

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 08 Mai 1945 de GUELMA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET SCIENCES DE LA TERRE ET L'UNIVERS
DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



A3/732

570.342

Domaine Sciences De La nature et de la Vie
Filiere : Biologie
Spécialité : Biochimie Microbiologie Appliqué
Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire
THÈME

Evaluation de risque de contamination des eaux de lac oubeira

Présentées par :

DJAGHOUT Fatima

LADASSI Fatma

MIHOUB Somia

Membres de jury :

Président : Mr Merzoug abdel ghani (M-A-A Université de Guelma)

Examinatrice : Mme khanaka karima (M-A-A Université de Guelma)

Encadreur : Mme Bidioui. Soraya (M-A-A Université de Guelma)

JUIN 2013



Remerciement

L'aunage à dieu le miséricordieux qui nous a éclairé la voix de la science et de la connaissance et par sa grâce on a réussi à achever ce modeste de travail.

*Nos vifs remerciement vent à notre encadreur **Mme.bidioui soraya** qui à proposer et discuter le sujet, il nous beaucoup aidé par ses conseils et son expérience, son soutien et surtout sa patience.*

*Nous adressons également nos sincère remerciement à **Mr. Merzoug abdel ghani** qui à bien voulu présidé le jury de se mémoire.*

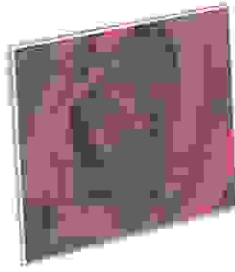
*Notre gratitude va également à **Mme khanaka karima**,qui nous honore par sa participation de notre jury d'examinassions.*

*On remercie également tou personnel de l'aide ,surtout les responsables de laboratoire de bactériologie pour l'aide qu'ils nous apporté dans la réalisation du stage pratique , en suivant de près les diverses étapes du développement de ce travail , et les responsables de laboratoire du département surtout **Mme houria** et le technicent de laboratoire trois **Mme Hasiba***

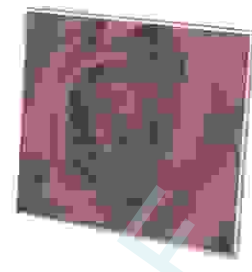
Tous les enseignants les enseignantes du département de biologie qui ont contribué à notre formation durent les Cinqe années.

*Enfin, tout les étudiants de 2^{ème} année **qualité de produit et sécurité alimentaire (2012/2013)** et tout ceux qui de pries et de loin participe à l'élaboration directe et /ou indirecte de ce modeste travail*

Fatma , Fatima , Soumia



Dédicace



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

Je dédie ce modeste travail à mes parents :

A ma très chère mère SABAH pour le soutien inconditionnel et à leur affection, leur patience et leur compréhension

A mon très cher père AMMAR pour l'encouragement et leur soutien financier

A ma sœur : MOUICHER A

Ames frères : SOULFYMENE, KHALIL, MOUHAMED

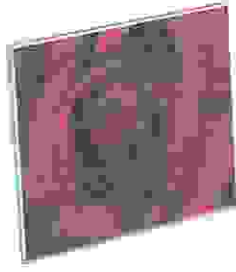
A ma grand famille : ma grand-mère et ma grand père, mes oncles et mes tantes

A mes chers amis : CHAYMA

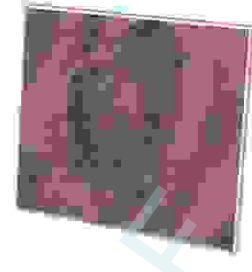
A tous ceux que connus au département de biologie et toutes mes amies sans exception.

Fatma





Dédicace



Pour le sourire de ma vie et mon ange gardien dans cette existence : celle qui est pleine d'amour et de tendresse et à qui je dois ma réussite après le bon Dieu, a ma mère chérie.

A celui qui m'a appris de donner sans retour, et a qui je porte le nom, à celui qui cherche mon bonheur avant tout a mon père.

A ma famille et tous les proches qui représentent la joie de ma vie :

Le soleil de ma vie : le neveu YAHIA

Ma sœur : Moufida

Mes frères : Fateh, Mouhamed, Khalil, Soufien

A la femme de mon frère : Mouna

Mes tantes et surtout Samira

Mes amis : Lina, Warda, Meriem, selsabile et et mouna

A ceux qui ma montré tout ce qui beau dans cette vie, a ceux avec qui j'ai partagé les meilleurs moment : soumia, feten et fatma

A tous ceux que j'ai connus au département de biologie et à toutes mes amies sans exception.

Fatima





Dédicace

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

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

Merci à mes proches pour m'avoir soutenu par leur présence dans les bons comme dans les mauvais moments :

Mes Sœurs Muona, Hadjer,

Mes Frère Khayreddine , Amir Et Khalef

Mon Mari : Sultan

Je voudrais aussi remercier plus spécialement Je dédie ma grande famille ma grand-mère , mes oncles et mes tantes

Pour finir, je voudrais aussi remercier mes très chers amis : Hadjer ,sabrina ,feten et fatma

A tous ceux que connus au département de biologie et toutes mes amies sans exception.

Soumia



SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Description du site « lac oubeira »

I- Localisation générale.....2

II- Les caractéristiques du lac Oubeira.....3

Chapitre II : Détermination de paramètres physico-chimique et Identification fongique «*Aspergillus, Penicillium*»

I- Les paramètres physico-chimiques.....4

I-1- La couleur.....4

I-2- La température.....4

I-3- La conductivité électrique.....4

I-4- Le pH.....4

I-5- L'oxygène dissous.....4

II- Identification fongique «*Aspergillus, Penicillium*».....5

II-1- Généralités sur les champignons.....5

II-2- La classification des champignons.....5

II-3- Identification des champignons filamenteux.....5

II-3-1- Le Genre *Aspergillus*.....6

II-3-1-1- Description et les Caractères épidémiologies et des *Aspergillus*.....6

II-3-1-2- Les caractères culturaux et pouvoir pathogène des *Aspergillus*.....7

II-3-1-3- Caractères macroscopiques et microscopiques.....7

II-3-1-4- Potentiel toxigène.....8

II-3-1-5- Exigences de croissance.....8

II-3-2- Le Genre *Penicillium*.....8

II-3-1-1- Identification fongique du genre <i>Penicillium</i>	8
II-3-1-2- Pouvoir pathogène.....	9
II-4- La condition favorable de la culture fongique.....	10
II-4-1- <i>Aspergillus</i>	10
II-4-2- <i>Penicillium</i>	10
II-5- Variation de la température.....	10
II-6- Composition biochimique de la biomasse fongique.....	11
Chapitre III : La pollution des eaux	
I- Les effets de la pollution sur les eaux de surface.....	12
II- Les différents types de pollution.....	12
III- Les indicateurs microbiologiques de la pollution.....	12
III-1- Les coliformes totaux.....	13
III-2- Les bactéries entérocoques.....	13
Chapitre IV : Matériel et Méthodes	
I- L'échantillonnage.....	15
I-1- Prélèvement des échantillons.....	15
I-2- Transport des échantillons.....	15
I-3- Stérilisation des milieux.....	15
II- L'identification fongique.....	15
II-1- Coulage des boîtes.....	15
II-2- Préparation des dilutions.....	15
II-3- Ensemencement et incubation.....	16
II-4- Lecture.....	18
II-5- Analyse microbiologique.....	18
II-6- Examen à l'état frais.....	18
II-7- Examen après coloration.....	19
II-7-1- préparation des frottis.....	19

III- Analyse physico-chimiques.....	19
III-1- Mesure de la température.....	19
III-2- Mesure de la conductivité.....	19
III-3- Mesure d'oxygène dissous.....	19
III-4- Mesure de pH.....	20
IV- Préparation du matériel bactériologique pour l'étude microscopique.....	21
IV-1- Méthode d'ensemencement sur gélose.....	22
IV-2- Examens microscopique.....	23
IV-2-1- Coloration de Gram.....	23
IV-2-2- Etude et caractères biochimiques.....	23
IV-2-2-1- Réalisation d'une galerie biochimique classique.....	23
IV-2-2-2- Identification biochimique.....	25
IV-3- Dénombrement bactérien des coliformes.....	26
IV-3-1- Test présumptif.....	26
IV-3-2- Test de confirmation.....	27
IV-4- Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux.....	31
IV-4-1- Test présumptif.....	31
IV-4-2- Test de confirmation.....	31

Chapitre V : Résultats et discussion

I- Résultats Analyse physico-chimique des eaux du lac Oubeira.....	33
I-1- La température.....	33
I-2- La conductivité.....	33
I-3- pH.....	34

I-4- L'oxygène dissous.....	35
II- Résultat de l'identification fongique.....	37
II-1- L'aspect macroscopique.....	37
II-2- L'aspect microscopique.....	38
II-3- Analyses bactériologiques.....	39
II-3-1- Caractères morphologiques et coloration de Gram.....	39
II-3-2- Détermination des caractères biochimique.....	40
II-3-2-1- Recherche et dénombrement des contaminations fécales coliformes totales.....	40

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Produced with Scantopdf

Listes des figures

Figures	Titre	Pages
Figure n° 01	Situation géographique du lac Oubeira dans le parc national d'EL- Kala	02
Figure n° 02	classification des champignons	05
Figure n° 03	Présentation de point du prélèvement.	14
Figure n° 04	localisation des stations d'échantillonnages dans le lac Oubiera.	14
Figure n° 05	Technique d'ensemencement pour l'identification fongique.	17
Figure n° 06	Multi-paramètre.	20
Figure n° 07	PH mètre.	20
Figure n° 08	Mode opératoire de l'analyse bactériologique de l'eau.	21
Figure n° 09	Recherche des bactéries dans les géloses.	22
Figure n° 10	Test présomptif pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et des coliformes	29
Figure n° 11	Test confirmatif pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux.	30
Figure n° 12	Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.	32
Figure n° 13	Variation de la température en fonction des six sites de prélèvement.	33
Figure n° 14	La variation de la conductivité en fonction des sites de prélèvement.	34
Figure n° 15	la variation de pH en fonction des sites de prélèvement.	35
Figure n° 16	La variation de l'oxygène dissous en fonction des sites de prélèvement.	36
Figure n° 17	Estimation des coliformes totaux /ml dans l'eau de Lac Oubeir.	41
Figure n° 18	Estimation des coliformes totaux /ml dans l'eau de Lac Oubeira.	42
Figure n° 19	Estimation des streptocoques fécaux /ml dans l'eau de Lac Oubeira.	43
Figure n° 20	Profile biochimique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau n°01	La caractéristique du lac Oubeira.	03
Tableau n°02	les principaux critères d'identification des champignons filamenteux.	06
Tableau n°03	Description et les Caractères épidémiologies et morphologique des <i>Aspergillus</i> .	06
Tableau n°04	Les caractères cultureux et pouvoir pathogène des <i>Aspergillus</i> .	07
Tableau n°05	Les caractères morphologique et cultureux et morphologie microscopique et exigences de croissance et habitat des <i>Penicillium</i> .	09
Tableau n°06	Présentation de point du prélèvement.	14
Tableau n°07	Les résultats de l'analyse de la température des eaux de lac Oubeira.	33
Tableau n°08	Variation de la température en fonction des six sites de prélèvement.	33
Tableau n°09	Les résultats de l'analyse de pH des eaux du lac Oubeira.	34
Tableau n°10	Les résultats de l'analyse de L'oxygène dissous des eaux du lac Oubeira.	35
Tableau n°11	Observation macroscopique des colonies.	37
Tableau n°12	Observation microscopique des colonies.	38
Tableau n°13	Détermination des caractères cultureux des souches isolés à partir des milieux GN et Chapman.	39
Tableau n°14	Evaluation du nombre des coliformes totaux en fonction des sites.	40
Tableau n°15	Evaluation du nombre des coliformes fécaux en fonction des sites.	41
Tableau n°16	Evaluation du nombre des streptocoques fécaux en fonction des sites.	42
Tableau n°17	Résultat de la galerie biochimique.	44

Tableau n°18	Résultat de la galerie API 20 E de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	46
--------------	--	----

Produced with ScanTOPDF

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCPL : Bouillon lactose au porpre de bromocrésol.

°C : Degré Celsius

CF : Coliformes fécaux

CT : Coliformes totaux

Fig : Figure

g/l : Gramme par litre

h : Heure

IND : Indol

LDC : Lysine déshydrogénase.

NPP : Nombre le plus probable.

OMS : Organisation mondiale de santé.

ONPG: Ortho-Nitrophényle-B-D-Galactosidase.

PH : Potentielle Hydrogène.

PNEK : Park Natonal d'El-Kala

RM : Rouge de méthyle

S/C : Simple concentration

SF : streptocoque fécaux.

TAB : Tableau.

TDA : Tryptophane décarboxylase.

TGEA : gélose numération : Gélostryptone-glucose-Extrait de levure.

TSI : Triple Sagar Iron.

AW : Activité de l'eau.

Introduction

Produced with ScanTOPDF

Introduction générale

La région d'EL KALA est une grande réserve hydrique naturelle composée de plusieurs lacs douces et salées avec une diversité abondante de la faune et flore, elle est aussi réputée d'être l'escale prolongée des oiseaux migrateurs. Avec le temps et par mépris et inconscience, la situation en cette région est devenue alarmante avec les eaux usées qui sont déversées dans ses lacs et qui sont utilisées illicitement par les agriculteurs pour l'irrigation des cultures maraîchères comme la tomate, poivron, salade, oignon.

En effet, L'UNESCO tente par son financement, destinée spécialement pour le lac OUBEIRA de cette région à protéger ce système vitale non seulement pour préserver le réserve hydrique de l'Algérie et beaucoup plus parce que la région se situe parmi les zones humides qui sont avec les forêts tropicales les poumons de la planète.

Dans le cadre de ce travail, nous proposons de réaliser une approche d'une étude de la qualité de l'eau de Lac Oubeira, dans le but de faire l'identification fongique et l'analyse des paramètres physicochimiques

Partie théorique

Produced with ScanTOPDF

Chapitre I :
Description du site
« lac oubeira »

Produced with Scantopdf

Introduction

El kala est une zone humide, possède un parc national qui a une importance internationale (site d'hivernage d'Algérie).

I-Localisation générale

Le Lac Oubeira est situé à 4 Km à l'ouest de la ville d'El-Kala entre le Lac Mellah et le Lac Tonga à l'extrême nord-est de l'Algérie ;d'eau douce avec un profondeur maximale de 4m, et une moyenne de 1,24m, dont le fond plus ou moins plat est légèrement incliné vers le Nord, de forme subcirculaire, d'un bassin versant de 9900 ha, à 4 km de la mer à vol d'oiseau. (10)



Fig. 01 : Situation géographique du lac Oubeira dans le parc national d'EL- Kala. (10)

II- Les caractéristiques du lac Oubeira

Tab.01 : La caractéristique du lac Oubeira.

