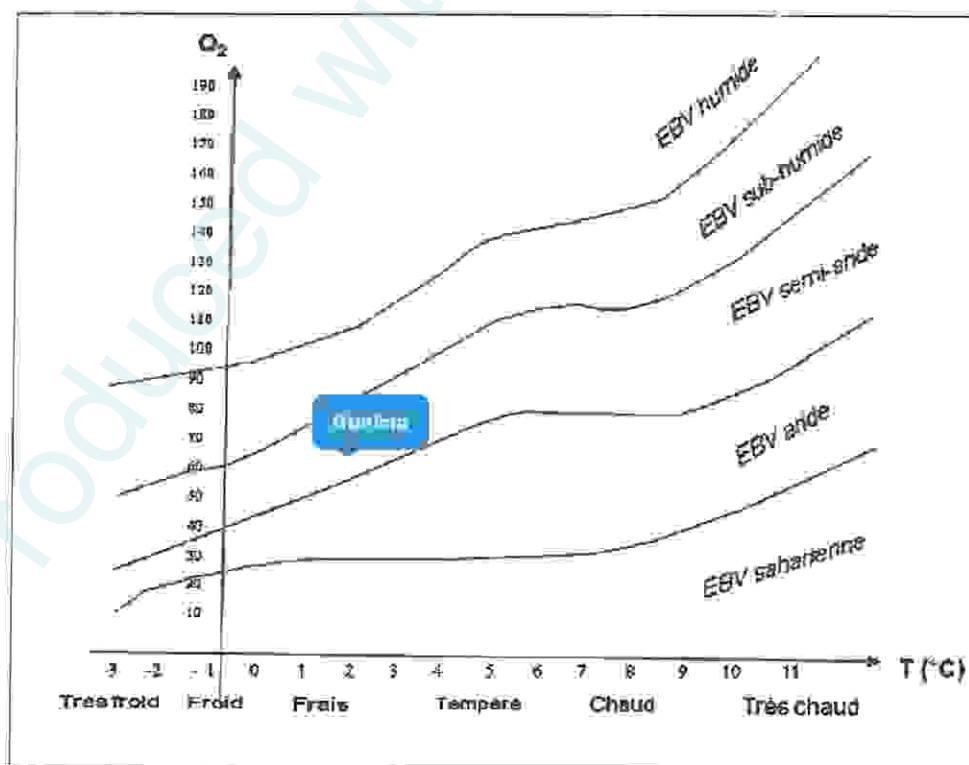


Fig. 1.7: Climagramme d'Emberger de la région Guelma (1994-2010)

Chapitre II

Matériel et méthodes

Produced with ScanTOPDF

2.1. Prélèvement et échantillonnage :

L'échantillonnage est primordial car il conditionne la pertinence de l'analyse. Il faut que l'échantillon destiné à l'analyse prélevé de façon à être le plus exactement possible représentatif du milieu d'où il provienne.

La totalité de nos analyses bactériologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'université du 08 mai 1945 de Guelma. Pour contribuer à l'évolution de la qualité bactériologique des eaux de l'Oued El Hammam nous avons choisi deux prélèvements de quatre sites sélectionnés sont : S1, S2, S3, S4 ont été effectués dans les mois d'avril et de mai. Les coordonnées de ces points et ces caractéristiques sont dans les deux tableaux : Tab. 2.1 ; Tab. 2.2 ; et dans la Fig.2.1.

Tab. 2.1 : Caractéristiques des points de prélèvement.

N° de prélèvement	Sites de prélèvement	X	Y	Z	Caractéristique :
P1 et P2	S1	919.260.09 m	374.205.78m	10m	- Situé au niveau de l'Oued El Hammam avant les rejets de Hammam Bouchahrin. -présence de végétation sur plan d'eau.
	S2	919.289.43 m	374.152.95m	60m	-Situé au niveau d'Oued Toummiate -présence de végétation sur plan d'eau.
	S3	918.946.64 m	373.975.13m	360m	-Situé au point de fusion d'Oued El Hammam et Oued Toummiate -présence de végétation sur plan d'eau.
	S4	918.365.49 m	373.460.32m	900m	-Situé au niveau de l'Oued El Hammam après les rejets de El Hammamat et plus proche des zones de l'agriculture. -présence de végétation sur plan d'eau.

Tab. 2.2 : Nature et période du prélèvement :

Nature du prélèvement	Périodes des prélèvements		Type d'analyses effectuées
Eau	P1 à : 13/04/2011	S1 /10: 25	Bactériologique
		S2/ 10 :35	
		S3/ 10 :45	
		S4/11 :55	
	P2 à : 02/05/2011	S1/11 : 25	
		S2/11 :35	
		S3/11 :45	
		S4/11:55	

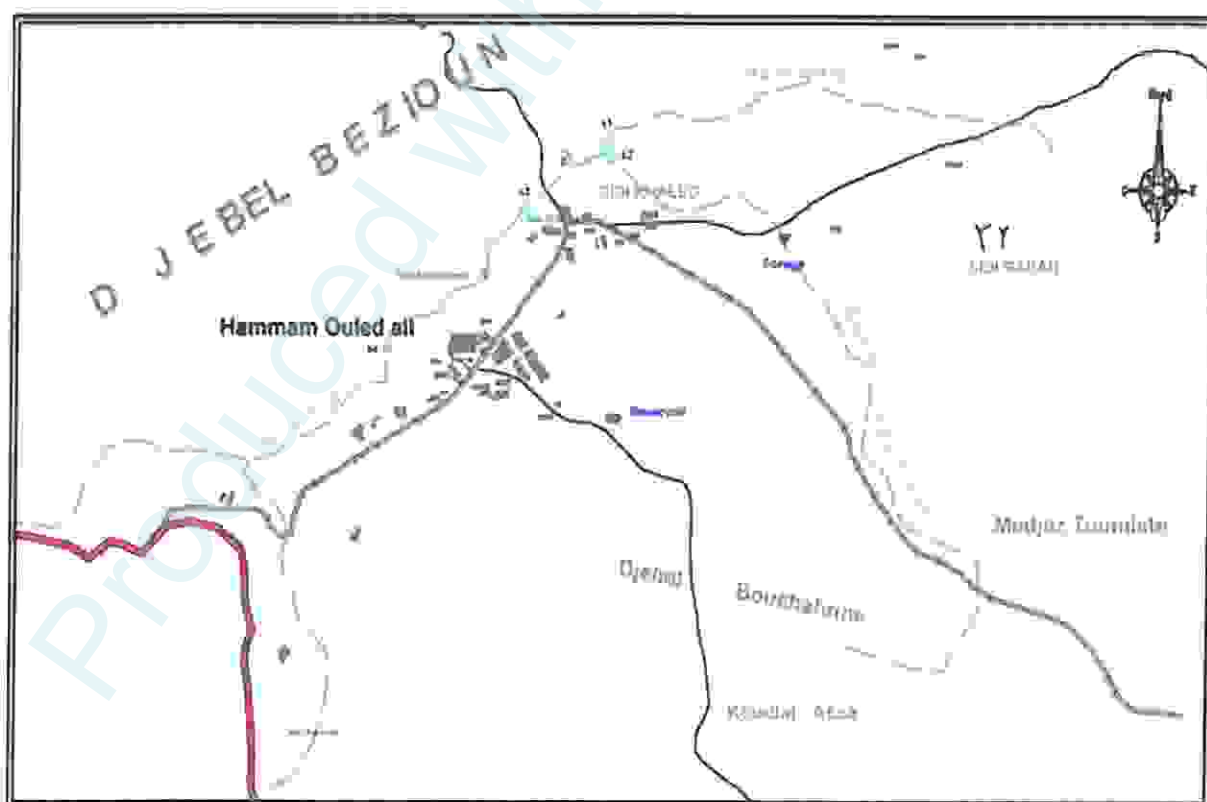


Fig.2-1 : Carte représentant les sites de prélèvement dans l'Oued de Hammam Ouled Ali.

2.1.1. Matériel de prélèvement :

Le matériel de prélèvement doit faire l'objet d'une attention particulière :
Pour les paramètres microbiologiques, le prélèvement effectués dans des conditions aseptiques.
Les flacons destinés au prélèvement doivent être stériles et en verre.

2.1.2. Méthode de prélèvement :

Les méthodes utilisées pour l'échantillonnage correspondent aux différentes directives, notamment l'OMS...

La verrerie lavée est ensuite stérilisée soit à la chaleur sèche (four Pasteur) à une température comprise entre 170 et 175°C, pendant au moins 1h.

Les flacons d'échantillonnage ne doivent être ouverts qu'au moment du prélèvement de l'échantillon. Une fois l'échantillon est prélevé, les flacons doivent être fermés hermétiquement jusqu'au moment de l'analyse. (Gharallah, 2005).

Les flacons stérilisés sont prolongés à une distance qui varie de 10 à 40 cm de la surface assez loin des bords, ainsi que des obstacles naturels.

Les flacons sont ouverts sous l'eau de telle façon qu'il n'y est aucune bulle d'air et qu'il ne soit pas éjecté au cours du transport (Rodier, 1978).

2.1.3. Enregistrement et étiquetage des échantillons:

Il est essentiel que les échantillons soient clairement étiquetés immédiatement avant les prélèvements et que les étiquettes soient lisibles et indétachables. Dans ces derniers, on doit noter avec précision; la date, l'heure, les conditions météorologiques, un numéro et toutes circonstances anormales. (Lightfoot, 2002).

2.1.4. Transport des prélèvements :

La teneur initiale en germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon, après le prélèvement. C'est pour cela que toute analyse doit être effectuée le plus rapidement possible. L'évolution est d'ailleurs assez difficile à prévoir et dépend de nombreux facteurs : température, concurrence bactérienne des espèces présentes, composition chimique de l'eau.

À ce sujet la circulaire du 21 janvier 1960, relative aux méthodes d'analyse bactériologique des eaux : « 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 à 6 °C. Même dans ces conditions, l'analyse bactériologique doit débuter dans un délai maximal de 8 heures, après le recueil de l'échantillon ». (Rodier et al 2009).

2.2. Paramètres bactériologiques :

Introduction :

Les bactéries dans l'eau peuvent avoir trois origines différentes :

- ✓ Origine purement aquatique.
- ✓ Origine terrestre.
- ✓ Origine animale ou humaine : ce sont des germes de contamination : le plus souvent fécale ; parfois rhino-pharyngée dont la température de développement est alentours de 37 °C et qui sont accoutumés à un milieu nutritif (matière fécale) riche en matière organique (Sayad, 2008).

