

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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

UNIVERSITE DU 8 MAI 1945 DE GUELMA
FACULTE DE SCIENCE ET DE L'INGENIERIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



570.157

10/308

MEMOIRE MASTER

DOMAINE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
SPECIALITES BIOCHIMIES ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
OPTION BIOLOGIES MOLECULAIRE DES PROCARYOTES

Thèmes

**CHLORATION DES EAUX POTABLES ET
L'EMERGENCE DES BACTERIES RESISTANTES
AU CHLORE.**

Présenté par :

- HADDAD Soumia
- REGHIS Fatima
- SAMSAR Zineb

Membre de jury :

PRESIDENT : M^R BENOURETH Djamel eddine

Prof. Université de Guelma.

ENCADREUR : M^{me} KHALEF Missaouda

M.A.T. Université de Guelma.

EXAMINATEUR : M^{me} TORCH Asma

M.A.T. Université de Guelma.

INVITE : M^R BOUKREDDINE Mahdi

ING. Station de traitement de

l'eau potable « Guelma ».

Juin 2010

Remerciement

Nous remercions au premier lieu, Dieu le tout puissant qui grâce à lui (tout seul) nous avons pu terminer cette mémoire. « Louange à Dieu ».

Nous remercions :

Mr. BENOUEZEH ; pour son compétence et ses qualités scientifiques et humaines qu'il nous a témoigné tout au long de ces années. Son rigueur dans la mise en place des manipulations et son savoir faire dans la transmis de l'information ont permis la prise de décisions opportunes pour le développement de nos connaissances.

Mme. KHALLEF ; pour sa confiance, ses sacrifices, et son encouragement. Et qui nous a guidées toute les années de spécialité.

M. BOUKEREDDINE Mehdi

Pour ses qualités scientifiques et humaines, pour son capacité de manipuler et d'analyser des résultats expérimentaux ce qui nous permis de comprendre rapidement les techniques bactériologiques. Ses explications nous permis d'acquérir une grande autonomie pour la réalisation et l'adaptation de protocoles expérimentales à notre modèle expérimental in vitro. Pour sa solidarité humaine qu'elle nous a témoigné dès notre arrivée au laboratoire ainsi que pour son esprit joyeux porteur de bonheur.

A tous le staff de station STEP et surtout le chef M. ELAGGOUNE Abdelghani qui nous a donné la liberté pour travailler dans des conditions favorables.

Sommaire

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Glossaire.

Introduction..... 1

Partie bibliographique :

Chapitre 1 : Traitement de l'eau potable de la wilaya de Guelma

1. Description du site	2
1.1 Le barrage de Bouhamdane	2
1.1.1 Situation géographique	2
1.1.2 Caractéristique du barrage	2
1.1.3 Rôle du barrage	3
1.2. Etude climatologique.....	3
1.3 Station de traitement des eaux potables.....	7
1.3.1 Localisation	7
1.3.2 Plan de la station	7
1.2.4 Le traitement effectué	10
-Pré-chloration.....	10
-Clarification.....	11
-Post-chloration.....	14
1.4 Chimie du chlore dans l'eau	15
1.5 Mode d'action du chlore.....	16
1.6 Dosage du chlore.....	17
1.6.1 Le break-point.....	17
1.7 Le contrôle de la désinfection.....	18

2.1. Prélèvement 01 :	35
2.1.1. Méthode de filtration sur membrane :	35
2.2. Prélèvement 02 :	45
2.2.1. Recherche sur milieu liquide :	45
3. Identification :	49
3.1 Examen macroscopique des caractères cultureux :	49
3.2. Examen microscopique après coloration de Gram :	49
3.3. Examen liés aux caractères biochimiques :	54
3.3.1. Galerie Api 20 E :	54
3.3.2. Galerie Api 20 NE :	54
3.3.3. Test d'oxydase :	54
3.3.4. Test de mannitol :	54
4. Détermination de la CMI des bactéries isolées :	55
Résultats et discussion.....	58
Conclusion.....	73

Résumé.

Références bibliographiques.

Liste des annexes.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Localisation géographique du barrage de Bouhamdane.	2
Figure2	Diagramme Ombrothermique de la ville de Guelma (1999-2009).	5
Figure3	Situation de la ville de Guelma dans le climagramme d'Emberger (1999-2009).	6
Figure4	Localisation géographique de la station de Hammam Debagh.	7
Figure5	Maquette représente le plan de la station de traitement de l'eau potable de Hammam Debagh.	8
Figure6	Les différentes étapes de traitement de l'eau potable de Hammam Debagh.	9
Figure7	La pré-chloration dans le premier bassin de mélange.	10
Figure8	Le bassin de coagulation.	12
Figure9	Le bassin de la floculation.	12
Figure 10	Décanteur raclé à ciel ouvert	13
Figure 11	Basin d'un filtre à sable.	14
Figure 12	La cohabitation du Cl_2 , HClO et ClO^- en fonction du pH.	15
Figure 13	Courbe de break-point.	17
Figure 14	Test du chlore par un comparimètre.	18
Figure 15	L'activité désinfectante de l' HClO et le ClO^-	20
Figure 16	Structure de la paroi des bactéries Gram ⁺ .	23
Figure 17	Structure de la paroi des bactéries Gram ⁻ .	23
Figure 18	Structure de la membrane cytoplasmique.	24
Figure 19	Formation d'un floc bactérien.	26
Figure 20	Photographie électronique d'un biofilm de salmonelle.	27
Figure 21	Protocole expérimentale.	31
Figure 22	Le point de prélèvement de l'eau brute.	33

Numéro	Titre	Page
Figure 23	Le point de prélèvement de décanteur (flèche rouge).	33
Figure 24	Point de prélèvement de l'eau.	34
Figure 25	Rompe de filtration à trois postes.	36
Figure 26	Méthode de recherche et dénombrement des coliformes totaux et Thermotolérants par filtration sur membrane.	38
Figure 27	Méthode de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux par filtration sur membrane.	40
Figure 28	Méthode de recherche et dénombrement des staphylocoques par filtration sur membrane.	42
Figure 29	Test de Staphylocoagulase.	44
Figure 30	Test de catalase.	44
Figure 31	Recherche des coliformes en milieu BCPL.	46
Figure 32	Méthode de recherche streptocoques en milieu ROTH.	48
Figure 33	Préparation de la galerie Api 20 E.	51
Figure 34	L'api 20 NE avant son utilisation	52
Figure 35	identification des staphylocoques par le test de mannitol	55
Figure 36	Méthode de détermination du CMI des souches isolées.	57
Figure 37	Dénombrement des coliformes à partir des 03 points de prélèvements.	59
Figure 38	Dénombrement des streptocoques fécaux du prélèvement 1.	59
Figure 39	Dénombrement des staphylocoques du prélèvement 1	60
Figure 40	Morphologie microscopique des coliforme Bacille à Gram (-) (G×100)	61
Figure 41	Morphologie microscopique des streptocoques à Gram (+) (G×100)	61
Figure 42	Morphologie microscopique des staphylocoques à Gram (+) (G×100)	61
Figure 43	Coagulase positif.	63
Figure 44	Catalase positif.	63

Numéro	Titre	Page
Figure 45	Oxydase positif.	63
Figure 46	Résultats de test de mannitol pour les staphylocoques.	63
Figure 47	Résultat de l'Api 20 E d' <i>Escherichia vulneris</i> .	63
Figure 48	Résultat de l'Api 20 NE d' <i>Aéromonas salmonicida ssp salmonicida</i> .	64
Figure 49	La CMI des souches isolées avec un pH= 5.41 et un temps de contacte de 5 min	66
Figure 50	La CMI des souches isolées avec un pH= 5.41 et un temps de contacte de 10 min	66
Figure 51	La CMI des souches résistantes à un pH=5.41 avec un temps de contacte de 5 min	67
Figure 52	La CMI des souches isolées avec un pH= 7.14 (ajusté par le NH ₃) et un temps de contacte de 5 min	68
Figure 53	La CMI des staphylocoques en fonction du temps avec un pH= 7.14 (ajusté par le NH ₃).	70
Figure 54	La CMI des souches résistantes à un pH=7.14 ajusté par le NaOH avec un temps de contacte de 5 min	70
Figure 55	L'influence du temps de contacte sur la CMI d' <i>Escherichia vulneris</i>	71

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Données météorologique de la région de Guelma (ONM).	3
Tableau II	Température moyenne mensuelle la région de Guelma (1994-2009).	4
Tableau III	Répartition des précipitations moyennes saisonnières (station de Guelma, 1994-2008).	4
Tableau IV	Spectre d'activité du chlore aux différents micro-organismes.	19
Tableau V	Présentation des points de prélèvement.	32
Tableau VI	les paramètres physicochimiques du premier prélèvement	58
Tableau VII	Les paramètres physicochimiques du deuxième prélèvement	60
Tableau VIII	tests biochimique des souches isolés	62

Glossaire :

Bactéricide : produit ou procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

Bactériostatique : c'est un produit ayant la propriété d'inhiber les bactéries dans des conditions définies.

Bactériostase : c'est l'état d'une population bactérienne dont la multiplication est momentanément inhibée.

Antibactérien : ceci qualifie un produit ou un procédé dont on ne précise.

Matière en suspension : particules solides très fines présentes dans l'eau.

Matières colloïdales : se sont de très fines particules de matière solide, d'origine minérale ou organique, invisible à l'œil nu en examen direct, dotées à leur surface de charges électrique qui se confèrent à ces particules un mouvement permanent (même lorsque le liquide est au repos) et les maintiennent en suspension.

En l'absence d'une neutralisation de leurs charges électriques, les matières colloïdales ne décantent pas et ne peuvent être retenues que par des filtres très fines.

Turbidité : Caractère d'une eau trouble, non transparente. La mesure de la turbidité donne une indication sur la teneur en matières solides en suspension. Elle peut aussi déterminée à l'aide d'un fuseau lumineux et d'une cellule photo-électrique avec mesure de l'absorption ou de la réflexion de la lumière par les solides en suspension.

Dans tout l'univers, il y'a une molécule que l'homme cherche avidement, car sa découverte dans l'atmosphère d'une planète lointaine libérerait aussitôt les rêves les plus fous de l'humanité. Elle est le synonyme de la vie biologique puisqu'elle est le constituant majeur de la matière vivante. Sa formule, peut s'écrire de façon très simple : H_2O , c'est l'EAU.

Derrière ce mot, se cache une vie très vaste ; c'est le monde des microorganismes où l'eau est l'environnement favorable pour leur prolifération à cause de son caractère humide. Malgré qu'elle soit d'apparence limpide et propre, elle peut être contaminée par des microorganismes pathogènes et poser de sérieux risques pour la santé.

Ceci implique la nécessité impérieuse de protéger l'eau selon des processus de traitement successifs et complémentaires en faisant appel à l'emploi de produits chimiques tels que le CHLORE qui se caractérise par son effet biocide pour maintenir de façon efficace les microorganismes nuisibles à distance. Cependant, ces microorganismes peuvent acquérir de plus en plus une résistance à ces désinfectants.

C'est pour cela, il faudrait que les concentrations soient suffisantes pour tuer toutes les bactéries exposées et éliminer le risque de résistance.

Nous avons entamé une recherche pour contrôler le niveau de résistance de ces bactéries ; en adaptant un protocole expérimentale visé pour la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des souches qui ont une résistance au chlore en fonction des paramètres ayant une influence sur cette adaptation bactérienne (dose du chlore, pH, temps de contact...).

Partie bibliographique

Chapitre 1 :

Traitement de l'eau potable de la wilaya de Guelma

Le traitement d'une eau brute dépend de sa qualité, laquelle est fonction de son origine et peut varier dans le temps. La seule origine hydrique de l'eau brute traitée au niveau de la station du traitement de l'eau potable de la wilaya de Guelma, est le barrage de Bouhamdane

1. Description du site :

1.1. Le barrage de Bouhamdane :

1.1.1. Situation géographique :

Le barrage est à 23 Km du chef-lieu de wilaya de Guelma puisqu'il est implanté à 03 km à l'amont de la localité de Hammam Debagh. (Fig.1). [1']

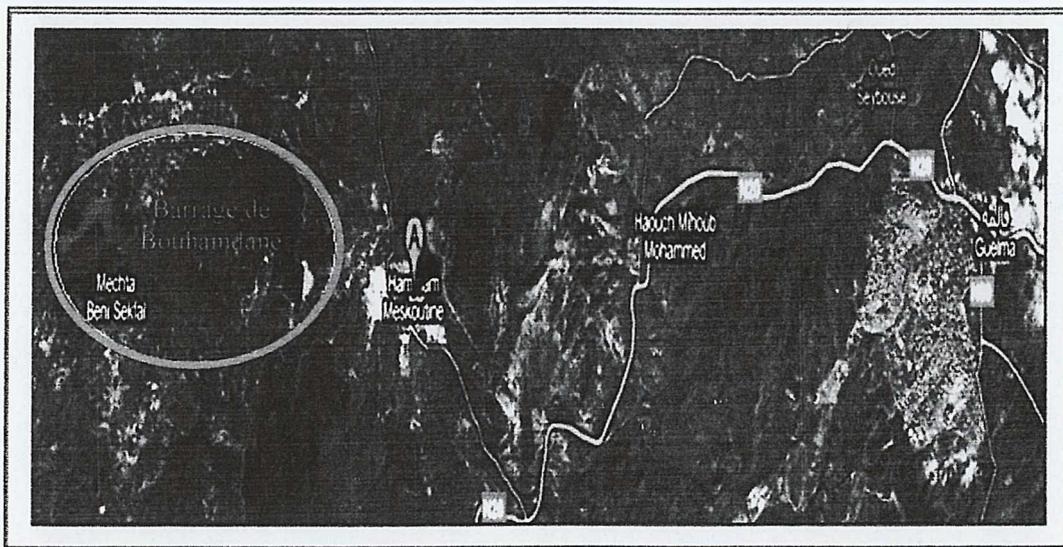


Figure 1: Localisation géographique du barrage de Bouhamdane. [2']

1.1.2. Caractéristique du barrage :

- Le barrage est de type terre.
- La capacité initiale est de 200 Hm³ et la capacité levé 2004 est de 185Hm³.
- Apport moyen annuel : 69Hm³.
- L'année de mise en eau est 1987.
- La surface du bassin versant est de 1070 Km². [3]

1.1.3. Rôle du barrage :

Le plan de l'eau du barrage de Bouhamdane est un grand lac ayant son rôle à jouer dans le souci de sauvegarder l'environnement, en plus de finalités pour lesquelles il a été construit à l'origine, à savoir :

- L'alimentation en eau potable d'une partie de la population de la wilaya, dont les communes de Guelma : Héliopolis, El Fedjoudj et Ben Djerrah, a-t-on fait savoir. A l'instar de celui de Medjez Beggar, à Ain Makhoulf.
- L'ouvrage contribue à l'irrigation d'une superficie de plus de 9.500 hectares de terres du périmètre agricole Guelma-Boucheougouf, a-t-on ajouté à la DHW, qui a fait état également de l'amélioration du niveau de 14 retenues collinaires, des oueds et de 333 puits répartis à travers le territoire de la wilaya. [1'] [2']

1.2. Etude climatologique :

Les facteurs climatiques jouent un rôle déterminant dans le régime des cours d'eau, et dans l'alimentation éventuelle des nappes souterraines.

Les données météorologiques récoltés de la station de Guelma ONM (Organisation National Météorologique), sur 15 ans (1994-2009) dont les données sont résumées dans le tableau I, nous permettent de caractériser le climat de la région.

Tableau I : Données météorologiques de la région du Guelma (ONM).

latitude	Altitude (m)	longitude	Période d'observation
36° 28'	227	07°28'E	1994-2009

1.2.1 La température :

La température est l'un des facteurs les plus importants du climat. Elle agit sur les répartitions d'eau qui s'opèrent par le phénomène de l'évapotranspiration et influe sur l'activité chimique et bactérienne.

L'étude des températures moyennes mensuelles et annuelles est primordiale, car c'est elle qui nous permet d'évaluer de déficit d'écoulement annuel et saisonnier. [4]

Les données des températures moyennes mensuelles mesurées au niveau de la station de Guelma, sur une période de 15 ans sont consignées dans le tableau II.

Tableau II : Température moyenne mensuelle la région de Guelma (1994-2009).

Mois	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Jun	Jui	Aout
T(°C)	23.56	19.83	14.33	10.87	9.76	10.19	12.47	14.84	19.65	24.25	27.16	27.51

Les températures moyennes mensuelles les plus élevées sont observées pendant la période allant de juin à octobre, avec des températures variantes de 20 à 27.51°C. Par contre les températures les plus basses (9 à 12.47°C) sont observées pendant la période hivernale (décembre à mars) avec un minimum enregistré pendant le mois de janvier 9.76°C. [4]

1.2.2 La précipitation :

La précipitation désigne tout type d'eau qui tombe de ciel, sous forme liquide ou solide. Elle représente un facteur climatique très important qui conditionne l'écoulement saisonnier et par conséquent le régime des cours d'eau.

La répartition mensuelle recueillie à la station météorologique de Guelma sur une période de 15 ans (1994 – 2008) sont récapitulées dans le tableau III. La valeur maximale est observée au mois de janvier avec 102.03 mm et la valeur minimale au mois de juillet avec 2.96 mm.

Tableau III : Répartition des précipitations moyennes saisonnières (station de Guelma, 1994-2008).

Saison	Automne			Hiver			Printemps			Été		
Mois	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Fev	Mar	Avr	Mai	Jun	Jui	Aout
P(mm)	46.41	37.05	71.25	81.8	102.03	62.77	60.12	67.71	45.05	16.45	2.96	12.47
Moy(mm)	51.57			82.20			57.63			10.67		

Ce tableau montre que la saison hivernale est la plus pluvieuse avec une moyenne de 82.20 mm/mois, ce qui produit une charge de la nappe et une dilution des éléments chimiques, tandis que l'été est sec avec une faible recharge de 10.63 mm/mois, ce qui produit une évaporation et une concentration des éléments chimiques. Il en ressort que janvier est le mois le plus pluvieux et que juillet est le mois le plus sec. [4]

1.2.3. La relation température-précipitation :

Selon Bagnouls et Gausson, une période sèche est due aux croisements des courbes de température et des précipitations. Cette relation permet d'établir un histogramme pluviométrique sur le quel les températures sont portées à une échelle double des précipitations. (Fig. 2)

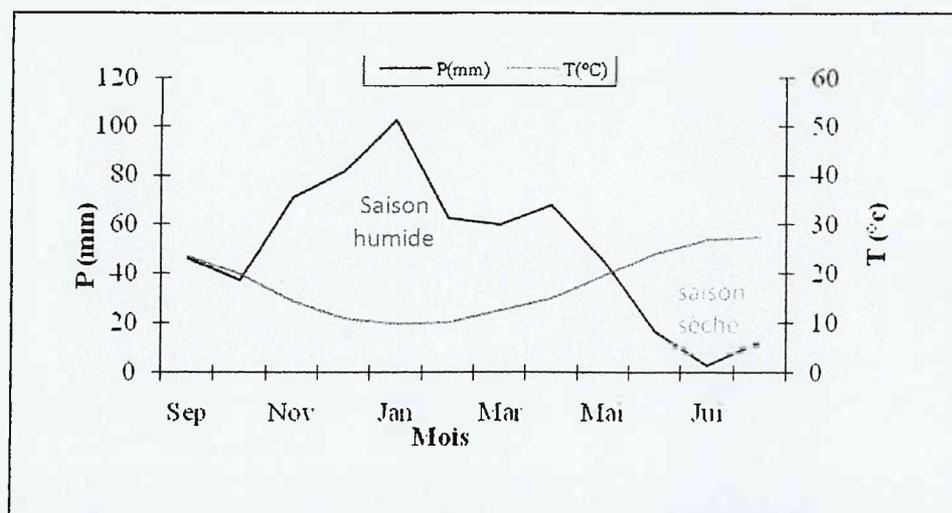


Figure 2 : Diagramme Ombrothermique de la ville de Guelma (1999-2009).

D'après ce diagramme établi à partir des 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 une grande importance pour la connaissance de la période déficitaire en eau.

1.2.4 Synthèse climatique :

Selon Emberger (1963), la région méditerranéenne est subdivisée en cinq étages bioclimatiques. Pour déterminer l'étage bioclimatique de la zone d'étude (Guelma), il faut procéder au calcul du quotient pluviométrique d'Emberger (Q^2).

$$Q^2 = \frac{1000 \cdot P}{(M+m) \cdot (M-m)}$$

D'où :

M : Température maximale du mois le plus chaud ($M = 36,34^\circ\text{C} = 309,34\text{K}$)

m : Température minimale du mois le plus froid ($m = 4,62^\circ\text{C} = 277,62\text{K}$).

P : Précipitation annuelle $P = 606,1$.

Notre région (Guelma) présente un $Q^2 = 65,10$ ce qui la classe dans l'étage bioclimatique à végétation semi-aride à hiver frais. (Fig.3). [4]

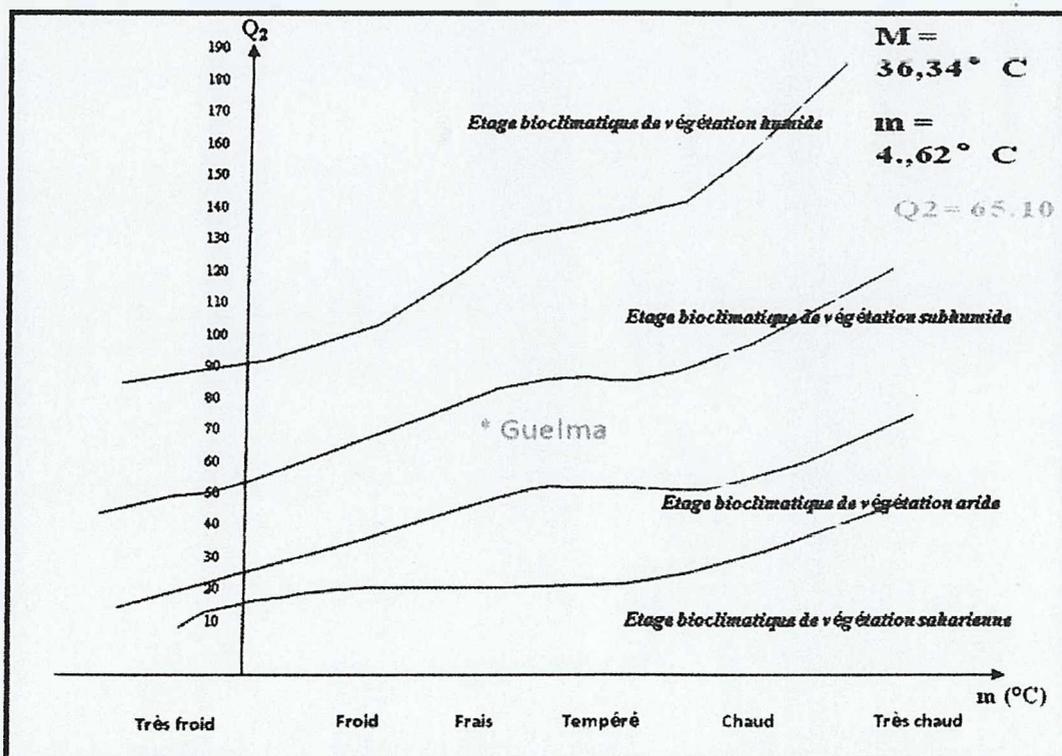


Figure 3: Situation de la ville de Guelma dans le climagramme d'Emberger (1999-2009).