Caractéristique physique :	
Géologie, géomorphologie Et hydrologique	-Lac endoréique, d'eau douce, dont la profondeur maximale est de 4m. - Le substrat est entièrement composé d'argile. - Le Lac est alimenté essentiellement par l'Oued Messida et d'une dizaine de petits affluents des collines avoisinantes. -Lac constitue un dépôt de sédiment provenant du bassin versant(10)
Climat	-Vents dominants N. W (permanents) - Pluviométrie annuelle entre 800 mm et 1000 mm(10)
Température	- Température de l'eau varie de 8,8 à 15,2° au Mois de Janvier (10)
Qualité des eaux	- Eaux très turbides surtout en hiver -Avec un pH variant entre 8 et 10,65(10)
Caractéristique écologique	
- C'est le seul site du complexe humide de la région qui présente une organisation. -Spatiale typique en ceintures de végétation (Hélophytes) avec une importante superficie colonisée par des herbiers flottants d'hydrophytes(10)	
Valeur sociales et culturelle	
- Installation de culture arachidière sur le pourtour du Lac - Présence d'un site archéologique (Mégalthique) au Sud Est du Lac - Le Lac présente un aspect paysager ouvert (10)	
Flore remarquables	
-Ceinture d'hélophite indispensables à la nidification des oiseaux d'eau Deux Espèces rares : Châtaigne d'eau : Trapanatanes (seules station en Algérie) Nénuphar jaune: Nupharluteum(10)	
Faune remarquables (espèces rares existants dans le lac Oubeira)	
-Les oiseaux d'eau : -Les sédentaires : Blongios nain ; Poule sultane. -Les hivernais : Erismature a tête blanche ; Grande aigrette spatule blanche. -Les mammifères sont représentés par la loutre (10)	

Chapitre II :

*Détermination de paramètres physico-
chimique*

et

*Identification fongique «Aspergillus,
Penicillium»*

Produced with Scantopdf

I- Les paramètres physico-chimiques

L'appréciation de la qualité des eaux de surface se base sur la mesure de paramètres physico-chimique ainsi que sur la présence ou l'absence d'organismes et de micro-organismes aquatiques, indicateur d'une plus ou moins bonne qualité de l'eau. (06)

I-1-La couleur

La couleur permet de donner une idée sur la composition qualitative de l'eau. En fonction de la turbidité, de la présence de plancton, des matières en solution (acides humiques, fer, manganèse, rejets industriels.). (06)

I-2-La température

La température de l'eau est un paramètre pour les usagers, en mettant en évidence de contrastes de température de l'eau sur un milieu, il est possible d'obtenir des indications sur l'origine et l'écoulement de l'eau. (06)

I-3-La conductivité électrique

La conductivité, mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. Permet d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau. (06)

I-4- Le pH

Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions H^+ de l'eau. Caractérise un grand nombre d'équilibre physico- chimique et dépend de facteur multiples dont l'origine de l'eau. (10)

I-5- L'oxygène dissous

La concentration en oxygène dissous est un paramètre essentiel dans le maintien de la vie et donc dans les phénomènes de dégradation de la matière organique et de la photosynthèse. C'est un paramètre utilisé essentiellement pour les eaux de surface. (11)

II- Identification fongique «*Aspergillus, Penicillium*»

II-1-Généralités sur les champignons

Les champignons filamenteux constituent un groupe d'organismes aux propriétés intéressantes. leur culture généralement aisée, leur cycle de vie haploïde et leur temps de génération souvent court permet simplement et rapidement le criblage de mutants. (09)

II-1-1-la classification des champignons

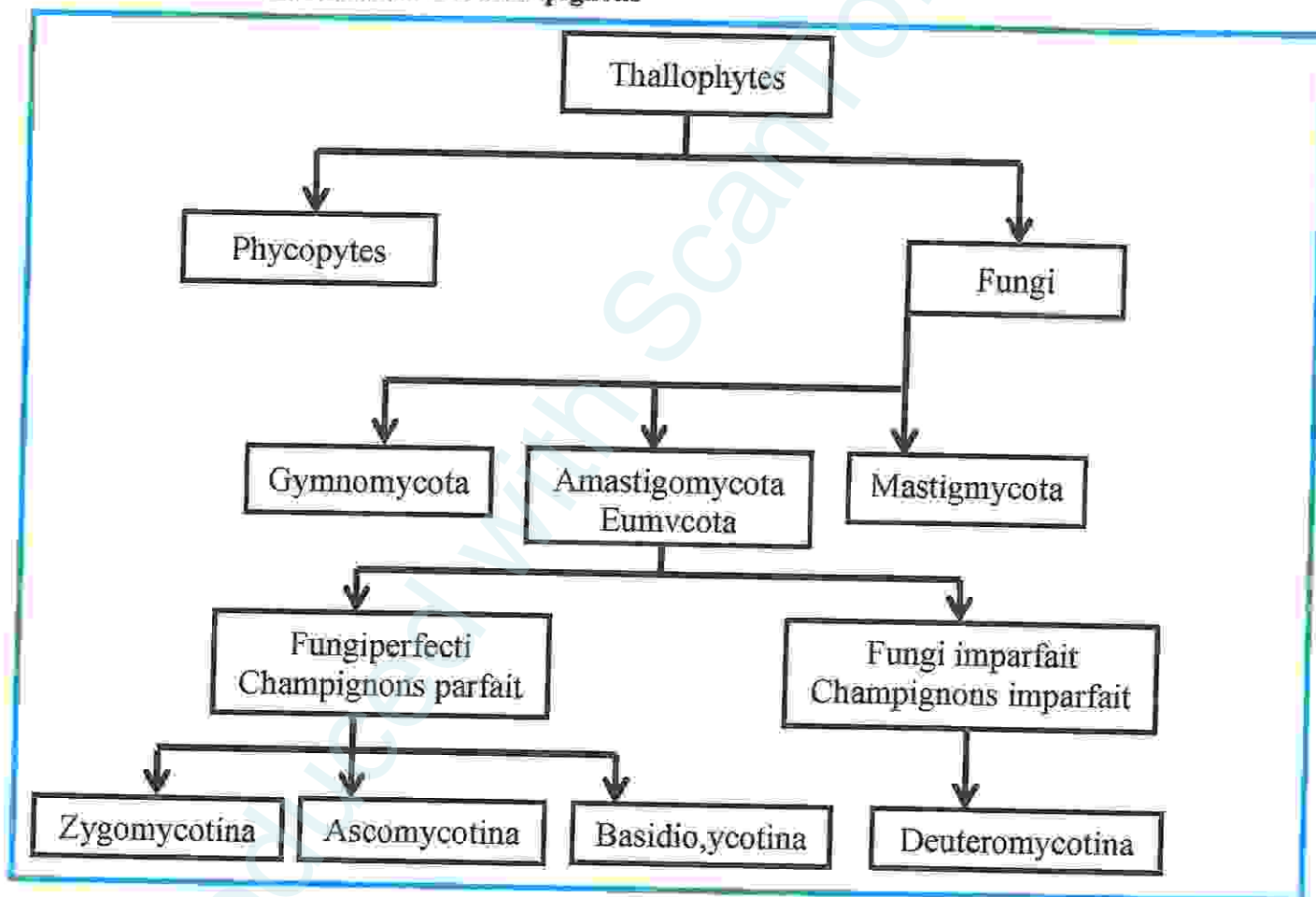


Fig.02:classification des champignons(09).

II-2-Identification des champignons filamenteux

Le milieu de Sabouraud favorise la croissance d'un mycélium des Champignons filamenteux, mais non leur sporulation. La morphologie microscopique des organes de reproduction asexuée ; Le critère majeur d'identification spécifique de ces champignons. Il est

nécessaire de repiquer les colonies sur des milieux d'identification non glucosés qui stimuleront la fructification des organes sporigènes et des spores. (13)

Tab.02 : les principaux critères d'identification des champignons filamenteux. (13)

Les critères d'identification des Champignons filamenteux
* Le délai d'apparition des colonies et la vitesse de leur croissance
* La thermo tolérance du Champignons et son optimum thermique de croissance
* Les caractères macroscopiques des colonies : forme (plane, bombée,), consistance (poudreuse, duveteuse,...), couleur (recto et verso)
*Les caractères microscopiques : mycélium (diamètre, régularité ; ramification,...), organes sporigènes (conidiophores et vésicules ;...), spores (abondance, dimensions, morphologie ;, -), ornements de mycélium (nœuds,...).

II-2-1-Le Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des moisissures à filaments cloisonnés appartenant à la famille des Aspergillaceae; la classe des Ascomycètes. Composent ce genre, parmi lesquelles *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent impliquée en pathologie humaine dans les pays tempérés. (15)

II-2-1-1-Description et les Caractères épidémiologies et des *Aspergillus*

Tab.03 : Description et les Caractères épidémiologies et morphologique des *Aspergillus*. (15)

Description et les caractères épidémiologies et morphologique des <i>Aspergillus</i>		
Caractères description	Caractères épidémiologies	Caractères morphologique
-La présence d'un thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores -non ramifiés, terminés en vésicule - phialides formées directement	- Les <i>Aspergillus</i> sont des moisissures cosmopolites - sont saprophytes de matières organiques en décomposition - ils se développent dans les silos, les composts, les céréales	-la présence de filaments conidiophores - renflés à leur sommet par une vésicule partiellement couverte de phialides fixées ou non à des métules - tout formant une entité

sur la vésicule	et diverses plantes.	spécifique	appelée «tête aspergillaire»
- conidies sèches associées en colonnes compactes, unicellulaires, de forme globuleuse ou elliptique	-Ce sont des contamineurs fréquents		

II-2-1-2-Les caractères cultureux et pouvoir pathogène des *Aspergillus*

Tab.04: Les caractères cultureux et pouvoir pathogène des *Aspergillus*. (15)

caractères cultureux	pouvoir pathogène
-les <i>Aspergillus</i> présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud)	Certaines espèces d' <i>Aspergillus</i> sont des pathogènes opportunistes; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...) ou générales.
-Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates formées de courts filaments aériens, blancs	
-la majorité des <i>Aspergillus</i> se multiplient à 22-25°C; les espèces thermophiles (<i>A. fumigatus</i>) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C	
-Les <i>Aspergillus</i> forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses.	

II-2-1-3- Caractères macroscopiques et microscopiques

Les caractères phénotypiques à apprécier sont la taille, la texture la couleur des colonies; le milieu de culture utilisé milieu Sabouraud.

➤ Caractères macroscopiques

Le conidiophore est court, lisse, incolore et se termine par une vésicule en forme de massue dont la taille varie entre 20 et 30 µm. les phialides en forme de bouteille col rétréci,

parallèles, sont disposées directement sur la vésicule. Les conidies sont globuleuses, échinulées, de taille homogène (2.5 à 3 µm) et pigmentées en gris-vert à maturité. (14)

➤ Caractères microscopiques

A l'aide de la coloration qui fait apparaître les éléments fongiques en rouge-rosé, les filaments aspergillaires, septés, ont un diamètre assez constant et présentent des dichotomiques régulières. Des têtes aspergillaires sont parfois observées dans certaines lésions. Les filaments fongiques apparaissent en mauve. (14)

II-2-1-4-potentiel toxigène

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines, telle que : *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. (16)

II-2-1-5-Exigences de croissance

Les températures minimales de croissance pour *A. niger* sont 6-8°C, les maximales, 45-47°C, et les optimales, 35-37°C. *A. niger* est xérophile : la germination se produit l'aw de 0.77 à 35°C. Entre pH 4.0 e 6.5, les variations de croissance sur les milieux NaCl ou glycérol sont minimales. *A. niger* peut se développer à un pH aussi bas que 2,0 si l'aw est élevés. (16)

II-2-2-Le Genre *Penicillium*

Appartenant aux champignons filamenteux avec un phylum des Ascomycètes. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées. (08)

II-2-2-1-Identification fongique du genre *Penicillium*

Le tableau 05 permet de détecter la morphologie ; les caractères cultureux et la nutrition des *Penicillium*.

Tab.05 : Les caractères morphologique et culturaux et morphologie microscopique et exigences de croissance et habitat des *Penicillium*. (08)

Habitat	-Les <i>Penicillium</i> retrouvés dans le sol, sur les végétaux en décomposition et le compost de même que sur le bois, les produits alimentaires secs, les céréales, les fruits frais et les légumes
Caractères morphologique	-Les colonies, duveteuses ou poudreuses, à croissance rapide, sont généralement vertes ou plus rarement blanches - Les conidiophores isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien définies, simples ou ramifiés ; Les conidies sont disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques.
Caractères culturaux	-Les <i>Penicillium</i> se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. -Après 2-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu.
Morphologie microscopique	Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. -Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés - Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores.
Exigences de croissance	Les <i>Penicillium</i> sont des mycètes mésophiles pouvant croître entre 5 et 37°C (température optimale de 20-30°C) à un pH de 3-4,5. La croissance est optimal <i>in vitro</i> à 23 °C, à un pH de 3-4,5. Activité de l'eau : Aw =0,78-88 {808}

II-2-2-2-Pouvoir pathogène

Les champignons sont des contaminations fréquemment isolés au laboratoire. Par contre les *penicilliums* sont très rarement incriminés en pathologie animal et humaine, la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C.

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires des espèces de (*Penicillium*) sont responsables de Kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe), d'onychomycose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes. (13)

III- La condition favorable de la culture fongique

III-1-*Aspergillus*

❖ Sur milieu Czapek (pH 7.5-8)

Colonies à croissance rapide au départ, vert jaune au centre et blanc avec aspect translucide vers les bords. Le revers est incolore. Absence d'exsudat et de pigment soluble. Le pH du milieu est basidifié (pH final 7,5-8). (09)

III-2-*Penicillium*

❖ Sur milieu Czapek (pH 6.5)

Colonies filamenteuses légèrement blanches croissance rapide, atteignant 3-4 cm de diamètre en 7 jours. Le revers du rose pâle au brun-orangé. Emanation d'une forte odeur aromatique sur les cultures âgées. Il y a une légère basification du milieu au cours de la croissance (pH final 6,5). (08)

IV-Variation de la température

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance, la germination et la sporulation des champignons, mais aussi sur leur métabolisme.

En effet l'influence de la température sur les moisissures est complexe. En particulier, les températures extrêmes de croissance, de germination et de sporulation peuvent être très différentes. (19)

Les moisissures sont généralement mésophiles : la croissance des hyphes est optimale à 20-25°C. En dehors de cet intervalle de température les hyphes se développent plus lentement.

Les spores de moisissures mésophiles ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à -20°C. (13)

Les espèces thermophiles sont les rares. C'est le cas de l'*Aspergillus flavus*. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35°C, mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C. (16)

V-Composition biochimique de la biomasse fongique

Les résultats d'analyse de la biomasse obtenue dans des conditions optimales relèvent des taux qui s'échelonnent de 32,63 % à 38,64 % de protéines totales ; 2,25 % à 7,10 % de matières grasses ; 45,88 % à 56,64 % de glucides et de 6% à 10,31 % de cendres selon l'espèce et le type de culture.

On évalue les protéines à partir de l'azote qu'elles contiennent. Les protéines totales sont déterminées par la méthode de Kjeldahl avec multiplication de Nx6, 25.