2.2.1 Les coliformes:

Le terme de « coliformes » est regroupé un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant en fait à la famille des Enterobacteriaceae et qui partagent certaines caractéristiques biochimiques. La définition suivante a été adoptée par l'Organisation internationale de standardisation (ISO) : Les coliformes correspondent à des organismes en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures, à des températures de 35 à 37 °C. (Rodier et al 2009).

2.2.2. Coliformes fécaux :

Les coliformes fécaux se définissent comme des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées, en forme de bâtonnet.

En raison de leur capacité de croître à la température élevée de 44,5 °C et non seulement à 35 °C comme les coliformes totaux, les coliformes fécaux sont de plus en plus souvent désignés par l'appellation « coliformes thermo tolérants » dans la littérature scientifique. Les coliformes fécaux qui produisent une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase.

Les *E. coli* sont des coliformes thermo-tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à une température comprise entre $42 \pm 2^\circ\text{C}$. (Bourgeois et Leveau, 1980; Denis, 2007).

2.2.3. Coliformes totaux :

Ils regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des Entérobactéries qui sont aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées en forme de bâtonnet. De plus, tous les coliformes totaux doivent produire une réaction négative à l'épreuve de la cytochromeoxydase et une réaction positive au test de l'ONPG (ortho-Nitrophényl- β -D-galactopyranozide), avec une grande dégradation de lactose à 37°C.

Les coliformes totaux sont des microorganismes indicateurs dont le dénombrement permet de déceler le niveau de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable (Ceaq, 2000).

2.2.4. Les streptocoques fécaux:

Anciennement la législation parlait de « streptocoques fécaux ». Sous cette dénomination générale, il faut entendre l'ensemble des streptocoques possédant la substance (acide teichoïque) antigénique caractéristique du groupe D de Lancefield. Ces streptocoques du groupe D sont généralement pris globalement en compte comme des témoins de pollution fécale, car tous ont un habitat fécal» (Rodier et al 2009).

Se sont des bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques ou ovoïdes formant des chainettes, (Bourgeois et Leveau, 1980).

Ils sont catalases négatives et possédant un antigène de groupe D. Cet antigène correspond au polysaccharide C pariétal des streptocoques et au support de la spécificité du groupe. (Charchar 2009).

Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif à l'azote de sodium en donnant des colonies caractéristiques réduisant le TTC et qui de plus hydrolysent l'esculine en 2 heures à 44°C. (Labres *et al.* 2008).

2.2.5. Les staphylocoques :

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, les staphylocoques doivent leur nom à OGSTON (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. (Pierre et Marie, 2002 – 2003)

2.3. Matériel:

Au laboratoire, le matériel classique d'un laboratoire de bactériologie se résume comme suit :

Des étuves à 37, à 44 et à 22°C, un bain Marie, des boîtes de Pétri, des tubes stériles, anse de platine, pipettes Pasteur, pipettes graduées, bec Bunsen et des milieux de culture liquides et solides et plusieurs réactifs. (Annexe).

2.4. Méthode d'analyse bactériologique:

L'analyse bactériologique a pour but de mettre en évidence la présence des bactéries qui modifient l'aptitude d'une eau à une utilisation donnée, elle consiste en recherche et numération des germes de la flore totale de l'eau.

2.4.1. Evaluation des germes totaux (G.T) :

Ensemençons quatre (04) boîtes de Pétri de gélose nutritive, avec de la solution mère (l'eau à analyser).

Incuber à 37°C et lire après 24 à 48 heures (Rodier, 2005).

2.4. 2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT) avec identification d'*Escherichia coli* :

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification d'*E.coli* ont été effectués par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) appelée aussi colimétrie. Le dénombrement des coliformes a été fait sur le milieu liquide BCPL, (Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol). (Sayad.2008).

Nous avons choisis la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) appelée aussi la colimétrie.

✓ La méthode du nombre le plus probable: (NPP)

Elle représente l'une des plus anciennes applications des statistiques à la microbiologie (Phelps, 1908 ; Mc Crady, 1915).

Cette technique présente des avantages par rapport à la technique de dénombrement sur plaque :

- ✓ Elle permet d'analyser des quantités importantes d'eau.
- ✓ Elle est plus favorable à la multiplication des microorganismes fragiles que la culture sur support solide.

• Principe :

Le principe de la méthode NPP consiste à ensemercer de nombreuses prises d'essai d'un même échantillon et / ou de dilutions celui-ci dans des tubes de milieu de culture liquide.

Cette méthode est une estimation statistique du nombre des micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire (loi de poisson). Dans ce type de méthode, les bactéries se multiplient librement dans le milieu liquide. En cas de présence, l'ensemble du milieu liquide inoculé vire à la positive (trouble ou virage de l'indicateur). Un jugement quantitatif est possible en jouant sur les volumes de la prise d'essai (Rodier, 1996).

• Lecture :

Après incubation, on compte les tubes positifs (apparition d'un trouble, virage de colorant, dégagement gazeux) dans les dilutions successives et 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, 1980).

• **Expression des résultats :**

Ce nombre caractéristique obtenu correspond d'après la table de Mac Crady 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 les dilutions effectuées (Bourgeois, 1980, Leclerc, 1983).

2.4. 3. Recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli*:

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo-tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux, en milieu liquide par technique NPP, se fait en deux étapes consécutives :

- ✓ Le test de présomption : réservé à la recherche des coliformes.
- ✓ Le test de confirmation : réservé à la recherche des coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli*.

a. Test de présomption :

• **Mode opératoire :**

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon afin d'obtenir une répartition homogène des microorganismes, nous avons réalisé trois dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.

- ✓ Nous prenons les tubes de BCPL (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol, simple concentration) munis d'une cloche de Durham.
- ✓ Prélever 1ml d'eau à analyser à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la porte dans le premier tube de la série contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-1} .
- ✓ Nous prélevons 1ml de la dilution 1/10 précédente et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-2} .
- ✓ Transférer 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube contenant 9ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-3} .

- **Lecture :**

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

- ✓ 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).
- ✓ Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).

Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série et déterminer le nombre caractéristique avoir le tableau de Mac grady pour déterminer le nombre de coliformes présent dans 100ml d'échantillon. (Délarras, 2008).

b. Test de confirmation :

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

- **Mode opératoire :**

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'un oco bouolo dans tube contenant le milieu Eau l'optonée exempté d'Indole.

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

- **Lecture :**

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant :

- ✓ Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacks. (Rejsek, 2002).

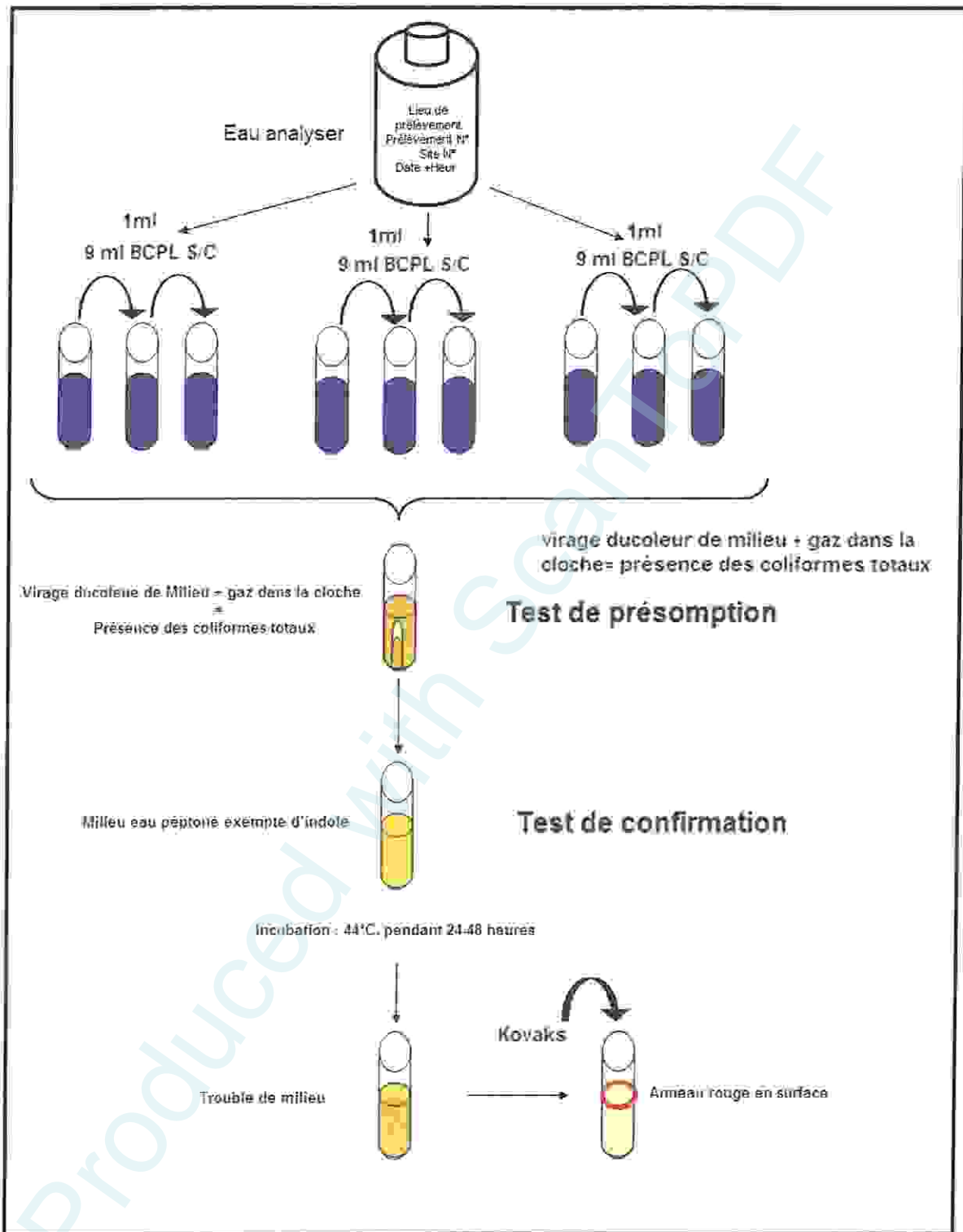


Fig.2.2 : Recherche et dénombrement des coliformes, des coliformes thermo tolérants.

2.4.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux :

On désigne sous le terme de coliformes fécaux diverses espèces d'Entérobactéries fermentant généralement le lactose à 40°C, avec production de gaz. L'identification et le dénombrement des coliformes fécaux se rapportent au fait à celui d'*Escherichia coli*.

