

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

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



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie - Ecologie

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

Thème

Evaluation de la Qualité Microbiologiques de l'eau du lac Souterrain: Bir
Osman Hammam Debagh-Guelma

Présenté par : - AIDAOUI Aida

-HARKETT Sara

Membres de jury :

Président : Mr. HOUHAMDI Moussa (Pr).

Université de Guelma

Encadreur : Mr. ROUIBI Abdelhakim (MAA).

Université de Guelma

Examineur : Mr. ROUABHIA Kamel (MAA).

Université de Guelma

2013

Remerciements

"La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage".

Avant toute chose, louange à Dieu qui m'a donné l'esprit, le courage pour surmonter toutes les difficultés durant cette étude ainsi que l'endurance pour terminer ce projet.

الحمد لله الذي أعانني على إنهاء هذا العمل و سخر لي القوة لإتمامه فكل توفيق منه وحده و كل سهو أو خطأ فمني و من الشيطان.

Je remercie vivement Mr Ruibi A. qui m'a encadré et a dirigé mon travail pour ces conseils bénéfiques, pour son soutien et sa patience.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements aux membres de jury : le président Monsieur le Professeur HOUHAMED DJOUHRA, maître de conférences au département de biologie à l'université de Guelma. Et l'examineur, Mr. Rouabhia K, et accepté de juger ce travail.

C'est un grand merci que j'adresse à tous les membres du Laboratoire de l'Université de Guelma.

Finalement, je remercie aussi ma famille, A ma promotion de mastère, et à tous les étudiants du S.F.F, tous mes amis et tous qui m'ont aidés de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

*Je voulais tout d'abord, remercier dieu de m'avoir donné le courage
pour accomplir ce modeste travail, que je dédie :*

*A ma chère mère et mon cher père pour l'affection, la patience,
l'encouragement, qu'ils m'ont donné toute ma vie, et toutes les
épreuves difficiles traversées.*

*A mes chers frères : Abd alhak, Lin, Omar, Ali, Salah, Walid
, Khyressah*

A mes chères amies : Sara, Soumia, Leyneb, Lamia

A tous ceux de la deuxième année master SLE

*A tous ceux de la faculté des sciences de la nature et de la vie et
sciences de la terre et de l'univers.*

A tous ceux qui m'aime

A tous ce que j'aime

ABDOU Aida

Dédicace

Je voulais tout d'abord, remercier dieu de m'avoir donné le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie à mes chers êtres au monde :

A ma chère mère et mon cher père pour l'affection, la patience, l'encouragement, qu'ils m'ont donné toute ma vie, et toutes les épreuves difficiles traversées.

A mon Mari "Mouhamed" qui ma donner le pouvoir de terminer mes études, et a ma fille qui j'attends,

A mes chers frères et sœurs: Adel, Youcef, Houria (et ses filles : Amel, Lahra, Yessmin), Nadia (et ses enfants : Ilyas, Yahia), Laila (et ses enfants : Thoraya, Abd Essami),

A mes chères amies : Aida, Lamia Leyneb, Soumia, Salma, Inen, ...

A tous ceux de la deuxième année master promo 2013 SLE

A tous ceux de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers.

A tous ceux qui m'aime

A tous ceux que j'aime

HARKETI Sara (Mme. Bouras)

Table des matières :

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Etude générale

1-L'eau :	02
2-Les eaux souterraines.....	03
2-1-Définitions	03
2-2-Stocks d'eau souterraine.....	03
3-La pollution des eaux souterraines	05
3-1-Les origines des pollutions.....	05
3-1-1- Habitats humains	05
3-1-2- Fermes	05
3-1-3- Cultures	06
3-1-4- Eaux de surfaces contaminées	06
3-1-5- Industrie	06
3-2-Les principaux indicateurs de contamination.....	06

Chapitre II : Présentation du site d'étude

1- Localisation et description du site	09
1-1- Localisation géographique	09
1-2- Description générale du site.....	09
2-Historique et origine naturelle de la formation du lac.....	10
3-Les conditions climatiques et l'occupation du sol de la zone d'étude.....	11
3-1- Etude climatiques.....	11
3-1-1- La relation température-précipitation.....	12

3-1-1-1- Diagramme ombrothermique Bagnouls et Gausson	12
3-1-1-2- Quotient pluviométriques et étages bioclimatiques d'Emberger.....	13
3-2- Occupation du sol.....	14