Les protéines totales enregistrent les taux suivants 32,36 % ; 38,36 % ; 36,38% ; 35,11% ; 35,64 % et 36,23% respectivement pour les cultures *Aspergillus niger*. (17)

Chapitre III :
La pollution des eaux

Produced with ScanTOPDF

Introduction

La pollution de l'eau est une altération qui rend leur utilisation dangereuse et perturbe l'écosystème aquatique, elle peut concerner les eaux superficielles (rivières, plans d'eau) et les eaux souterraines. Elle perturbe aussi les conditions de vie de la flore et la faune aquatique et compromet les utilisations de l'eau et de l'équilibre du milieu aquatique.

Elle a pour origines principale :

- L'activité humaine.
- Les industries.
- L'agriculture.
- Les décharges de déchets domestiques et industriels. (06)

I- Les effets de la pollution sur les eaux de surface

- ❖ une diminution de la teneur en oxygène dissous.
- ❖ La présence de produit toxiques.
- ❖ Une prolifération d'algues.
- ❖ Une modification physique du milieu récepteur.
- ❖ La présence de germes pathogène. (06)

II- Les différents types de pollution

La pollution des eaux peuvent être retenues :

- la pollution thermique.
- la pollution par des matières organiques.
- la pollution d'origine agricole.
- la pollution bactériologique.
- la pollution radioactive. (06)

III- Les indicateurs microbiologiques de la pollution (la pollution bactériologique)

La majorité des microorganismes pathogènes (virus, bactéries, ou protozoaires pouvant causer des maladies) susceptibles de se trouver dans l'eau proviennent de déjections humaines ou animales. Comme il est techniquement impossible de faire l'analyse de tous les pathogènes, on utilise plutôt des indicateurs microbiologique qui sont en soi sans danger: les bactéries coliformes totales, les bactéries entérocoques et les bactéries *E. coli*. (05)

III-1-Les coliformes totaux

Ils constituent un groupe hétérogène de bactéries d'origine fécale (dont les bactéries *E. coli*.) et environnementale. En effet, la plupart des espèces peuvent se trouver naturellement dans le sol et la végétation. Leur présence dans l'eau n'indique généralement pas une contamination fécale ni un risque sanitaire, mais plutôt une dégradation de la qualité bactérienne de l'eau. Cette dégradation peut être attribuée entre autres à une infiltration d'eau de surface. L'analyse des coliformes totaux permet donc d'obtenir de l'information sur la vulnérabilité possible d'un puits à la pollution de surface (05)

III-2-Les bactéries entérocoques

Ils sont moins abondantes dans la flore intestinale des humains et des animaux que les bactéries *E. coli* et certaines espèces ne sont pas d'origine fécale. La détection de bactéries entérocoques dans l'eau de surface indique une contamination fécale *E. coli*.

Ils font partie du groupe des coliformes fécaux. C'est une espèce très abondante dans la flore intestinale humaine et animale, et c'est aussi la seule qui soit strictement d'origine fécale. Les bactéries *E. coli* sont considérées comme le meilleur indicateur de contamination par une pollution d'origine fécale et qu'elle donc contenir des microorganismes pathogènes. (05)

Partie pratique

Produced with ScanTOPDF

Chapitre IV :
Matériel et Méthodes

Produced with ScanTOPDF

Pour le suivi de l'analyse physicochimique et bactériologique des eaux du lac Oubeira, nous avons choisi six sites de prélèvement. (Fig.03)

➤ **Présentation des points de prélèvement**

Tab.06 : Présentation de point du prélèvement.

Site	Date de prélèvement	Heure de prélèvement
Site 1	19 mars 2013	10 :33 h
Site 2		10 :50 h
Site 3		11 :05 h
Site 4		11 :20 h
Site 5		11 :35 h
Site 6		11 :50 h



Fig.03 : Présentation de point du prélèvement.

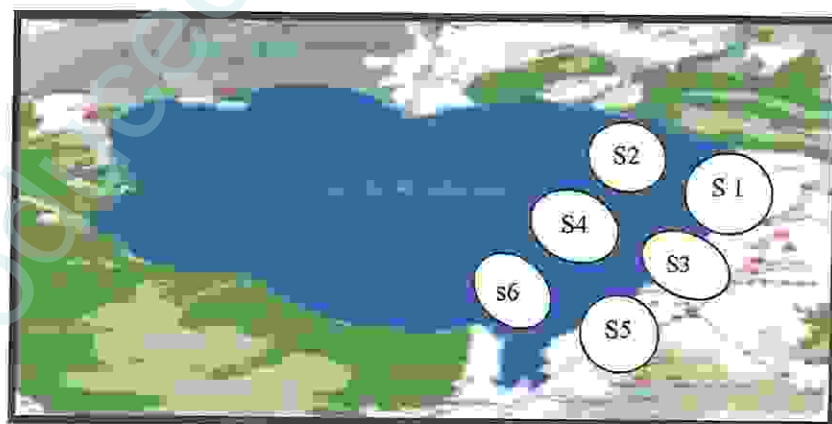


Fig.04: localisation des stations d'échantillonnages dans le lac Oubiera. (10)

L'eau est l'élément grâce auquel se maintient la vie. L'importance de l'eau se développe dans l'économie humaine ne cesse de croître et l'approvisionnement en eau douce devient de

plus en plus difficile tant en raison de l'accroissement de la population humaine que du développement accéléré des techniques industrielles modernes. (01)

Notre études a été fois pas l'utilisation du matériel et méthode suivant :

I-L'échantillonnage

I-1-Prélèvement des échantillons

L'étude a été effectuée sur 6sites différents sur Lac oubeira pour obtenir des différents résultats.

Les échantillons ne doivent pas contaminés on utilise des flacons de 250ml en verre bien stérilisé à four pasteur pendant 30minutes à 180°C. On prélève 6 échantillons de chaque site étude, l'ouverture et la fermeture des flacons se fait dans l'eau à une profondeur de 25à30cm de manière à éviter de les remplir totalement. (01)

I-2-Transport des échantillons

Les échantillons sont mis dans une glacière (4°C) et transportés jusqu'au laboratoire dans la même journée. (01)

I-3.Stérilisation des milieux

La stérilisation destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu, est réalisée dans un autoclave par la vapeur d'eau sous pression, à haute température, elle est habituellement pratiquée à 120 pendant 20 minutes. (01)

II- L'identification fongique

II- 1-Coulage des boites

Les différents milieux de cultures utilisés : **Sabouraud ; Czapek simple ; Czapek concentré** et **TGEA** (Tryptone-Glucose-Extrait de levure-Agar) sont couler dans des boites de pétries, laisser refroidir. (04)

II-2-Préparation des dilutions

➤ But

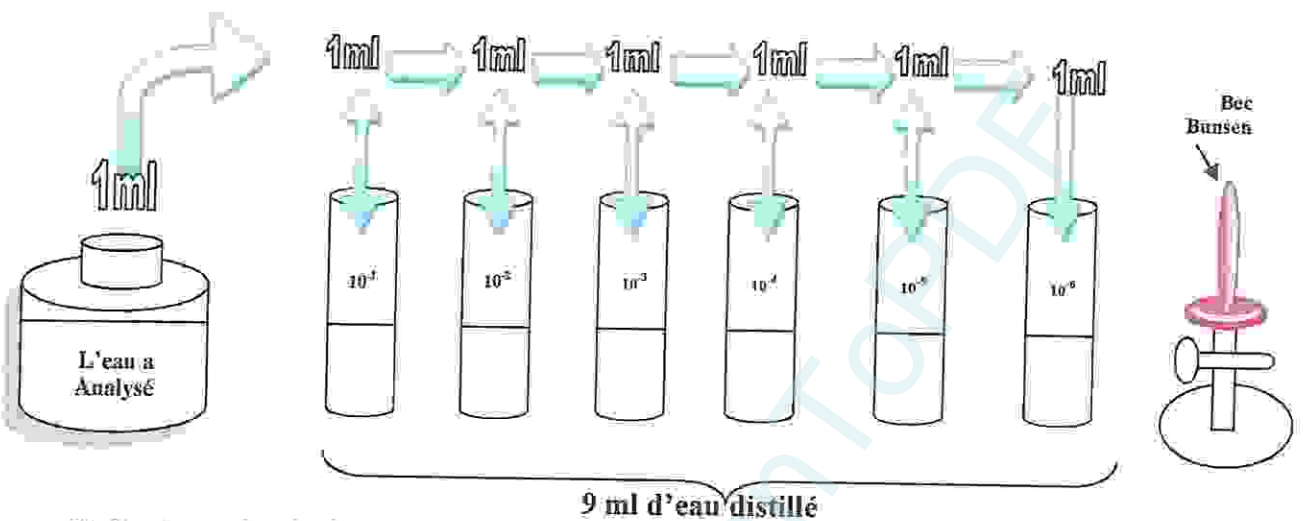
La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon d'eau à analyser, a pour but un isolement des colonies séparées.

➤ Principe

La dilution décimale consiste à diminuer la densité de l'eau en micro-organismes, d'abord à 1/10 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de l'échantillon mère au facteur de 10^{-6} .

➤ Mode opératoire

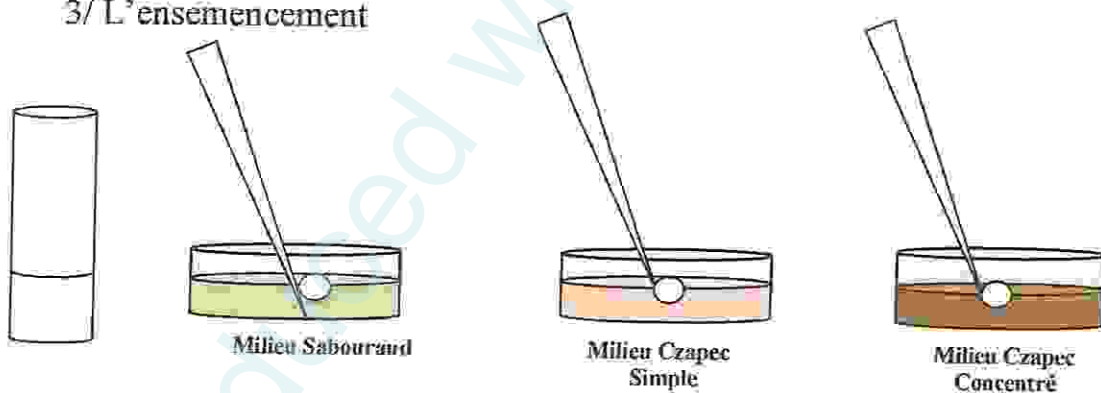
1/ La préparation des dilutions



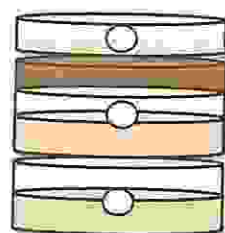
2/ Coulage des boîtes



3/ L'ensemencement



4 / L'incubation



L'incubation de toutes les boîtes ensemencées dans l'étuve à des températures différentes : 37°C

Fig.05 : Technique d'ensemencement pour l'identification fongique. (04)

A l'aide d'une pipette graduée ; prélever 1ml d'échantillon mère, puis l'ajouter à 9ml d'eau distillé dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-2} par rapport à l'échantillon mère.

Prélever 1ml de la suspension 10^{-1} agitée à l'avance par une pipette Pasteur et diluer dans un second tube à essai contenant 9ml d'eau distillé. (04)

II-3- Ensemencement et incubation

L'ensemencement s'effectue par l'addition d'une goutte (équivalent à 1 ml) de l'échantillon. Par une pipette pasteur à la surface d'une boîte de pétrie coulée d'un milieu suivi d'un étalement à l'aide d'une anse de platine.

Toutes les boîtes ensemencées sont incubées à des températures allant de 28°C à 37°C.

L'incubation se fait dans une étuve, les boîtes qui sont destinées à la température ambiante sont rangées sur la paillasse du laboratoire car la température de mois d'avril et les écarts de température entre le jour et la nuit sont très faibles. (04)

II-4-Lecture

La lecture de culture se fait tous les jours à partir du troisième afin de noter les caractéristiques des colonies et suivre leur cycle, ce qui nous aide à les identifier.

❖ Aspect macroscopique

- ✓ Caractères culturaux (aspect du thalle).
- ✓ Couleur du thalle.
- ✓ Couleur du revers.
- ✓ Exsudat : présence ou absence.
- ✓ Odeur : présence ou absence.

❖ Aspect microscopique des colonies

- ✓ Organes de fructification.
- ✓ Aspect et taille de spores.
- ✓ Couleur des spores.
- ✓ Disposition des spores. (03)

II-5- Analyse microbiologique**❖ Fongique**

Cette étape consiste à décrire les spécificités morphologie détaillées qui font, à côté des caractères culturaux et comportementaux, les critères d'identification des champignons. (02)

❖ Principe

La préparation microscopique consiste à choisir un fragment mycélien à partir d'un site de prélèvement, sur le thalle, intermédiaire du mycélium juvénile à la marge et le vieux mycélium au centre ceci permet le visionnement idéal des appareils sporifères. Le matériel biologique fongique est préparé pour l'observation sous microscopie photonique, aux différents grossissements. (02)

II-6-Examen à l'état frais

Permet l'observation des champignons vivants en l'absence de toute coloration.

- La morphologie des champignons.
- Leur mode de regroupement et leur structure. (02)

➤ La technique

Prélever à l'aide d'une anse de platine un fragment de mycélium de la culture qu'on dépose entre lame et lamelle propres.

L'observation effectuée avec le microscope optique à grossissement (X10 et X40).

II-7- Examen après coloration

Indispensable pour la morphologie et la structure des champignons.

Les préparations colorées peuvent se conserver longtemps pour d'autres résultats valables en microscope optique. En utilisant la coloration simple. (02)

II-7-1-Préparation des frottis

Les frottis destinés à la coloration doivent être étalés en couches minces régulières, séchés et le plus souvent fixés.

➤ Coloration simple (bleu de méthylène)

1- Réactif : bleu de méthylène.

2- Technique

*Recouvrir le frottis et le fixer avec le bleu de méthylène.

*Laisser agir de 1 à 3 minutes selon la force de la solution colorante.

*Laver puis sécher délicatement avec un papier filtre fin.

*Addition de l'huile de cèdre.

*Examiner à l'inversion (X 100). (02)

III-Analyse physico-chimiques

III-1- Mesure de la température

La mesure de la température de l'eau est réalisée à l'aide d'un Multi-paramètre de type : (Multi 1970 i)

L'immersion de la sonde de l'appareil de mesure dans l'eau durant suffisante pour que la valeur affichée soit stabilisée. Ainsi on procédera lecture en laissant la sonde dans l'eau. (01)

III-2-Mesure de la conductivité

La mesure de la conductivité a été réalisée d'un Multi-paramètre de type : (Multi 1970 i), qui comprend une sonde de type : (Tetra Con[®] 325)

La sonde de la conductimètre est rincée à plusieurs reprises avec de l'eau déminéraliser puis deux fois au moins avec l'eau à examiner. Avant d'effectuer la mesure de la conductivité. (02)

III-3-Mesure d'oxygène dissous

Le mesure de l'oxygène dissous dans l'eau est réalisé à l'aide d'un Multi-paramètre de type : (Multi 1970 i), qui comprend une sonde de type : Oxi Cal[®] - SL

L'immersion de la sonde de l'appareil de mesure dans l'eau était d'une durée suffisante pour que la valeur affichée soit stabilisée. Ainsi on procédera lecture en laissant la sonde dans l'eau. (02)



Fig.06: Multi-paramètre.