• **Isolement :**

Un repiquage est réalisé en prélevant une goutte de la solution mère (l'eau à analyser) et un l'étalant par striation sur le milieu gélose Hecktoën.

• **Lecture :**

Après incubation, le développement de colonies plates à la surface caractéristique d'*Escherichia coli*.

• **Confirmation :**

La confirmation d'*Escherichia coli* se poursuit avec une coloration de Gram, et la recherche de l'oxydase.

L'observation microscopique révèle la présence de bacilles Gram négatif. Le test de l'oxydase doit également être négatif pas de coloration violette. (Sayad 2008).

2.4.5. Les streptocoques fécaux :

Leur recherche est effectuée sur le milieu Rothe, suivant le même procédé décrits pour les CT. L'incubation à 37°C pendant 24 h. (Fig. 2.3).

• **Ensemencement des milieux confirmatifs**

A partir de chaque tube de milieu présomptif ayant donné un résultat positif, ensemercer avec une anse bouclée ou une pipette Pasteur les milieux confirmatifs.

• **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. (Lebres, 2006).

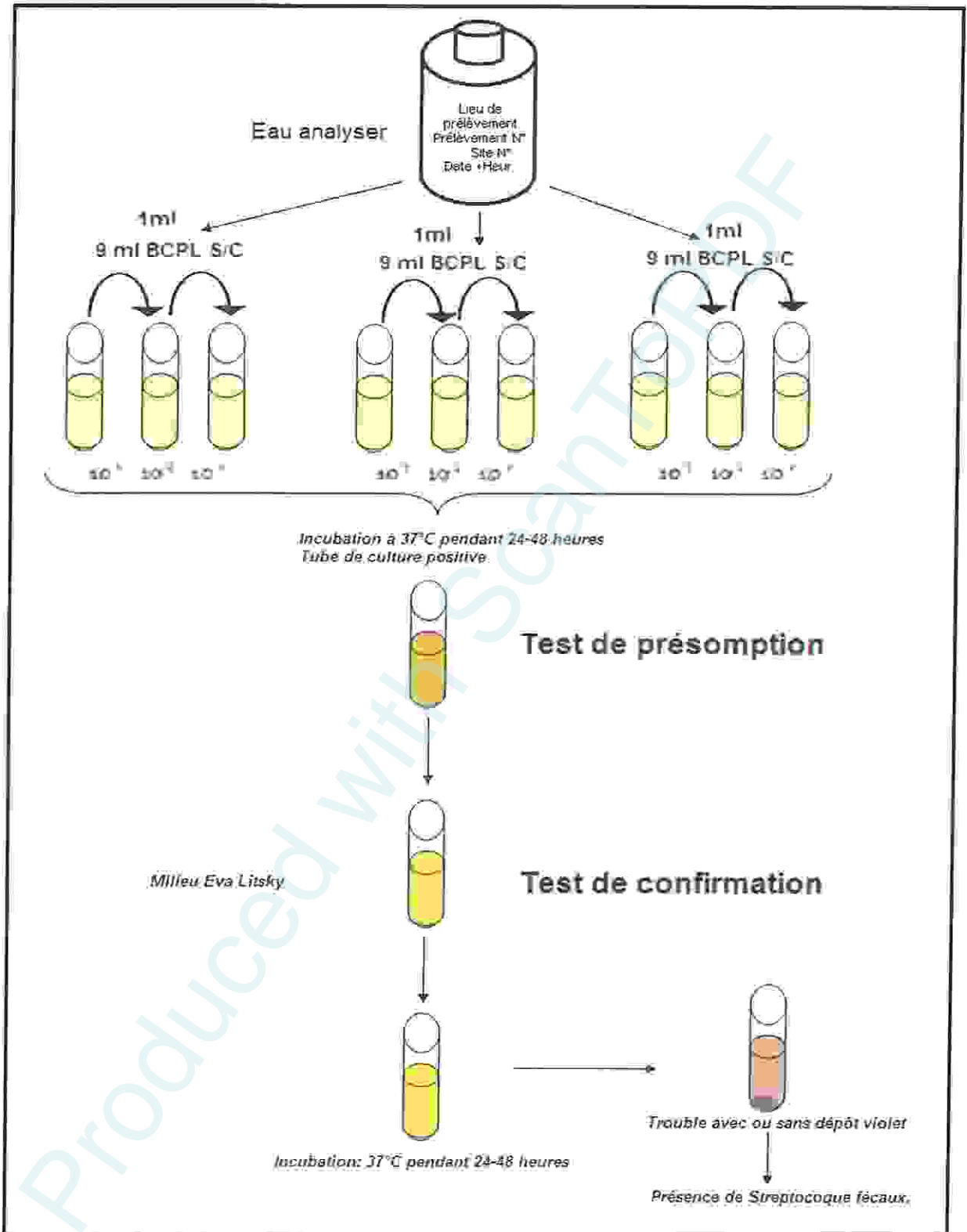


Fig.2.3 : Recherche et dénombrement des *Streptocoques* fécaux.

2.4.6. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfitoréducteurs (ASR) :

Les anaérobies sulfitoréducteurs (ASR) se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie (VF) en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire. (Lebres, 2006).

- **Mode opératoire :**

- ✓ A partir de l'eau à analyser prendre environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.
- ✓ Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.
- ✓ Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.
- ✓ Ajouter environ 20 ml de gélose Viande Foie, fondue, additionnée d'une ampoule d'Alun de fer et d'une ampoule de Sulfite de sodium, puis refroidie à $45\pm 1^\circ\text{C}$.
- ✓ Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant la formation des bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène.
- ✓ Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ, puis incubé à 37°C , pendant 24 à 48 heures.

- **Lecture :**

La première lecture doit absolument être faite à 16 heures. Il est donc impératif de repérer et de dénombrer toutes les colonies noires poussant en masse et de rapporter le total des colonies à 20 ml d'eau à analyser. (Lebres, 2006)

2.4.7. Recherche des germes pathogènes :

Parmi les bactéries associées à la recherche des germes indices de pollution fécale, figurent : *Salmonella*, *Shigella*, les Staphylocoques pathogènes et le Vibriion Cholérique.

2.4.7.1. Recherche des *Salmonella* et de *Shigella* :

- **Principe :**

La méthode de recherche de ces microorganismes découle de deux constatations :
D'une part leur présence en nombre relativement faible dans les eaux aussi que leur difficulté à y suivre ; d'autre part, la présence en nombre important de germes d'accompagnement d'origine fécale (coliformes fécaux, *Streptocoques fécaux*...) ou non (*Pseudomonas*...) ont tendance à supplanter les germes pathogènes qui disparaissent rapidement.

Ces constatations entraînent l'obligation d'utiliser des milieux d'enrichissement sélectif dans le but d'inhiber le développement des autres bactéries (Bourgeois et Leveau, 1980).

- **Mode opératoire :**

La recherche de *Salmonella* et de *Shigella* comporte plusieurs étapes : (Leminor, Leminor Grimont P. A. D).

Ensemencer 1ml dans le bouillon Sélénite. Incuber à 37°C pendant 24h

- **Isolement :**

A partir des tubes d'enrichissement positifs, nous ensemençons la gélose (SS). Nous incubons à 36°C pendant 24 à 48 heures, et nous ensemençons la gélose Hecktoën et nous incubons à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture :**

- Sur la gélose SS, on distingue deux types de colonies :

- Colonies rouge : Coliformes ;

- Colonies incolores ou transparentes : *Shigella*

- Colonies incolores à centre noir : *Salmonella*, *Proteus vulgaris* et *mirabilis*.

- Sur gélose Hecktoën :

- Colonies Saumons à centre noir : *Proteus vulgaris*

- Colonies bleu vert à centre noir : *Salmonella*

- Colonies Saumons à centre noir : *Salmonella*, *Shigella*.

- **Identification :**

Les colonies suspectes sur gélose d'isolement sont repiquées sur milieu TSI par stries longitudinales sur la pente et piqure du culot ; Nous incubons à 37°C pendant 24h ;

Le culot doit être jaune, fermentation de la gélose, la pente reste rouge, pas de fermentation ;

L'apparition de bulles dans le culot indique la production de gaz à partir du glucose. La recherche de l'oxydase doit être négative, réaliser une coloration de Gram.

- **Identification biochimique de *Salmonella* :**

Elle est réalisée par la galerie biochimique « Api 20 E »

Tab. 2.3 : Caractères d'identifications biochimiques de *Salmonella*.

Milieu	Tests	<i>Salmonelle</i>
TSI	Glucose Lactose H ₂ S Gaz	+ - + (<i>sauf S typhi</i>) + (<i>sauf S. paratyphi A et S. Choleraesuis</i>).
Maanitol	Mobilité	+
Mobilité	Mobilité	+
<i>Nitrate</i>	<i>Nitrate</i>	
Urée-Indole	Uréase	-
	TDA	-
	Indole	
Simmons	Citrate	+ (<i>sauf S typhi et S. paratyphi A</i>)
Glycérol	Eau péptoné+ glycérol	-/+

Identification biochimique de *Shigella* :

A partir d'une galerie « Api 20E ».

Tab. 2.4 : Caractères d'identifications biochimiques de *Shigella*.

Milieux	Tests	<i>Shigella</i>
TSI	Glucose	+
	Lactose	-
	H ₂ S	-
	Gaz	-
Maanitol- Mobilité	Mobilité	-
Urée-Indole	Uréase	-
	TDA	-
Simmons	Citrate	-

2.4.7.2. Recherche des *Pseudomonas aeruginosa* :

• **Isolement :**

- L'isolement est fait directement sur milieu sélectif King A et King B qui seront coulés dans des boîtes de Pétri stérilisés. (Brossad H.)
- On ensemence à l'aide d'une anse de platine une goutte d'eau à analyser, par stries à la surface de la gélose.
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

• **Confirmation :**

- Coloration de Gram.
- Recherche de la pyocyanine, pigment bleu caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Nous ensemençons à partir des colonies développées, l'eau peptonée.
- Nous incubons à 37°C jusqu'à apparition de couleur verdâtre, ajouter 2 ml de chloroforme.
- Après agitation, la pyocyanine communique au chloroforme une teinte bleue.