1.3 Station de traitement des eaux potables:

1.3.1 Localisation :

Elle se situe juste à la sortie de village de Hammam Debagh de 1 km avant le barrage, elle occupe 3 Hectares de surface (Fig.4).

Ses travaux sont commencés en 06 février 2002 et d'une façon officielle en 2003. [1]

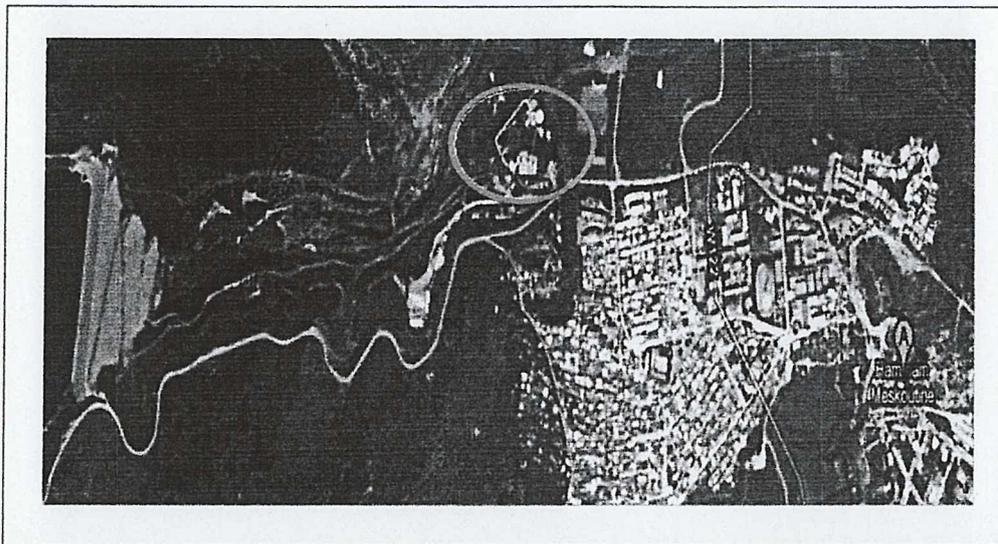
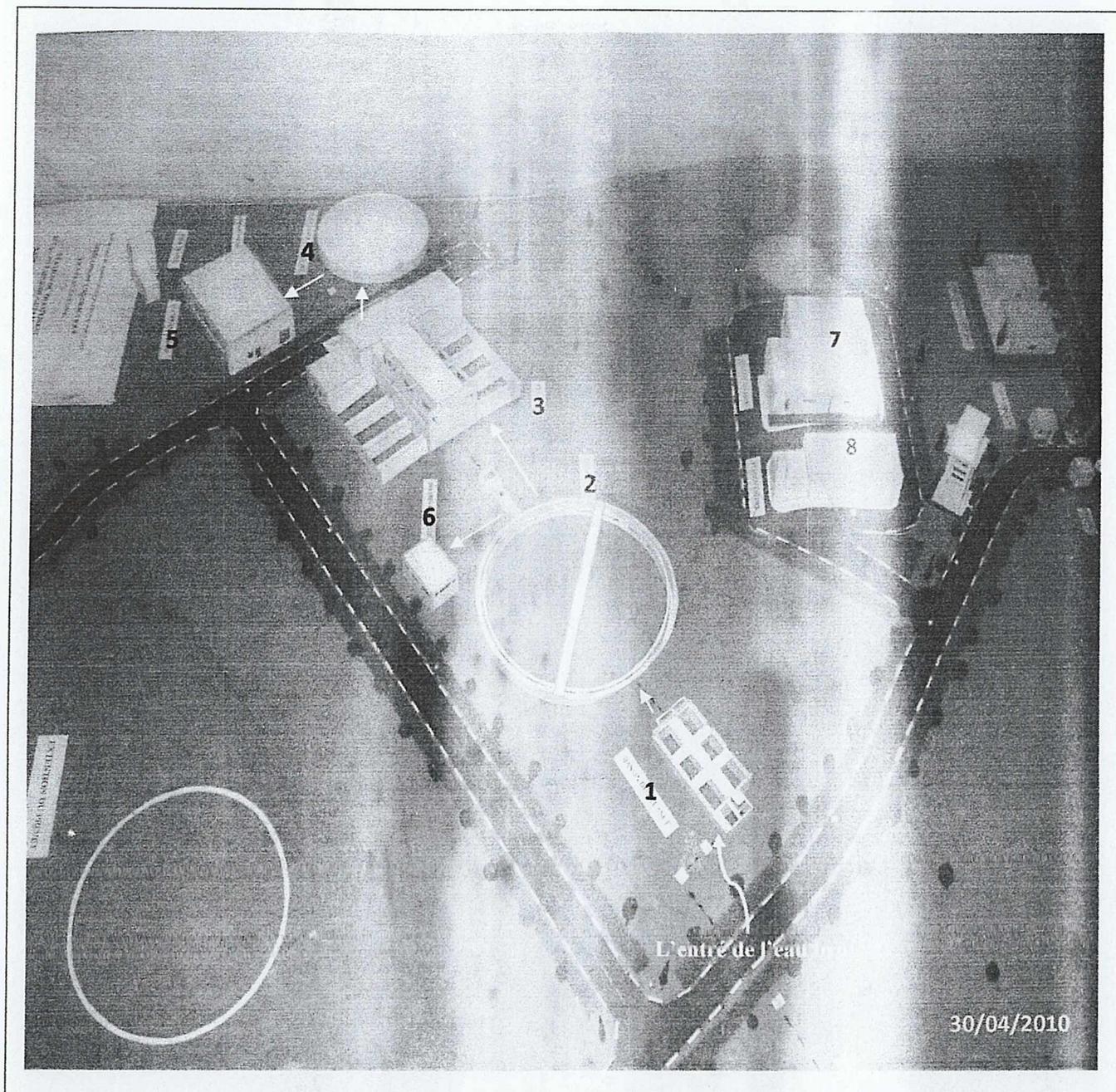


Figure 4 : Localisation géographique de la station de Hammam Debagh. [3']

1.3.2 Plan de la station :

Les figures : (5) et (6) représentent les différents stades du traitement de l'eau potable effectué au niveau de la station de Hammam Debagh.



- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1- Bassin de mélange. | 5- SPI. |
| 2- Décanteur. | 6- La boue. |
| 3- Filtres à sable. | 7- sulfate d'alumine. |
| 4- Réservoir. | 8- station chlore. |

Figure 5: Maquette représente le plan de la station de traitement de l'eau potable de Hammam Debagh.

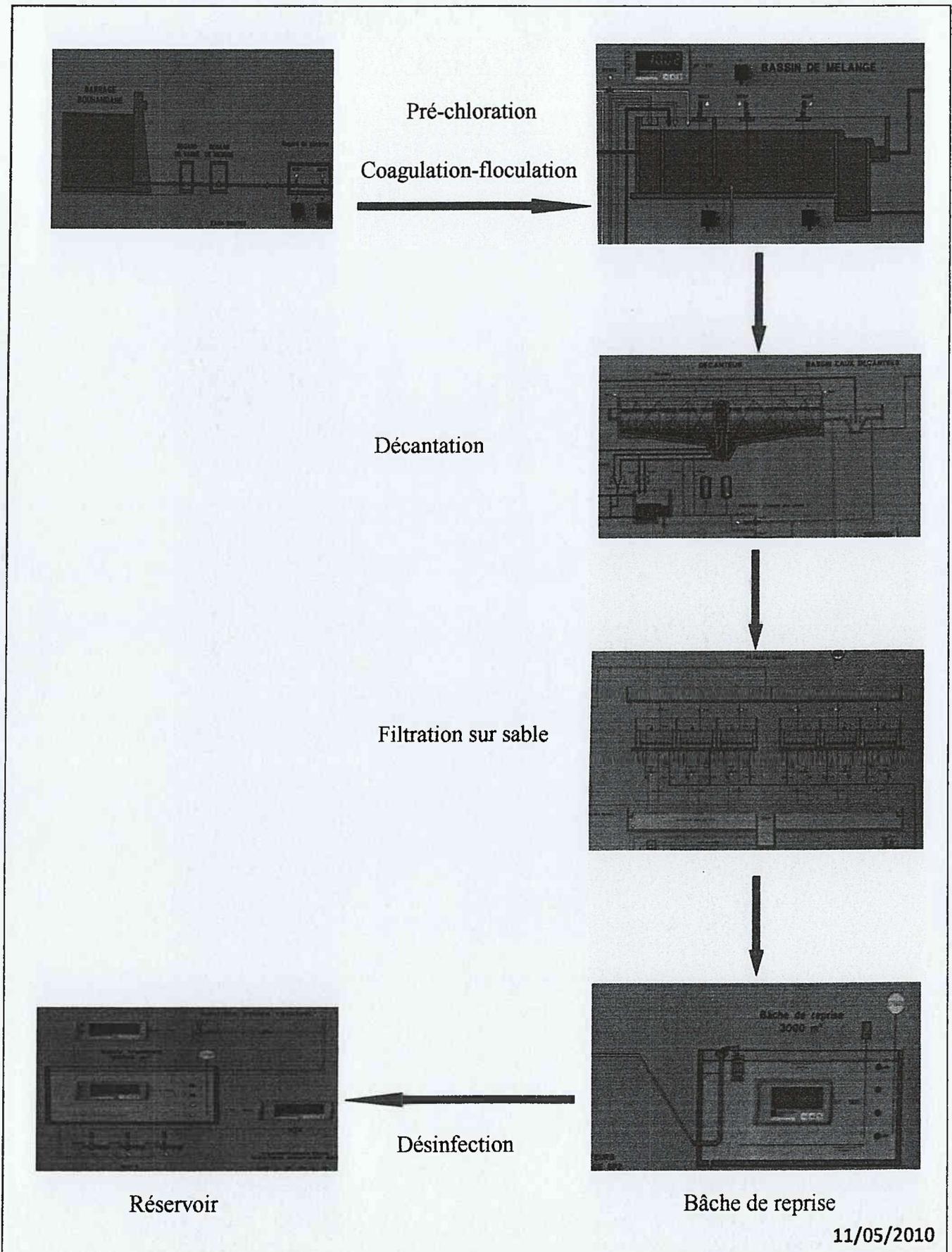


Figure 6 : Les différentes étapes du traitement au niveau de la station de Hammam Debagh.

1.2.4 Le traitement effectué :

La station de traitement des eaux potables (STEP), est une usine de traitement des eaux d'une capacité de 500L/S. Ce traitement passe par des étapes bien définies qui forment le procédé de traitement qui a été mis au point en fonction de la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau brute du barrage de Bouhamdane. Le procédé se compose de plusieurs étapes, chacune de ces étapes comprend des techniques spécifiques pour l'amélioration de la qualité de l'eau. [1]

Le procédé du traitement de l'eau de surface comporte en général un ordre chronologique qui comporte :

A) Pré chloration :

Elle se fait par l'hypochlorite de sodium (NaClO) ou communément appelé l'eau de javel qui est l'oxydant utilisé ; à défaut, il est parfois remplacé par l'hypochlorite de calcium.

La solution est ajoutée en surface dans le premier bassin de mélange avec une concentration en fonction du débit de l'eau entrée qui est d'environ 1900m³/h. (Fig.7). [1]

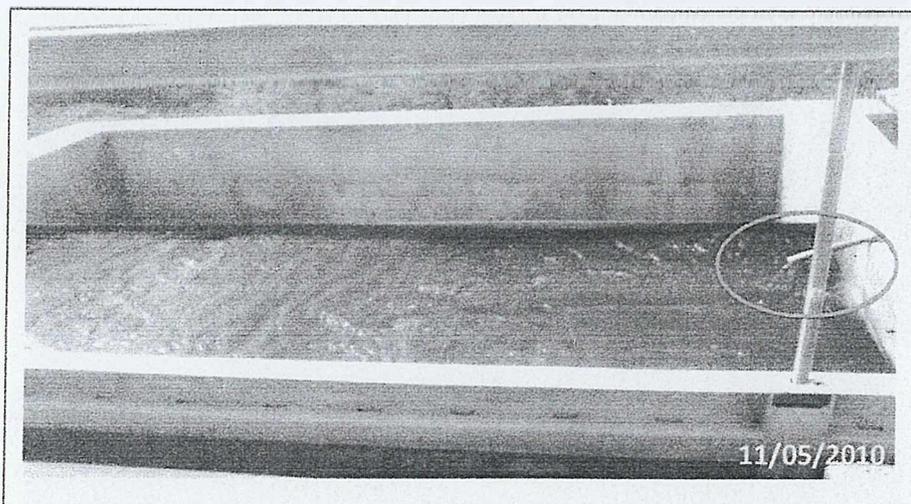
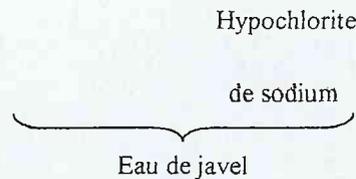
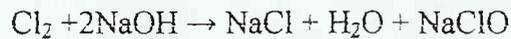


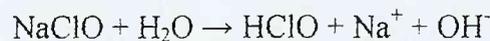
Figure 7: La pré-chloration dans le premier bassin de mélange.

➤ **Hypochlorite de sodium :**

Pour la fabrication de l'eau de Javel, on fait agir le chlore sur la soude, on obtient du sel, de l'eau et de l'hypochlorite : le mélange de ces trois produit constitue l'eau de Javel.



L'équation suivante illustre la réaction qui se produit entre l'hypochlorite de sodium et l'eau.



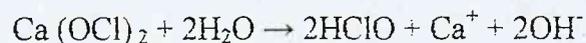
Contrairement à l'hydrolyse du chlore, l'ajout d'hypochlorite de sodium dans l'eau produit un ion hydroxyle qui fait grimper le pH.

➤ **Hypochlorite de calcium :**

Il est obtenue à partir de la précité issu de la dissolution du chlore gazeux dans une solution d'oxyde de calcium (chaux vive) et d'hydroxyde de calcium. [17]



L'équation d'hypochlorite de calcium dans l'eau est la suivante :



Hypochlorite de calcium

B) La clarification :

➤ **Coagulation :**

C'est une opération qui consiste à provoquer dans un premier temps la déstabilisation des matières en suspension* et des substances colloïdales*, puis leur agrégation en flocons décantables, elle se fait par le sulfate d'alumine $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ qu'il est ajouté dans un bassin d'agitation rapide (180 t/min) pour permettre la formation des petits flocs. (Fig. 8). [1]

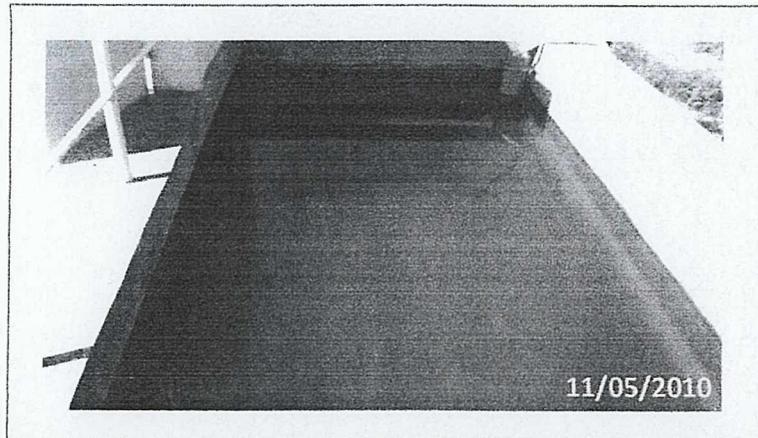


Figure 8 : Bassin de la coagulation.

➤ **Floculation :**

C'est une opération complémentaire à la coagulation qui consiste à un grossissement des micros floes formés par l'aluminium. (Fig.9)

Elle se fait par un flocculant qui est le poly-électrolyte dans un bassin d'agitation lente (40t/min), elle assure une plus grande cohésion du floe et une meilleur vitesse de sédimentation, ce qui permet une meilleur récupération des eaux de la surface du décanteur.

Le temps entre la coagulation et la floculation est de 20min c'est le temps nécessaire pour la formation des floes. Le dosage des produits chimiques (sulfate d'alumine et poly-électrolyte) est effectué par la technique du **jarre-test** pour mieux optimiser l'utilisation de ces produits et avoir une bonne floculation selon la turbidité de l'eau brute. [1]

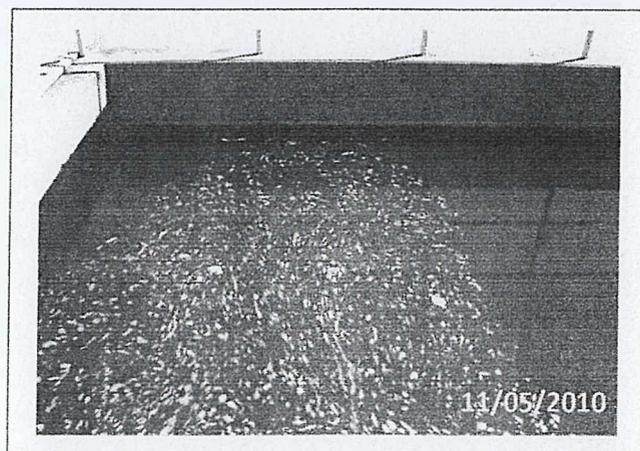


Figure 9 : Bassin de floculation.

➤ **Décantation :**

C'est la phase de séparation gravitaire des matières insolubles dans l'eau. Elle vise à éliminer les floccs issus de la coagulation- floculation.

Elle se fait dans un décanteur raclé à ciel ouvert de 17 mètre de diamètre pendant deux heures qui sont le temps nécessaire pour permettre aux floccs de décanter.

On distingue généralement la décantation à flux vertical où l'eau suit un trajet vertical et à flux horizontal où les particules décanterent tout au long du trajet en fonction de leur densité [1]

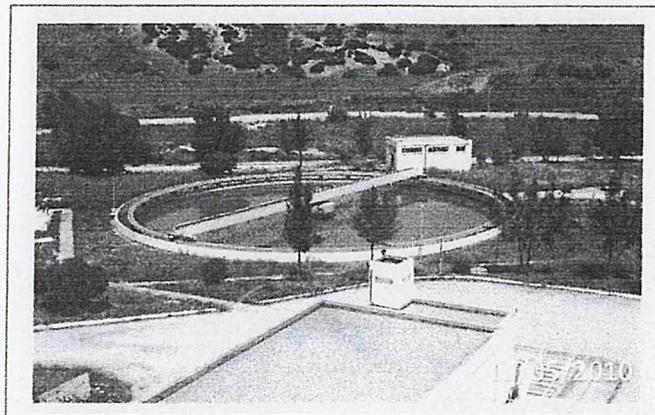


Figure 10: Décanteur raclé à ciel ouvert

➤ **Filtration sur sable :**

C'est une étape essentielle pour la réalisation d'un traitement efficace, puisque après la décantation il reste toujours des petits floccs et des particules de faible masse qui ne se décanterent pas. (Fig. 11)

L'objectif de la filtration est tout d'abord d'améliorer la qualité de l'eau décanterent essentiellement du point de vue de la turbidité (obtention d'une turbidité < 2 NTU) mais aussi celui de l'utilisation du lit de sable comme support biologique aux bactéries nitrifiantes (membrane biologique) pour l'élimination de l'azote ammoniacal non éliminé par l'oxydation.

La vitesse de filtration est de 0,1 à 0,2 m/h. Au cours de ce passage, la qualité de l'eau s'améliore considérablement par la diminution du nombre de microorganismes (bactéries,

virus, kystes), par l'élimination des matières en suspension, des colloïdales et par des changements dans la composition chimique de l'eau.

Cette méthode de traitement est souvent la plus économique et offre l'avantage d'une grande efficacité et d'une exploitation simple. Ainsi, elle répond aux besoins d'amélioration de la qualité de l'eau tout en offrant la possibilité d'associer la collectivité à la gestion, à l'entretien et à l'exploitation des installations. Son aptitude à apporter une amélioration simultanée des qualités physiques, chimiques et bactériologiques de l'eau brute représente un avantage considérable par rapport à d'autres techniques : celui d'accéder à une qualité d'eau satisfaisante sans rajouter d'autres étapes dans le processus de traitement. [1]



Figure 11 : Bassin d'un filtre à sable.

C) post-chloration :

C'est l'étape ultime du traitement de l'eau de consommation avant sa distribution. Elle permet la préservation de l'eau contre toute contamination exogène qui peut altérer sa qualité tous au long du réseau où l'eau peut séjourner plusieurs jours.

Dans l'eau, il existe des germes banals car la désinfection n'est pas une stérilisation c'est-à-dire elle ne permet pas la destruction de tout les microorganismes vivants dans l'eau, mais plutôt, de garantir l'absence des germes infectieux et d'éviter toute contamination extérieure du réseau de distribution. [2]

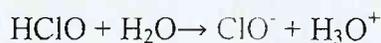
1.4. Chimie du chlore dans l'eau :

Dans des conditions normales ; de pression et de température ; le chlore est un gaz jaune vert.

L'introduction du chlore dans l'eau conduit à son hydrolyse.



L'acide hypochloreux va ensuite se dissocier pour générer des ions hypochlorites :



Ces trois espèces, Cl_2 , HClO et ClO^- vont cohabiter deux à deux en solution aqueuse. (Fig 12)

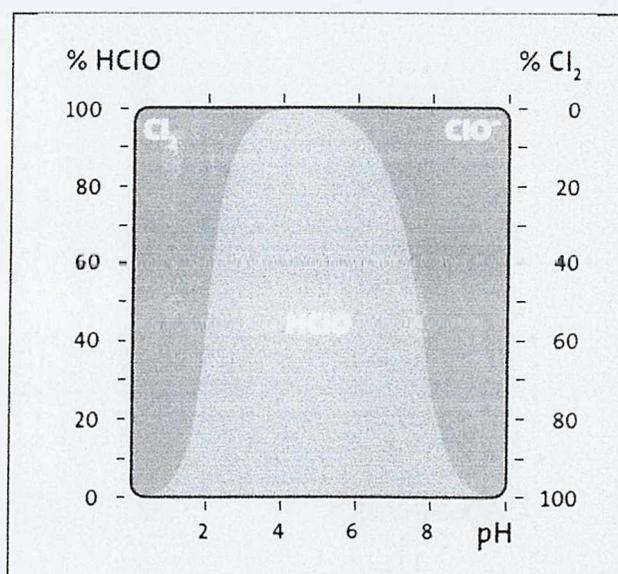


Figure 12 : La cohabitation du Cl_2 , HClO et ClO^- en fonction du pH. [4']

La position de l'équilibre chimique qui s'établit est fortement liée au pH du milieu :

- Si $\text{pH} < 4$: Cl_2 dissous, l'équilibre est complètement déplacé vers la gauche.
- Si $4 < \text{pH} < 5.6$: formation de HClO non dissocié.
- Si $5.6 < \text{pH} < 10$: formation de HClO et ClO^- .
- Si $\text{pH} > 10$: formation de ClO^- . [1]

1.5. Mode d'action du chlore :

Le chlore se trouve dans l'eau brute se forme de :

- ✓ **Le chlore actif libre** : c'est l'ensemble d'acide hypochloreux et les hypochlorites ($\text{HClO} + \text{ClO}^-$).
- ✓ **Le chlore actif combiné** : c'est l'ensemble des dérivés N-chlorés (chloramine) dont l'action stérilisante et oxydante est faible, mais très rémanente.
- ✓ **Le chlore total** : c'est l'ensemble du chlore libre et du chlore actif combiné.