III-4- Mesure de pH

Le paramètre a été mesuré à l'aide d'un pH mètre électronique de type : pH mètre de terrain W TW 197i (2.00 à 19.99 pH) .Composé d'une électrode de verre.

On fait prolonger dans l'eau l'électrode de verre et on ne procède a la lecture qu'après la stabilisation du pH mètre ce qui prendre plusieurs minutes. (02)

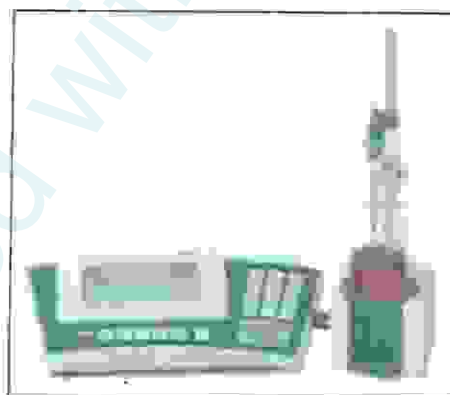


Fig.07: PH mètre.

IV-Préparation des matériels bactériologiques pour l'étude microscopique « l'étude bactériologique »

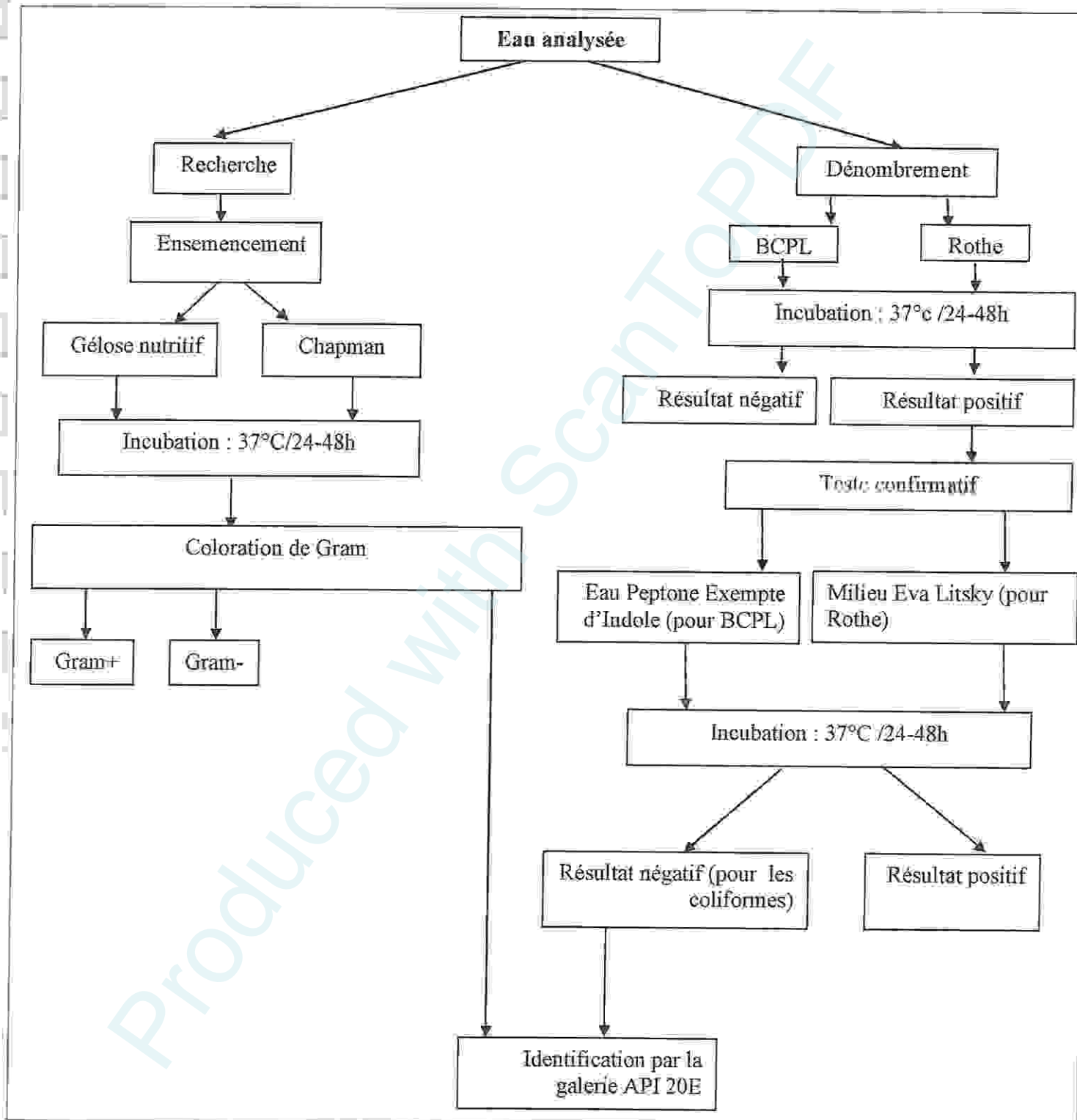


Fig.08: Mode opératoire de l'analyse bactériologique de l'eau. (01)

IV-1- Méthode d'ensemencement sur gélose

Les milieux de culture utiliser sont : Chapman, gélose nutritive, L'ensemencement par stries sur boîtes de pétris est pratiqué le plus souvent dans le but d'isolement. L'inoculation est prélevée directement à partir de l'eau à analyser est déposée sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface. Les boîtes sont codées puis incubées à 37°C pendant 24-48 heures. (04)

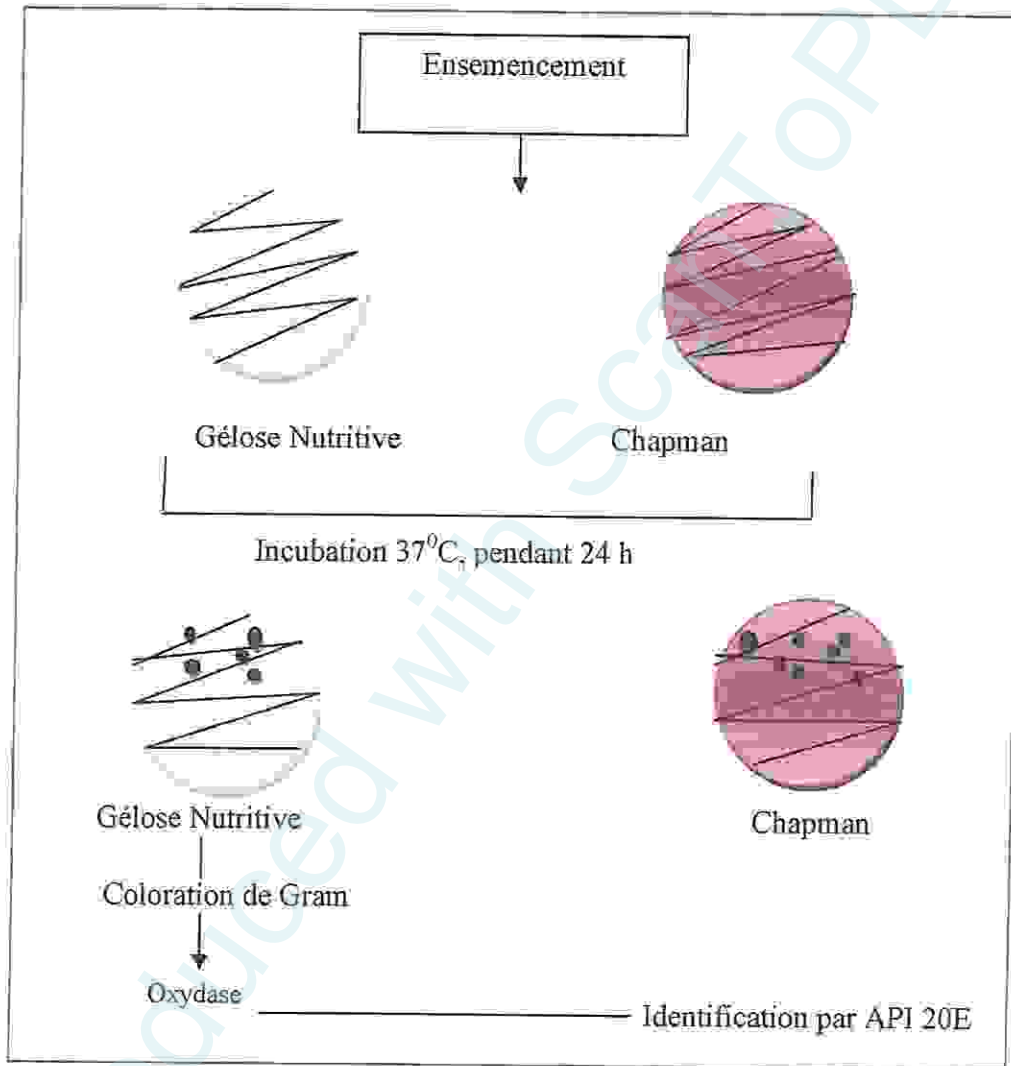


Fig.09: Recherche des bactéries dans les géloses. (04)

IV-2- Examens microscopique

A partir des colonies suspectes isolées sur les milieux de culture précédents, nous avons réalisé une coloration de Gram. (01)

IV-2-1- Coloration de Gram

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue selon les étapes suivantes :

- Préparation d'un frottis bactérien
- Coloration par le violée de Gentiane : laisser agir la solution de cristal violet pendant 1mn puis laver la lame avec l'eau.
- Mordantage : laisser agir le lugol pendant 1mn puis rinçage avec l'eau.
- Décoloration : recouvrir la lame avec l'alcool pendant 30 secondes, lavé avec l'eau.
- Recoloration : laisse agir la solution de fushine pendant 30 à 40 secondes laves l'eau et enfin sécher. (01)

IV-2-2- Etude et caractères biochimiques

IV-2-2-1- Réalisation d'une galerie biochimique classique

La galerie est composée de trois milieux solides et autres liquides:

➤ Les milieux liquides

L'ensemencement s'effectue par:

- Prélèvement une colonie sur milieu gélosé à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie.
- Inoculer les bouillons (Clarck et Lubs, Bouillon nitrate et milieu d'eau peptonée exempte d'indole), et incubé à 37°C pendant 24 heures. (03)

✓ Recherche de l'enzyme nitrate-réductase

La réduction des nitrates se cherche habituellement par la mise en évidence des nitrites da une culture de bouillon nitrite. Si la réaction est négative ; deux éventualités :

- Les nitrates sont réduit en nitrites, mais la réduction s'est poursuivie jusqu'au stade ammoniacque et gazeux.

- Les nitrates n'ont pas été réduits, et se trouvent encore dans le bouillon. (03)

▪ **Technique**

Ajouter 1 ml d'une suspension bactérienne dans bouillon nitraté, ajouter une goutte des réactifs de Griss et mélanger ; incubation 37°C / 24h.

Si le milieu devient rose rouge (présence de nitrate) la culture est nitrate réductase positive. (03)

✓ **Recherche de l'acétone**

La culture s'effectue dans le milieu Clark et Lubs, incubé après inoculation pendant 24 h à 37°C, l'acétone est mise en évidence par addition de VP18 et VP11, la réaction positive se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge. (03)

Recherche de l'indole

On recherche la production d'indole par les bactéries dans des cultures de 24 heures en eau peptone. Son apparition se traduit par une coloration rouge (anneau rouge à la surface) en présence de réactif Kovax. (02)

➤ **Les milieux solides**

✓ **Utilisation de citrate**

A l'aide d'un fil de platine préalablement flambé et refroidi, on effectue la culture présente sur le milieu solide ou la bactérie a été isolée, ensemercer en ligne centrale sur le milieu de Simmons et incubé à 37°C pendant 24 heures. Lorsque le test positif il y a alcalinisation, levirage de couleur de milieu vers bleu. (04)

✓ **Estimation de la mobilité**

Ensemencer le milieu de mannitol mobilité par pique centrale et incubé 37°C pendant 24 heures. Ce milieu permet d'apprécier à la fois la mobilité d'une bactérie et la fermentation de mannitol qui devient jaune après dégradation de mannitol. (04)

✓ **Utilisation des hydrates de carbone**

Le milieu Triple Sager Iron (TSI) est utilisé pour l'identification rapide des Entérobactéries ; et permet de mettre en évidence :

- La fermentation de saccharose, de glucose (avec ou sans production de gaz) et plus précisément du lactose.
- la production d'Hydrogène sulfureux (H_2S) à partir de la cystéine : acide aminé.
- L'ensemencement de milieu s'effectue par stries au surface tout le long de la pente, puis par piqure centrale au niveau de culot ; l'incubation se fait à $37^\circ C$ /24 h. (04)

IV-2-2-2- Identification biochimique

➤ La galerie API 20 E.

✓ But

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des enterobacteriaceae et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés ainsi qu'une base des données. (01)

✓ Principe

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant deshydratés. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20 E. (01)

✓ Mode opératoire

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir tubes et capsules des tests : CTI, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les capsules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H_2S en remplissant leur cupules avec l'huile de sèder
- Renfermer la boîte d'incubation, coder et placer à $37^\circ C$ pendant 18 à 24 heures. (01)

✓ Lecture

Reporter sur la fiche d'identification tous les résultats spontanés. Vérifier si le test glucose est positif et/ou si trois tests ou plus sont positifs. Révéler les tests nécessitant l'addition ou l'ajout de réactifs.

- **Test VP** : ajouter une goutte de réactifs VP1 et VP2 attendre au minimum 10 minutes ; aucune virage de couleur n'indique une réaction négative.
- **Test TDA** : ajouter une goutte de réactif TDA le no virage de couleur qu'indique que la réaction est négative.
- **Test IND** : ajouter une goutte de réactif de Kovax la non formation d'anneau rouge indique une réaction négative.

Lire les résultats, réunir en un profil numérique de 07 chiffres et identifier à l'aide du catalogue API 20 E0. (01)

IV-3-Dénombrement des bactéries coliformes (Recherche et dénombrement des coliformes)**IV-3-1-Test présomptif « dénombrement en milieu liquide sur BCPL »****➤ Généralité**

Un échantillon d'eau à analyser ou à un certain volume de l'une de ses dilutions est introduit dans un tube de milieu de culture liquide. Puis après l'incubation à température appropriée, le tube est examiné ; s'il est trouble c'est qu'une contamination dont la spécificité du milieu permettait la croissance. En principe une cellule suffit à troubler le milieu.