Tab. 2.5: Caractéristiques d'identification des principales espèces de *Pseudomonas* :

Espèce / Caractère	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluoresces</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>P. mallei</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. diminuta</i>
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydation Du glucose	+	+	+	+	+	+	+	-
Pyocyanine	+	+	-	-	-	-	-	-
Pyoverdine	+	+	+	-	-	-	-	-
Culture à 4°C	-	+	d	-	-	+	-	-
Culture à 42°C	+	-	-	+	+	d	d	d
Nitrate	+	d	-	+	+	+	+	-
Gélatinase	+	+	-	-	+	+	d	-
Citrate de Simmons	+	+	+	+	++	-	+	-

d : variable suivant les souches.

p.mallei* : bacille immobile

2.4.7.3. Recherche des Vibrions cholériques :

• **Principe :**

Après enrichissement par passage en milieu hypersalé, et après isolement d'une part sur un milieu sélectif ; d'autre part sur un milieu non sélectif, l'identification est basée essentiellement sur des épreuves immunologiques. (Mayat , 1994).

• **Mode opératoire :**

▪ **Enrichissement :**

Se fait en ensemençant 1 à 2 ml de l'eau à analyser dans l'eau péptonée alcaline. Nous incubons à 37 °C pendant 3 heures .On réensemence à partir du premier tube une seconde fois le milieu d'enrichissement Réincuber à 37°C pendant 3 h.

▪ **Isolement :**

On prélève à la surface du 2^{ème} tube d'enrichissement une ansée pour ensemencher la gélose alcaline biliée (GN) et la gélose hyperalcaline.

On incube à 37 °C pendant 24h.

▪ **Identification :**

Les colonies sont très fines sur la gélose nutritive, jaunâtre sur la gélose hyperalcaline. (Berche et al 1988). L'identification du germe est faite par :

Un examen microscopique entre lame et lamelle pour observer la morphologie des bactéries, forme incurvé ; une coloration de Gram ; et une recherche de l'oxydase qui doit être positive.

2.4.7.4. Recherche des *Staphylocoques* :

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif, très répandus dans la nature (air, eau, sol) et vivent souvent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux. Le genre *Staphylococcus* est constitué de plusieurs espèces dont :

- ✓ *Staphylococcus aureus*.
- ✓ *Staphylococcus epidermidis*.
- ✓ *Staphylococcus saprophyticus*. (Délarras, 2008)

◆ **Milieu Chapman (dégradation de mannitol) :**

- **Principe :** Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure

de sodium (75g/l), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. (Joffin et Leyrol, 2001)

• **Résultat :**

Les colonies mannitol⁺ : sont entourées d'une auréole jaune.

-Le milieu Chapman permet seulement une orientation pour l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* mais des tests de confirmation sont obligatoires.

♦ **Recherche de catalase :**

- **Principe :** La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène libre qui se dégage sous forme gazeuse selon la réaction suivante :



- **Mode opératoire :**

À partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame. (Joffin et al, 2001).

- **Résultat :**

Si un dégagement de bulles de gaz (oxygène) apparaît, le test est dit positif. (Délarras, 2008).

♦ **Recherche de la Staphylocoagulase :**

- **Principe :**

Les souches *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté de lapin en 24 heures, ainsi que des espèces de staphylocoques animale (*S. intermedius*). Les autres espèces d'origine animale et humaine sont à coagulase négative.

- **Mode opératoire :**

Nous avons ensemencé un bouillon cœur cerveau à 37°C pendant 24h par des colonies de Chapman, ensuite on prend 0,1 ml de bouillon cœur cerveau et on l'ajoute au plasma de lapin puis on l'incube à 37°C. Examiner les tubes 2 h, 6 h puis 24 h après.

• **Résultat :**

Les résultats du test est de voir le coagulum occupant plus de $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial. (Bourgois et al, 1980 ; Délarras, 2008).

• **Mode opératoire :**

A partir de l'eau à analyser :

- ✓ Transférer environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 75°C pendant 15 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies sulfite-réductrices éventuellement présentes. Un autre flacon rempli d'une autre eau servira de témoin de température.
- ✓ Après chauffage, refroidir immédiatement le flacon destiné à l'analyse, 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 Tryptose Sulfite Cyclosérine ou Tryptose Sulfite Néomycine ou encore gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à $47 \pm 1^\circ\text{C}$, additionnée de leurs additifs spécifiques.
- ✓ Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air et de l'oxygène.
- ✓ Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ, puis incubé à $36 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 44 ± 4 heures, dans le cas de la gélose Viande Foie. (Labres et al, 2008).

• **Lecture et interprétation**

La première lecture doit être absolument faite à 16 heures car très souvent les spores des bactéries anaérobies sulfite-réductrices sont envahissantes sinon on se trouvera 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.

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

Le tableau suivant résume quelques caractères biochimiques de différentes espèces de Staphylocoques. (Tab.2.6)

Tab. 2.6 : Les principaux caractères biochimiques des staphylocoques isolés en microbiologie. (Sayad, 2008).

Staphylocoque	<i>aureus</i>	<i>Intermedius</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>epidermitis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol en anaérobie	+	-	-	-
Résistance à la Novobiocine (5 µ-g)	S	S	R	S

2.5. Recherche de Levures :

- **Principe :**

N'importe quel milieu de culture glucosé convient pour la numération des levures.

- **Isolement et détection des levures :**

L'isolement des levures peut être pratique sur le milieu de Sabouraud .Ce milieu est rendu sélectif par addition de chloram-phénicol (0.5 mg/mg) ou de gentamicine (0.4mg/ml).

- **Mode opératoire :**

Nous ensemençons à partir de l'échantillon brut, le milieu gélosé Sabouraud, et nous incubons à 37°C pendant 24 h.

- **Identification :**

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure préalablement isolée sur le milieu gélosé Sabouraud.

- **Coloration simple :**

Elle est effectuée entre lame et lamelle sur les cultures en milieu solide, ayant permis d'observer les caractéristiques culturales :

La forme : (sphérique, ovoïde, allongée) et la taille des cellules en milieu solide.

Test de filamentation :

Une colonie suspecte sur gélose d'isolement est repiquée sur un sérum humain contenant dans un tube.

Nous incubons à 37 °C pendant 2 h.

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame de microscope.

- S'il y a de filament : présence de *Candida albicans*
- S'il y a absence de filament : présence de Candida non pathogènes

2.6. Identification :

Pour étudier les microorganismes, il est indispensable de les isoler et d'en faire une culture pure.

L'identification permet au cours de l'isolement ou non de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés biochimiques d'une bactérie pour commencer à l'identifier. Elle repose sur la morphologie, les caractères enzymatiques et biochimiques.

A) Caractères morphologiques :

➤ **Examen à l'état frais :**

Il permet d'observer sur les cellules vivantes :

- La forme des cellules.
- Leur mode de groupement
- Leur mobilité
- La quantité approximative des bactéries par champ microscopique.

➤ **Après Coloration de Gram :**

C'est la coloration différentielle systématiquement réalisée lors d'un examen microscopique de bactéries.

Elle permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents.

-bactéries Gram-positives : Gram (+).

-bactéries Gram-négatives : Gram (-).

L'examen microscopique après coloration de Gram nécessite au départ une préparation d'un frottis : Étaler la suspension bactérienne en un film mince et régulier sur la lame avec une anse de platine par un mouvement régulier et circulaire (étalement de 2 à 3 cm de diamètre). En tenant la lame bien au dessus de la flamme, le frottis doit devenir terne mais ne doit ni brunir ni brûler.

Recouvrir le frottis fixe de Violet de Gentiane, laisser agir une minute.

Laver l'excès de Violet de gentiane avec quelques gouttes de Lugol ; attendre 1 minute.

Laver à l'eau et égoutter sur un mouchoir en papier.

Décolorer la préparation avec de l'alcool/acétone goutte à goutte jusqu'à ce que l'alcool/acétone ajouté n'entraîne plus de Violet de Gentiane.

Recolorer avec la fuchine pendant 30 secondes, puis laver à l'eau distillée, égoutter et sécher doucement la lame.

Observer à l'immersion avec l'objectif : X100. Pour cela, déposer une goutte de liquide à immersion sur la lame, directement au contact du frottis. Ne pas utiliser de lamelle.

B) Caractères biochimiques :

➤ **API 20E :**

On réalise 20 tests pour avoir le plus de caractères possibles de manière à identifier de façon plus certaine les différentes Entérobactéries.

Les tests sont réalisés dans l'ordre du tableau d'identification API des entérobactéries. Le tableau est d'ailleurs appelé "Api 20E" à cause du nombre de tests à effectuer. Tab2.7 (Annexe).

La galerie Api 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

- **Technique :**

- ◆ **Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation. (Fig. 2.4). (Aouissi *et al.*, 2007).

- ◆ **Préparation de l'inoculum :**

Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé et la mettre dans un tube d'eau distillée stérile, on réalisant une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle de Mc Ferland).

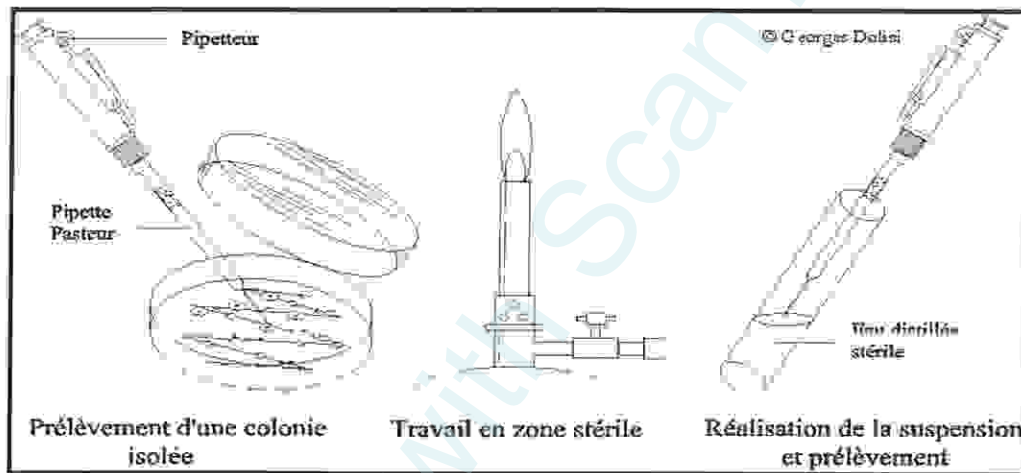


Fig. 2.4 : Préparation de l'inoculum.

- ◆ **Incubation de la galerie :**

Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule. (Fig.2.5)

- Remplir les tubes et les cupules des tests du type **ICITI**.
 - Remplir les tubules des tests du type **ADH** et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour créer l'**anaérobiose**.
 - Remplir uniquement les tubules des tests restants.
- **Remarque :** il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat. De plus l'apparition de bulles après l'incubation apportera un caractère d'identification supplémentaire (gaz +).