1.5.1. Action du chlore sur les composés organiques :

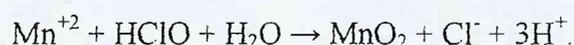
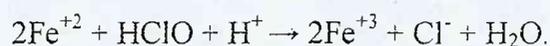
HClO est une molécule sélective et n'agira que sur des sites privilégiés des micropolluants organiques. Ainsi chaque molécule organique a sa propre réactivité avec le chlore. Les réactions générées par l'acide hypochloreux donnent des modifications structurales des molécules organiques, en particulier :

- Formation de composés plus oxydés.
- Génération de molécules organochlorées. [1]

1.5.2. Actions du chlore sur les composés inorganiques :

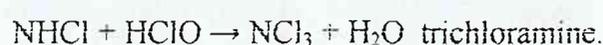
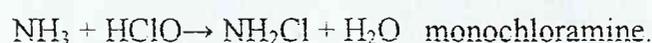
- **Fer et manganèse :**

L'oxydation du fer et du manganèse transforme des espèces solubles précipitables qui peuvent être éliminés par filtration.

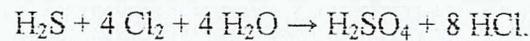


- **Ammonium (NH_4) :**

L'oxydation d'ammonium donne des désinfectants (chloramines) moins efficaces que le chlore.



- **Autres composés inorganiques :**



1.6. Dosage du chlore :

L'hypochlorite de sodium est stocké et livré dans des conteneurs en plastique venus sois d'Alger à un degré chlorométrie de 51° ou de Skikda à un degré de 43°.

Un degré chlorométrique correspond à 3.17g de chlore libre par Kg d'hypochlorite ; par exemple 1Kg d'hypochlorite à 51° renferme donc : $3.17 \times 51 = 161.67\text{g}$ de chlore.

Le degré peut être diminué en fonction de la période et la méthode de stockage, c'est pour cela il est mesuré au niveau du laboratoire de chimie de la station avant l'utilisation, suivie par la détermination du break point qui présente la concentration du chlore utile selon la composition de l'eau brute et le débit d'eau entré au bassin de mélange. [2]

1.6.1. Le break point :

Si on ajoute de l'eau de javel à une eau polluée (l'eau brute à traiter) qui contient des produits organiques, ordinairement aminés, la recombinaison du chlore avec ces constituants de l'eau donne des produits d'addition et des chloramines qui sont appelés : « chlore combiné ».

Cette combinaison permet d'obtenir une courbe sous forme de N présentant la variation de la teneur en chlore résiduel d'une eau à traiter en fonction de la teneur en chlore introduit (ajouté) à cette eau. (Fig.13).

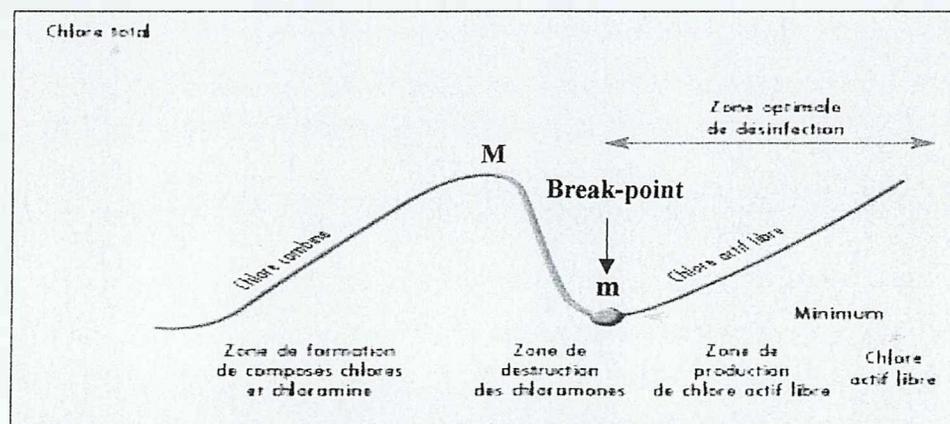


Figure 13 : Courbe de Break-point.

1.7. Le contrôle de la désinfection :

Les examens bactériologiques sont des tests de contrôle de garantis de la désinfection. Cependant, de fréquentes déterminations de la teneur en chlore pour préjuger de l'efficacité de la chloration. Pour cela, il est impératif de mettre en œuvre une méthode qui permettra d'évaluer le chlore actif libre. L'usage de petits dispositifs appelés comparimètre ou comparateurs, portatifs, est rependu pour l'évaluation du chlore sur le terrain.

Parmi ces comparimètre on distingue le comparimètre à la DPD : met en œuvre la DPD (N, N Diéthyl-Para-phenylène Diamine) et l'iodure de potassium (KI). Souple à l'emploi (réactifs sous forme de comprimés).

Il a l'avantage de permettre la détermination des trois formes de chlore : libre, total et combiné.

-DPD₁ → chlore libre.

-DPD₁+DPD₃ → chlore combiné.

-DPD₄ → chlore total.

1.7.1. Principe général d'un comparimètre :

Un comparateur présente d'un coté un tube rempli d'eau à analyser et le deuxième coté défilée une série de filtres colorés, jusqu'à égalité des colorations (roses ou rougeâtre) des deux cotés. (Fig.14). [2]

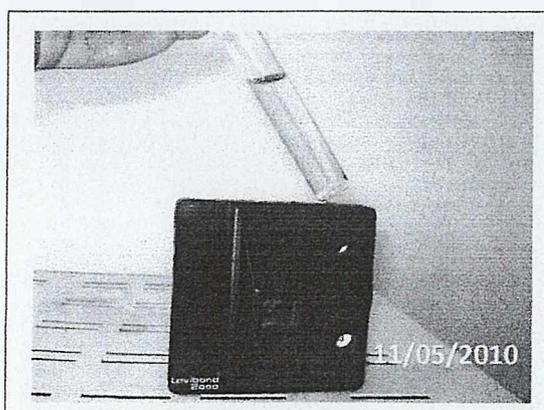


Figure 14 : Test du chlore par un comparimètre.

Chapitre 2 :

Resistance bacterienne au chlore.

La capacité des micro-organismes à s'adapter de façon très rapide à leur environnement, en développant une résistance aux éléments extérieurs agressifs tel que les désinfectants est aujourd'hui bien connue. [5']

L'intérêt de leur étude est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue de souches résistantes aux différents désinfectants est les infections nosocomiales.

Parmi les désinfectants les plus utilisés on peut citer le chlore qui est un désinfectant capable d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase*, fongistase), ou d'avoir une action létale (bactéricide*, fongicide, sporicide), ces deux modes d'action sont obtenus en fonction de la dose et le temps de contact. [6']

1. Spectre d'activité du chlore sur les micro-organismes :

Les dérivés chlorés ont un spectre d'activité étendu: bactéries (formes végétatives et sporulées), champignons, virus, spores. (Tab. IV) [7']

Tableau IV : Spectre d'activité du chlore aux différents micro-organismes.

HALOGENÉS CHLORÉS (eau de Javel)	Spectre d'activité							
	Gram+	Gram-	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nu	Virus enveloppés	Spores
	+++	++	+	+	+	+	+	+

2. Les principales cibles du chlore :

Les organismes qu'on cherche à éliminer ne réagissent pas tous de la même façon aux désinfectants qu'on utilise. Ces réactions sont les résultats des caractéristiques physiologiques et morphologiques propres à chaque type d'organisme. [5']

L'action du chlore résulte de l'oxydation des structures des microorganismes. En fonction de la dose appliquée, le traitement entraîne soit des lésions réversibles (inhibition, blessures), soit des lésions irréversibles causant de fait la mort cellulaire.

Cette oxydation entraîne un changement de perméabilité et inhibe le transport des nutriments. [8']

La première étape à réaliser avant d'entreprendre une désinfection est de définir le type d'organismes dont on veut prévenir ou réduire la présence dans l'eau. Selon les circonstances, il peut être nécessaire de cibler un ou plusieurs types d'organismes.

Chacun de ces types d'organismes possède des caractéristiques biologiques qui leur sont propres et qui influent sur leur capacité à résister ou non à la présence de désinfectants. [6']

3. Action bactéricide du chlore :

L'eau de javel est utilisée comme désinfectants pour ces propriétés microbicides mais comment fonctionne-t-il ?

On a déjà décrit dans le chapitre précédant que le NaClO se dissocié dans l'eau est donne le HClO (acide hypochloreux) et le ClO^- (hypochlorite).

L'acide hypochloreux est un composé non chargé tandis que l'hypochlorite est chargé négativement c'est pour cela le HClO est 100 fois plus bactéricide que l'ion hypochlorite. [10]

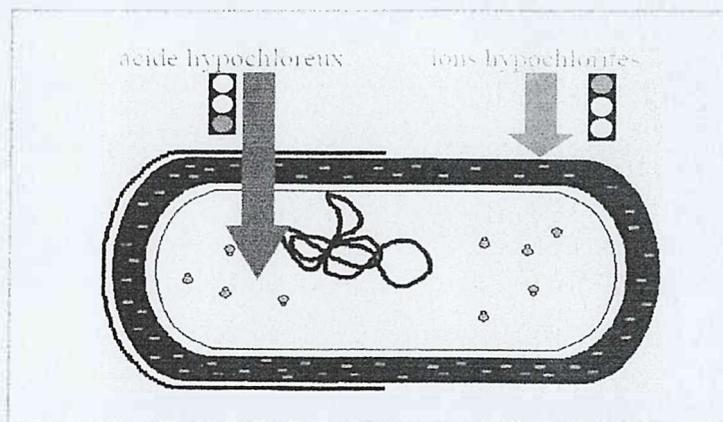


Figure 15 : L'activité désinfectante de l' HClO et le ClO^- . [5']

Le chlore actif libre présent dans la solution agira de 2 façons : par un caractère oxydant général et par l'action immédiate et spécifique de chloration des fonctions aminées des protéines. Donc suivant la concentration en acide hypochloreux et le temps de contact avec les microorganismes, l'action pourra être majoritairement inhibitrice ou destructrice ou une combinaison des deux mais à la fin le résultat est le même un dysfonctionnement du microorganisme. [9']

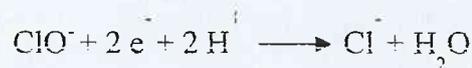
Généralement l'action de l'eau de Javel est décrite en cinq étapes :

- ✓ Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.
- ✓ Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation.
- ✓ Sortie des composés de faible poids moléculaire du cytoplasme (lyse cellulaire).
- ✓ Dégradation des protéines et des acides nucléiques.

L'action la plus évidente de l'efficacité destructrice de ce produit est l'éclatement des microorganismes. [5']

3.1. Oxydation par ClO^- :

Le ClO^- est un oxydant qui sera à la base de réaction d'oxydation :



Son action microbicide est liée à la capacité d'arracher des électrons à la membrane des microorganismes. La fragilisation de leur structure, par exemple en présence de protéines de la membrane des bactéries, ClO^- oxydé rendra inactif cette protéine. [9']

3.2. L'oxydation par HClO des fonctions aminées des protéines membranaires :

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant : il va agir sur de nombreux réducteurs cellulaires comme les acides aminés des protéines, les lipides... L'acide hypochloreux diffuse à travers la paroi des bactéries; l' HClO détruit notamment les protéines capsulaires. [9']



4. La résistance des micro-organismes à l'action du chlore :

L'exposition des bactéries au chlore se traduit par l'activation d'un système de défense. La conséquence de cette réponse cellulaire est une très grande résistance des bactéries à une exposition ultérieure au chlore et la quasi-impossibilité de tuer la cellule par des taux de traitement classiquement utilisés par l'industriel.

D'une manière générale, la réponse d'un microorganisme à un antimicrobien est définie in vitro par deux valeurs :

- **CMI** (la concentration minimale inhibitrice) : c'est la plus faible concentration du produit qui inhibe totalement en 18 ou 24 heures la multiplication du microorganisme.
- **CML** (la concentration minimale létale) : c'est la plus faible concentration du produit capable de détruire un certain nombre de cellules du microorganisme dans un temps déterminé.

Une population microbienne est résistante à un désinfectant (chlore) quand la CML ou la CMI de ce produit vis-à-vis de la plus part des populations microbiennes est plus grande.

La CML est spécifiée en fonction de chaque type de microorganisme, ainsi pour les bactéries, il s'agit de la CMB.

- **CMB** : selon l'AFNOR est définie comme la plus faible concentration du produit capable de tuer in vitro (dans les conditions totalement standardisées) en 5 minutes 10^5 bactérie par ml dans une population en contenant 10^8 par ml.

Les valeurs CMI et CMB du chlore vis-à-vis des principales espèces peuvent être déterminées avec précision grâce à des méthodes standardisées. Les travaux réalisés à ce sujet permettant de faire un bilan relativement satisfaisant de la sensibilité et la résistance de principales espèces. [6']

4.1. Mécanisme de résistance :

Plusieurs mécanismes conférant la résistance bactérienne au désinfectant sont inhérents à la bactérie, d'autres à la population bactérienne.

4.1.1. Résistance due à la bactérie elle-même (individuelle):

On distingue deux types de résistance bactérienne aux antimicrobiens : la résistance intrinsèque ou naturelle et la résistance acquise. [6']

A) La résistance intrinsèque ou naturelle :

La résistance naturelle est un caractère inné, stable, de l'espèce ou de la souche bactérienne. Elle détermine le spectre d'activité du désinfectant. [7']

❖ **Mécanisme de résistance intrinsèque :**

✓ **La paroi cellulaire :**

La composition de la paroi cellulaire est l'élément majeur de la résistance. En effet, la majorité des désinfectants exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi. Chez les souches devenues résistantes, ces mécanismes de passage sont altérés. [7']

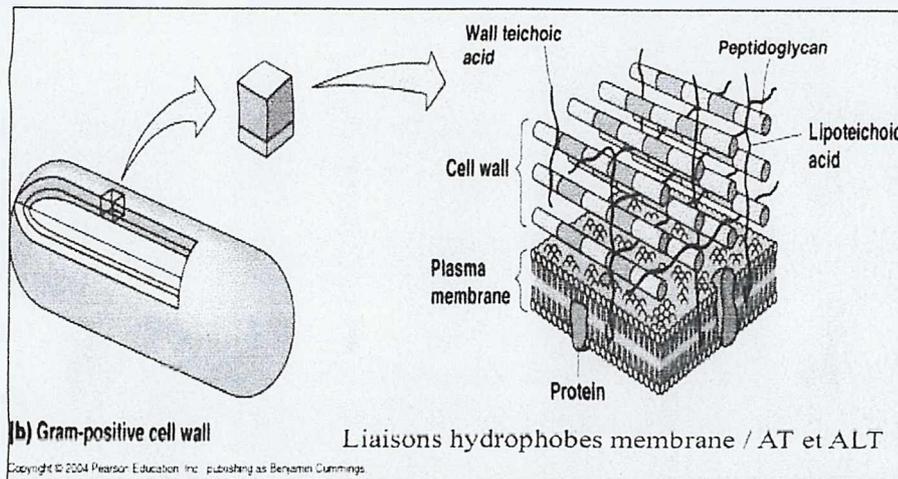


Figure 16 : Structure de la paroi des bactéries Gram (+). [5']

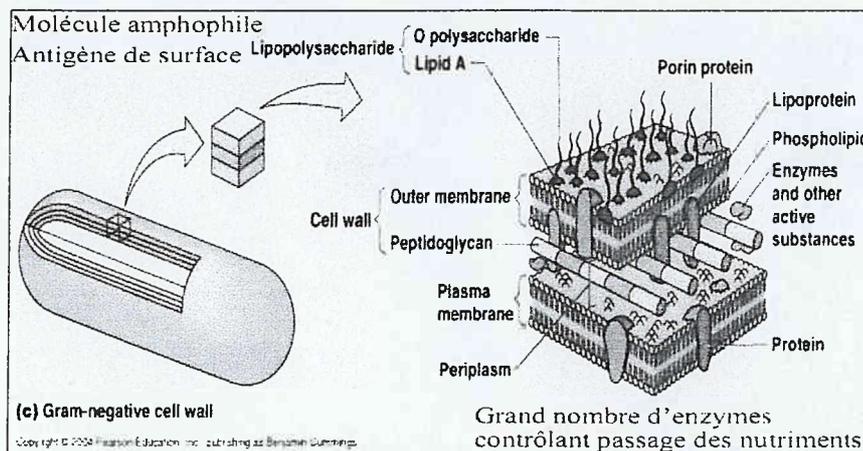


Figure 17 : Structure de la paroi des bactéries Gram(-). [5']

Si on compare les figures (16) et (17), on est en mesure de constater que cette paroi est beaucoup plus épaisse chez les bactéries Gram+, 20-80nm (ex *staphylococcus aureus*), que les bactéries Gram-, 10-15 nm (ex : *Escherichia coli*).

Par contre, la composition de la paroi des bactéries Gram- est beaucoup plus complexe que celle des bactéries Gram+. Cette complexité rend la paroi imperméable à la plus part des substances, à l'exception de celles qui pénètrent par les porines.

La composition de la paroi des Gram- est protéique (peptidoglycane) que lipidique (lipopolysaccharides LPS) ceci facilite leur halogénéation par le chlore.

Donc, on peut dire que les bactéries Gram- sont plus réfractaires au chlore que les bactéries Gram+. [5']

✓ La membrane cytoplasmique :

Les microorganismes « bactéries, mycoplasmes, champignons » sont entourés d'une membrane cytoplasmique. Cette membrane est une enveloppe qui délimite physiquement l'organisme par rapport au milieu extérieur elle joue un rôle important dans les échanges moléculaires entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule en plus de jouer un rôle de protection.

Cette membrane est principalement composée d'une double couche lipidique, incrustée de protéines. Cette bicouche de lipides ainsi que les protéines diffèrent selon les organismes.

La bicouche lipidique (phospholipides) présente, au centre de la membrane, une zone hydrophobe (qui n'aime pas l'eau) et en périphérie une partie hydrophile (qui aime l'eau) (Fig. 18). [5']

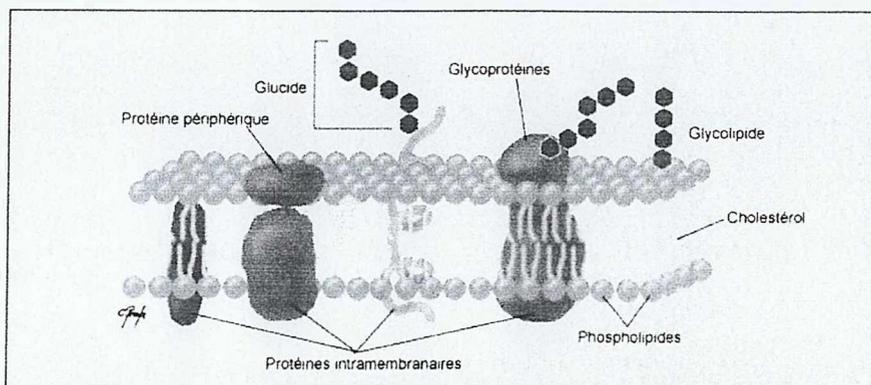


Figure 18 : Structure de la membrane cytoplasmique. [5']

B) Résistance acquise :

Les microorganismes peuvent développer une résistance aux produits désinfectants que l'on qualifie de résistance acquise.

Ce phénomène peut être due à :

- ❖ Une introduction par l'agent antimicrobien d'un enzyme spécifique synthétisé par la cellule et qui dégrade l'agent antimicrobien.
- ❖ Introduction d'un métabolite compétitif qui inhibe l'action de la substance antibactérienne.
- ❖ Un changement au niveau du matériel génétique de la cellule qui devient ainsi insensible à la substance antimicrobienne.

Ce changement du génome induit une mutation et une sélection qui est basée sur le principe suivant :

Une mutation spontanée au niveau d'un chromosome peut conférer à un microorganisme un nouveau caractère qui le rend résistant à un produit désinfectant précis tel que le chlore.

Par exemple la mutation ou l'acquisition d'éléments génétiques (plasmide, transposant, intégrons, ADN nu) par conjugaison ou transformation conduisant ensuite à un rejet de désinfectant hors de la cellule (pompe à efflux).

Lorsque le microorganisme se multiplie, transmet ce gène de résistance qui devient graduellement dominant à chaque fois que l'on effectue une désinfection avec le même produit et avec la même concentration car avec le temps, on va éliminer une partie de la population microbienne qui est non résistante et ne reste que les microorganismes possédant le gène résistant.

Ces modifications permettant aux microorganismes de s'adapter et peuvent s'opérer à différents niveaux :

- production de nouvelles enzymes résistants.
- Modification de la structure de la paroi de la cellule.

- Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- Changement dans la structure interne de la cellule. [10']

4.1.2. Résistance due à la population bactérienne :

A) Formation des floques :

Les bactéries, d'une taille de quelques micromètres, constituent, par mitoses successives, des micro-colonies circulaires d'un diamètre moyen de treize micromètres.

Lors de l'étape suivante, plusieurs micro-colonies s'assemblent, sous l'influence de facteurs physiques, pour former un floc d'environ cent vingt cinq micromètres de diamètre.