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

- Elle permet des quantités importantes d'eau.
- Elle est plus favorable à la multiplication des microorganismes que la culture sur support solide. (01)

➤ Principe

Selon la technique du nombre le plus probable (NPP), nous réalisons trois séries logarithmiques, Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. (01)

➤ Mode opératoire

Nous prendrè 2 tubes de BCPL (bouillon Lactosé au pourpre de bromocrésol), simple concentration, munis d'une cloche de Durham à raison de 9 ml pour la série 1, 3 tubes pour la série 2, et 5 tubes pour la série 3, pour chaque dilution après l'avoie homogénéisée soigneusement, par l'aide d'une pipette pasteur stérile et la maintenir pour chaque tube de série 1 ;

- Prélaver 1ml d'eau à analyser dans chaque tube de la série 2 ;
- Prélaver 1ml d'eau à analyser dans chaque tube de la série 3, et ainsi de suite jusqu'au la dilution (10^{-6}). (01)

➤ **Lecture**

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- 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 production de gaz traduite par le soulèvement de la cloche de Durham introduit dans le milieu (au moins 1/10 de la cloche devra être vide).

Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites. (01)

IV-3-2-Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo-tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*. Les Coliformes thermo-tolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C. Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage dans tube contenant le milieu Schubert (milieu indole mannitol) muni d'une cloche de Durham.

-Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et mélanger le milieu et l'inoculum.

-L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures. (01)

➤ **Lecture**

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

- Un dégradation gazeuse.
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole (anneau en rouge en surface) par *E. coli* après adjonction de 2à3 gouttes de réactif de Kovax.

- la suite, on note le nombre des tubes positifs et on exprime le résultat selon la table de Mac Grady. (Annexes) pour déterminer le nombre le plus probable (N.P.P) de coliformes fécaux par 100ml d'échantillon. (01)

Produced with ScanTOPDF

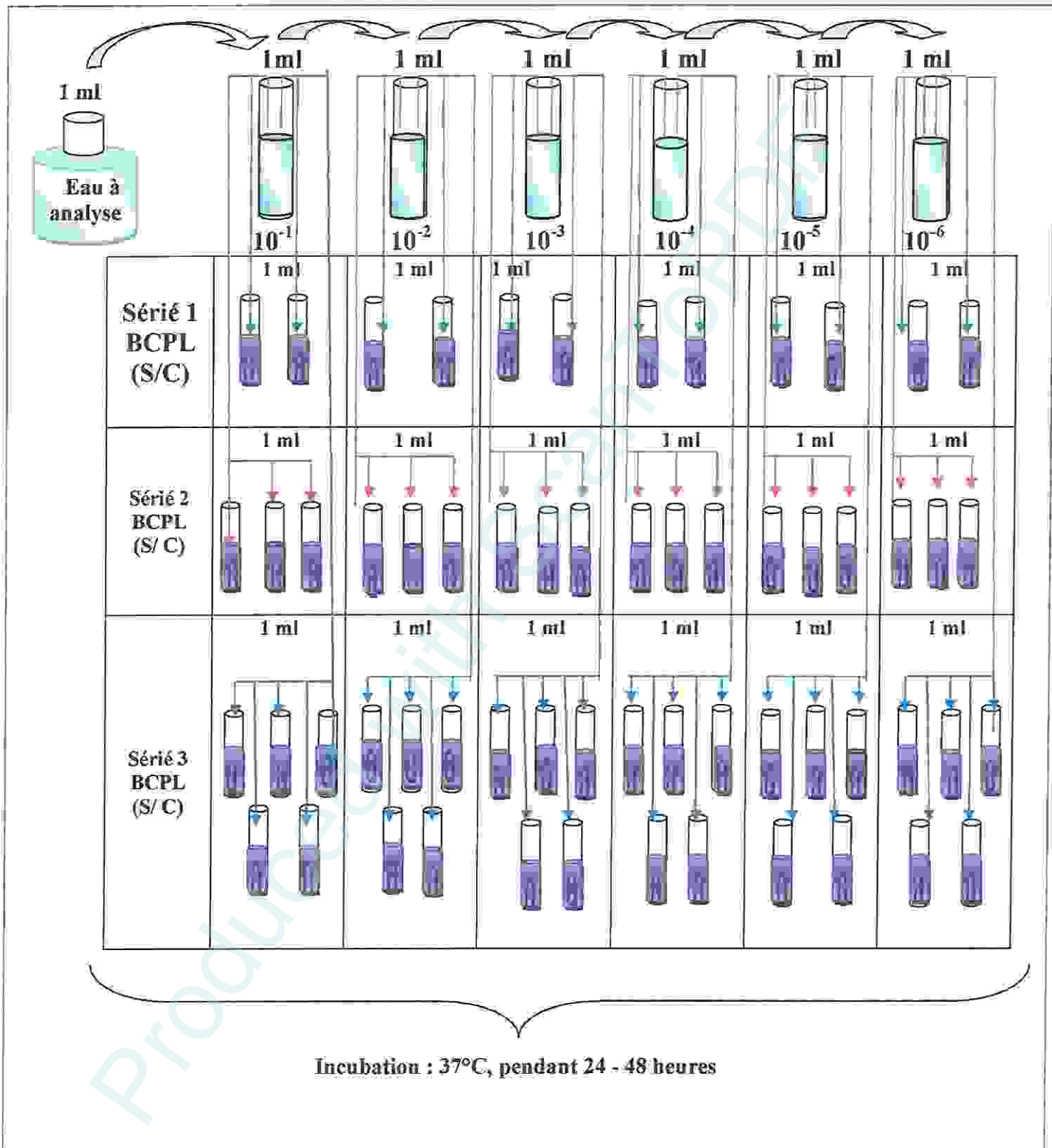


Fig.10: Test présomptif pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et des coliformes

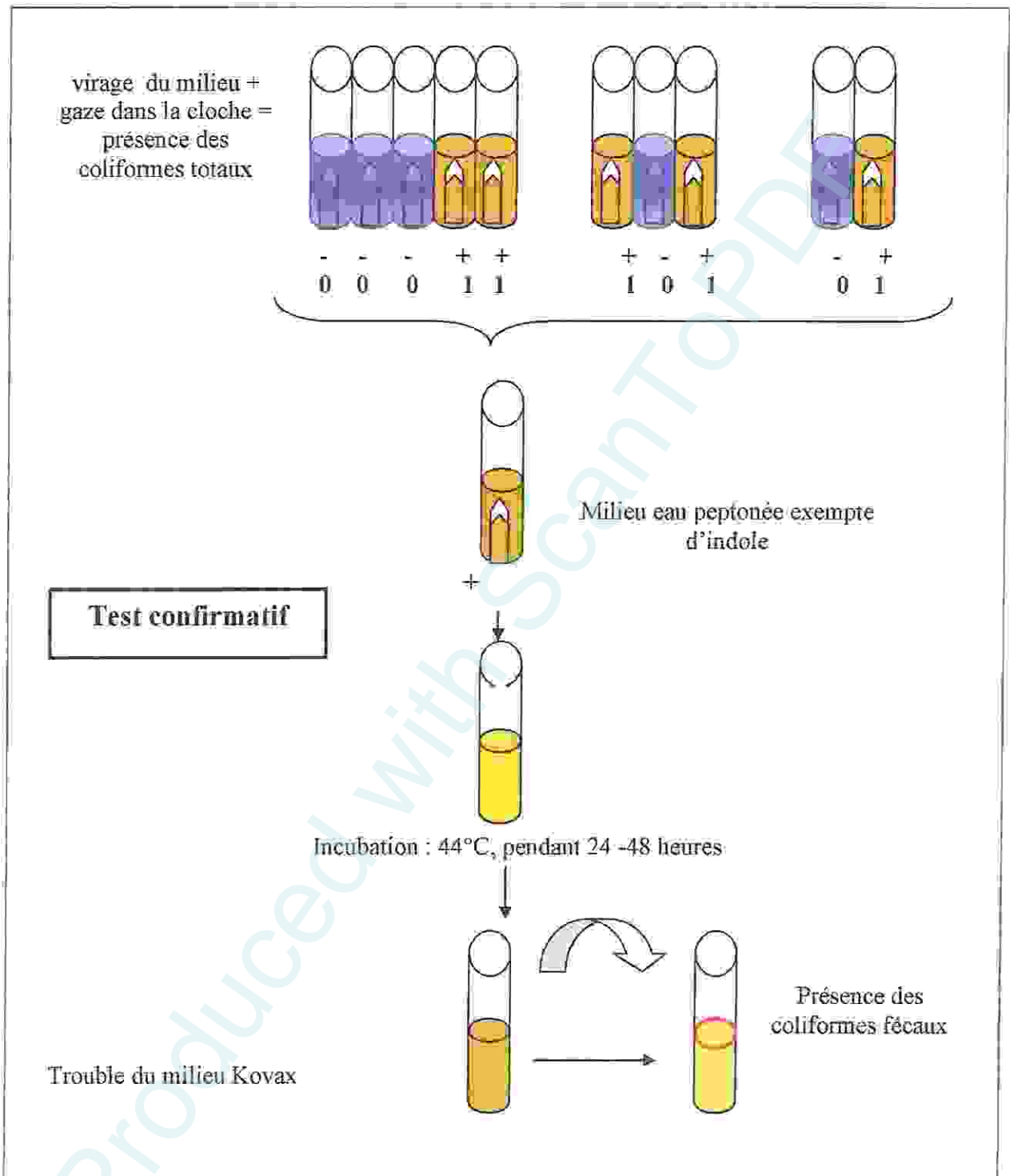


Fig.11: Test confirmatif pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux coliformes fécaux.

IV-4-Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

Anciennement la législation parlait de « streptocoques fécaux » ou streptocoques du groupe « D » de la classification de LanceField, ou encore les entérocoques intestinaux, sont des bactéries qui se présentent sous forme de Cocci à Gram positive, sphérique ou ovoïdes formant des chainettes, ne possédant pas de catalase mais possédant l'antigène du groupe D. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies caractéristiques réduisant le TTC et qui de plus hydrolysent l'esculine en 2 heures à 44°C. (03)

Les Streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide à l'aide de deux bouillons de culture (milieu de Rothe et le milieu Eva Litsky). Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs à savoir : test de présomption suivi du test de confirmation. (03)

IV-4-1-Test présomptif

L'inoculation du milieu de culture s'effectue comme le cas précédent pour le milieu BCPL. Le dénombrement est réalisé en milieu liquide sur bouillon glucosé à l'azoture (Rothe). L'incubation des tubes ensemencés s'effectue dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Les tubes présentant un trouble microbien seront considérés comme positifs. (04)

IV-4-2-Test de confirmation

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption. La présence de streptocoques se traduit par un trouble plus ou moins important et la formation d'une pastille violette au fond du tube. Les tubes de milieu Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage dans tube contenant le milieu Eva Litsky (bouillon à l'éthyle violet et aide de sodium), l'incubation se fait cette fois-ci à 37°C, pendant 24 heures. (04)

➤ Lecture

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.
- La lecture finale s'effectue également selon l'ultration de la table du Mac Grady (04)

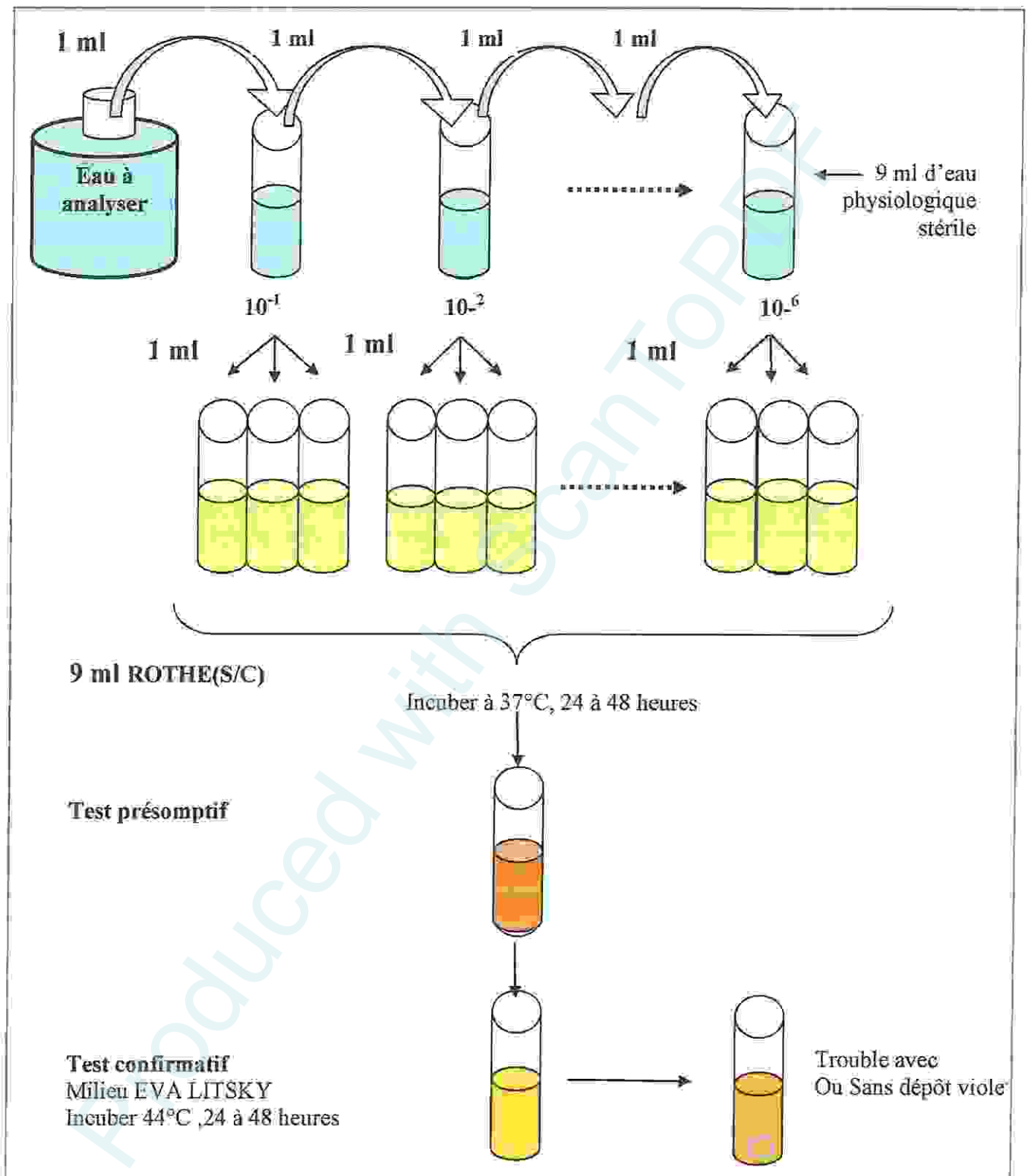


Fig.12: Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.

Chapitre V :

Résultats et discussion

Produced with ScantOPDF

I-Résultats Analyse physico-chimique des eaux du lac Oubeira

I-1-La température (T°)

La température d'une eau douce, varie de 2 à 30 °C sont sensibles à la variation de la température.