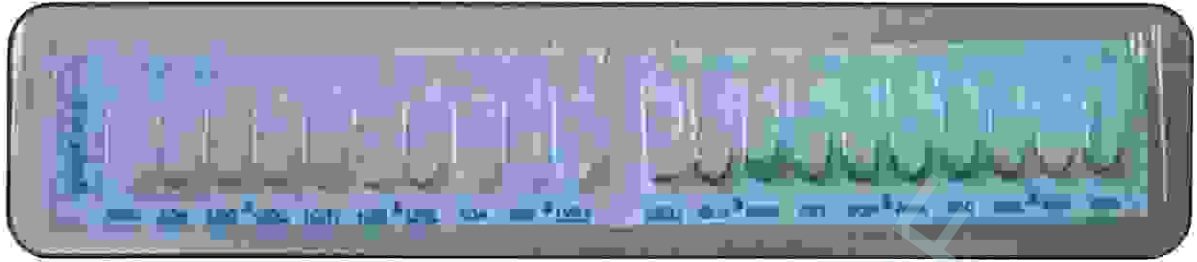


Fig.2.5 : Galerie APi20E.

Résultats :

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test **VP**, **TDA**, **IND**...

Fig.2.6 : Fiches des résultats de l'API20E

➤ **Test complémentaire :****A) Recherche de l'oxydase:**

Le terme d'oxydase désigne une enzyme recherchée en bactériologie systématique. La présence d'oxydase serait liée à celle dans la chaîne respiratoire du complexe enzymatique IV: cytochrome-oxydase. Certains bactériologistes préfèrent parler de cytochrome-oxydase plutôt que d'oxydase. (Carbannelle, 1988).

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. La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette. (Carbannelle, 1988).

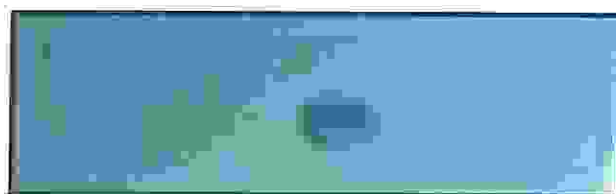


Fig. 2.7: Test d'oxydase.

B) Mise en évidence d'une catalase:

C'est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme. (Carbonnelle, 1988).

C) La galerie classique :

➤ **Etude de la mobilité:**

• **Principe:**

Cette étude est faite sur un milieu mannitol-mobilité qui permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité.

• **Technique:**

Nous ensemençons par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, chargé de culture en milieu solide. Nous incubons 24h à 37°C.

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

- ✓ Si le germe est très mobile, elle se développe le long de la piqûre la masse microbienne envahit tout le tube;
- ✓ S'il est peu mobile, elle 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, 1988; Sayad, 2008).

➤ **Utilisation de citrate :**

Pour ce test, nous utilisons le milieu citrate de Simmons, celui-ci contient qu'une seule source de carbone: le citrate, seule les bactéries possèdent une perméase sont capable de se développer sur ce milieu. Il contient également du phosphore mono-ammoniac servant à la fois source d'azote et de phosphore.

L'utilisation du citrate par les bactéries peut se faire de façon très diverse, ce qui suivant le cas se traduit par alcalinisation du milieu. (Carbannelle, 1988).

• **Technique:**

La pente du milieu estensemencée à partir d'une suspension bactérienne, ou une colonie bien isolée. Le tube est incubé à 37°C pendant 24h.

- Bactérie citrate positive: culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu); (Fig.18).
- Bactérie citrate négative: pas de culture (coloration verte du milieu inchangée). (Sayad, 2008).

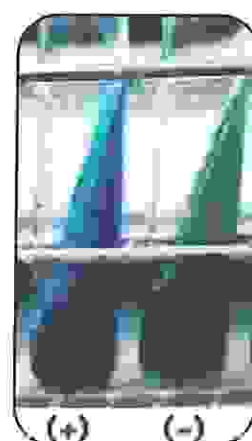


Fig. 2.8: Test de citrate.

➤ **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 (H₂S) et la production de gaz (CO₂) (Bugnicourt, 1983). 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'H₂S se traduit par un noircissement du milieu.

• **Procédure :**

Nous avonsensemencé le milieu TSI à l'aide d'une anse de platine 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 h.

La lecture est toujours effectuée entre 18 et 14h. ce milieu fournit plusieurs indications: Changement de la couleur du milieu du rouge au jaune (la pente et le culot) donc fermentation du glucose, lactose et saccharose.

Production de gaz : bulles dans la masse du milieu ou encore les parois ou poche gazeuse décollant le culot.

Noircissement du milieu donc H₂S positif.

➤ **Recherche du tryptophane désaminase (TDA) :**

• **Principe :**

La désaminase agit sur le L -tryptophane en donnant l'acide indole - pyruvique. L'acide indole pyruvique donne avec le perchlorure de fer une coloration Brun rouge.

• **Technique :**

Nous ensemençons le milieu urée -indole, avec une suspension épaisse de bactéries.

Nous incubons 2à 24h. Nous ajoutons 2 gouttes de perchlorure de fer dilué au 1/3.

Résultat TDA+ : coloration brun -rouge avec présence d'un précipité.

Résultat TDA- : coloration jaune orangé.

➤ **Mise en évidence de l'Uréase :**

• **Principe :** la recherche de l'uréase consiste à constater l'alcalinisation d'un milieu contenant de l'urée d'où l'utilisation du milieu urée-indole.

• **Technique :**

Nous réalisons à partir d'une culture sur Hecktoën une suspension aussi dense que possible des bactéries à étudier dans 0.5mlde milieu urée-indole. Nous incubons à 37°C pendant 12 à 18 h.

-Uréase positive : virage d'indicateur du jaune au rouge violacé ou au rose rouge.

-Uréase négative : pas de changement de coloration ou virage au jaune.

➤ **Test de l'indole :**

• **Principe :**

Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase. La lecture est effectuée sur un milieu riche en tryptophane et l'indole produit est révélé par le réactif de Kowacs.

• **Technique :**

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

Nous agitons et nous laissons le réactif remonter à la surface.

La lecture est immédiate. Lorsque il y a production d'indole, ce composé est extrait de la culture par le réactif qui se rassemble en une couche rose à la surface.

-Réaction indole-positive : anneau rose en surface.

-Réaction indole-négative : absence d'anneau.



Fig. 2.9 : Réaction d'indole négative.



Fig. 2.10 : Réaction d'indole positive.

➤ **Test de Voges-Proskauer (VP) :**

• **Principe :**

Certaines bactéries sont capables de produire de l'acétyl méthyle carbinol. En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétyl).



- **Technique :**

Nous ensemençons un tube Clark et Lubs, puis nous ajoutons 2 gouttes du VPI et laissons 30 mn, puis nous ajoutons 2 gouttes du réactifs VPII.

- Une réaction positive se manifeste par une coloration rose ou rouge.

➤ **Test au rouge de Méthyle (RM) :**

- **Principe :**

Il consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu péptoné glucosé au phosphate après fermentation du glucose.

La zone de virage du rouge de méthyle est plus basse que celle des indicateurs habituellement utilisés : virage à un (pH < 5), au jaune à (pH > 5.8).

- **Technique :**

Nous ensemençons 5ml de milieu de Clark et Lubs, avec le germe à étudier, nous incubons à 37°C pendant 48h, le pH de la culture est évalué par addition de quelques gouttes d'une solution de rouge de Méthyle.

- Réaction rouge méthyle positive : teinte rouge (pH < 5).
- Réaction rouge méthyle négative : teinte jaune (pH > 5.8).

Remarque : Généralement, on fait une des deux réactions, soit la recherche du VP, soit le RM.

Chapitre III

Résultats

Produced with ScanTOPDF

3.1. Résultats de la recherche et du dénombrement des micro-organismes de l'eau :

Les résultats des analyses bactériologiques des échantillons d'eau prélevés et que nous avons obtenues sont présentés sous forme des tableaux exprimant les différents variations de tous les paramètres microbiologiques étudiés.

3.1.1. Recherche et dénombrement des témoins de contamination fécale :

3. 1.1.1. Coliformes :

L'évolution du nombre de coliformes fécaux dans les eaux d'Oued El Hammam de Hammam Ouled Ali durant les mois d'avril et mai est présentée dans la Fig. 3.1, Fig. 3.2, et le tableau 3.1.

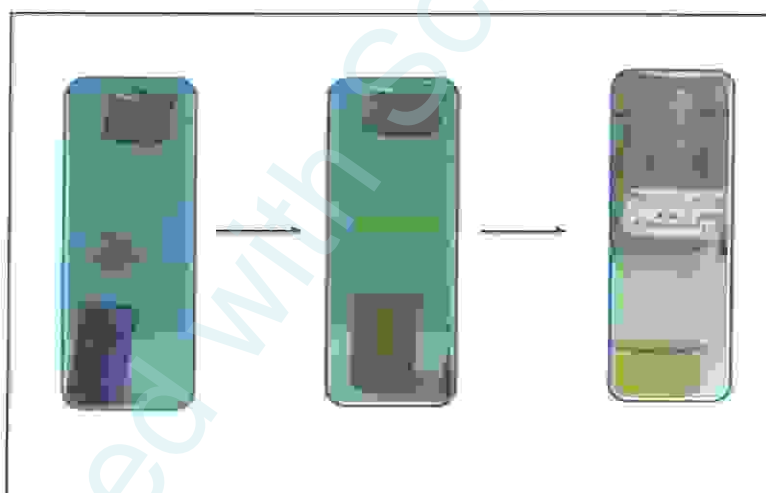


Fig. 3.1 : Résultat de la recherche des coliformes.

Tab 3.1 ; Evolution du nombre des coliformes.