Dans un réacteur de station, la taille des flocs se stabilisera par cisaillement des structures de brassage qui libéreront de petits flocs menant une vie autonome. Les différences de taille entre les flocs entraînent une différence dans la distribution des micro-organismes qui les constituent. (Fig.19)

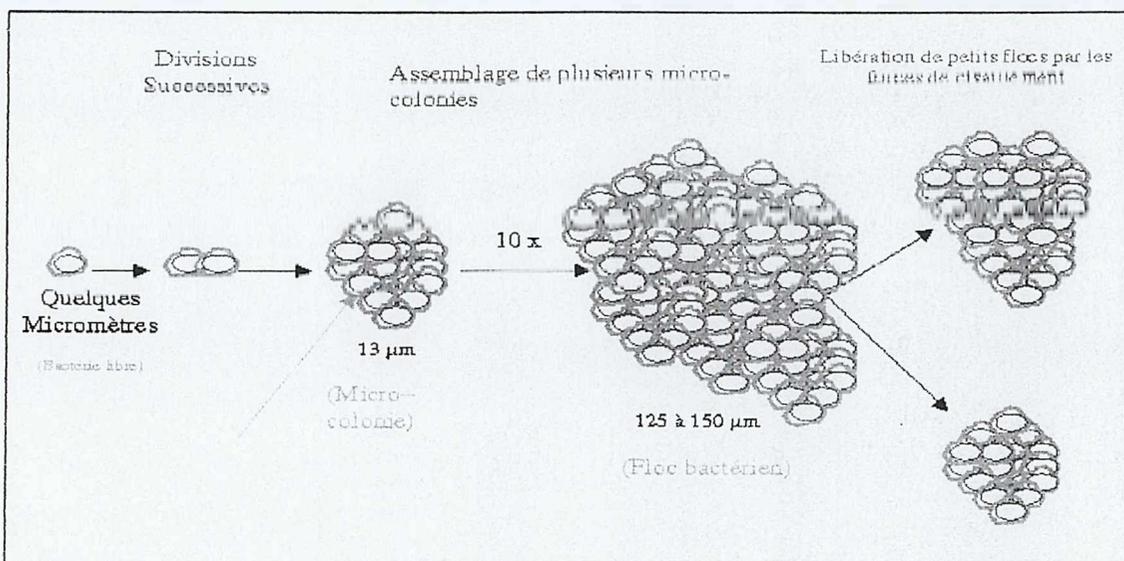


Figure 19 : Formation des flocs bactériens. [9']

Les flocs peuvent aussi dépendre des espèces bactériennes qui le composent. La production d'exopolymère varie, en nature et en nombre, en fonction de l'espèce. Si l'exopolymère est puissant les amas cellulaires seront gros et résisteront mieux aux forces de dispersion. Il y'a des études qui ont aussi permis d'avancer des hypothèses sur le rôle de l'agglomération (Les études du CIRCEE à plusieurs associé laboratoires français. [9])

B) Formation du biofilm :

La prolifération des microorganismes dans les réseaux de distribution d'eau potable résulte le plus souvent d'une multiplication des bactéries sur les parois des tuyaux de distribution suivie de leur arrachage et de leur transport par l'eau. [19]

De fait, tout matériau immergé dans l'eau est colonisé très rapidement et la principale conséquence est l'accumulation à la surface des tuyaux d'une biomasse prise dans une matrice de polymères encapsulatrice (constitué de polysaccharides, de protéines, d'acide nucléique,...) encore appelée biofilm. (Fig.20)

Ce biofilm formé est très stable, adapté au stress, une vie propre s'organise au sein de cette matrice protégée par les polymères extracellulaires avec formation de réseaux de pores et de canaux de circulation : accumulation de nutriments, échanges génétiques, concentration microbienne forte, communication entre les cellules), le biofilm présente ainsi une entité physiologique complexe qui se présente dans l'organisation, la forme et la densité de ces assemblages qui ne sont pas liée au hasard. [7]

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes pendant lesquelles les bactéries adhérentes à la surface des équipements ou des joints, se protègent grâce à une couche de polysaccharides, et se développent sous forme de colonies. La destruction de la couche de protection est très difficile avec les moyens classiques de désinfection, c'est pour ça, Le biofilm jouent un rôle important dans la protection des bactéries contre l'exposition à des agents désinfectants tel que le chlore. [11']

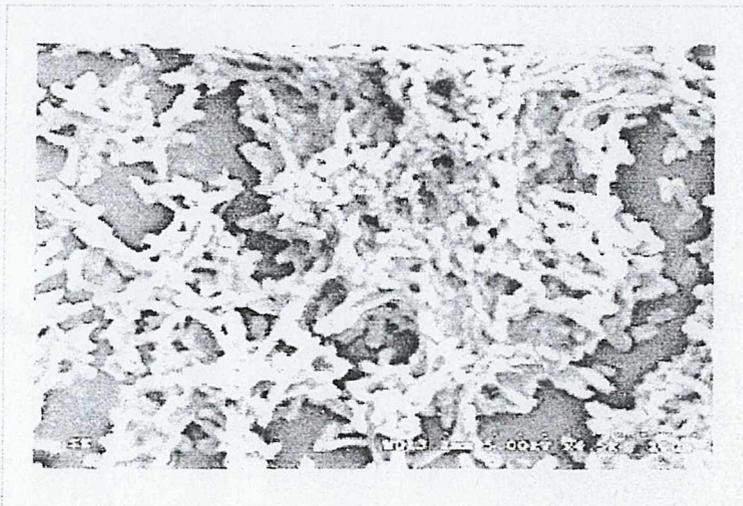


Figure 20 : Photographie électronique d'un biofilm de salmonelle. [11']

5. Paramètres influencent sur le contact entre le chlore et les microorganismes :

Dès leurs premiers travaux plusieurs auteurs ont pris conscience du rôle du milieu environnant et de divers facteurs sur la détermination de l'activité des désinfectants.

Diverses tentatives ont abordé l'étude des lois de la désinfection, mais il est vite apparu qu'aucune loi générale ne pouvait être établie : non seulement le chlore à une entité particulière et une action spécifique, mais encore, toute association avec d'autres substances (actives ou non) et toute modification de paramètre expérimentale modifie la loi régissant de l'activité du chlore [6']

Parmi ces paramètres environnementale : la turbidité, la nature d'eau à désinfecté, la température.

Néanmoins, un certain nombre de données a été établi, qui doit être connues de l'expérimentateur pour une bonne interprétation d'un essai. Les facteurs les plus importants qui influent sur l'activité du chlore sont :

5.1. Le type de microorganisme :

Bactéries Gram(+) et Gram(-), levures, champignons ... etc résistent à un pourcentage différents et d'une manière différentes selon la structure de chaque microorganisme. [11']

5.2. Age des microorganismes :

Un jeune microorganisme est plus facile à être détruit que les plus vieux. Chez les bactéries le vieillissement donne l'avantage à développer une couche de polysaccharide au-dessus de la paroi des cellules, qui les rendent plus résistantes au chlore. [11']

5.3. La matière organique :

L'interférence de la matière organique est imputable à une véritable réaction chimique (oxydation ou réduction) qui consomme le produit actif et réduisent sa disponibilité pour les microorganismes à atteindre. [6']

5.4. La dose du chlore et le temps de contact :

La concentration du chlore a été considérée comme le facteur le plus important qui affecte son efficacité. [12']

Si la concentration est faible les microorganismes en la chance de s'échapper ou de produire des moyens de lutte contre la désinfection et donc avoir une résistance.

Le temps de contact entre le chlore et les microorganismes est aussi un facteur important car c'est la durée nécessaire pour obtenir une réduction très importante du nombre de germes. [5']

5.5. Le pH de l'eau :

Bien que certain microorganisme préfère un pH acide (champignon) d'autre alcalin (staphylocoques), ils puissent être plus sensibles soit à l'acide hypochloreux soit à l'ion hypochlorite, l'activité germicide est liée essentiellement à l'acide hypochloreux non dissocié, et comme nous avons décrit au chapitre précédant : la dissociation de HClO en ClO^- est fortement liée au pH du milieu. [1]

Partie pratique

Materiels et méthodes

L'apparition des microorganismes indésirables après le traitement d'eau potable reflète que la désinfection n'était pas efficace ; ça nous mène à penser qu'il y a une résistance de ces microorganismes au désinfectant utilisé (chlore) ; sachant qu'il a été utilisé à deux niveaux de traitement (pré-chloration et post-chloration).

La concentration du chlore a été considérée comme le facteur le plus important qui affecte son efficacité (elle est également au cœur de la définition de la résistance bactérienne dans la partie pratique).

Par conséquent la mesure de l'inhibition de la croissance est primordiale.

Donc, nous allons essayer de préciser la (CMI) c.-à-d, la plus faible concentration du chlore capable d'inhiber la croissance de ces microorganismes.

Le protocole expérimental a été réalisé au laboratoire de bactériologie et de chimie de la station du traitement de l'eau potable de Hammam Debagh « Guelma ».

Ce travail expérimental a été réalisé dans la période s'éloignée entre Avril et Mai, les prélèvements et les différents tests effectués sont présentés dans la figure (21).

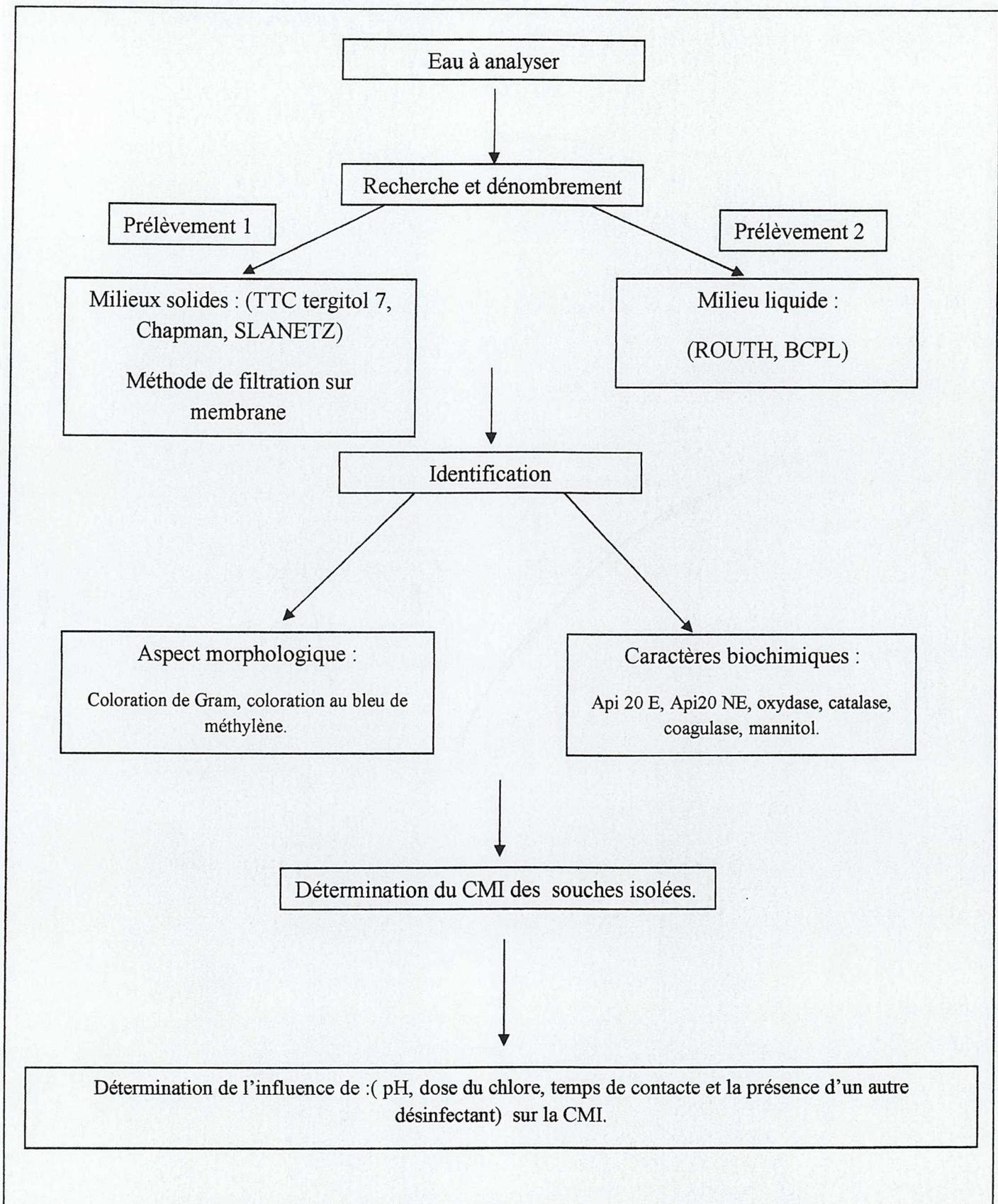


Figure 21 : Protocole expérimental.

1. L'échantillonnage :

L'échantillonnage est primordial car il conditionne la pertinence de l'analyse. Il doit être de qualité mais également représentatif de ce que l'on veut analyser.

Nos échantillons ont été prélevés dans des flacons à vis en verre stérile de 250ml, remplis immédiatement et fermés hermétiquement.

1.1. Points de prélèvement :

Les différents prélèvements effectués sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : Présentation des points de prélèvement.

Nature d'eau prélevée	Date et heure de prélèvements			Point de prélèvements	Caractéristiques des prélèvements
	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3		
Eau brute	Prélèvement 1	11/04/2010	10 : 58	L'entrée de l'eau de barrage de Bouhamdane	Pas de contact avec le chlore
	Prélèvement 2	20/04/2010	14 : 20		
Eau de décanteur	Prélèvement 1	11/04/2010	11 : 04	Centre de décanteur	Contacte de demi-heur avec le chlore
	Prélèvement 2	20/04/2010	14 : 28		
Eau traitée	Prélèvement 1	11/04/2010	11 : 18	Réservoir SP1	Contacte de deux heurs ou plus avec le chlore
	Prélèvement 2	20/04/2010	14 : 35		

1.2. Méthode de prélèvement :

Pour une étude bactériologique, le prélèvement de l'eau doit être fait avec asepsie, c'est-à-dire qu'aucun germe extérieur supplémentaire ne doit venir souiller l'eau prélevée. Il se fait en flacon de verre stérile de 500ml. [5]

➤ **Eau brute :**

Le prélèvement est effectué au niveau de l'entrée de la station de traitement exactement à l'arrivée de l'eau du barrage, dans le bassin de mélange. (Fig.22).



Figure 22 : Le point de prélèvement de l'eau brute.

➤ **Eau du décanteur :**

Le prélèvement de l'eau est effectué au centre du décanteur en trompant les flacons doucement à l'intérieur de l'eau pour prélever d'une profondeur de presque 30 cm de la surface, pour éviter l'action des UV, et la contamination par l'air. (Fig.23). [5]

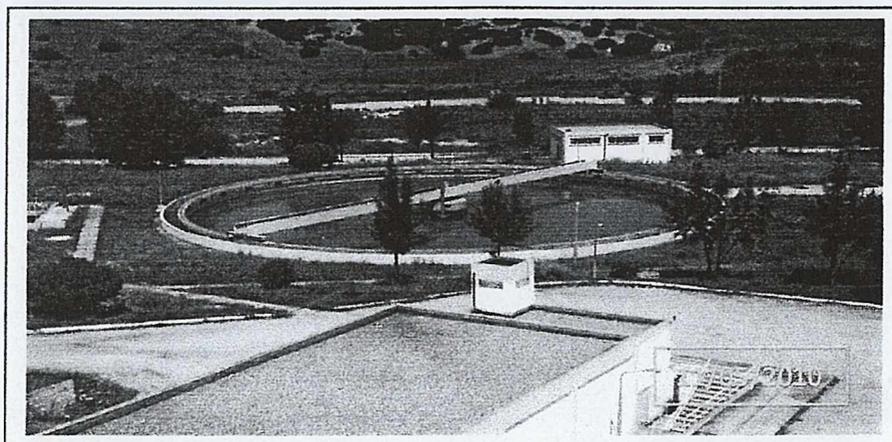


Figure 23 : Le point de prélèvement de décanteur (flèche rouge).

➤ **Eau du réservoir :**

Les prélèvements sont effectués directement du robinet métallique préalablement flambé (Fig.24), et laisser l'eau couler un certain temps (5 minutes) avant le prélèvement. [5]

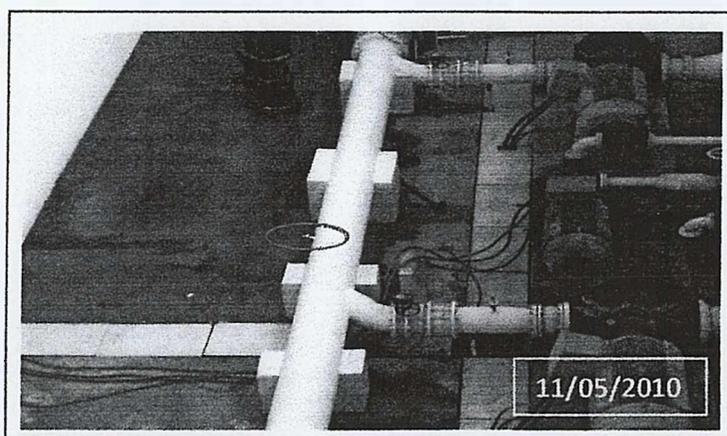


Figure 24 : Point de prélèvement de l'eau.

Remarque :

Chaque prélèvement doit être suivi par la mesure du pH, de la température, de la salinité et de la turbidité.

En plus, il faut mesurer le chlore libre pour l'eau du décanteur et l'eau du réservoir.

2. Recherche et dénombrement des germes :

La présence d'organismes indicateurs spécifiques indique qu'une eau donnée peut être contaminée par des pathogènes.

Nous avons basé notre recherche et dénombrement sur des microorganismes considérés comme des indicateurs pathogènes et au même temps ils ont la possibilité de résister même après un traitement avec le chlore tels que :

- ✓ Les coliformes totaux et fécaux.
- ✓ Les staphylocoques.
- ✓ Les streptocoques fécaux.

La recherche des bactéries peut se faire selon deux méthodes :

- Soit par filtration sur membrane de $0,45\mu$ en milieu solide par une rampe de filtration.
- Soit en milieu liquide par la méthode de NPP (nombre plus probable).

Les deux techniques font appel à deux tests consécutifs : le test présomptif et le test confirmatif. [18]

2.1. Prélèvement 01 :

2.1.1. Méthode de filtration sur membrane :

A. Les Coliformes :

L'indicateur le plus largement utilisé en ce qui concerne la contamination microbienne de l'eau est le groupe de microorganismes constitué par les coliformes car leur présence indique une contamination fécale et rend l'eau concernée impropre à la consommation humaine.

Ils sont définis comme des bactéries en forme de Bacilles Gram négatifs (BGN) aéro-anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase négative, capables de croître en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C . [18]

➤ **Test présomptif :**

Réservé à la recherche des Coliformes totaux.

➤ **Principe :**

L'échantillon d'eau à analyser est filtré à travers une membrane qui retient les micro-organismes recherchés. La membrane est ensuite placée sur le milieu gélosé TTC Tergitol 7.

Mode opératoire :

On utilise l'appareil de filtration représenté sur la Figure 25 :

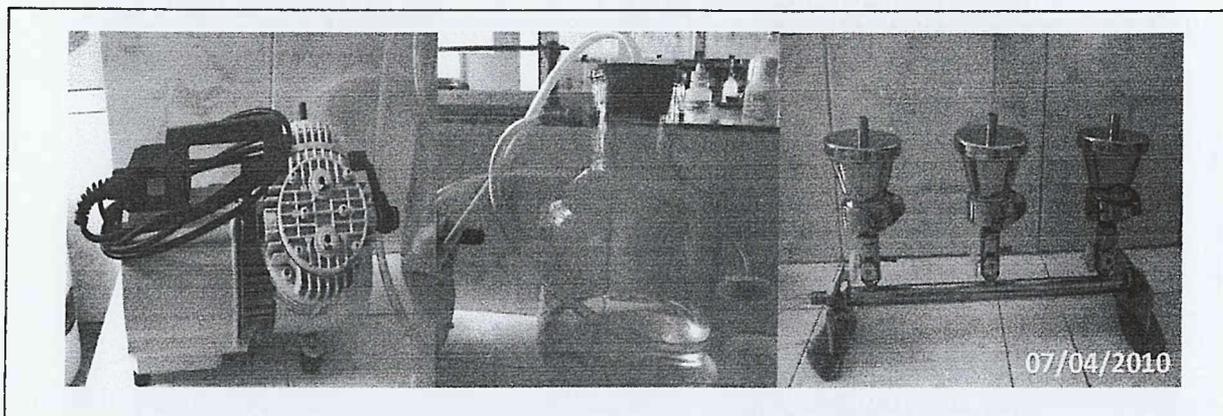


Figure 25 : Rompe de filtration à trois postes.

- Bien stériliser la face supérieure (plaque poreuse) et l'entonnoir à l'aide d'un bec bunsen.
- Placer la membrane sur le disque poreux par une pince stérile.
- Placer l'entonnoir en le fixant par le dispositif adéquat.
- Remplir de façon aseptique l'entonnoir avec 100ml d'eau à analyser après une bonne agitation.
- Actionner la pompe à vide pour permettre le passage de l'eau à travers la membrane.
- Retirer l'entonnoir et transférer la membrane à l'aide d'une pince stérile sur le milieu gélosé TTC Tergitol 7 en assurant que l'air n'est pas emprisonné entre la membrane et le milieu de culture. (Fig.26-A-). [18]
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

Etant donné le caractère sélectif de la gélose TTC térgitol 7; théoriquement seul les coliformes pousseront.

Après 24 heures d'incubation, il peut apparaître des colonies rouges (ou roses) et jaunes (ou orangées), lisses, légèrement bombées pour les coliformes totaux. Cependant, sauf les colonies jaunes correspondantes aux coliformes fécaux (Thermotolérants).

Ne dénombrer que les boîtes refermant entre 15 et 300 colonies. [18]

➤ **Test confirmatif :**

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes Thermotolérants parmi lesquels : *Escherichia coli*.

Les coliformes Thermotolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais pousseront à 44°C. (Fig.26-B-). [18]

Remarque :

Les colonies rouges vont être identifiées ultérieurement par l'api 20 E.

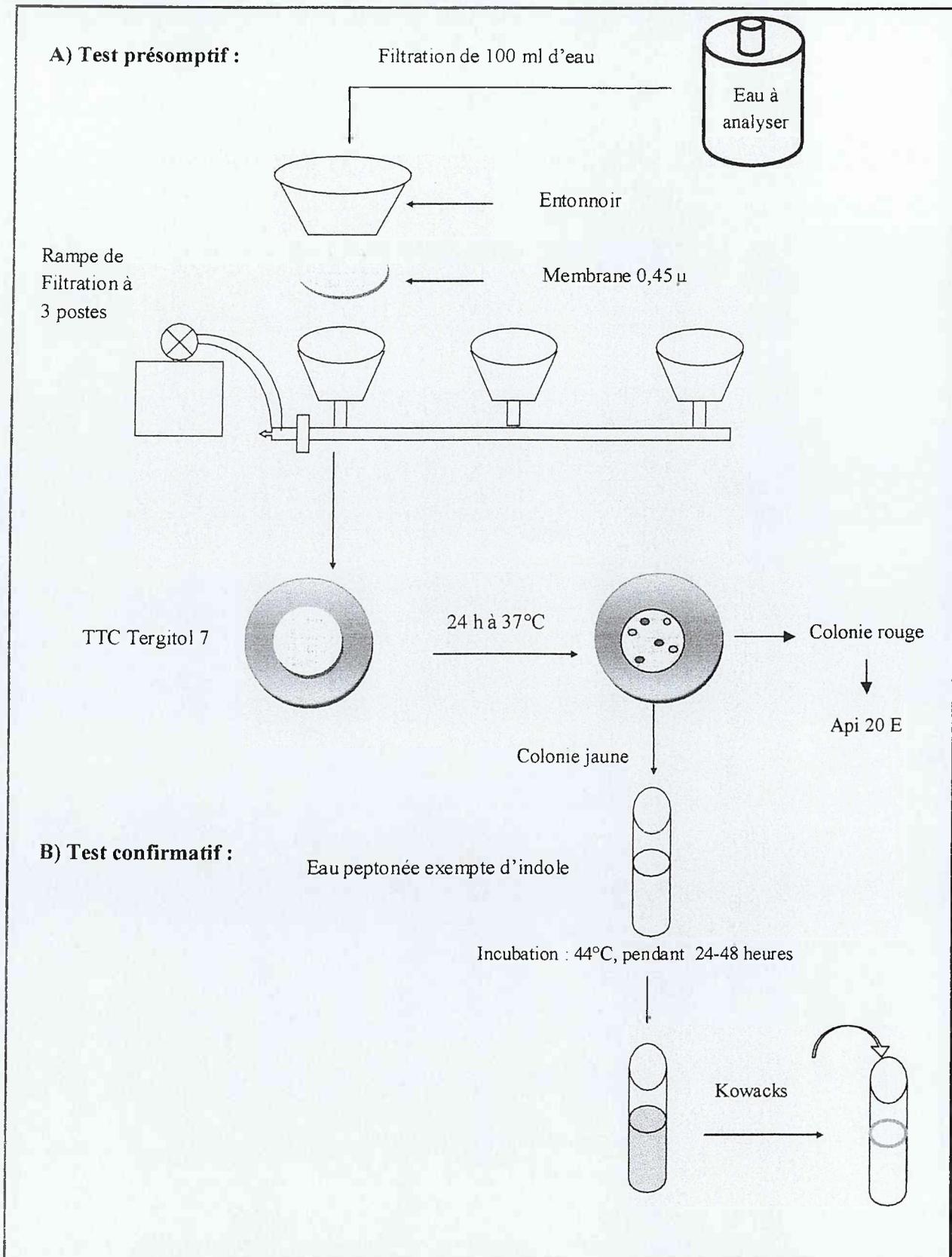


Figure 26 : Méthode de recherche et dénombrement des coliformes totaux et Thermotolérants par filtration sur membrane.