Tab.07: Les résultats de l'analyse de la température des eaux de lac Oubeira.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
T (°C)	18	18,1	18,4	16,8	17,8	17,7

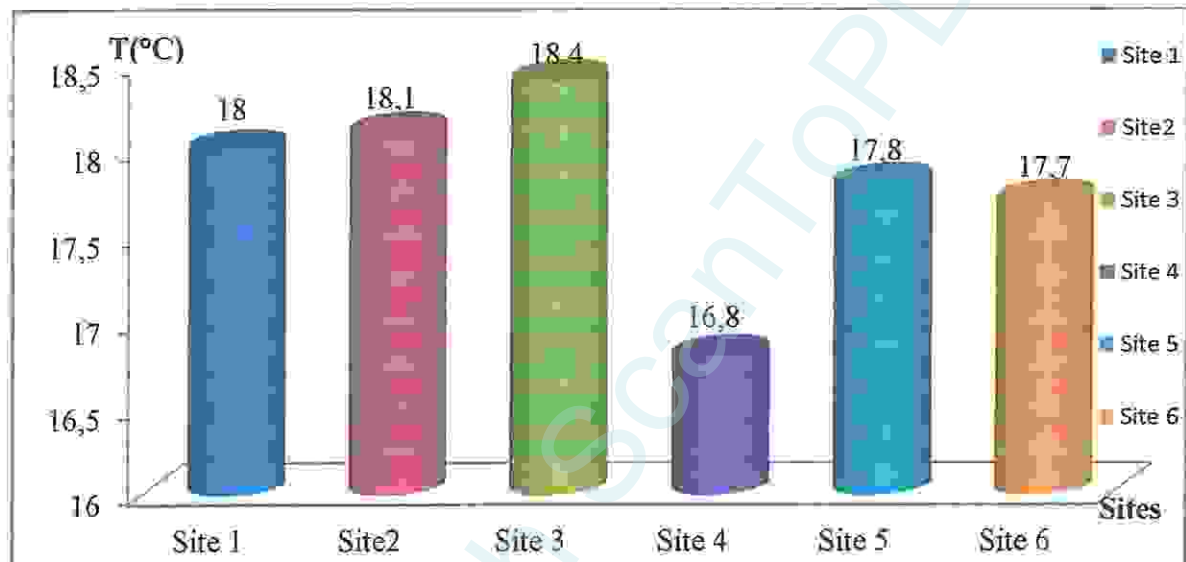


Fig.13 : Variation de la température en fonction des six sites de prélèvement.

Selon nos résultat on observe une perturbation à partir du site (3) avec une valeur de 18.4°C jusqu'à le site (6) avec une valeur (17.7°C) qui ce exprime la variation. (06)

I-2-La conductivité (X)

La minéralisation de l'eau est influencée par la conductivité, et des modifications importantes de la conductivité peuvent intervenir rapidement au cours de la journée.

On peut admettre que la situation est particulière ou anormale au-delà de 2000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (Ces valeurs sont les valeurs guides de l'OMS), et à partir de 1500 $\mu\text{s}/\text{cm}$, on peut considérer que les eaux de lac Oubeira ne sont pas réutilisables dans les irriguées. (06)

Et on note que nos résultats obtenus comprennent entre 822 et 832 $\mu\text{s}/\text{cm}$ donc la minéralisation du lac est importante, et le site six (832 $\mu\text{s}/\text{cm}$) contient plus de sels minéraux que les autres sites.

Tab. 08: Les résultats de l'analyse de conductivité des eaux du lac Oubeira.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Conductivité ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	824	828	822	830	826	832

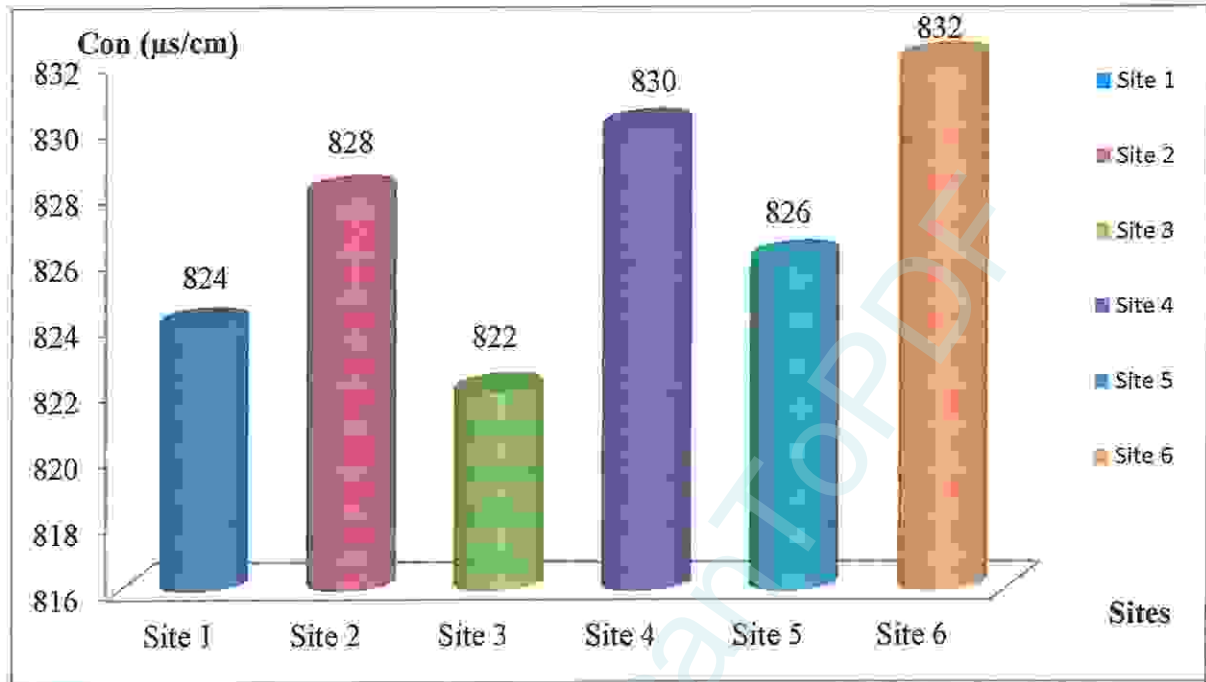


Fig.14 : La variation de la conductivité en fonction des sites de prélèvement.

- Il y a une augmentation dans le taux de la conductivité avec une moyenne de $825.66\mu\text{s}/\text{cm}$ dépasse la norme d'eaux douces de $2000\mu\text{s}/\text{cm}$ (selon OMS) ce qui confirme que l'eau du lac Oubiera est fortement minéralisé.

I-3-pH

Le pH des eaux douces varie habituellement entre 7,2 et 7,6. Le pH d'une eau représente son acidité ou son alcalinité.

D'une façon générale les eaux très calcaires ont un pH élevé, et celles provenant de terrains pauvres en calcaires ou siliceux ont un pH voisin de 7 et quelquefois un peu inférieur (environ 6).

(10)

Tab. 09: Les résultats de l'analyse de pH des eaux du lac Oubiera.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
pH	7.23	7.29	7.27	7.44	7.46	7.37

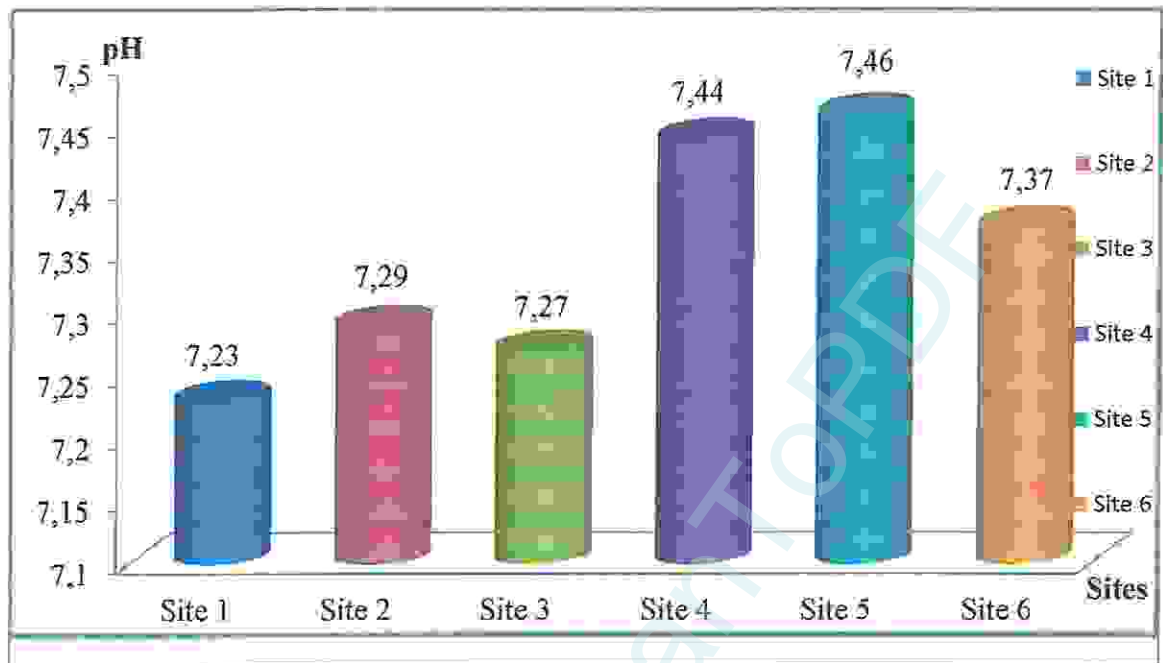


Fig. 15: la variation de pH en fonction des sites de prélèvement.

Ces valeurs sont comprises entre 7.23 et 7.46 pour les six sites avec une moyenne de 7.34 proche de la neutralité selon l'OMS2006 provoquant une variation d'une microflore (présence bactéries et champignons) (6.5-8.5).

I-4-L'oxygène dissous (O_2)

La concentration en Oxygène dissous (O_2) est importante dans le but d'avoir une dégradation de matières organique nécessaire pour les bactéries aérobie à connaître car l' O_2 est contraignants pour l'existence de nombreux organismes.

Tab.10 : Les résultats de l'analyse de L'oxygène dissous des eaux du lac Oubeira.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
O_2 (mg/l)	8.1	8.15	8.28	7.2	8.01	7.97

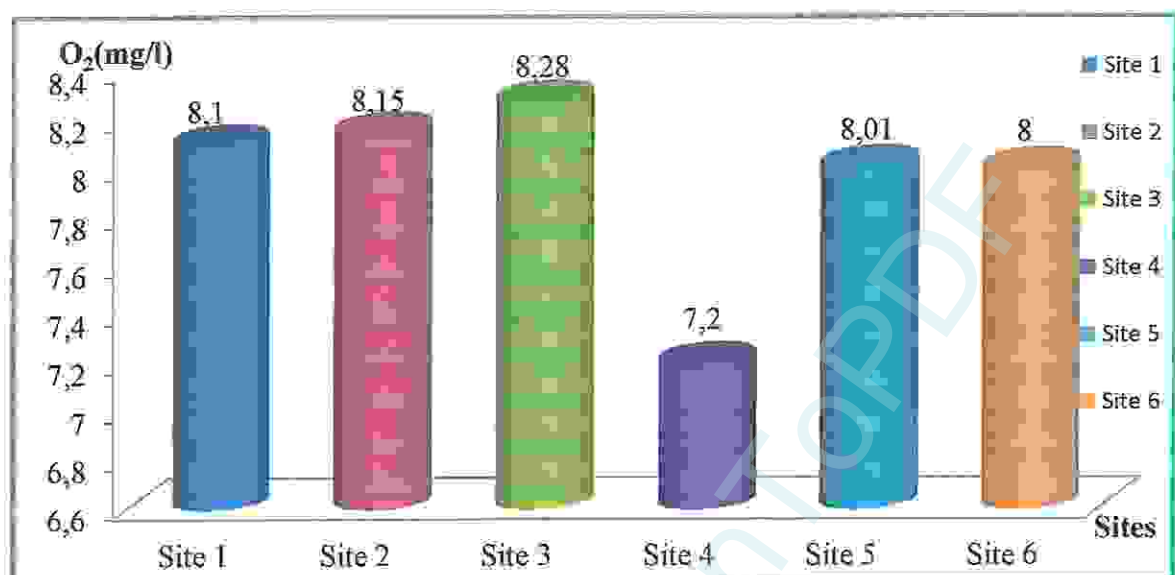


Fig.16 : La variation de l'oxygène dissous en fonction des sites de prélèvement.

On remarque qu'il y a une augmentation dans le taux d'oxygène à partir du site 1 (8.1) jusqu'à le site 3, avec la valeur de 8.28 mg/l ce qui exprime une dégradation énorme d'oxygène peut provoquer un nombre élevé des micro-organismes.

II-Résultats d'identification fongique



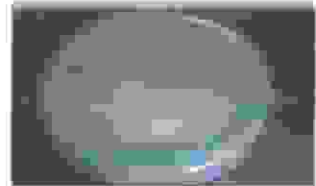
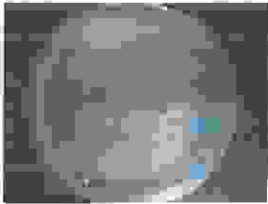
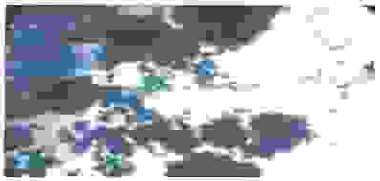
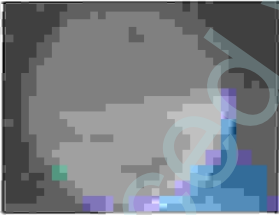

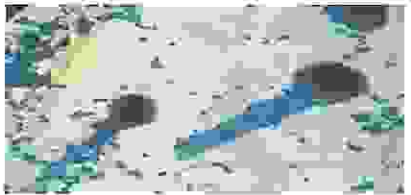

II-1-L'aspect macroscopique

Tab.11: Observation macroscopique des colonies.

Milieux de culture / site de prélèvement	Czapek simple	Czapek concentré	Sabouraud	TGEA
site 1	-absence de colonie	- une colonie de couleur verte de diamètre 3cm	- des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,5cm -4 colonies de couleur blanc de diamètre 3 cm	absence de colonie
site 2	- une colonie de la couleur gris vert de diamètre 3cm -une colonie de couleur blanc jaune de diamètre 1cm	- une colonie de la couleur gris vert de diamètre : 3cm	- 2 colonies de la couleur blanche de diamètre 2 cm - des colonies de couleur verte de diamètre 0,1-0,5cm - des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,5cm - 2 colonies de la couleur blanche de diamètre : 2 cm	- des colonies de couleur gris avec auteur blanc de diamètre 1-2 cm -absence de colonie
site 3	-absence de colonie	-absence de colonie	- des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,5cm - 2 colonies de la couleur blanche de diamètre : 2 cm	-absence de colonie
site 4	- une colonie de couleur blanc jaune de diamètre 1cm	-absence de colonie	2 colonies de la couleur blanche de diamètre : 2 cm - des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,5cm	- des colonies de couleur blanche de diamètre 0,2-0,5cm
site 5	- une colonie de la couleur gris vert de diamètre : 3cm - une colonie de couleur blanc jaune de diamètre 1cm	-absence de colonie	- des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,4cm - 5 colonies de couleur blanc de diamètre 3-5cm	-absence de colonie
site 6	- une colonie de couleur blanche de diamètre 0,5cm	- une colonie de couleur verte de diamètre 3cm	- des colonies de couleur verte avec contour blanc de diamètre 0,2-0,5cm	- Une colonie de couleur blanche avec autour jaune de diamètre:

II-2-L'aspect microscopique

Tab.12: Observation microscopique des colonies.