Les sites de prélèvement:	nombre de germes/ml dans le moi d'avril :	nombre de germes/ml dans le moi de mai :
S1	4.000 CF/ml	3.000 CF/ml
S2	140.000 CF/ml	140.000 CF/ml
S3	140.000 CF/ml	140.000 CF/ml
S4	140.000 CF/ml	140.000 CF/ml

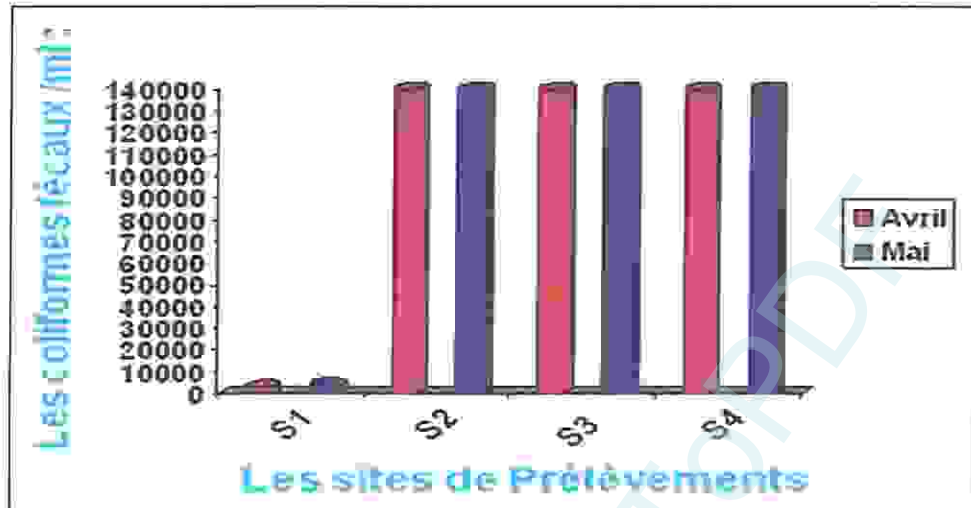


Fig.3.2 : Estimations des coliformes / ml dans l'eau d'Oued El Hammam.

3. 1.1.2. Streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contaminations récentes par la matière fécale des animaux. Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans la Fig.3.3, Fig.3.4, et le Tab 3.2

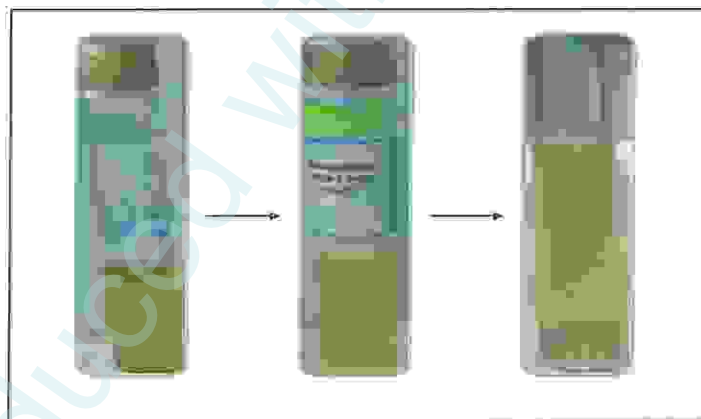


Fig.3.3 : Résultat de la recherche des streptocoques fécaux.

Tab 3.2 : Evolution du nombre des Streptocoques fécaux.

Les sites de prélèvement	nombre de germes/ml dans le moi d'avril	nombre de germes/ml dans le moi de mai
S1	00.000 SF/ml	2.000 SF/ml
S2	140.000 SF/ml	4.000 SF/ml
S3	20.000 SF/ml	3.000 SF/ml
S4	140.000 SF/ml	140.000 SF/ml

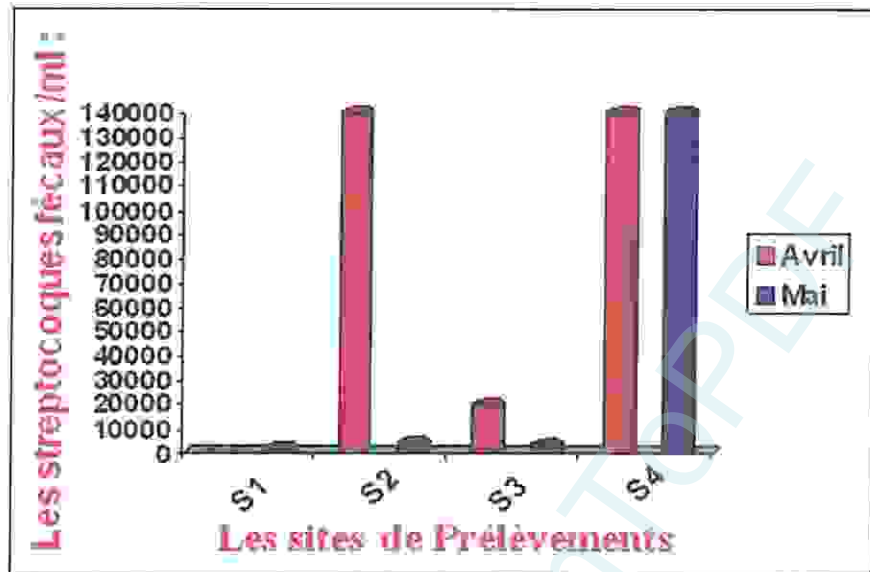


Fig.3.4 : Estimation des streptocoques fécaux / ml dans l'eau d'Oued El Hammam.

3. 1.1.3. Les Anaérobies sulfito-réducteurs(ASR):

Les anaérobies sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des indices de contamination ancienne. La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes exclusivement végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de déceler une pollution fécale.

Tab 3.3 : Résultat de la recherche des Anaérobies sulfito-réducteurs(ASR).

Prélèvement	S1	S2	S3	S4
P1	-	-	-	-
P1	-	-	-	-

3.1.2. Identification des souches bactériennes:

3.1.2.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram:

Le repiquage successif utilisé dans le seul but de purifier les souches nous a permis de distinguer les caractères de toutes les colonies sur leurs milieux préférentiels d'isolement. Ces résultats sont résumés dans les tableaux : Tab 3.5 et Tab 3.6.

Tab 3.4 : Les caractères macroscopiques des eaux d'Oued El Hammam.

Culture	Observation macroscopique des colonies
Gélose nutritive (GN)	<ul style="list-style-type: none"> Colonies Circulaire, lisse, plate, brillante transparente, 1mm de diamètre. Colonies Bambée, lisse, brillante, à contour régulier, de couleur jaune.
Mac-Conkey	<ul style="list-style-type: none"> Colonies roses élevées, lisses bombés, régulières, 0,8 mm à 0,9 mm de diamètre. Colonies transparentes, grandes de 1,2 mm à 2,5 mm de diamètre.
Chapman	Culture négative
Viande foie (VF)	Culture négative
GNAD	<ul style="list-style-type: none"> Colonies petites tailles transparentes, lisses, régulières, de 0,1 mm à 0,2 mm de diamètre. Colonies de grandes tailles, transparentes, lisses, plates, régulières de 0,5 mm à 1 mm de diamètre.
Sabouraud	Culture négative
Hektoën	Culture négative
SS	<ul style="list-style-type: none"> Colonies blanchâtres, muqueuses, bombées, lisse, régulières de 1 mm à 2 mm de diamètre.
Hektoën (d'enrichissement)	<ul style="list-style-type: none"> Colonies rouges creuses de tailles très petites, lisses, régulières, bombées, de 1,2 mm à 2,5 mm de diamètre.
Columbia + Sang frais	<ul style="list-style-type: none"> Colonies incolores, bombés, régulières, lisses, avec hémolyse



Fig.3.5 : Observation macroscopique des colonies.

Tab 3.5 : Les caractères microscopiques de l'eau d'Oued El Hammam.

Culture	Observation microscopique des colonies
Gélose nutritive (GN)	Bacilles isolés ou en chaînettes, Gram négatif.
Mac-Conkey	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilles, Gram négatif. • Coccobacilles, Gram négatif.
Chapman	Culture négative
Viande foie (VF)	Culture négative
GNAB	Bacilles Gram positive.
Sabouraud	Culture négative.
Hektoën	Culture négative
SS	Bacilles isolés, Gram négatif.
Hektoën (après enrichissement)	Diplocoque, Monocoques, Streptocoques Gram (-).
Columbia + Sang frais	Coccobacilles, bacilles Gram négatif.
King A	Coccobacilles Gram positive.
King B	Bacilles Gram positive.

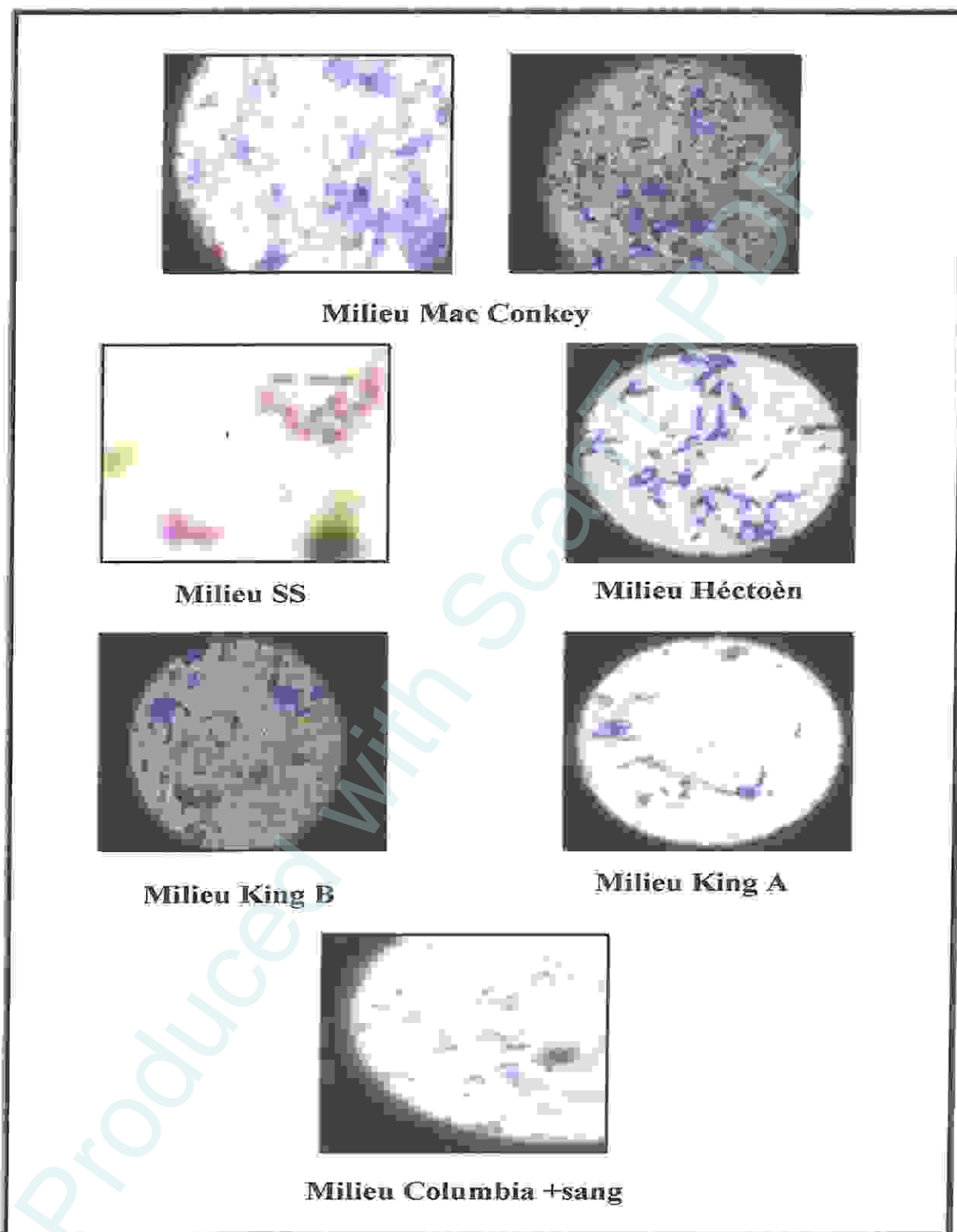


Fig.3.6 : Observation microscopique des colonies.