B) Streptocoques :

- Les streptocoques sont des cocci Gram positifs, sphériques à ovoïdes, formant des chaînettes. Ils sont anaérobies aérotolestants, immobiles, non sporulés, catalase négatif. Ils comprennent des groupes A, B, C et D. [20]

➤ Test présomptif :

La recherche peut se faire de la même manière que les coliformes, c'est à dire à l'aide d'une rampe de filtration et seul le milieu de culture qui va changer car leur milieu sélectif pour les streptocoques fécaux est SLANETZ. (Fig.27-A-)

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

Lecture :

- Après 24 heures d'incubation, les streptocoques fécaux apparaissent sous forme de petites colonies rouges, marron ou roses, lisses, légèrement bombées. [20]
- Etant donné le caractère sélectif de la gélose SLANETZ ; ne pousseront théoriquement que les streptocoques fécaux.
- Ne dénombrer que les boîtes refermant entre 15 et 300 colonies. [18]

➤ Test confirmatif :

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

- Les colonies rouges feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube contenant le milieu EVA LITSKY.
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum. (Fig. 27-B-)

Lecture :

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

- un trouble microbien.
- une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes. [18]

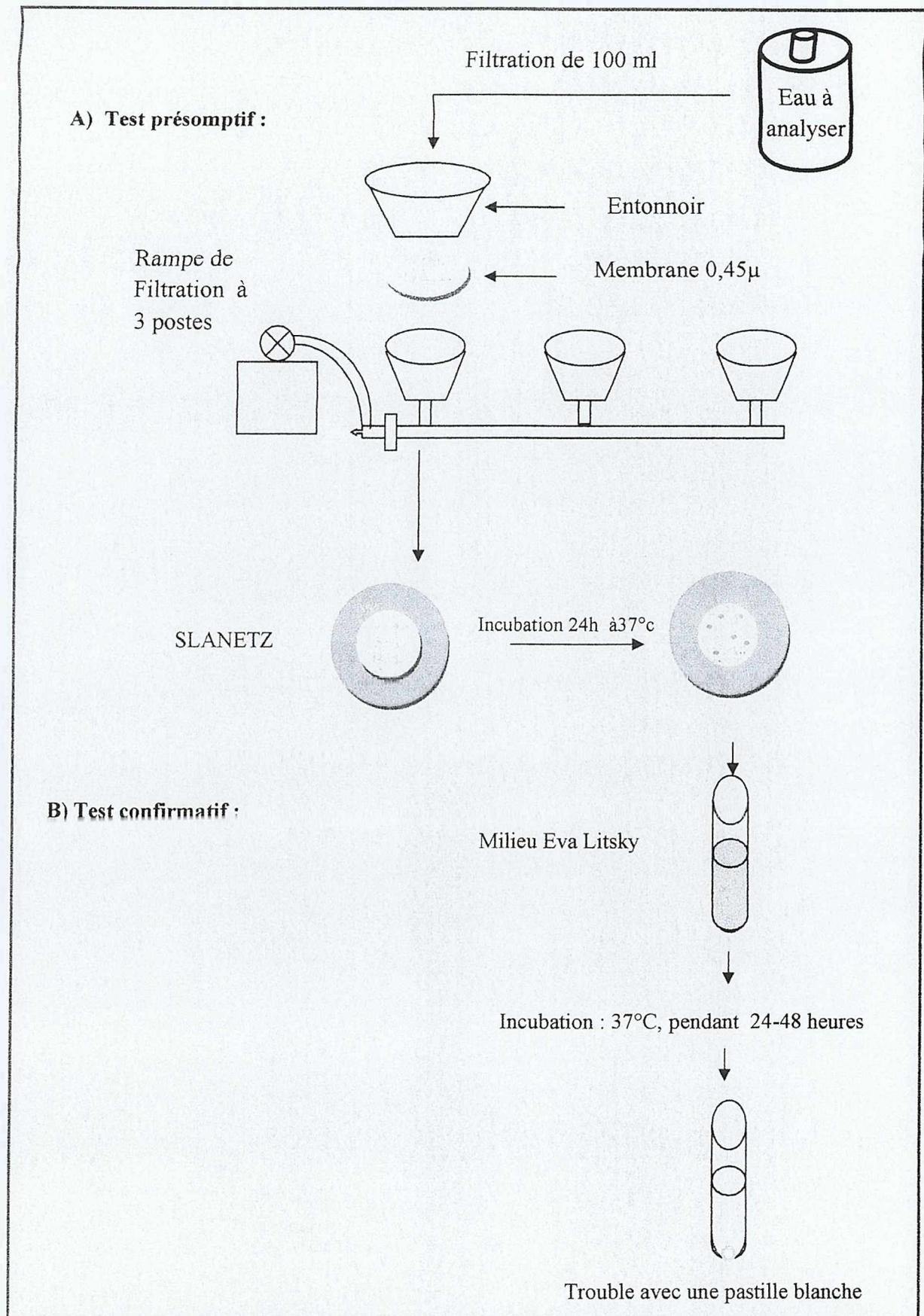


Figure 27 : Méthode de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux par filtration sur membrane.

C/ Staphylocoques :

Les staphylocoques font partie de la famille des *Micrococcaceae*, se sont des coques à Gram⁺, immobiles, non capsulés, groupés en amas plans irréguliers (sur milieu solide) :

- catalase +.
- Aérobie facultatif.
- Faisant fermentés les glucides.
- Arginine-dihydrolase(+) (en générale). [20]

Parmi les espèces les plus répandus on peut citer : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ... etc.

➤ Principe :

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, permettant la croissance des germes halophiles. 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 Na Cl. [15]

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

Lecture :

Après 24 heures d'incubation, les staphylocoques apparaissent sous forme des colonies jaune paille, arrondi semi-bombée. (Fig.28). [20]

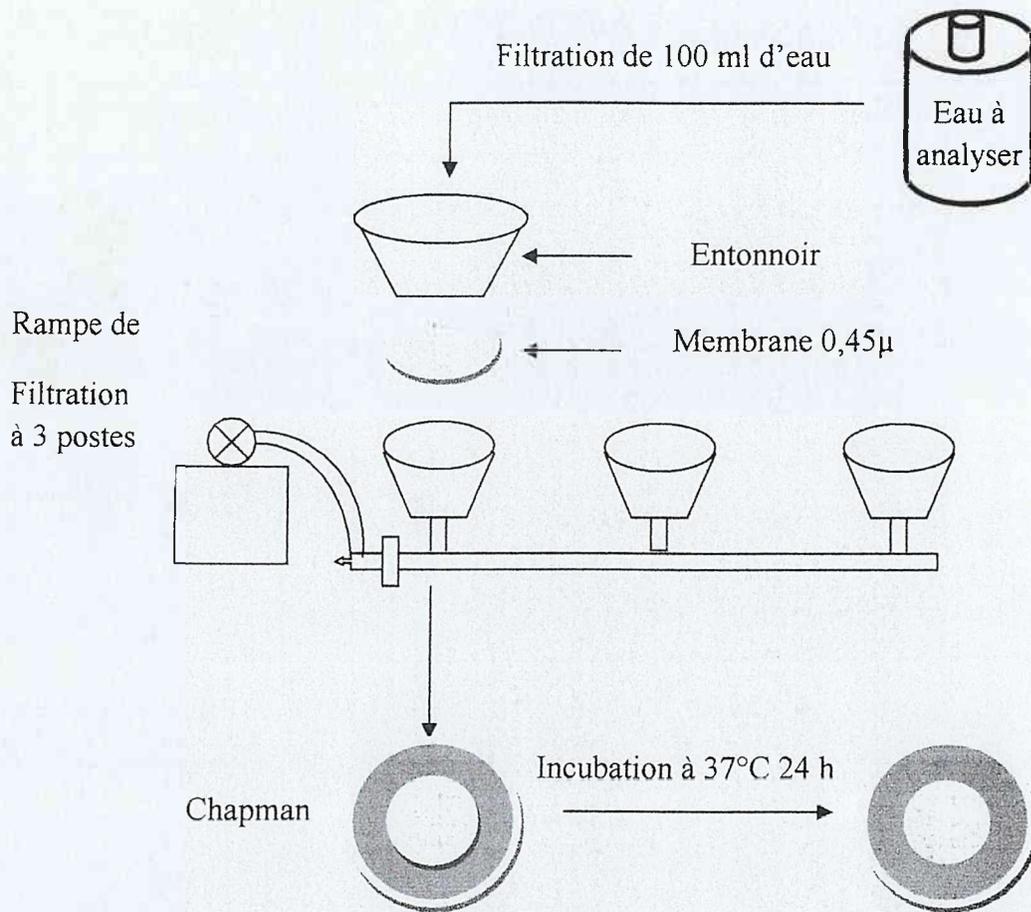


Figure 28 : Méthode de recherche et dénombrement des staphylocoques par filtration sur membrane.

➤ **Tests confirmatifs :**

➤ **Recherche de catalase :**

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 :



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.

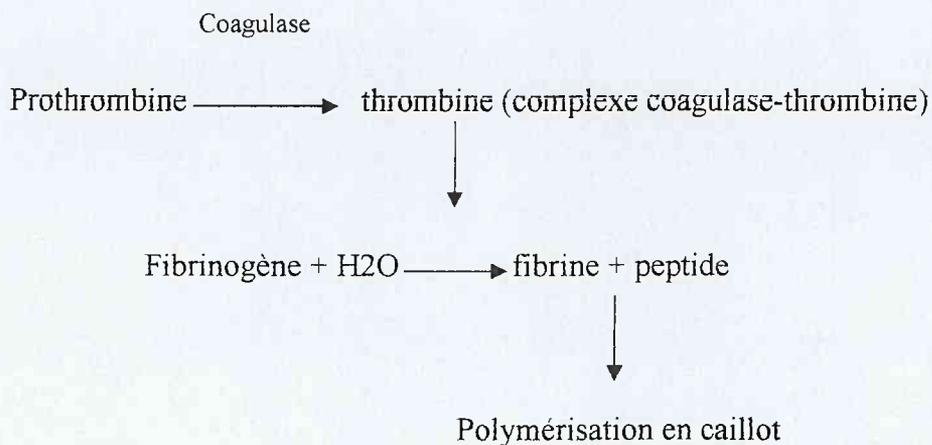
Résultat :

Le test est dite positif, si un dégagement de bulles de gaz (oxygène) apparait. (Fig. 30).

➤ **Recherche de la staphylocoagulase :**

Ce test est pour but de rechercher l'enzyme staphylocoagulase qui est l'un des caractères majeur de *Staphylococcus aureus*.

Cette enzyme est thermostable, il agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.



Mode opératoire :

Après la réalisation d'une culture en suspension on met 4 gouttes dans un tube à hémolyse qui contient le même volume de plasma de lapin oxalaté.

- l'incubation se fait à 37°C.
- La lecture se fait après 2 à 4 heures voir 6 heures sinon on laisse le tube à l'incubateur jusqu'à 24 heures.

Résultats :

Les résultats du test est de voir le coagulum occupe plus de $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial. (Fig. 29). [15]

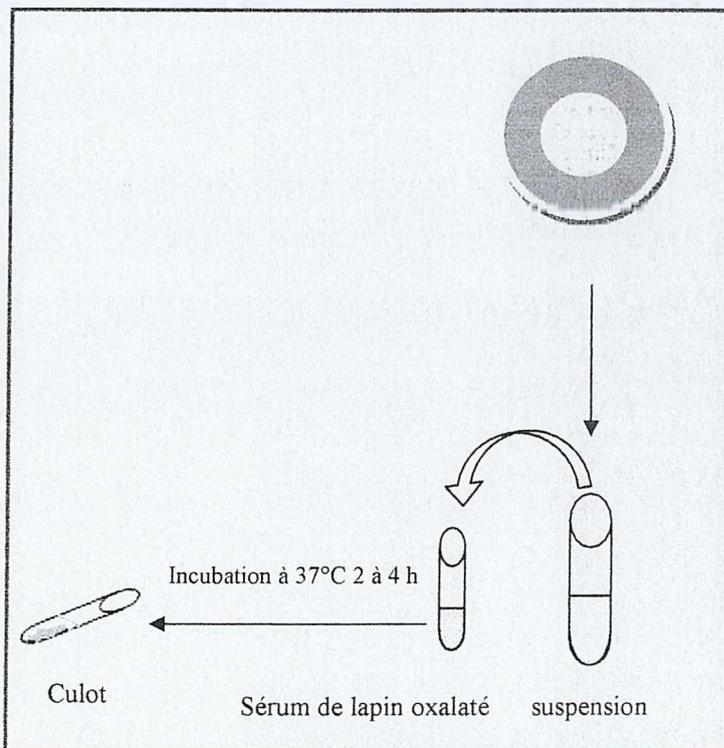


Figure 29 : Test de Staphylocoagulase.

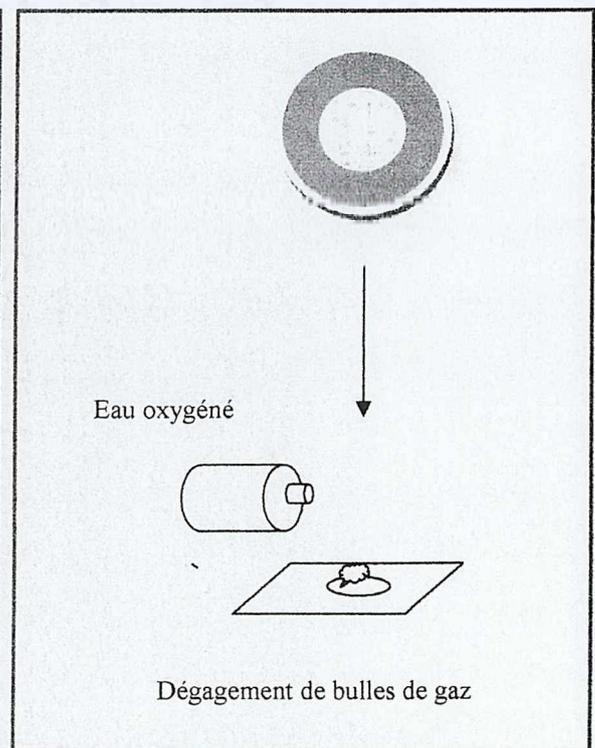


Figure 30 : Test de catalase.

2.2. Prélèvement 02 :

2.2.1. Recherche sur milieu liquide :

A) Coliformes :

➤ Test présomptif :

Technique en milieu liquide sur BCPL :

A partir de l'eau à analyser on porte aseptiquement :

- 10ml dans chacun des 3 tubes D/C (double concentration).
- 1ml dans chacun de 3 tubes de S/C (simple concentration).
- 0.1ml dans chacun des 3 tubes qui restent de S/C.

NB : - Les tubes sont munis d'une cloche de durham.

- Le gaz présent éventuellement dans ces cloches doit être chassé en bien mélangeant le milieu et l'inoculum.

-L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).
- La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui figure en annexe. (Fig.31-A-)

➤ Test confirmatif :

Tous comme la technique précédente en utilise l'eau peptonée exempte d'indole. (Fig.31-B-).

[18]

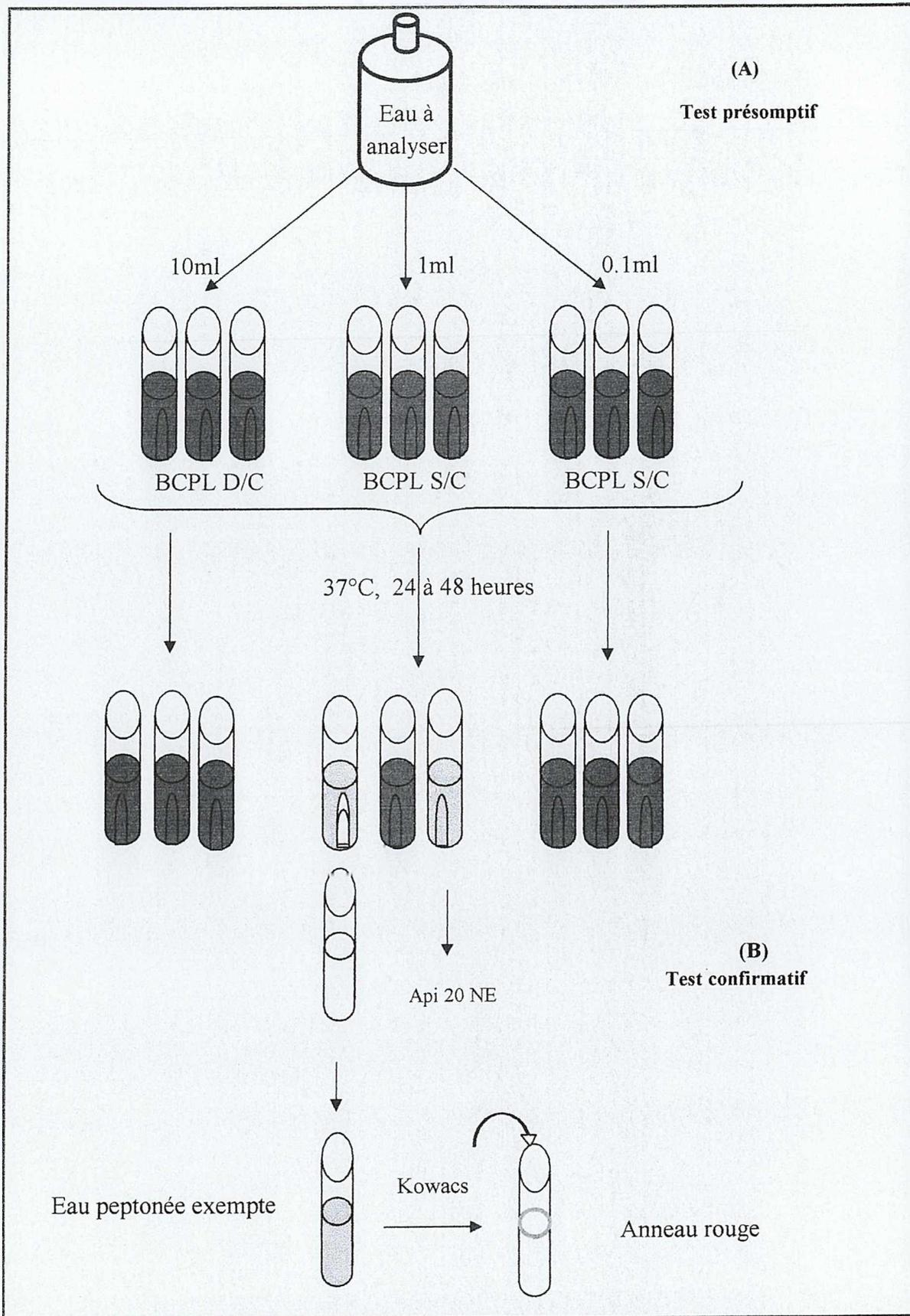


Figure31: Recherche des coliformes en milieu BCPL.

B) Streptocoques :

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et le dénombrement des Streptocoques fécaux est faite par la même façon sauf le milieu utiliser est ROTHE D/C (double concentration) et S/C (simple concentration).

➤ **Test présomptif :** comme décrit au par avant.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien. (Fig. 32-A-)

➤ **Test confirmatif :**

Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée dans des tubes contenant le milieu EVA LITSKY.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum. . (Fig.32-B-)

-L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures. [18]

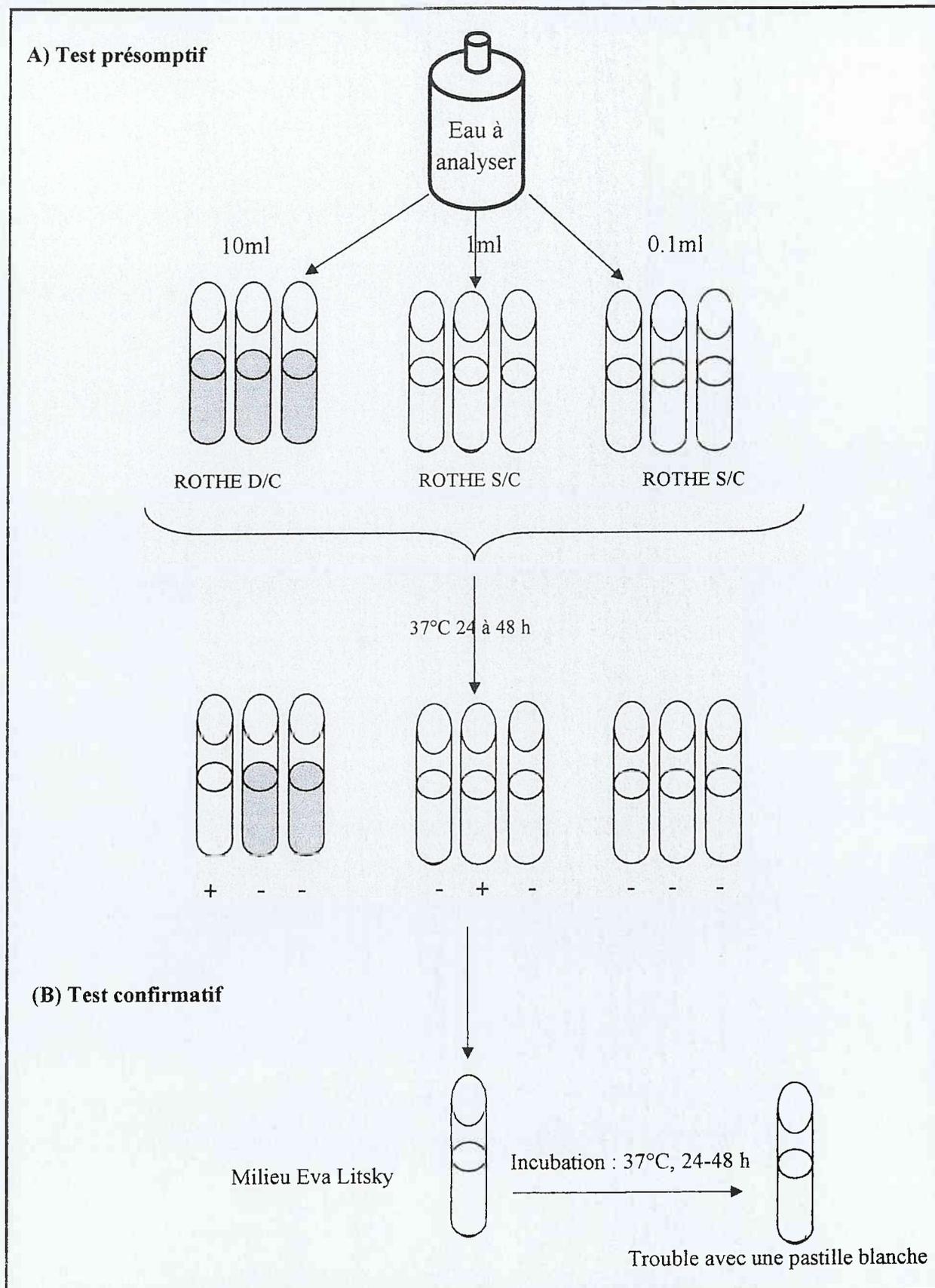


Figure 32 : Méthode de recherche des streptocoques en milieu ROTH.