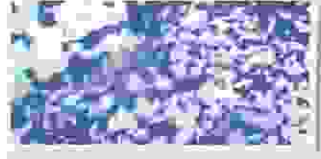

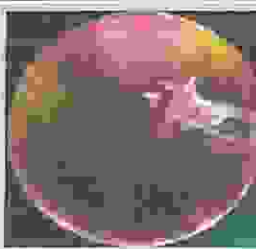
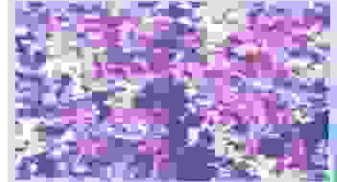
Milieux de culture	Boits de pétrie	Aspect Microscopique (Gx100)	
Czapek simple	 Recto	Des colonies de couleur verte avec un diamètre 4-5 cm	Les têtes conidiennes, bisériées, radiées sont disposées en plusieurs colonnes.  <i>Penicillium Crysogium</i>
	 Verso	Colonie jaune avec des filaments simple	
Czapek concentré	 Recto	Des colonies de couleur gris verte leur diamètre atteint 3,6cm	Ils se caractérisent par la formation d'organes de reproduction asexuée : les têtes aspergillaires. Le conidiophore de longueur variable se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule.  <i>Aspergillus Ochraceus</i>
	 Verso	Reverse la couleur vers les jaunes,	
Sabouraud	 Recto	Des colonies vertes à contour blanc	Les filaments sans cloisons avec des têtes de forme allongée  <i>Aspergillus Fumigates</i>
	 Verso	Le revers peut être incolore, jaunâtre	

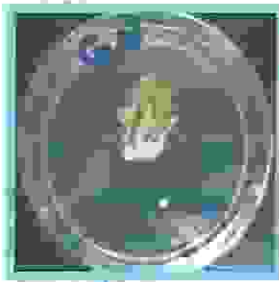
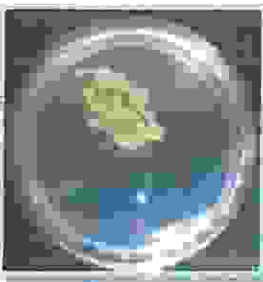

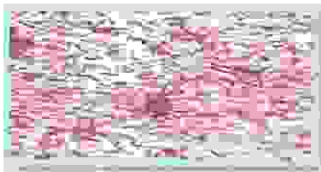
III-Analyses bactériologiques

III-1- Caractères morphologiques et coloration de Gram

Les souches nous a permis de distinguer une variation de couleur et une dégradation de substrats dans les milieux le caractère les d'isolements sont représentée dans le tableau suivant colonies sur leurs milieux préférentiels d'isolement. Ces données sont représentées dans le tableau 13.

Tab. 13 : Détermination des caractères cultureux des souches isolés à partir des milieux GN et Chapman.

Milieu de culture	Observation	
	Macroscopique	Microscopique
Milieu Chapman	  <p>Recto Bombée, lisse, avec contour régulier, jaunâtre avec virage de couleur du milieu de rouge verre le jaune</p>	 <p>Cocci, regroupés en amas, et en chaînette à Gram positif</p>
	  <p>Recto Petite taille, lisse, plats, avec un contour régulier, et un couleur blanche.</p>	 <p>Cocci groupées en amas à Gram positif</p>

Gélose nutritive (GN)			 <p style="text-align: center;">Bacilles à Gram négatif.</p>
	<p style="text-align: center;">Recto Irrégulière, lisse, bombée, de couleur jaune, brillante.</p>	<p style="text-align: center;">Verso Lisse, plate, à contour irrégulier, de couleur jaune.</p>	 <p style="text-align: center;">Bacilles isolés à Gram négatif.</p>

III-2- Détermination des caractères biochimique

III-2-1-Recherche et dénombrement des contaminations fécales coliformes totales

➤ **Coliformes totaux (CT)**

La recherche des coliformes est primordiale du fait qu'un grand nombre d'entre eux vivent en abondance à partir des animaux (matières fécales) à sang chaud et de ce fait constituent des indicateurs de première importance.

Les variations du nombre de bactéries dans les différentes sites, situées sur le Lac Oubeira sont illustrées dans le tableau 14 et la figure 15.

Tab.14: Evaluation du nombre des coliformes totaux en fonction des sites.

Sites	Site-1	Site 2	Site-3	Site-4	Site 5	Site-6
Nombre de CT/ml	40000	45000	60000	110000	200000	1500000

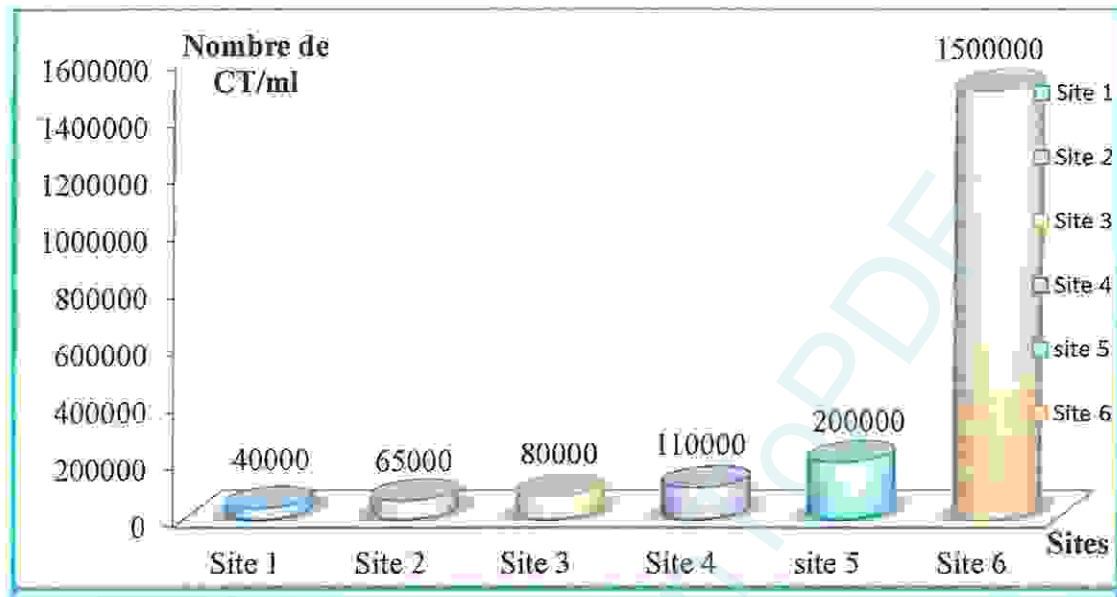


Fig. 17: Estimation des coliformes totaux /ml dans l'eau de Lac Oubeira.

Le dénombrement des coliformes totaux a atteint son maximum en mois de mars dans le site 6 respectivement avec 1500000 CT/ml (fig.17). Par contre le minimum est observé dans le site 1 avec 40000 CT/ml, s'explique par l'abondance des pluies et les déchets importés par les eaux des ruissellements durant ce mois. (05)

➤ Coliformes fécaux (CF)

Escherichia coli est le type de coliforme d'habitat fécal exclusif ; sa recherche et donc extrêmement importante. L'évolution du nombre de coliformes fécaux dans l'eau du Lac Oubeira.

Tab.15 : Evaluation du nombre des coliformes fécaux en fonction des sites.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Nombre de CF/ml	20000	25000	33000	21000	64000	90000

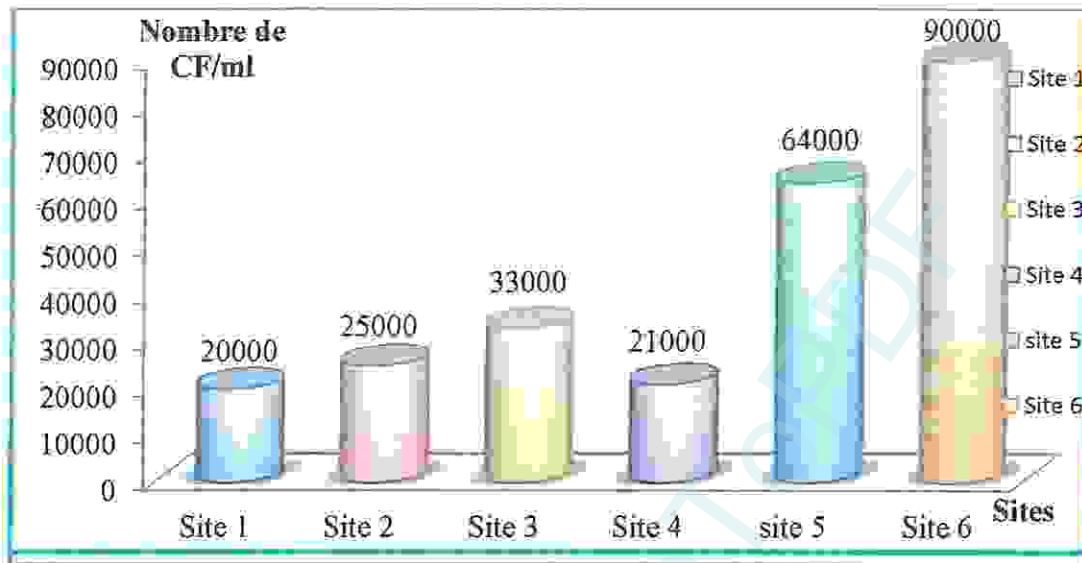


Fig. 18. Estimation des coliformes totaux /ml dans l'eau de Lac Oubeira.

Notre résultat montre un nombre élevé des coliformes fécaux dans le site 6 qui indique une contamination fécale due à un nombre remarquable.

Le dénombrement des micro-organismes fécaux, dans les six sites, a montré une différence entre les sites 6, par un maximum enregistré avec 90000 CF/ml dans le site 6 et un minimum de 20000 CF/ml dans le site 1 en Ces eaux polluées et inutilisables en irrigation selon les normes (OMS de 2006). (05)

> Streptocoques fécaux(SF)

Les streptocoques fécaux sont des indicateurs de contaminations récentes par la manière fécale des animaux. Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans le tableau 12 et la figure 17.

Tab.16 : Evaluation du nombre des streptocoques fécaux en fonction des sites.

Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
Nombre de SF/ml	4000	4000	6000	15000	450000	70000

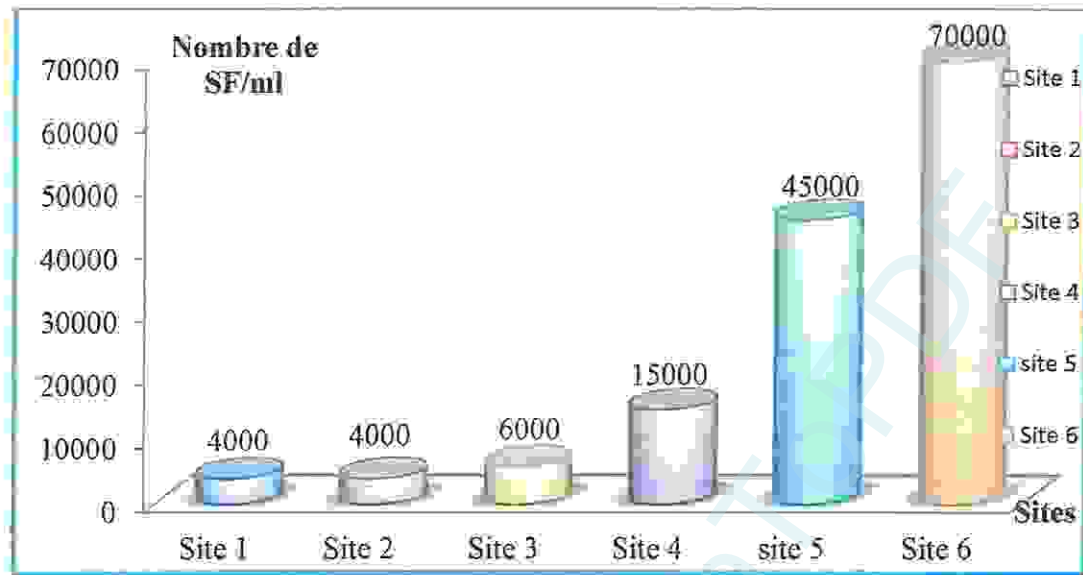









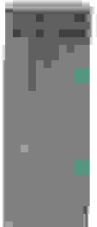


Fig. 19 : Estimation des streptocoques fécaux /ml dans l'eau de Lac Oubeira.

Les résultats du dénombrement des streptocoques fécaux montrent que, les effectifs les plus élevés ont été observés durant le mois de mars au niveau du site 1 avec un maximum de 70000SF/ml, et un minimum 4000SF/ml au niveau du site 1 et 2 signifiant contamination fécale. Selon les normes OMS l'eau du lac Oubeira est très polluée. (05)

➤ Résultat des caractères de la galerie classique

Tab.17 : Résultat de la galerie biochimique

	Résultat	La lecture
TSI	 +	-C'est un milieu utiliser pour l'identification des bacilles Gram (-) est essentiellement pour différencier les entérobactériaceae. -La lecture demande la bénification des deux sucre (virage du rouge ou jaune rapidement) formée à partir des acides aminés soufrés et la présence du sulfate fireux
Citrate de Simmons	 -	-Le virage de couleur du vert en bleu vert indique la présence d'un enzyme perméase capable d'accumulé le citrate dans le cycle du Krebs
Mannitol Mobilité	 Mannitole + Mobilité +	-Le mannitol est un produit de la réduction de D mannose (sucre simple) -Le milieu mannitol mobilité permet de recherche la fermentation des mannitols et la mobilité bactérienne
Clarck et Lubs	 VP-	-La lecture se réalise à partir d'un milieu spécifique clarck et lubs, l'addition de VP (voges proskawer) la transformation des couler jaune vers le rose indique la présence d'acétone (incolore absence d'action)
	 RM +	-La technique de rouge de méthyle permet de déterminer la nature des bactéries acidophile ou bien basidophile. -L'ensemencement se réaliser à partir d'un bouillon clarck et lubs, le virage de couleur des jaune vers le rouge indique que les bactéries sont acidophile (incolore sont basidophile)

Bouillon de nitrate	 <p>- Nitrate réductase</p>	<p>-La réduction de nitrate en nitrite généralement caractéristique les entérobactériaceae; le nitrate réductase se mise en évidence après culture sur un bouillon liquide jaunâtre appelée Bouillon de nitrate. Le nitrite son rechercher par l'addition de 2 goutte d'un réactif spécifique Griess (NR1, NR2)</p> <p>- La réaction instantanée qui se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge traduisant la réduction de nitrate en nitrite.</p>
Eau Péptonée exempte d'indole	 <p>+ Indole</p>	<p>- L'ensemencement se fait par l'addition d'un réactif kovax après l'incubation l'apparition d'un anneau rouge permet l'obtention de l'indole</p>
Disque ONPG	 <p>B galactosidase +</p>	<p>-En prépare une suspension bactérienne après de la culture pure puis en ajoute des disques de ONPG(Ortho-Nitrophényle-B-D-Galactosidase), après l'incubation le virage de couleur vers le jaune permet la lise des germe ; les éclatements des cellules provoque la libération de B galactosidase.</p>
Disque Oxydase	 <p>+ Oxydase</p>	<p>-La réaction se manifeste par une coloration rose pendant quelque minute permet la présence d'enzyme oxydase.</p>
Catalase		<p>-Le teste positif se traduit par un dégagement gazeuse O₂ sous forme de bille d'air confirme la présence d'une catalase.</p>
	Bactérie	<i>E.coli</i>

➤ Résultat de la galerie API 20 E

La suspension bactérienne préparée par le milieu de culture GN:

- Le site 1 enfermé la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (64%).