3.1.2.2. Résultats de l'identification biochimique:

Les résultats de l'identification biochimique par l'API 20E et de la galerie classique sont représentés dans le Tab.3.6 et Tab.3.7

▪ Tab 3.6 : Résultats biochimiques de l'API 20 E.

Milieu	Numéraux de code	Nom des bactéries Bactéries
Mac-Conkey	7366573	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
Mac-Conkey	7376673	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
Hectoën	1216774	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
GNAB	7247673	<i>Aeromonas hydrophilla.</i>
GNAB	7266163	<i>Aeromonas hydrophilla.</i>



Fig.3.7 : Résultats de quelques identifications biochimiques par API 20E.

▪ Tab 3.7 : Résultats biochimiques de la galerie classique.

Les milieux	SS	GNAB
TSI	+	+
Manitole-Mobilité	-	+
Citrate de simmons	-	-
Urée – indole (TDA)	-	-
Indole	-	-
Uréase	-	-
Bouillon nitraté	+	+
VP	-	-
RM	-	+
Bactérie recherchée	<i>Providencia</i>	<i>Enterobacter</i>

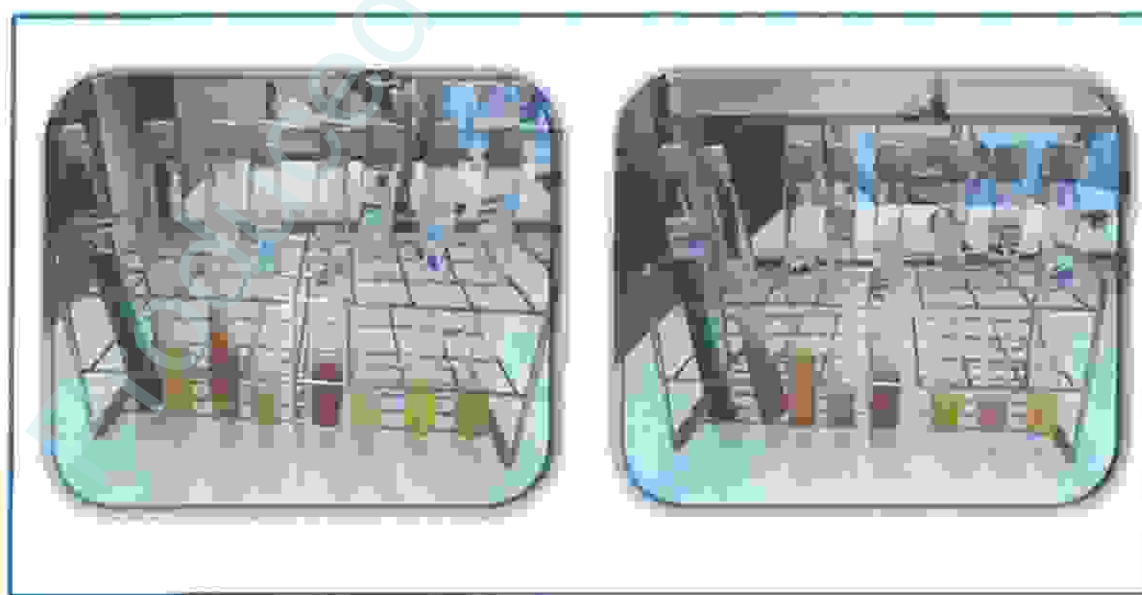


Fig.3.8: Résultats de quelques identifications biochimiques par galerie classique.

Discussion et Conclusion

Produced with ScanTOPDF

La répartition des coliformes montre que le cours d'eau d'Oued El Hammam subit une contamination fécale importante. Les résultats des analyses indiquent que le nombre des coliformes est faible pour le premier site S1 des deux prélèvements. Par comparaison avec les valeurs impératives, on note que le nombre le plus probable (NPP) reste supérieur dans les deux prélèvements au niveau des trois sites : S2, S3, S4, exhibant la valeur la plus élevée de 140.10^3 C/ml (Fig.3.2).

La présence des streptocoques fécaux dans les eaux indique généralement une pollution fécale. Le graphique de Streptocoques D de Lansfield, (Fig.3.4) nous montre que le nombre des Streptocoque fécaux dans le premier prélèvement est faible dans le site S1 puis il exhibe la valeur la plus élevée (140.10^3 CF/ml) dans le site S2. Il diminue ensuite dans le site S3, puis on réobserve une valeur supérieure dans le dernier site : 140.10^3 SF/ml.

Pour le deuxième prélèvement le nombre de Streptocoques fécaux est bas dans les trois premiers sites et exhibe une valeur élevée 140.10^3 SF/ml dans le quatrième site S4.

Pour les spores des ASR les résultats négatifs obtenus (Tab. 3.3) montrent l'absence des espèces sulfitoréductrices (*Clostridium*) responsable des maladies graves tel le botulisme ou le tétanos.

Du point de vue recherche microbiologique, notre étude nous a conduit à observer des colonies bactériennes de différentes tailles (Tab.3.5). Une étude microscopique basée sur la coloration différentielle de Gram nous a confirmé que les bâtonnets Gram (-) sont plus représentés par rapport aux cocci Gram (+) qui demeurent faiblement représentés.

L'identification de ces bactéries par l'étude de leurs métabolismes (anabolisme + catabolisme) et de leurs arsenaux enzymatiques cellulaires par le biais de la galerie API 20 E et la galerie classique, nous a permis d'identifier 4 espèces bactériennes : *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Providencia* et *Enterobacter* dans les deux prélèvements durant les deux mois de l'étude.

Ces bactéries très communes dans les eaux peuvent dans certains cas considérés comme synonyme de maladie à transmission hydrique et de ce fait peuvent constituer une menace de santé publique.

Produced with ScanTOPDF

Résumé :

La détermination de la qualité microbiologique de l'eau d'Oued El Hammam situé à proximité de la région de Hammam Ouled Ali a été réalisée pendant deux mois (avril et mai 2011). Il en ressort des résultats obtenus une pollution fécale intense principalement après les rejets des hammamets où les taux de coliformes et des streptocoques fécaux sont élevés. Une absence totale des *Clostridium* sulfito-réducteurs et de bactéries pathogènes est à noter.

Ce type de pollution affecte certainement l'environnement immédiat de l'oued et peut constituer une menace majeure sur la santé humaine.

- ◆ **Mots clés :** Qualité microbiologique, pollution fécale, Hammam Ouled Ali, coliformes, streptocoques fécaux, *Clostridium* sulfito-réducteurs.

Produced with Scantopdf

Abstract :

The determination of the microbiological quality of Oued El Hammam water situated near the region of Hammam Ouled Ali has been realised for two months (april and may 2011). The results obtained showed an intensive fecal pollution especially after the throws of the Hammamet where the levels of coliform and fecal streptococcus are raised, a total absence of clostridium Sulfite-réducteurs, and of pathogenic germs. This type of pollution affects the immediate environment of El Oued and composed a major threat for the Human Health.

- ◆ **Key words:** microbiological quality, fecal pollution, Hammam Ouled Ali, coliform, fecal streptococcus, clostridium Sulfite-réducteurs.

Produced with ScanTopDF

ملخص:

التحديد النوعي للميكروبيولوجي لمياه واد الحمام الذي يقع في حدود تجمع حمام اولاد علي ، قد اجري خلال شهري أفريل و ماي 2011 استخلصنا نتائج توضح التلوث البرازي الحاد خاصة بعد فضلات الحمامات أين يكون مدى القولونيات، السابحة البرازية ، مرجعات الكبريت و البكتيريا الممرضة موجودة. هذا النوع من التلوث احيانا يصيب فعلا محيط الواد، وقد يشكل تهديدا كبيرا على صحة الانسان. الكلمات الرئيسية: النوعية الميكروبيولوجية، التلوث البرازي، حمام اولاد علي، السابحة البرازية، القولونيات، مرجعات الكبريت.

Bibliographie :

- **Aouissi A., Fouzari A., et Meziane N., (2007).** *Qualité bactériologique de l'eau de Oued Seybouse.* Mémoire d'ingénieur. Université 8 mai 1945 Guelma. 57p.
- **Aouissi Amina (2009).** Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie). Mémoire de magister, Université du 08 Mai 1945. Guelma. 141p
- **Berche P., Gaillard. J-L. et Simouet. M., (1988).** Bactériologie, les bactéries des infections Humaines. *Flammarion*, 660p.
- **Bourgeois C. M. et Leveau J. Y., (1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. T3. *Apria*, 33 Ip.
- **Bugnicourt M. (1983).** Dictionnaire de microbiologie générale, la vie racontée par les bacteries. Edition Ellipses. 699p.
- **Carbonnelle D. Kouyoumdjian S., (1988).** Bactériologie médicale techniques usuelles. *Méd. Mal. Inf.* 251 p.
- **CEAEQ 3000,** Recherche et dénombrement des coliformes totaux; méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec : pp4.
- **Charchar ,2009.** Contribution à l'étude de la pollution d'Oued Seybouse(Guelma) par les tensioactifs anionique(LAS). Mémoire de magistère. Université 8 Mai 1945 de Guelma.
- **Délaras C, (2008)** .surveillance sanitaire Et Microbiologique des eaux : Réglementation-Prélèvements-Analyses.*IEC & DOC.*269p.
- **Denis F., (2007).** Bactériologie médicale techniques usuelles. *Masson*. 384p.
- **Direction d'hydraulique.** Guelma
- **Gharsallah Z., (2005).** *Evaluation de la pollution du littoral d'Annaba qualité microbiologique de l'eau et teneur en métaux lourds du sédiment superficielle.* Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. 76p.
- **Ghodbane M., 2009.** Etude de la contamination des eaux souterraines de la zone de Chemora par les nitrates –Est Algérien-. Ed. Mémoire de l'ingéniera en hydraulique, Université de Batna : pp5.