3. Identification :

La méthode utiliser dans se prélèvement est l'ensemencement par inondation.

3.1. Examen macroscopique des caractères culturaux :

L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation.

Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

- ✓ La taille
- ✓ La forme : bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé.
- ✓ L'aspect de la surface: lisse, rugueux.
- ✓ L'opacité : opaque, translucide, transparent.
- ✓ La consistance : grasse, crémeuse, sèche, muqueuse.
- ✓ Pigmentation.

3.2. Examen microscopique après coloration de Gram :

Les étapes de coloration de Gram :

- ✓ A partir de la culture à étudier préparer un frottis.
- ✓ Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1 minute.
- ✓ Ajouter le Lugol et laisser agir pendant 1 minute.
- ✓ Verser l'alcool jusqu'à ce que la dernière goutte soit incolore.
- ✓ Recolorer avec la Fuchsine, laissé agir pendant 30 secondes.

Observation au microscope :

- ✓ Les bactéries Gram(-) ont de coloration roses.
- ✓ Les bactéries Gram(+) ont de coloration violette. [8]

3.3. Examens liés aux caractères biochimiques :

3.3.1. La Galerie Api 20 E :

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

➤ **Principe :**

La galerie Api 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. (Fig.33)

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique Api 20 E. [6]

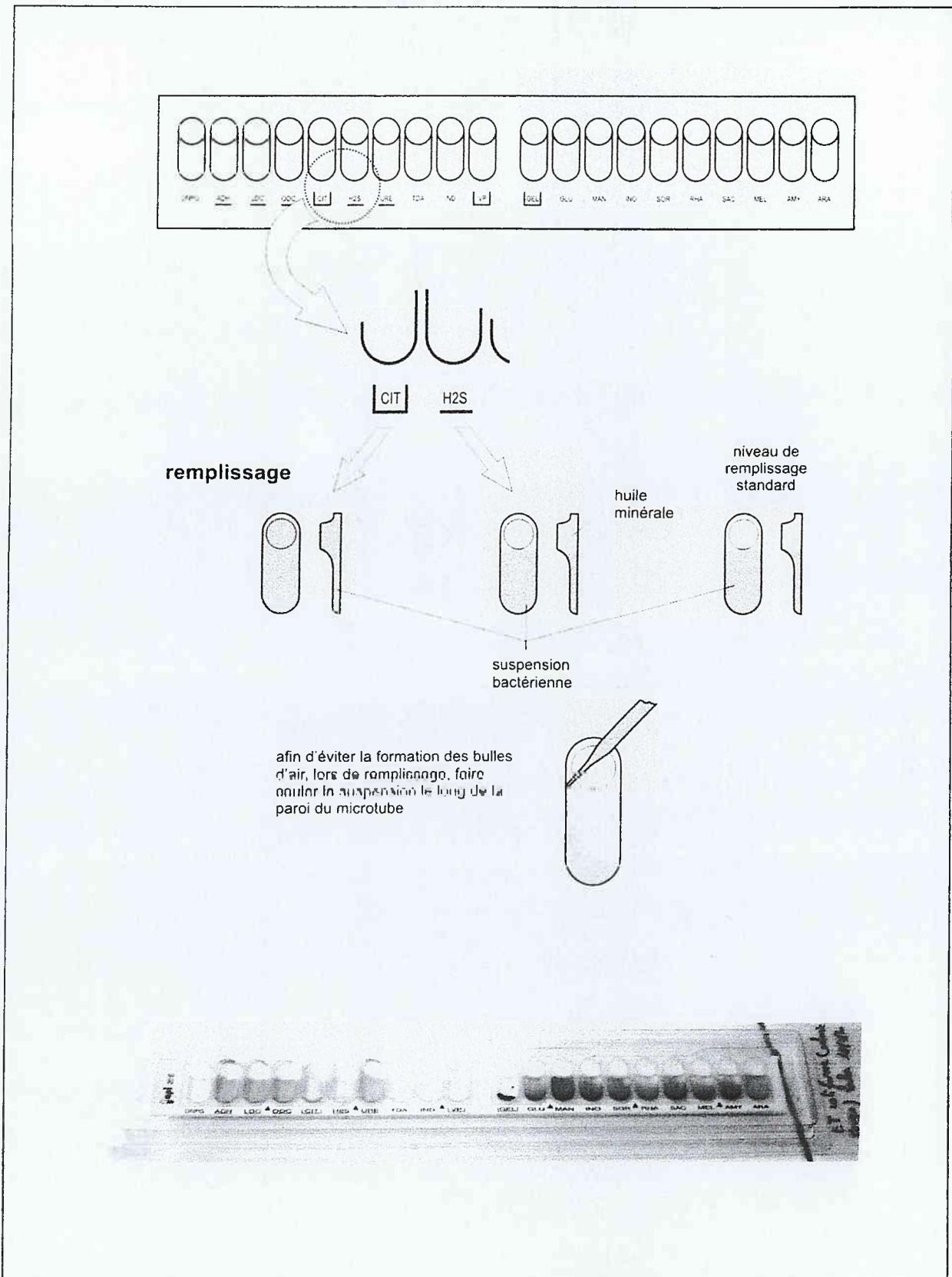


Figure 33: Préparation de la galerie Api 20 E.

3.3.2. La galerie API 20 NE :

C'est un système standardisé pour l'identification des bacilles à gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex *psedomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*etc).

➤ **Principe :**

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. (Fig.34)

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.



Figure 34 : L'Api 20 NE avant l'utilisation.

➤ **Mode opératoire :**

L'opération s'effectue selon les mêmes étapes effectuées dans l'Api 20 E.

✓ **Préparation de la galerie :**

- Inscrire la référence de la souche sur languette latérale de la boîte.
- Réunir fond et couvercle de la boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée pour créer une atmosphère humide.
- Sortir la galerie de son emballage individuel et la placer dans la boîte d'incubation.

✓ **Préparation de l'inoculum :**

-A partir d'une colonie jeune (18-24h) on réalise une suspension bactérienne dans l'eau distillé stérile.

-L'ouverture de l'ampoule d'Api eau medium, et mettre 0.2 ml de suspension bactérienne à l'aide d'une pipette.

✓ **L'inoculation de la galerie :**

- Remplir les tubes (et non les cupules) des testes NO₃ à PNPG.

- Les testes GLU, ADH, URE vont être complété avec l'huile de vaseline.

- Remplir les tubes et les cupules des testes de GLU à PAC.

-La boîte d'incubation est refermer et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24h pour une première lecture et 48h pour une deuxième lecture.

✓ **Lecture est interprétation :**

- Les résultats doivent être notés sur la fiche de résultat.

- La lecture se fait à l'aide d'un tableau de lecture ou d'un logiciel d'identification. [6]

3.3.3. Test d'oxydase :

L'oxydase est un des caractères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à gram négatif.

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

➤ **Méthode de disques :**

- Le disque d'oxydase est placé sur une lame puis mettre une goutte d'eau distillée stérile.

- Une quantité suffisante de culture aérobie est déposée sur le disque en écrasant la colonie sur ce disque.

Lecture :

- Apparition d'une couleur rose violacé instantané voir 2 min. [15]

➤ **Test de mannitol :**

Le milieu mannitol est un milieu complexe utile pour le test de mobilité pour les entérobactéries. En plus il permet de différencier les différents types de staphylocoques.

La fermentation du mannitol :

Cette attaque permet de distinguer les *St.auréus* actif en anaérobiose, *St.saprophyticus* actif en aérobiose et *St. epidermidis*, inerte. (Fig.35)

Donc :

- *St.auréus* : Fermente le mannitol en milieu anaérobiose
- *St.epidermidis* : Ne fermente pas le mannitol en milieu anaérobiose
- *St.saprophyticus* : Oxydation du mannitol en milieu aérobiose.
- *Micrococcus* : ne fermente pas le mannitol en milieu aérobiose. [20]

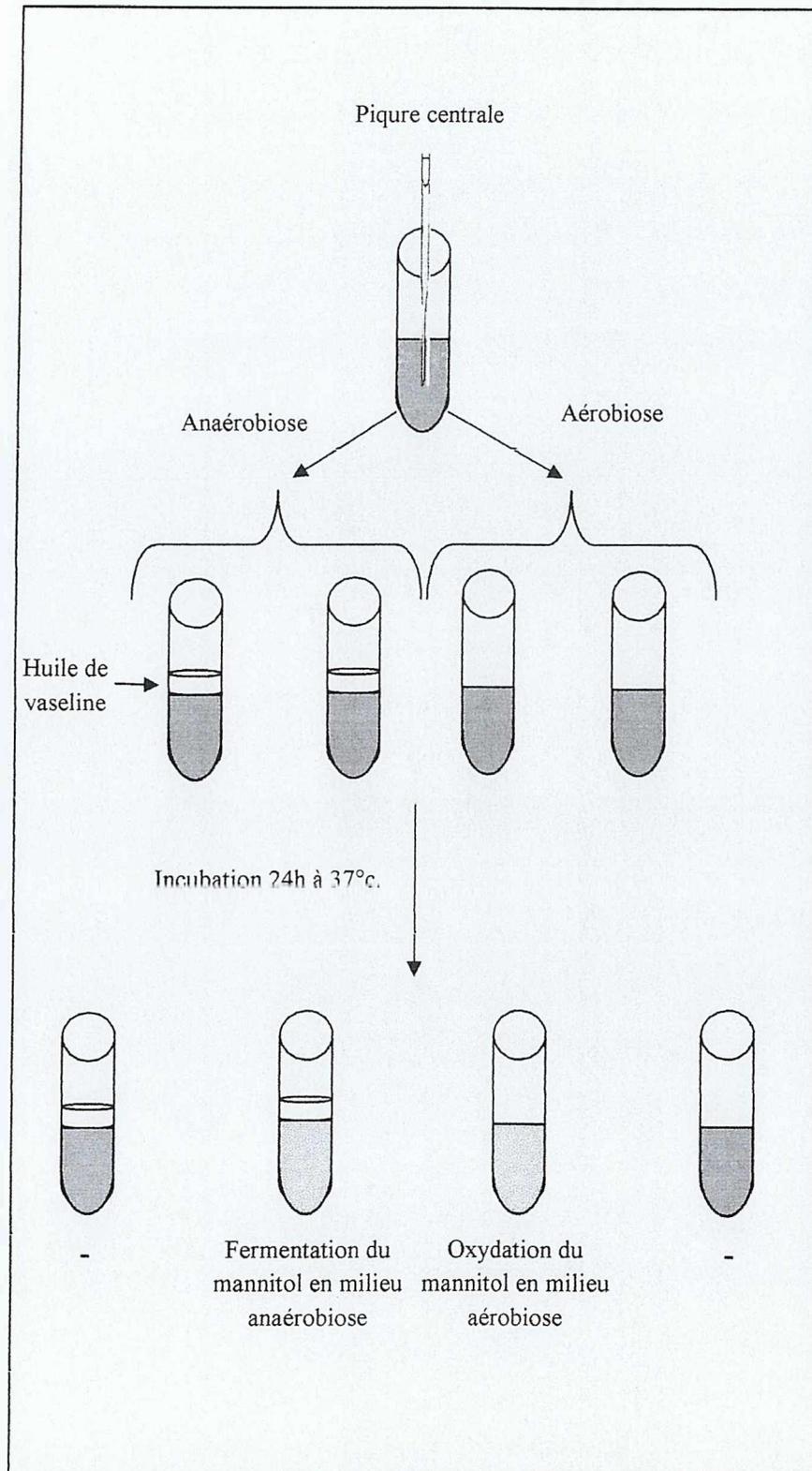


Figure 35 : Test de mannitol.

4. Détermination de la CMI des bactéries isolées :

Les bactéries qu'on cherche à éliminer de l'eau au cours du traitement ne sont pas influencées de la même façon par le chlore. Ces réactions sont en fonction des caractéristiques physiologiques et morphologiques propres à chaque type bactérien.

De plus le contacte entre le chlore et les microorganismes est influencé beaucoup plus par le pH du milieu, la matière organique, la dose du chlore utilisé et le temps de contacte.

Pour déterminer le niveau de résistance de chacun des microorganismes isolée, il faut déterminer leur CMI.

Mode opératoire :

La détermination du CMI est basée sur la mise en contacte des microorganismes avec des concentrations croissante du chlore (de 0.1 à 1.5 mg/l) selon le protocole suivant :

- ✓ Préparation de dilution de 1/10 de l'eau de javel. (Voir annexe)
- ✓ Pour chaque microorganisme on prépare :
 - Une série de 16 tubes : 1 tube témoin (sans eau de javel) et les autres tubes contenant les concentrations d'une eau de javel de 0.1 à 1.5mg/l successivement.
 - Les tubes sont remplis avec 10 ml d'eau distillé stérile au paravent.
 - Après 5 minutes, on met dans chaque tube des séries une goutte de l'inoculum après une légère agitation.
 - les tubes sont laissés pour un temps de contacte bien déterminé selon le but de l'expérience.
 - on ensemence quelques gouttes de chaque tube dans une boîte de pétrie contenant un milieu ordinaire (GN).
- Incuber à 37°C pendant 24h. (Fig.36)

Lecture : on va suivre les boîtes positives jusqu'à la boîte où il n'y a plus de pousser.

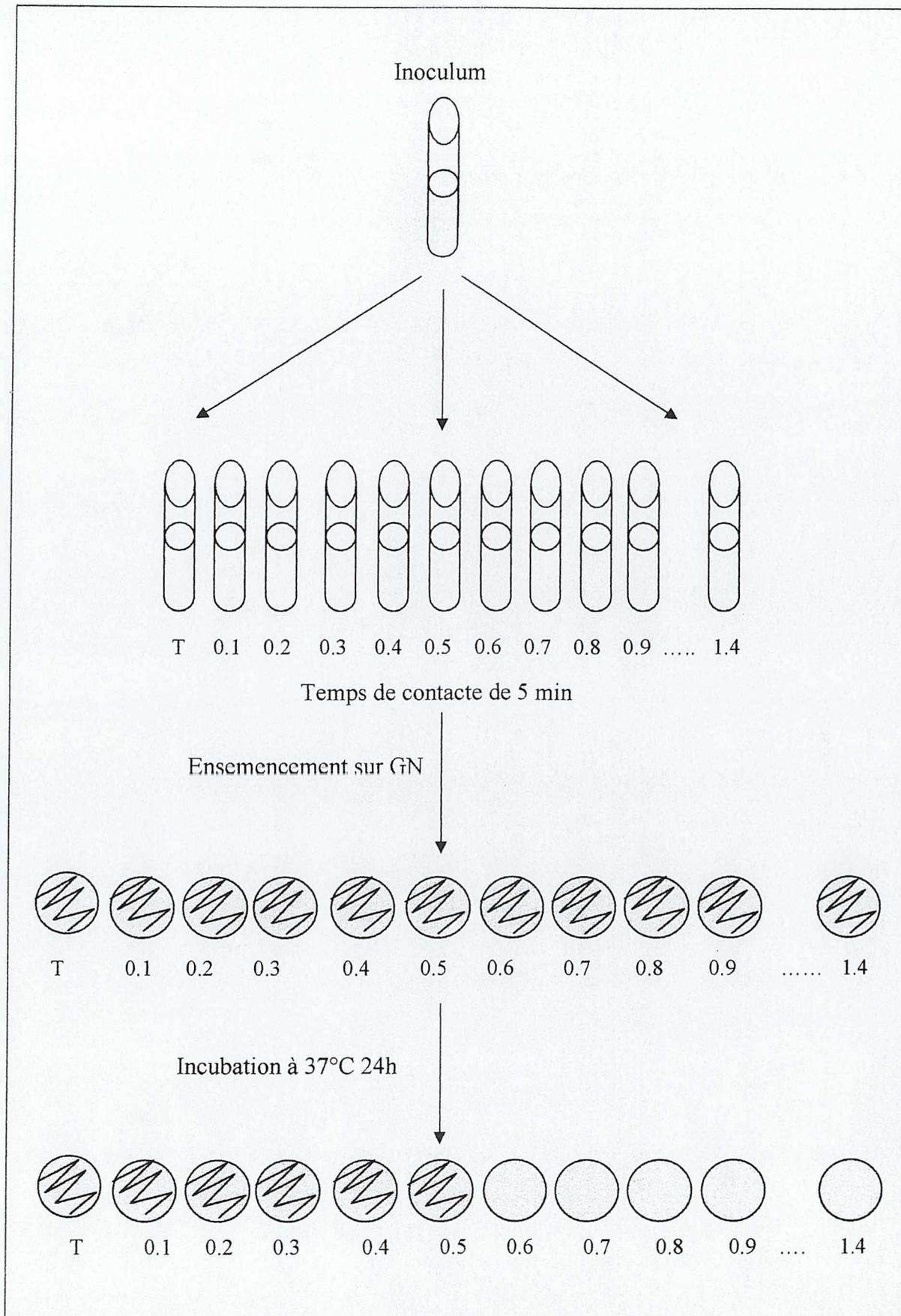


Figure 36 : Méthode de détermination du CMI des souches isolées.

Résultats et discussion

1. Prélèvement 01:

Les paramètres physicochimiques mesurés au cours du prélèvement 1 sont présentés dans le tableau (VI):

Tableau VI : Les paramètres physicochimiques du premier prélèvement.

	T°C	pH	Chlore libre mg/l	Sal mg/l	Turbidité NT _p
Eau brute	17.9	7.96	/	00	5.74
Eau de décanteur	17.6	7.62	Trace	00	7.13
Eau de réservoir	16.3	7.68	1	0.1	1.97

1.1. Dénombrement bactérien :

1.1.1 Les coliformes :

Le résultat de dénombrement bactérien montre la présence des coliformes totaux au niveau des trois points de prélèvement (eau brute, décanteur et réservoir), tandis que le nombre des coliformes fécaux (Thermotolérantes) dans l'eau à analyser est nul ce qui répond à la norme de l'OMS pour une eau potable.

La persistance des coliformes totaux au niveau de l'eau du décanteur et du réservoir, malgré leur contact avec le chlore, témoigne d'une résistance bactérienne vis-à-vis du désinfectant utilisé. (Fig.37).

D'un autre coté, la diminution du nombre des coliformes totaux au niveau du décanteur et du réservoir par rapport à l'eau brute successivement explique une forte charge de l'eau brute en coliformes par rapport l'eau du décanteur et du réservoir.

Il existe des bactéries sensibles ou résistantes au niveau de l'eau brute.

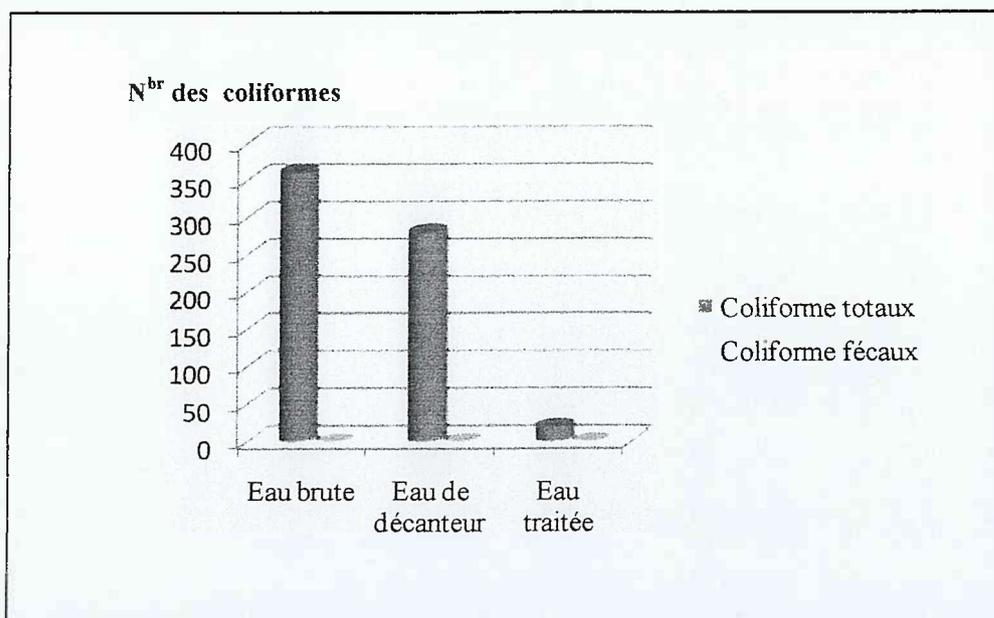


Figure 37 : Dénombrement des coliformes à partir des 03 points de prélèvements.

1.1.2. Les streptocoques :

Concernant le nombre de streptocoques fécaux, les résultats obtenus montrent une présence dans l'eau brute, ceci provient principalement d'une contamination liée à la quantité des matières fécale animale de l'eau en provenance du barrage.

Cette présence est néanmoins faible, ce qui indique que les streptocoques sont des bactéries sensibles au chlore. (Fig.38)

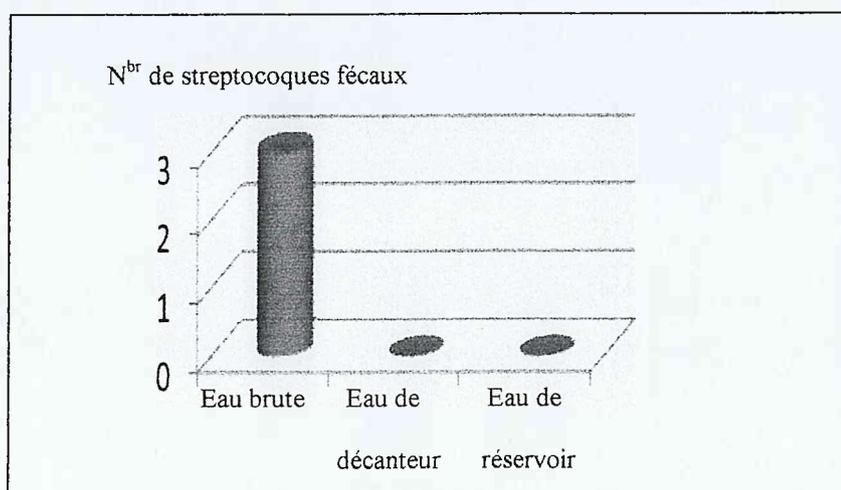


Figure 38 : Dénombrement des streptocoques fécaux du prélèvement 1.