Fig.20 : Profil biochimique de *Pseudomonas aeruginosa*

Tab.18 : Résultat de la galerie API 20 E de *Pseudomonas aeruginosa* (amex)

micro tube	RESULTATS		REACTION /ENZYME	LA LECTURE
	NEGATIVE	POSITIVE		
ADH	jaune	rouge/orange	- Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydrolase	+
[CIT]	Vert	bleu-vert/bleu	- Utilisation de citrate comme seule source de carbone	-
<u>H₂S</u>	incoloré	Noir	- Production du sulfure d'hydrogène (H ₂ S) à partir du thiosulfate (S ₂ O ₃)	-
[VP]	incoloré	rose/ rouge	- Formation d'acétoïne à partir du Pyruvate de sodium.	+
[GEL]	pas de diffusion de pigment noire	diffusion de pigment noire	- Liquéfaction de gélatinase (protéine)	+
GLU	bleu/ bleu-vert	jaune/ vert jaune	- (Glucose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-

Conclusion

Produced with ScantOPDF

Conclusion

Le lac oubeira est une zone humide très importante en Algérie présente, avec l'ensemble du complexe lacustre du parc national d'El-kala, des valeurs écologiques et des richesses naturelles considérables à l'échelle mondiale.

Une analyse physico-chimique et bactériologique et l'identification fongique est souvent utiliser pour étudier et vérifier l'état de santé d'un écosystème aquatique.

Les résultats ont révélés la présence des germes de contamination fécale (*E. coli*) aussi nous avons dénombré un taux important de bactéries pathogènes tel que (*Pseudomonas aeruginosa*) capable de causer des maladies graves.

Les résultats de l'analyse physicochimique concernant la consommation de l'oxygène et l'existence des matières organiques confirment la présence de toutes les sources de nutrition pour la croissance des microorganismes hétérotrophes notamment les champignons

En perspectives, Le lac oubeira est un écosystème agréable, et malgré l'utilisation de son eau, elle reste une eau qui peut être sauvée.

Donc il faut la protéger pour rendre la vie à la flore et la faune disparue par les activités humaines.

Produced with Scantopdf

Références bibliographiques

Produced with ScanTOPDF

Référence bibliographique :**1-Livres :**

- (01) Bourgeois et Leveau, 1980 (Bourgeois C.M. et Leveau.J.Y, (1980).Technique bactériologique. *Doin*.335p)
- (02) Rejsek.F, (2002).;Délarras, 2008 : Analyse des eaux : technique et aspects réglementaires Scérène CRDP Aquitaine. 358p.
- (03) Rodier. J., Lliguebe. B., Merlet. N., *et coll.* (2009).L'Analyse de l'eau, 9^{ème} Edition.*Dunod*.
- (04) Roux.M, (2003) TP de microbiologie : Analyse de l'eau.Novello Célia. (3).1-9
- (05) -B.BOTTON, Y.VAYSSIER et P.VEAU, 1990. -Moisissures utiles et nuisibles. Edition Masson, Paris, p 17-314
- (06) Rodier J., 1996.- L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eau résiduaires, eaux de mère. Edition DUNOD, Paris. p23-1068
- (07): livre et publication : Atlas(IV) des zones humides Algériennes d'importances internationales (Edition 2004).Disponible à la Direction Générale des forêts Atlas de 105 pages.
- (08) : livres et publication=zerguine, k. 2009-2010. Contribution à l'étude des chironomidae<diptera,Insecta>des mares temporaires de la Numidie orientale.Aspect de Biologie, Ecologie et Systématique, pour l'obtention du diplôme de Doctora, option : biologie animale et environnement., université Badjimokhtarannaba,p :289.).
- (09) thèse : présentée pour obtenir le titre de docteur de l'Institut National Polytechnique et de l'Université de bucares. Spécialité : Pathologie, Mycologie, GÉNÉTIQUE ET Nutrition. Titre : FLORE FONGIQUE DE DIFFERENTS SUBSTRATS.
- (10) DE VILLERSI, SQUILBIN M., 2005. -Qualité physicochimique et chimique des eaux de surface. Institut Bruxellois pour la Gestion de l'Environnement. 16 p
- (11) Leclerc H., 1969. -Microbiologie générale. Edition Doin. P.384, 386.

Site web :

(12) : Anonyme., 2003. -Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar. 7 p.

(13) : Anonyme, Identification des champignons filamenteux..

(14): Anonyme, caractères macroscopiques et microscopiques des As(11) :

(15) :Anonyme, les caractères des Aspergillus. pergillus)

(16) : fiche pdf : fermentation en milieu solide-croissance des champignons filamenteux sur substrat amylage.

(17): fiche pdf de production de protéines d'organismes unicellulaires cultivés.

(18):http://www.oieau.fr/ReFEA/fiches/AnalyseEau/physico_chimie_presGen.htm.

(12/04/2013)

(19) -<http://mycota-ercc.mnhn.fr/site/espece.php?idE=108#ancre>

Composition des milieux de culture et des réactifs

I - Milieu de culture :

- **Eau péptonée exempte d'indole** : Elle est surtout utilisée pour la recherche de la production d'indole.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée) :

Peptone exempte d'indole.....	10 g / l.
Chlorure de sodium	5g / l.
pH final	7, 2.

Préparation :

Mettre 15 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée. Mélanger soigneusement jusqu'à complète dissolution. Ajuster, si nécessaire, le pH à 7,2. Répartir puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

- **B.C.P.L (bouillon lactosé au bromocrésol-pourpre)** : il permet de rechercher et de dénombrer les coliformes, par la fermentation du lactose et la production de gaz.

- **Simple concentration :**

Peptone	5 g/l.
Extrait de viande	3 g/l.
Lactose	5 g/l.
Pourpre de bromocrésol.....	0.025 g/l.
Eau distillée.....	1000 g/l.
pH final = 6, autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.	

- **Milieu de Chapman** : Le milieu de Chapman mannité est un milieu sélectif pour la culture des staphylocoques.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée) :

Peptone bactériologique	10 g / l.
Extrait de viande de bœuf	1 g / l.
Chlorure de sodium.....	75 g / l.

Mannitol10 g/l

Rouge de phénol.....0,025 g/l.

Agar 15 g/l.

pH : 7,5(environ)

Préparation :

Verser 111 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

➤ **Czapeck Simple :**

NaoH3	2g
K2HPO4	1g
kCl	0.5g
MgSO4, 7H2O	0.5g
FeSO4, 7H2O	0,01g
ZuSO4, 7H2O	0.005g
CuSO4, 7H2O	0.01g
Saccharose	30g
Agar	20g
Eau distillé	1000ml

➤ **Czapeck Concentré :**

NaoH3	30g
K2HPO4	20g
kCl	10g
MgSO4, 7H2O	10g
FeSO4, 7H2O	0.2g
Saccharose	30g
Agar	20g
Eau distillé	1000 ml

➤ **Citrate de simmons (milieu de culture) :**

Cholorure de sodium.....5 g

Sulfate de magnésium 7420.....0.2 g.

Phosphate d'ammo.....1 g.

Phosphate dipotassique PO4HK2.....2 g.

Citrate trisodique.....	2 g.
Solution de bleubbromothymol.....	8 g.
Agar.....	15 g.
Eau distillée.....	1000 ml.

➤ **Milieu Mannitol-mobilité :**

Peptone pancréatique de viande.....	20 g.
Agar-Agar.....	4 g.
Mannitol.....	2 g.
Nitrate de potassium.....	1 g.
Rouge de phénol en solution à 1%.....	4 ml.
Eau distillée.....	1000 ml.

II - Réactifs :

➤ **Réactifs TDA : Pour la recherche de tryptophane désaminase :**

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

➤ **Réactifs IND : Pour la recherche de l'indole :**

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.....	5.0 g.
Alcool isoamylique.....	75.0 ml.
HCL 37%.....	25.0 ml.

➤ **Réactifs de VogesProskauer (VP) : Pour la recherche de l'acétone :**

• **VP1 :**

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

• **VP2:**

Alpha naphotol.....	6 g.
Ethanol.....	100 ml.

➤ **Réactif Kovax** : la mise en évidence de la production d'indol :

Formule :

Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....5 g.

Alcool amylique.....75 ml.

Hel pur.....25 ml.

❖ **Coloration de Gram**

• **Lugol** : elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer colorant.

Iode.....1g.

Iodure de potassium.....2 g.

Eau distillée.....3 g.

• **Violet de gentiane** : elle est utilisée pour colorer les bactéries.

Violet de gentiane.....1 g.

Ethanol à 90%.....1 ml.

Phénol.....2 g.

Eau distillée.....100 ml

Tab.02:Les différents types de pollution (20)

Type de pollution	Nature	Source ou agent causal
Pollution thermique	Rejets d'eaux chaudes	Centrales électriques
Fertilisants chimiques	Nitrates, phosphates, mercure	Agriculture
Pesticides	Insecticides, fongicides	Agriculture
Composés organiques	PCB, solvants chlorés	Industries
Matière organique	Glucides, lipides,protides	Effluents domestiques
Pollution microbiologique	Bactéries, virus	Effluents urbains

Tab.03. Tableau de lecture de l'API 20 E

micro tube	SUBSTRAT	REACTION /ENZYME	RESULTATS	
			NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	ortho-nitro-phenyl-B-D-galactopyranoside	beta-galactosidase	incoloré	jaune
ADH	arginine	arginine dés hydrolase	jaune	rouge/orange
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orange
ODC	ornithine	ornithine décarboxylases	jaune	rouge/orange
[CIT]	sodium citrate	Utilisation de citrate	vert	bleu-vert/bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	incoloré	noir
URE	urée	uréase	jaune	rouge/orange
TDA	tryptophane	tryptophane désaminase	jaune	noir
IND	tryptophane	production d'indol	incoloré	rose
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne	VP 1+VP2/10(5) incoloré rose/ rouge	
[GEL]	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	gélatinase	pas de diffusion de pigment noire	diffusion de pigment noire
GLU	glucose	fermentation/oxydation	bleu/ bleu-vert	jaune/ vert jaune
MAN	mannitol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	sorbitol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	rhamnose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	sucrose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	Mlebiose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	Arabinose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	arabinose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
NO ₃ -NO ₂	GLU tube	Production de NO ₂ Réduction N ₂ gaz	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			jaune	rouge

Tab.04. Table de Mac Grady :

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						
5 tubes par dilution							
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre De cellules
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

❖ Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API20E :

Tab.17 : Résultat de la galerie API 20 E de *Pseudomonas aeruginosa*

micro tube	RESULTATS		REACTION /ENZYME	LA LECTURE
	NEGATIVE	POSITIVE		
ONPG	incolore	jaune	- Détermination de la présence de l'enzyme β -galactosidase	+
ADH	jaune	rouge/orange	- Transformation de l'arginine (acide aminé) par l'arginine déshydratase	+
LDC	jaune	orange	- Transformation de la lysine (acide aminé) par la lysine décarboxylase	-
ODC	Jaune	rouge/orange	- Transformation de l'ornithine (acide aminé) par l'ornithine décarboxylases	-
[CIT]	Vert	bleu-vert/bleu	- Utilisation de citrate comme seule source de carbone	-
<u>H₂S</u>	incolore	Noir	- Production du sulfure d'hydrogène (H ₂ S) à partir du thiosulfate (S ₂ O ₃)	-
URE	jaune	rouge/orange	- Libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase,	+
TDA	jaune	noir	- Formation de l'acide indole pyruvique à partir de tryptophane désaminase	-
IND	incolore	rose	- Formation d'indole à partir du tryptophane (acide aminé)	+
[VP]	incolore	rose/ rouge	- Formation d'acétoïne à partir du Pyruvate de sodium	+
[GEL]	pas de diffusion de pigment noire	diffusion de pigment noire	- Liquéfaction de gélatinase (protéine)	+
GLU	bleu/ bleu-vert	jaune/ vert jaune	- (Glucose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-
MAN	bleu / bleu-vert	jaune	- (Mannitol). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	+
INO	bleu / bleu-vert	jaune	- (Inositol). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-
SOR	bleu / bleu-vert	jaune	- (Sorbitol). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-
RHA	bleu / bleu-vert	jaune	- (Rhamnose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-
SAC	bleu / bleu-vert	jaune	- (Sacrose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-
MEL	bleu / bleu-vert	jaune	- (Mélobiose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	+

AMY	bleu / bleu-vert	jaune	- (Amygdaline). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	+
ARA	bleu / bleu-vert	jaune	- (Arabinose). Formation d'acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone.	-

Produced with ScanTOPDF

Résumé:

Le lac Oubeira présente, avec l'ensemble du complexe lacustre du parc national d'El-Kala, des valeurs écologiques et des richesses naturelles considérables à l'échelle mondiale.

Après les analyses physico-chimiques et bactériologique et identification fongiques notre résultat montre des concentrations élevées de plusieurs paramètres et une variation d'une microflore fongique et une degré sérieux de contamination bactérienne.

Mots clés : Lac Oubeira, identification fongique, analyse bactériologique, Les propriétés physico-chimiques.

المخلص

بحيرة أوبيرة إحدى بحيرات الحضيرة الوطنية للقالا تتميز بأنها ذات قيمة بيئية و ثروة طبيعية معترف بها على المستوى العالمي.

بعد التحاليل الفيز و كيميائية والبكتريولوجية وعزل الفطريات المجهرية تحصلنا على نتائج التي أظهرت وجود نسب مرتفعة للعديد من العناصر الملوثة كذلك وجود تنوع في الفطريات المجهرية وثلوث بيكتري.

كلمات مفتاحية :

بحيرة - الفطريات المجهرية - تنوع البيولوجي - تحليل بكتريولوجي - الخصائص الفيزيوكيميائية

Summary:

Lake Oubeira presente with the 'whole complex lake national park' s El-Kala, ecological values and natural resources globally significant al. After the physico-chemical bacteriology and fungal identification result shows our students the concentrations of several parameters And a variation of 'a fungal micro flora and a serious degree of bacterial contamination.

Keyword: Lake Oubeira, fungal identification, biodiversit .Thephysico-chemical properties bacteriology analysis