- **Institut Pasteur, (1978).** Les milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Publifab.575p.
- **ISO (1988).** International organisation for Standardization Microbiology- Dénombrement des microorganismes revivables- Comptage des colonies par inoculation dans ou sur un milieu de culture nutritif gélosé. ISO 6222.
- **ISO (1999).** International organisation for Standardization Microbiology- methode par ensemencement en milieu liquide du NPP. ISO 9308-3.
- **Joffin J J-N et Leyrol G. (2001).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3^{ème} éditions. *CRDP d'Aquitaine*. 320p
- **Labres 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.
- **Labres E. (2006).** Manuel des travaux pratique : analyse des eaux, *Institut Pasteur d'Algérie*.60p.
- **Leclerc H. (1983).** Microbiologie générale. Edition Doin. 450p.
- **Lightfoot N. F., (2002).** Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. *Directives pour l'assurance qualité*, 387 p.
- **Mayat S., (1994).** Techniques de traitement, aliments et eaux, 1^{ère} édition, *Edisem*, 195p.
- **OMS.** Organisation mondiale de la santé.
- **P.D.A.U.** Utude révision du plan directeur d'aménagement et d'urbanisme de la commune de Heliopolis
- **Phelps E. (1908).** *A method for calculating the number of E coli from the results of dilution tests*. Edition pub hyg.145p.
- **Pierre et Marie, 2002 – 2003.** Bactériologie. Faculté de médecine, Université Paris-VI. 122p.
- **Reggam, 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 8 Mai 1945 de Guelma.
- **Rejsek F., (2002).** Analyse des eaux. *Tec et Doc*. 358p.

- **Rodier J., (1996).** Analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, 8^{ème} édition, Dunod, Paris 1130p.
- **Rodier J. (2005).** L'analyse de l'eau. 8^{ème} édition DUNOD. 1384p.
- **Rodier J et al. (2009).** *L'analyse de l'eau*. 9eme édition DUNOD Paris.
- **Sayad L., (2008).** *Qualité physico-chimique et bactériologie des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux (wilaya de Taraf)*. Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. 125p.

Webographie :

- Google earth, (2011). Europa Technologies. Tele Atlas. www.googleearth.com.
- www2.ac-lyon.fr/enseigne/.../macgrady.htm
- <http://www.bacteriologie.net>
- www.oieau.org/.../AnalyseEau/AnalyseFau_PresGen.htm
- www.cceaq.gouv.qc.ca/.../bio_toxico_micro.htm
- <http://www.experteau.com/EauTraitement/AnalyseBacteriologique.asp>
- www.techniques-ingenieur.fr/.../surveillance-microbiologique-de-l-eau-p4218/ - Surveillance microbiologique de l'eau.

Tabl.1: Evaluation des températures mensuelles de la région d'étude
(Années 1994-2010).

	T(max.)	t(minl.)	Moyenne
Jan.	9,82	16,32	4,36
Fév.	10,24	17,77	3,93
Mar.	12,44	20,87	5,72
Avr.	14,86	22,89	7,71
Mai	19,51	27,97	11,37
Jui.	24,24	32,33	15,6
Juill.	27,2	36,75	18,25
Aou.	27,51	36,58	19,58
Sept.	23,49	31,77	17,04
Oct.	19,35	27,77	13,34
Nov.	14,28	21,57	8,66
Déc.	10,99	17,43	5,82

Tabl. 2: Evaluation mensuelle des humidités relatives: (1994-2010)

Mois	Humidité relative (%)
Jan.	78,58
Fév.	75,28
Mar.	74,14
Avr.	72,25
Mai	68,42
Jui.	60,44
Juill.	55,04
Aou.	58,72
Sept.	60,55
Oct.	70,31
Nov.	72,84
Déc.	75,39

Table du Nombre le plus probable (NPP) :

<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		

Produced with Scantopdf

Tab 2.7: Tableau de lecture (Api 20E)

Teste	Composants Actifs	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-Nitrophényl- β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine déshydrogénase	Jaune	Rouge/Orange
LCD	L-lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/Orange
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/Orange
CIT	Trisodium citrate	Citrate perméase	Vert/Pale/jaune	Bleu-vert
H ₂ S	Sodium thiosulfate	Production d'H ₂ S	Incolore	dépôt noir
URE	Urée	Urease	Jaune	Rouge/Orange
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
			Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'indole	Kovac/immédiat	
			Incolore	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétone	VP1+VP2/10min	
			Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatine	Gélatinase	Non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/Oxydation glucose	Bleu/ Bleu vert	Jaune/Jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation/Oxydation mannitol	Bleu/ Bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/Oxydation inositol	Bleu/ Bleu vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/Oxydation sorbitol	Bleu/ Bleu vert	Jaune
RAH	L-rhamnose	Fermentation/Oxydation rhamnose	Bleu/ Bleu vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/Oxydation saccharose	Bleu/ Bleu vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/Oxydation melibiose	Bleu/ Bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/Oxydation Amygdaline	Bleu/ Bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/Oxydation arabinose	Bleu/ Bleu vert	Jaune

Milieux utilisés

❖ **Gélose nutritives (GN) : pH = 7.6 à 7.8**

Macération de viande

(Eau distillée + extrait de viande) 1000ml

Peptone trypsine 15g

NaCl ou KCl 5g

Agar 15 à 20 g

❖ **Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol (BCPL) : pH = 6.7**

Peptone 5g

Extrait de viande 3g

Lactose 10g

Cristal violet 0.005g

Pourpre de Bromocrésol 0.025g

Eau distillée 1000ml

❖ **Gélose Hecktoën : pH = 7.5**

Protéose peptone 12g

Extrait de levure 3g

Chlorure de sodium 5g

Thiosulfate de sodium 5g

Sels biliaires 9g

Citrate de fer ammoniacal 1.5g

Salicine 2g

Lactose 12g

Saccharose 12g

Fuchsine acide 0.1g

Bleu de bromothymol 0.065g

Agar 14g

Eau distillée 1000ml

❖ **Gélose viande foie (VF) : pH = 7.2**Gélose de base :

Base viande foie	30g
Glucose	2g
Amidon	2g
Agar	11g
Eau distillée	1000ml

Gélose complète :

Même formule que le milieu de base auquel sont ajoutés :

Sulfite de sodium à 5%	50ml
Alun de fer ammoniacal à 5%	10ml

❖ **Gélose Salmonella-Shigella (SS) : pH = 7.0**

Extrait de viande de bœuf	5g
Polypeptone	5g
Lactose	10g
Sels biliaires	8.5g
Citrate de sodium	10g
Thiosulfate de sodium	8.5g
Citrate ferrique	1g
Gélose	13.5g
Vert brillant	0.00033g
Rouge neutre	0.025g
Eau distillée	1000ml

❖ **Milieu de Chapman mannité : pH = 7.4**

Peptone bactériologique	10g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g

Rouge de phénol	0.025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

❖ **Milieu de Sabouraud** : pH = 6 à 6.3

Peptone Chapoteaut	10g
Glucose massé	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

❖ **Milieu de Roth** : pH = 6.8 à 7Milieu simple concentration :

Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate monopotassique	2.7g
Azohydrate de sodium	0.2g

Milieu double concentration :

Peptone	40g
Glucose	10g
Chlorure de sodium	10g
Phosphate bipotassique	5.4g
Phosphate monopotassique	5.4g
Azohydrate de sodium	0.4g

❖ **Milieu de Litsky** : pH = 6.8 à 7

Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate monopotassique	2.7g

Azohydrate de sodium	0.3g
Ethyl-violet	0.0005g
❖ Gélose de Mac Conkey : pH = 7.1	
Peptone bactériologique	20g
Sels biliaire	1.5g
Chlorure de sodium	5g
Lactose	10g
Rouge de neutre	0.03
Cristal violet	0.001
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
❖ Milieu Clark et Lubs : pH = 7.5	
Peptone	5g
Phosphate dipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	1000ml
❖ Eau peptonée exempte d'indole : pH = 7.2	
Peptone exempte d'indole	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml
❖ Milieu mannitol mobilité : pH = 7,6 à 7.8	
Peptone tryptique de viande	20g
Agar	4g
Mannitol	2g
Rouge de phénol à 1%	4g
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1g
Eau distillée	1000ml

❖ Milieu de TSI (gélose glucose-lactose-saccharose-H₂S) : pH = 7,4

Peptone	20g
Extrait de levure	3g
Extrait de viande	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	0.5g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Glucose	1g
Rouge de phénol	q.s
Agar	12g
Eau distillée	1000ml

❖ Milieu de simmons : pH = 6,8

Sulfate de magnésium	0.2g
Phosphate mono ammoniacal	1g
Phosphate dipotassium	1g
Citrate de sodium	2g
Chlorure de sodium	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Agar	15g
Eau distillée	1000g

❖ Urée indole : pH = 7,2

L- tryptophane	3g
Phosphate bipotassium	1g
Phosphate monopotassium	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Rouge de phénol	28mg

Eau distillée	1000ml
❖ Eau peptonée alcaline (EPA) : pH = 8.6	
Peptone tryptique	30g
NaCl	30g
Eau distillée	1000ml
❖ Milieu de B.H.L.B : pH = 7.4	
Protéose peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12.5
Infusion de cœur de bœuf	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2.5g
Glucose	15g
Eau distillée	1000ml (Institut Pasteur,
1978).	

Réactifs utilisés

❖ Réactif rouge de méthyle (RM) :	
Rouge de méthyle	0.5g
Alcool à 60°	100ml
❖ Réactif de Voges Proskauer (VP): pour la recherche de l'acétoïne :	
<u>VP1:</u>	
Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml
<u>VP2:</u>	
Alpha naphтол	6g
Ethanol	100ml
❖ Réactif de Kowacks :	
la mise en évidence de la production d'indole :	
Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5g

Alcoolamylique 75ml

HCL pur 25ml

❖ **Réactif de TDA** : pour la recherche du tryptophane désaminase

Peptone de fer 3,4g

Eau distillée 100ml (Institut Pasteur, 1978).

Produced with ScanTOPDF