1.1.3. Les staphylocoques :

En ce qui concerne les Staphylocoques dans les trois points de prélèvement, nous avons constaté :

-Une légère diminution du nombre de staphylocoque dans l'eau du décanteur par rapport à l'eau brute.

- cette augmentation n'avoir comme origine que la possible formation du biofilm au niveau du réservoir.

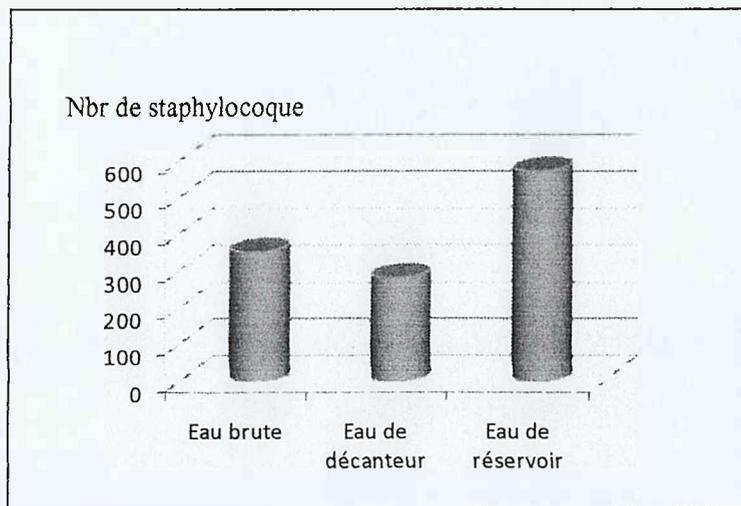


Figure 39 : Dénombrement des staphylocoques du prélèvement 1

2. Prélèvement 2 :

Les paramètres physicochimiques mesurés au cours du prélèvement 2 sont présentés dans le tableau (V) :

Tableau VI : Les paramètres physicochimiques du deuxième prélèvement.

	T°C	pH	Chlore libre mg/l	sal mg/l	Turbidité NTμ
Eau brute	17.8	7.85	/	00	5.84
Eau de décanteur	18.1	7.74	0.4	00	5.62
Eau de réservoir	17	7.80	1	0.1	1.98

2.1 Dénombrement bactérien:

Concernant le dénombrement du deuxième prélèvement, l'absence des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans les trois points de prélèvements, ce phénomène peut être lié à la diminution de la précipitation et l'augmentation de la température selon le tableau (V) (début de saison sèche) provoquant une diminution de la turbidité de l'eau qui devient moins chargée au matière en suspension qui a une grande influence sur le contact du chlore avec les microorganismes.

La présence des staphylocoques dans les trois points de prélèvement montre qu'elles sont des souches très résistantes au chlore.

3. Identification des bactéries isolées :

3.1. Caractères microscopiques :

3.1.1. Coloration de Gram :

L'observation microscopique de la coloration de Gram des souches dénombrées au paravent est montrée dans les figures : (40), (41), (42).



Figure 40 : Morphologie microscopique des coliforme Bacille à Gram (-) (G×100)

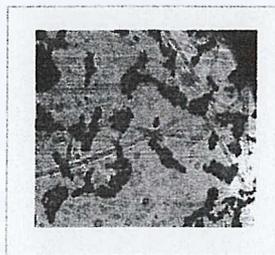


Figure 41 : Morphologie microscopique des streptocoques à Gram (+) (G×100)

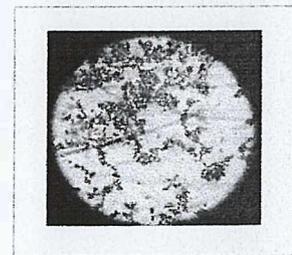


Figure 42 : morphologie microscopique des staphylocoques à Gram (+) (G×100)

3.1.2. Caractères biochimiques :

Le tableau(VI) résume les différents tests biochimiques des souches bactériennes pour les deux prélèvements effectués, et illustrés dans les figures (43) (44) (45) (46).

Tableau VI: tests biochimique des souches isolés.

		Souches isolés	indole	oxydase	catalase	coagulase	mannitol
Prélèvement 1		Coliforme de réservoir (colonie rouge)	-	-	/	/	mobile
	staphylocoques	Souche 1 de décanteur	/	/	+	+	+ (F) en anaérobiose ¹
		Souche 2 de réservoir	/	/	+	-	- en aérobiose
Prélèvement 2		Non entérobactérie du décanteur	-	+	+	/	mobile
	staphylocoques	Souche 3 de décanteur	/	/	+	-	+ (O) en aérobiose ²
		Souche 4 de réservoir	/	/	+	-	- En anaérobiose

1 : fermentatif en anaérobiose.

2 : Oxydatif en aérobiose.

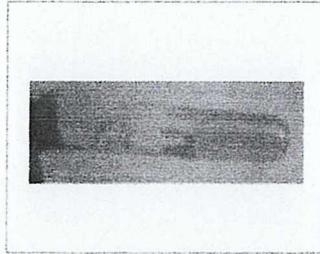


Figure 43 : Coagulase positif.

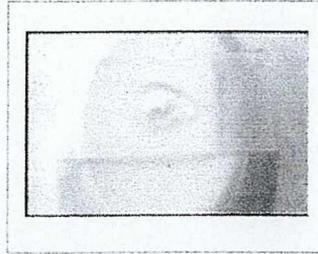


Figure 44 : Catalase positif.

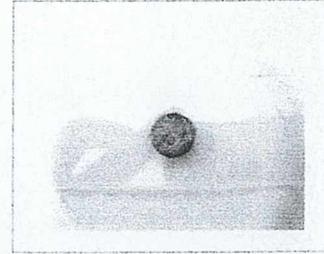
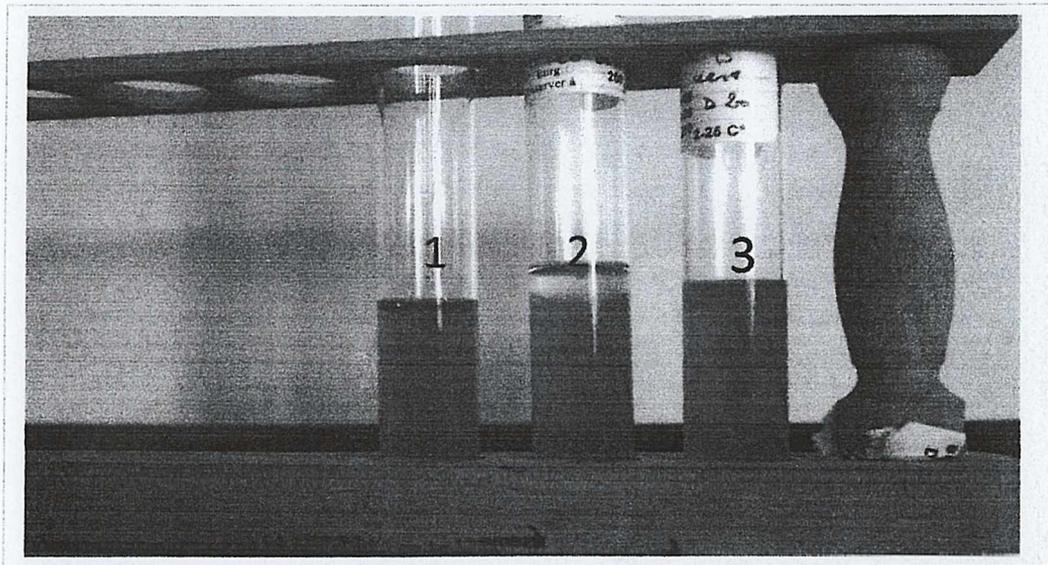


Figure 45 : Oxydase positif.



1 : bouche 2 (réservoir) 2 : bouche 4 (réservoir) 3 : bouche 3 (décanteur)

Figure 46 : Résultats de test de mannitol pour les staphylocoques.

• **Api 20 E :**

Le test de l'Api 20 E de la souche isolé à partir de l'eau de réservoir donne le résultat montré dans la figure (47).

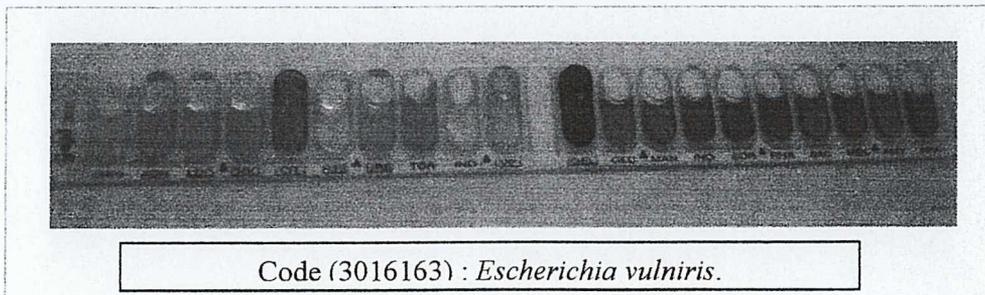


Figure 47 : Résultat de l'Api 20 E d'*Escherichia vulneris*.

- **Api 20 NE :**

Le test de l'Api 20 NE de la souche de prélèvement 2 isolé à partir de l'eau du décanteur donne le résultat montré dans la figure (48).

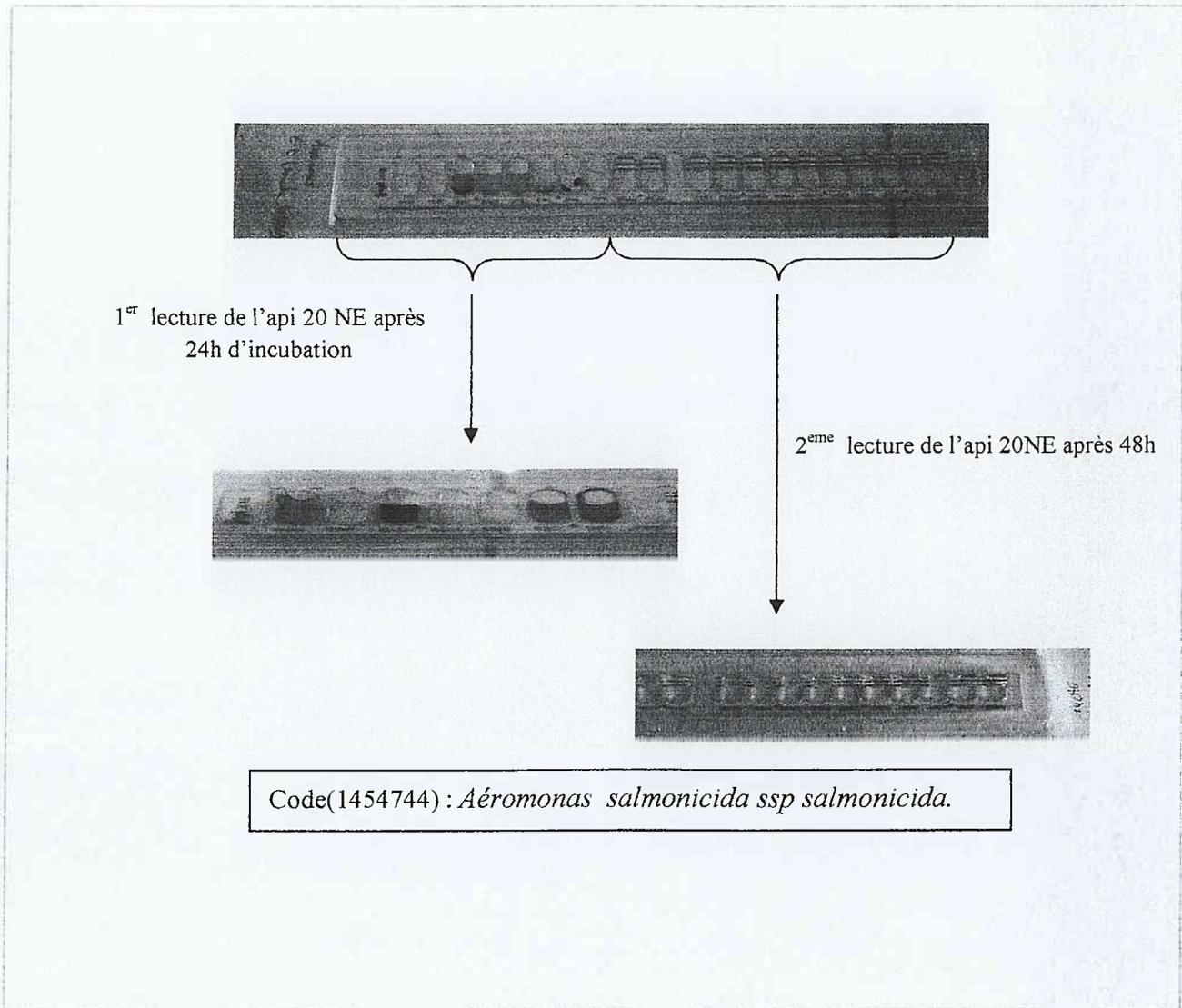


Figure 48 : Résultat de l'Api 20 NE d'*Aéromonas salmonicida ssp salmonicida*.

4. Détermination de la CMI des souches identifiées :

Les résultats de la détermination de la CMI dans un pH=5.41 avec un temps de contact de 5 minutes (Fig.49), montrent que les souches, *St.auréus*, *Micrococcus*, *St. epidermidis* et *St. saprophyticus* résistent à la concentration de 1.4 mg de chlore ajouté / litre d'eau distillée et pour *Aéromonas salmonicida ssp salmonicida*, elle résiste jusqu'à 0.4 mg/l et *Escherichia vulniris* à 0.8 mg/l.

Ce résultat se reproduit même après avoir augmenté le temps de contact de 5 à 10 minutes. (Fig.50)

Sachant que dans le pH=5.41 le HClO est à sa forte concentration (maximale) qui est de 98% cependant le ClO⁻ est à sa faible concentration (minimale) de 2%. (Voire annexe)

NB: Cette expérience in vitro reflète les mêmes résultats trouvés in vivo (l'échantillon), mais elle ne présente pas exactement ce qui se passe vraiment au niveau du traitement car le pH au niveau de décanteur et de réservoir est presque 7 (neutre).

Cependant le chlore au niveau du décanteur et du réservoir c'est un chlore libre, par contre au niveau de laboratoire c'est le chlore total.

C'est pour ça cette expérience nous montre que la dose du chlore d'une CMI bien définie est différente selon les espèces ce que montre l'histogramme de la figure(49),

Sachant que les staphylocoques sont des espèces très robustes à quel n'importe désinfectant, c'est pour cela on a opté pour un temps de contact plus long (10mn) avec le même pH = 5.41, les résultats de la figure (50) sont identiques de celles de la figure (49).

- Sur la base de l'ensemble de ces observations, il s'avère que le chlore comme désinfectant n'est pas aussi efficace sur les Gram(+) dans des conditions de pH acide (pH=5.41) malgré qu'il était à sa forte concentration.

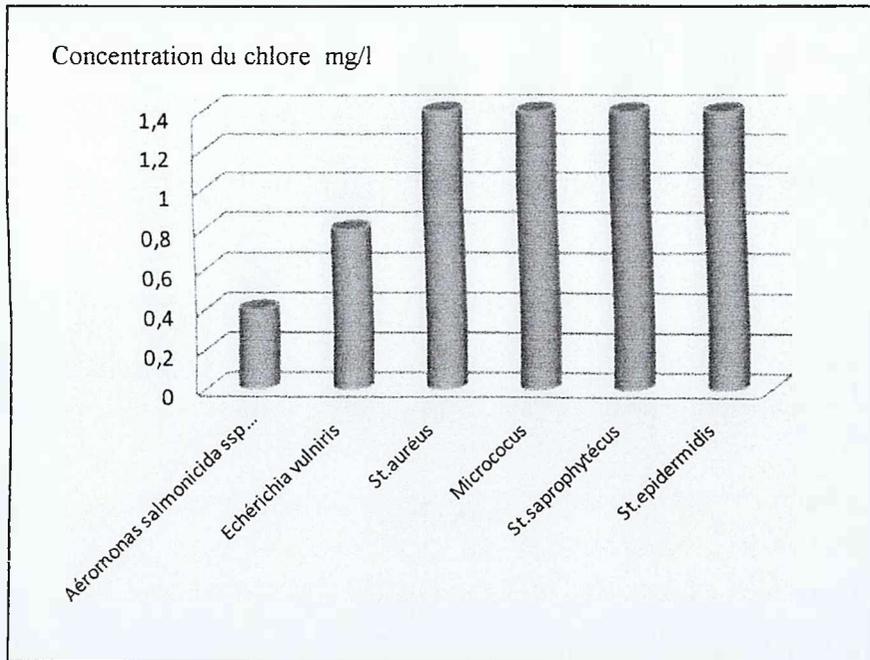


Figure 49 : La CMI des souches isolées avec un pH= 5.41 et un temps de contacte de 5 min

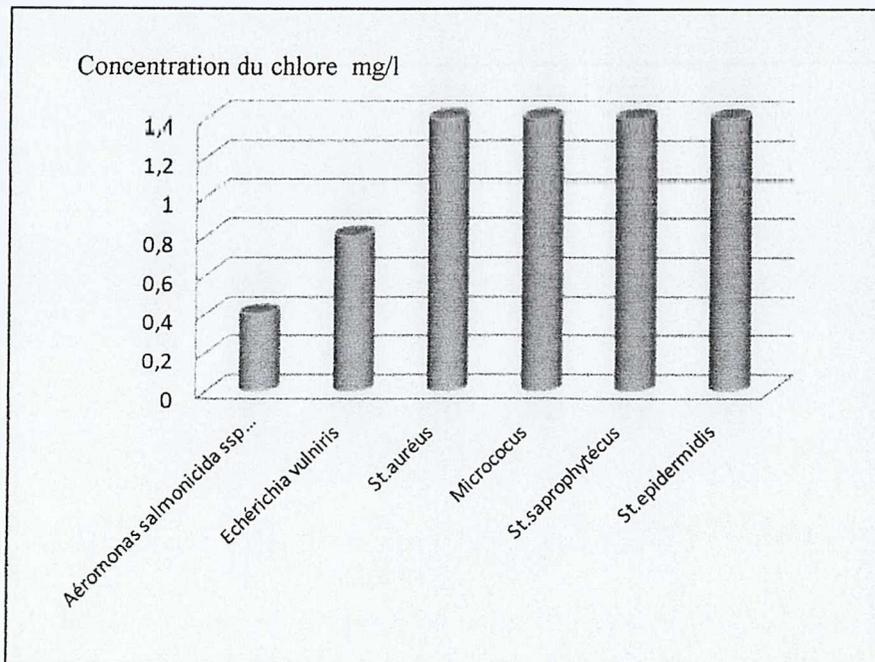


Figure 50 : La CMI des souches isolées avec un pH= 5.41 et un temps de contacte de 10 min

Nous avons réalisé une deuxième expérience pour voir l'effet du chlore au même pH (5.41) et avec un temps de contact de 5 minutes mais avec l'ajout de NH_3 (un deuxième désinfectant).

On observe une nette diminution pour les trois souches de Gram(+): *Staphylococcus.aureus*, *Micrococcus* et *St.saprophyticus*. (Fig.51)

Donc, on peut dire que ces trois souches deviennent sensibles à cause de l'ajout de NH_3 .

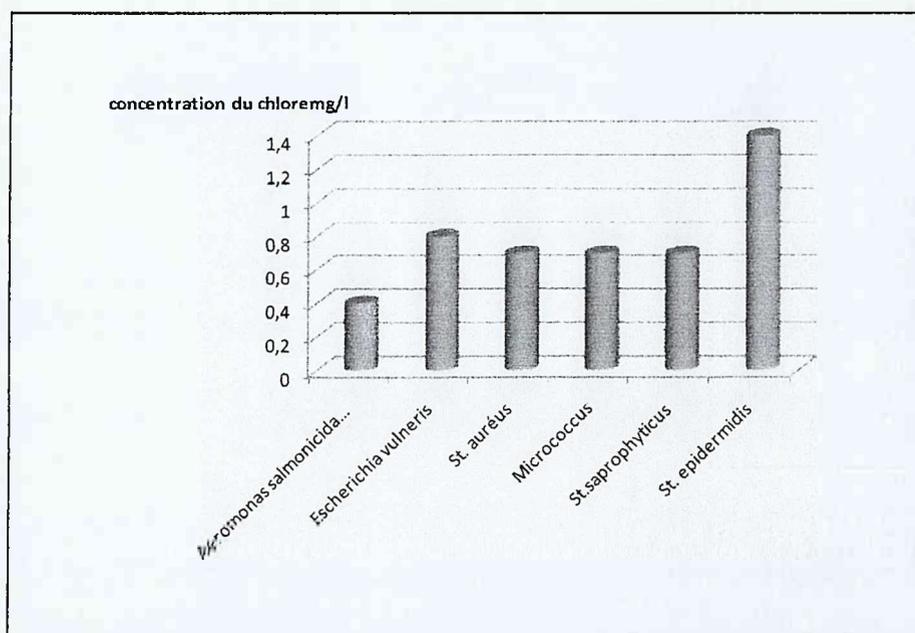


Figure 51 : La CMI des souches résistantes à un pH=5.41 avec un temps de contact de 5 min

Dans l'objectif d'augmenter le pH vers la neutralité (le pH recommandé pour une eau potable), nous avons ajouté le NH_3 et le NaOH séparément.

Au pH=7.14 nous constatons :

- le même résultat pour *St. epidermidis* (1.4 mg/l) et *St. saprophyticus* (0.7 mg/l).
- Par contre : - *St.auréus* (0.7 mg/l→1 mg/l).
- *Micrococcus* (0.7mg/l→0.8mg/l).

- Aucun changement pour *Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* et *Escherichia vulneris* (0.4 mg/l et 0.8mg/l successivement) pour les deux valeurs de pH (5.41 et 7.14).

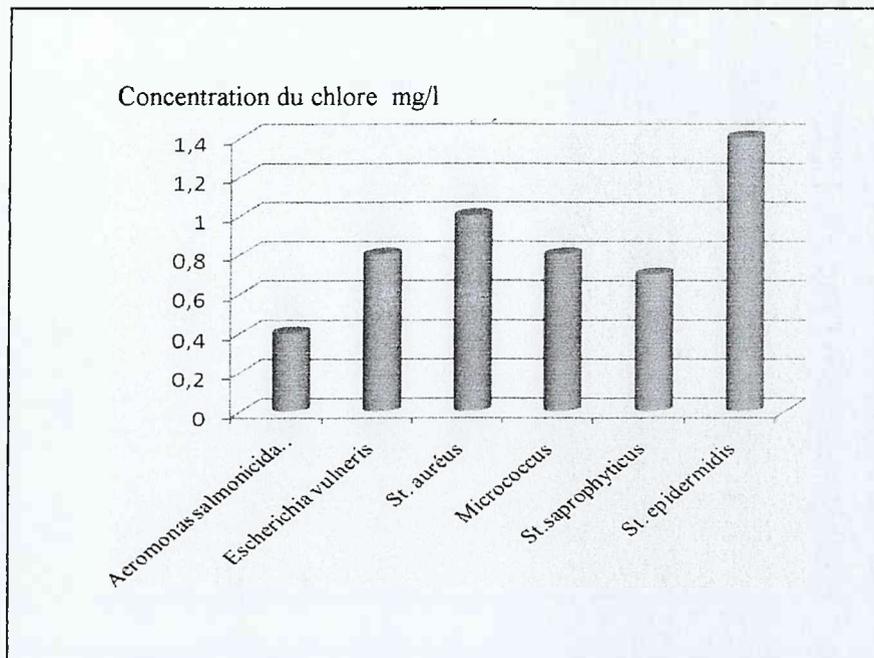


Figure 52 : La CMI des souches isolées avec un pH= 7.14 (ajusté par le NH₃) et un temps de contact de 5 min

D'après ces résultats, l'association des deux désinfectants est plus efficace sur les Gram(+) mais sans effet sur les Gram(-), ceci est du à plusieurs possibilités :

- Soit le désinfectant (de type chloramines) fragilise la défense bactérienne vis à vis le du HClO.
- Soit le HClO fragilise la bactérie, et par la suite intervient l'attaque de 2^{eme} désinfectant (chloramines).
- Soit les deux désinfectants agissent en synergie.

Mais selon les résultats on opte pour la première possibilité car selon les résultats des deux premières expériences qui montrent que le chlore comme un désinfectant n'est pas aussi efficace même s'il est à sa forte concentration (au pH=5.41), aussi bien la

troisième proposition est refusée puisque l'action de deux désinfectants à la fois sur la même bactérie provoque une compétition sur les sites d'attaque, ce qui favorise à la bactérie d'échapper facilement.

En plus, la 1^{ère} possibilité suggérée concorde avec les observations de (Marc, Price, Claude, Marie BURIN DES ROZIERES ; 2002) qu'expliquent que :

« Les composés à base de chloramines sont très utilisés en raison de leur capacité de pénétration. La monochloramine est très appréciée car elle pénètre très bien les polysaccharides et ses effets ne dépendent pas de l'âge du biofilm ou des caractéristiques microbiennes. Bien que l'hypochlorite soit plus efficace que la monochloramine sur les micro-organismes planctoniques, une étude comparative menée sur l'acide hypochlorique, le dioxyde de chlore et la monochloramine (utilisés à des concentrations et pendant une durée identiques) a montré que la monochloramine était plus efficace pour inactiver les bactéries fixées. »

Puisqu'un seul staphylocoque continu a présenté une CMI élevée, avec un temps de contact de 5 mn au pH= 7.14, les résultats vis-à-vis le terrain sont satisfaisantes sachant que l'HClO est à sa faible concentration ; en plus d'une petite quantité de chloramine la CMI de chaque espèce de Gram(+), qui est forte au paravent, a été diminuée.

Nous avons augmenté le temps de contact jusqu'à 30 mn. On a trouvé que tous les staphylocoques soient résistés à 10 mn, mais au-delà il n'y plus de croissance sauf chez *Micrococcus* et *St. epidermidis*. (Fig.53)

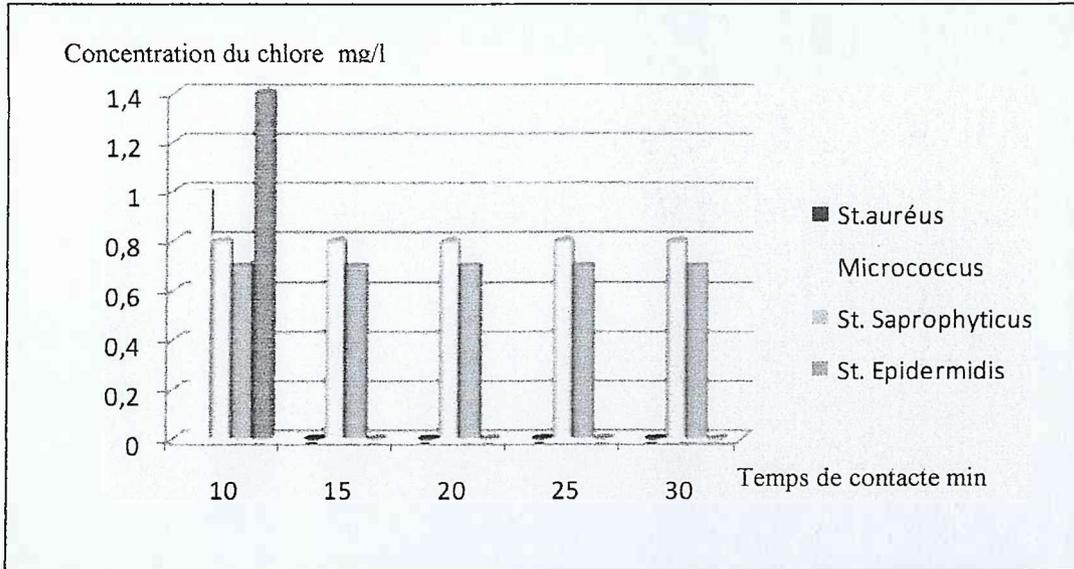


Figure 53: La CMI des staphylocoques en fonction du temps avec un pH= 7.14 (ajusté par le NH₃).

Pour l'ajout d'une solution de NaOH afin d'ajuster le PH à la neutralité (7.14) sachant que cette solution contient aussi le mercure et d'autres métaux lourds tels que l'argent (voir annexe) et selon le même protocole de l'histogramme de (Fig.49), on a trouvé qu'il y a une absence totale de Gram(+) et aucun changement pour les Gram(-). (Fig.54)

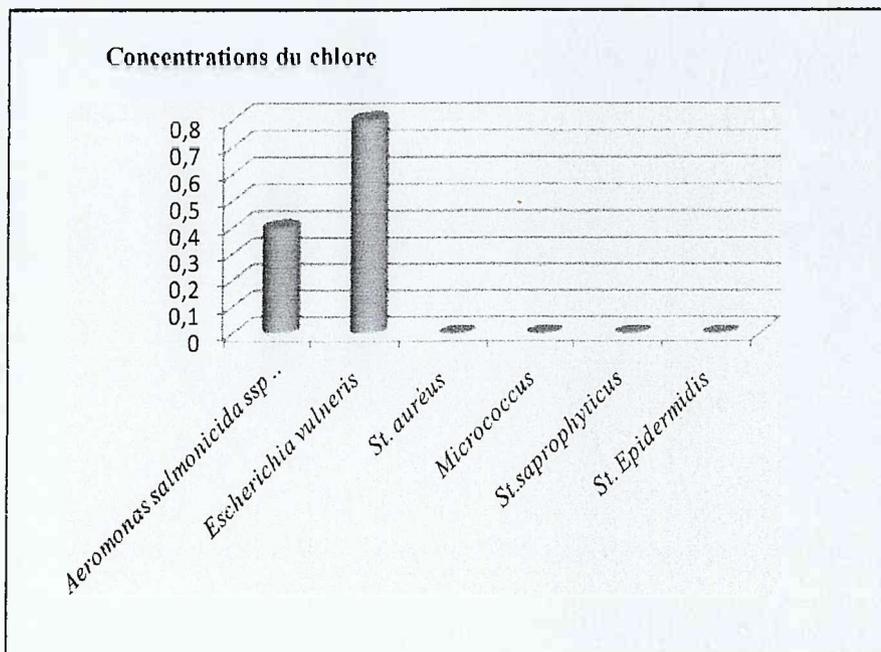


Figure 54 : La CMI des souches résistantes à un pH=7.14 ajusté par le NaOH avec un temps de contacte de 5 min

- Alors on conclue que les Gram(-) testé sont insensibles à des doses infimes de métaux lourds (Mercure et Argent) par contre les Gram(+) sont très sensibles à ces composés surtout le mercure.

Parmi tous ces différents facteurs (pH, concentration du chlore, présence de mercure, Argent), les deux souches Gram(-) (*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* et surtout *Escherichia vulniris*) peuvent résister d'une manière stable.

Pour cela on a suggère d'estimer le temps de contact nécessaire avec sa CMI pour voir sa résistance maximale selon le temps et aussi selon les différentes concentrations du chlore.

- On a trouvé qu'au delà de 20 min il n'y a pas une poussé, donc on conclue que pour l'élimination de cette espèce résistante, il suffit une dose minimale de chlore de 0.8mg/l pendant un temps supérieur à 15mn. (Fig.54)

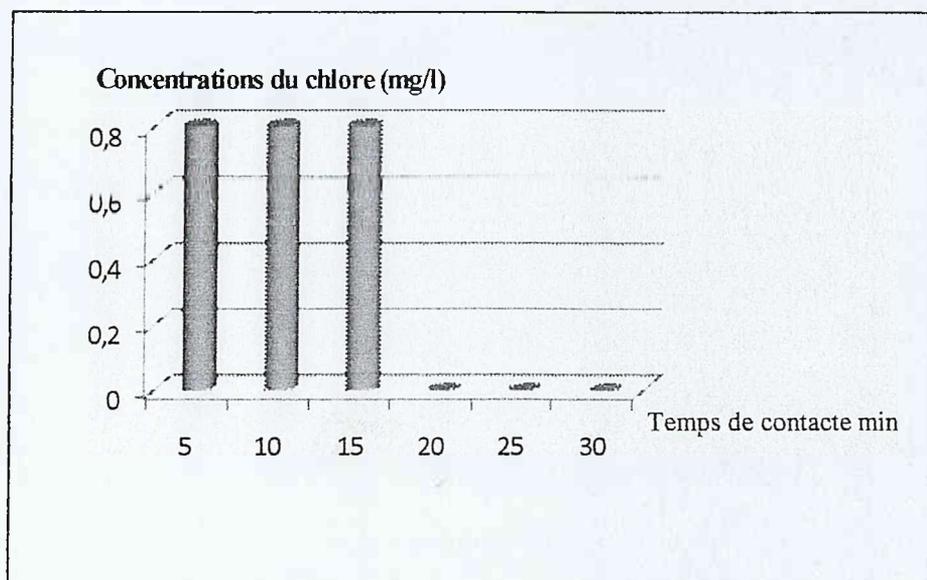


Figure 55 : L'influence du temps de contacte sur la CMI d'*Escherichia vulniris*.

A l'issu de ces résultats on suggère que pour un bon traitement il faut mélanger deux désinfectant plus un temps au voisinage de 30 min pour l'élimination des bactéries Gram (+) (*St.auréus*, *Micrococcus*, *St. saprophyticus* et *St. epidermidis*) ; et pour les bactéries Gram(-)

(*Aéromonas salmonicida ssp salmonicida* et *Escherichia vulneris*) qui ont résisté à tous ces conditions avec des doses bien définie, elles n'ont pas pus changer leurs sensibilités vis-à-vis les deux désinfectants utilisés il sufie augmenté le temps de contacte pour l'éliminer.

Même en ajoutant des métaux lourds, on a trouvé que les Gram(+) sont très sensibles surtout au mercure par contre les Gram(-) sont insensibles à ces composés.

Mais cette solution n'est pas envisageable car les métaux lourds sont nocifs pour l'être humain.

Alors la possibilité est d'augmenté le temps de contacte avec le désinfectant qui nous montre qu'avec un temps supérieur à 20mn plus de croissance.

Donc pour un bon traitement contre les Gram(-) il est préférable d'augmenter le temps de contacte avec une concentration du chlore supérieure ou égale à 0.9 mg/l.

Le véritable problème au cours de la désinfection de l'eau se présente lorsque des microorganismes résistent à des concentrations proches ou supérieures à la concentration recommandées pour les détruire. Donc une diminution de la concentration du produit peut être la cause de l'émergence d'une résistance bactérienne.

A l'issue de cette étude, nous avons déterminés la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactéries présentant une résistances au chlore, *St.auréus*, *Micrococcus*, *St. saprophyticus*, *St. epidermidis*, *Aéromonas salmonicida ssp salmonicida*, et *Escherichia vulniris*).

L'association de deux désinfectants (chlore et chloramine) a montré une efficacité avec le prolongement du temps de contact au voisinage de 30 minutes. Ce procédé nécessite néanmoins la maîtrise de nombreux paramètres (pH, temps de contact, turbidité, température, dose du chlore...) qui influencent sur l'efficacité de cette association vis-à-vis des microorganismes.

Perspectives :

Les circonstances de réduction de l'activité des désinfectants sont nombreuses : matière organiques, substances interférentes, vieillissement des produits, etc....

Ce phénomène justifie également la nécessité de varier le type de désinfectant à employer. Ce dernier doit être tous aussi efficace que le produit qu'il remplace. Il doit se faire occasionnellement ou lorsque le produit utilisé perd de son effet germicide.

Cette solution peut entrainer un autre problème, c'est l'apparition d'une nouvelle résistance à tous les désinfectants utilisés au cours du temps... !

Résumé :

L'eau est l'élément naturel qui fait l'objet d'une surveillance attentive à travers le monde. L'eau prélevée de son milieu naturel est généralement impropre à la consommation humaine, c'est pour cela qu'elle doit subir des traitements pour pouvoir être consommé sans danger.

La chloration constitue le procédé de désinfection le plus répandu pour le traitement de l'eau destinée à la consommation humaine, elle a pour l'inhibition des microorganismes et l'assurance d'une protection sanitaire de l'eau.

Il est donc essentiel de respecter les conditions d'utilisation de désinfectants et surtout la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du chlore afin d'éviter le problème d'émergence des souches résistantes.

Mots clés : eau, désinfection, chlore, bactérie résistante, CMI.

Abstract :

Water is a natural element that is being closely monitored throughout the world. The water taken from its natural habitat is generally unsuitable for human consumption, therefore it must undergo treatment to be safely consumed.

Chlorination is the disinfection process as expanded for water's treatment oriented for human consumption, it has for inhibition of microorganisms and the assurance of health protection.

Therefore, it is essential for respecting conditions disinfectants' use and especially the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chlorine to avoid the emergence problem of resistant strains.

Keywords: water disinfection, chlorine, bacteria resistant, MIC.

الملخص:

الماء هو عنصر أساسي تتم مراقبته عن كثب في جميع أنحاء العالم، والمياه المأخوذة من بيئتها الطبيعية بصورة عامة تكون غير صالحة للاستهلاك البشري، وبالتالي فإنه يجب أن تخضع للعلاج لكي تستهلك بسلام.

يستعمل الكلور في عملية التطهير لمعالجة المياه المخصصة للاستهلاك البشري، ولتثبيط الكائنات الحية الدقيقة وضمان الحماية الصحية للمياه.

ولذا فمن الضروري أن تحترم شروط استخدام المطهرات وخاصة في تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) للكلور لتجنب مشكلة ظهور سلالات مقاومة.

مفتاح الكلمات: الماء، التطهير، الكلور، البكتيريا المقاومة، الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI).

Références bibliographiques :

1-ADE (1999).

Office international de l'eau. 400p.

2-ADE (2007).

Normes Algérienne (NA) et Internationales(ISO); Qualité de l'eau échantillonnages et analyses bactériologiques. Algérienne des eaux.43p.

3-ANB (2010).

Agence National du Barrage.

4-Aouissi Amina (2009-2010).

Microbiologie et physico-chimique de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie).145p.

5-Athamnia S, Babouri S. (2002).

Les analyses bactériologiques (Rapport de stage).30p.

6- Biomérieux. Fiche technique (2009). PARIS

7-Boukredine Mehdi(2003).

Contamination microbiologique par les dispositifs médicaux dans les unités dentaires.

Université Badji Mokhtar Annaba) p24.

8-Bourdon J.L et Marchal. N. (1981) Techniques bactériologiques .Ed DOIN. 335 P

9-CAILLEUX G. (2001)

L'épuration biologique: fonctionnements et dysfonctionnements « Qualité et Gestion de l'Eau ». Univ. Picardie Jules Verne, 63p.

10-Castel.O. (2010).

Clostridium deficile et utilisation de l'eau de javel dans les établissements de soins.PDF.Ed. SHU de POITIER CC lin.18p.

11-Duppont.A. (1986).

Hydrologie urbaine (tom I) 6^{ieme} Ed. FYROLLES. 262p.

Références bibliographiques :

1-ADE (1999).

Office international de l'eau. 400p.

2-ADE (2007).

Normes Algérienne (NA) et Internationales(ISO) ; Qualité de l'eau échantillonnages et analyses bactériologiques. Algérienne des eaux.43p.

3-ANB (2010).

Agence National du Barrage.

4-Aouissi Amina (2009-2010).

Microbiologie et physico-chimique de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord-Est de l'Algérie).145p.

5-Athamnia S, Babouri S. (2002).

Les analyses bactériologiques (Rapport de stage).30p.

6- Biomérieux. Fiche technique (2009). PARIS

7-Boukredine Mehdi(2003).

Contamination microbiologique par les dispositifs médicaux dans les unités dentaires. Université Badji Mokhtar Annaba).p24.

8-Bourdon J.L et Marchal. N. (1981) Techniques bactériologiques .Ed DOIN. 335 P

9-CAILLEUX G. (2001)

L'épuration biologique: fonctionnements et dysfonctionnements « Qualité et Gestion de l'Eau ». Univ. Picardie Jules Verne, 63p.

10-Castel.O. (2010).

Clostridium deficile et utilisation de l'eau de javel dans les établissements de soins.PDF.Ed. SHU de POITIER CC lin.18p.

11-Duppont.A. (1986).

Hydraulique urbaine (tom I).6^{ieme} Ed EYROLLES 262p.

Site d'internet :

- [1']. http://www.guelma.org/francais/index2.php?rub=sejour&srub=promenades&goto=barrage_bouhamdane DATE 30/03/2010
- [2']. (http://www.Journaux_d'Algériejournaux.ma/algerie/guelma-amelioration-du-niveau-deau-du-barrage-de-bouhamdane). mise a jour 22/ 05/2010
- [3']. 2010Google-Imagerie©2010Terre Metrics, Données cartographiques©2010 Europa Technologies.
- [4']. www.grundfosalldos.com.(2008)
- [5']. (www.lenntech.fr/résistance-antimicrobienne.htm mise a jour 2010
- [6']. www.eautracie.com/3.Eau_de_pluie/D.Le_chlore_et_l'eau.htm mise a jour 22/05/2010
- [7']. http://www.cclinparisnord.org/Guides/guide_desinfectant.pdf, consulté le 19.03.07
- [8']. (www.senat.fr.2010).
- [9'].olduvai.e-monsite.com/rubrique,eaupurificationdesinfection,1183727.html mise a jour 25/05/2010
- [10']. Québec, <http://www.hug-ge.ch/QuickPlace/pharmacoclin/Main.nsf> mise a jour 28/05 2010
- [11']. Read more: <http://www.lenntech.fr/resistance-antimicrobienne.htm> ixzz0jID7erKP.
Mise a jour 22/05/2010.
- [12']. Copublication. Greenfacts.org. mise a jour 12/04/2010.

Liste des annexes :

I	Composition de NaOH (Hydroxyde de sodium)
II	Préparation des concentrations croissantes de chlore
III	Tableau de NPP
IV	Concentration maximale admissible pour une eau désinfectée selon OMS
V	T.T.C. et Tergitol 7
VI	Cohabitation de l' HClO et ClO^- selon le pH

Annexe

I) Composition de NaOH (Hydroxyde de sodium) :

-carbonate de sodium (Na_2CO_3), %P/P.....	0.4Max.
-chlorure (Cl), ppm.....	80Max.
-fer (Fe), ppm.....	7Max.
-Mercure, ppm.....	50.
-sulfates (SO_4), ppm.....	30.
-métaux lourds (tel Ag), ppm.....	20.
-nickel, ppm.....	3.

II) Préparation des concentrations croissantes de chlore :

Mesure du degré :

- dans une éprouvette contienne 10 ml du chlore concentré, on ajoute 100 ml eau désilé.
- on ajoute 03 g de Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à 10ml de la solution mère.
- agiter bien pendant 15 mn à l'aide d'un agitateur.
- on ajoute l'amidon (2ml).
- titrer la solution avec le KI (iodure de potassium) jusqu'à l'obtention d'un couleur bleu, ça veut dire que le volume KI = 1.12.

$$\text{Degré} = V(\text{KI}) \times 1.12$$

Mesure du chlore actif :

$$\left. \begin{array}{l} 1^\circ \longrightarrow 3.17\text{g} \\ \text{Degré} \longrightarrow X \end{array} \right\} X (\text{chlore actif}) = \text{degré} \times 3.17$$

Dilution :

Sachant que : $V_1=1\text{ml}$, $C_1=3.17\text{g/ml}$, $C_2= [\text{chlore actif}]$.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad 3.17 \times 1 = [\text{chlore actif}] \times V_2 \longrightarrow V_2 = C_1 \cdot V_1 / C_2$$

Donc : 1g \longrightarrow 1ml (elle est confirmée par un comparimètre).

IV) Concentration maximale admissible pour une eau désinfectée selon OMS :

Paramètres microbiologiques	Concentration maximale admissible pour une eau désinfectée
-Germes aérobies revivifiables à 37°C, 24h LJFC/ml	10
-Germes aérobies revivifiables à 22°C, 72h UFC/ml	100
-Coliformes totaux / 100 ml	0 dans 95 % des cas
Coliformes fécaux / 100 ml	0
-Streptocoques fécaux / 100 ml	0
-Clostridium sulfito-réducteurs / 20ml	1
-Salmonelles / 5000ml	0
-Staphylocoques pathogènes/ 1100ml	0
-Bactériophages fécaux/ 100ml	0

V) T.T.C. et Tergitol 7 : Base pour gélose lactosée au T.T.C. et Tergitol 7

Gélose lactosée au T.T.C. et Tergitol 7, dont la formulation résulte essentiellement des travaux de Chapman, est utilisée pour les recherches et dénombrement des coliformes et coliformes thermotolérants, en particulier dans le cadre de la colimétrie des eaux par la méthode des membranes filtrantes.

1- Le Tergitol 7 (heptadecylsulfate de sodium), additionné extemporanément au milieu de base, inhibe la pousse des germes à gram positif, réduit l'envahissement du milieu par les protéus et favorise le recouvrement des coliformes.

2-Autre additif, le T.T.C (Triphenyl-2,3,5-Tetrazolium Chlorure) est réduit très rapidement par la majorité des bactéries coliformes.

Enfin, les micro-organismes capables de fermenter le lactose présent dans le milieu, donnent des colonies jaunes cernées de halos jaunes, coloration due au virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol.

VI) Cohabitation de l'HClO et ClO⁻ selon le pH :

pH	% HClO	% ClO ⁻
4	100	0
5	98	2
7	73	27
8	54	46
9	23	73
10	0	100