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

1- Choix des stations et période de prélèvement	15
2-L'échantillonnage.....	15
2-1- Matériel de prélèvement	16
2-2- Méthode de prélèvement.....	16
2-3-Étiquetage, transport et conservation des échantillons avant l'analyse.....	17
3- Les analyses physicochimiques mesurées <i>in situ</i>	17
3-1. La couleur apparente	18
3-2- La température	18
3-3- Le pH.....	19
3-4- La conductivité électrique.....	20
4- Les analyses microbiologiques	20
4-1-Matériel de laboratoire	21
4-2- Recherche et dénombrement des germes revivifiables à 37°C et à 22°C	21
4-3- Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale.....	24
4- 3-1.Recherche et dénombrement des coliformes totaux et termotolérants	24
4-3-2- Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (<i>enterococcus</i>)	28
4-3-3. Recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfite réducteurs (<i>clostridium</i>)	31
4-4-Recherche des germes pathogènes	33
4-4 -1.Recherche des <i>staphylococcus</i>	33
4-4-2-Recherche de <i>salmonella</i>	35
4-4 -3-Recherche de <i>shigella</i>	37
4-4 -4-Recherche de <i>pseudomonas</i>	38
4-4-5-Recherche de <i>vibrio cholérique</i>	39

4-5- Recherche des levures et moisissures.....	40
5- L'identification microbienne.....	41
5-1- Examen macroscopique des caractères cultureux.....	41
5-2-Examen microscopique	41
5-3- Examens liés aux caractères biochimiques	42

Chapitre IV : Résultats et discussion

1-Les paramètres physicochimiques mesurés <i>in situ</i>	50
1-1- La couleur apparente	50
1-2 -La température.....	50
1-3-Le pH	51
1-4- La conductivité électrique	51
2-Analyses microbiologiques.....	52
2-1- Les germes totaux.....	52
2-2- Recherche et dénombrement des germes indicateur de la contamination fécale...53	
2-2-1- Les coliformes totaux.....	53
2-2-2 -Les coliformes termotolérants	54
2-2-3 -Les streptocoques fécaux	55
2-3- Les Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR).....	56
2-4- Identification des souches bactérienne	56
2-4- 1-Caractères morphologiques et coloration de Gram	57
2-4- 2-Résultats de l'identification biochimique.....	59
2-5- Identification de levure et moisissures.....	61
Conclusion	62

Référence bibliographique

Annexes

Liste des abréviations :

- : caractère négatif

+ : caractère positif

± : plus ou moins

ADH : Arginine dihydrolase

API20E : Analytical Profile Index 20 enterobacteria

ASR : anaérobies sulfito-réducteurs

BCPL : Bouillon lactose au pourpre de bromocrésol

BGN : Bacilles Gram négatifs

°C: Degré Celsius

CF : Coliformes fécaux

CTI : Citrate de Simmons

CT : Coliformes totaux

D/C : Double concentration

E. coli : *Escherichia coli*

EPA : eau peptonée exempte d'indole

Eva Litsky : Bouillon à l'éthyle violet et azide de sodium

g/l : Gramme par litre

GEL : Gélatinase

Glu : Glucose

GN : Gélose Nutritive

G CH : Gélose Chapman

G He : Gélose Hektoen

G Mec : Gélose Mac –Cankey

GNAB : Gélose Nutritive Alcaline et biliée

G SS : Gélose *salmonella-shigella*

ha : hectare

h : Heure

H₂O₂ : Eau oxygénée

IND : Indole

Km² : Kilomètre carré

LDC : lysine décarboxylases

L : Litre

mg/l : Milligramme par litre

ml : Millilitre

m/s : Mètre par second

n.m : Nanomètre

N.P.P : Nombre le plus probable

ODC : Ornithine décarboxylases

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ONPG: Orthonitrophényl-béta – D-galactopyranoside

pH : potentiel Hydrogène

Q2 : Quotient pluviométrique d'Emberger

Rothe : Bouillon à l'azide de sodium

S1 : site de lumière

S2 : site d'obscurité

S/C : Simple concentration

SF : Streptocoque fécaux

SFB : Bouillon Sélénite cystéine

Tab : tableau

TDA : Tryptophane Désaminase

TGEA : Tryptone Glucose Extract Agar

TSI : Triple Sugar Iron

UFC : Unité Formant Colonie

U-I : Urée-Indole

URE : urée

μS/ cm : Micro siemens par centimètre

VF : Viande Foie

VP : Voges Proskauer

Liste de figures :

Figure 1 : Distinction entre la zone non saturée et la zone saturée	04
Figure 2 : La zone urbaine environ 150m proche de la grotte (à gauche) et la zone d'agriculture au-dessous du lac souterrain de Birr Ben Osman).....	05
Figure 3 : Oued Seybouss qui traverse la région de Hammam Debagh-Guelma.....	06
Figure 4: Situation géographique du lac souterrain de "Bir Ben Osmane" Hammam Debag.....	09
Figure 5 : L'entrée de la grotte.....	10
Figure 6: L'escalier de la grotte.....	10
Figure 7 : Diagramme ombrothermique BAGNOULS ET GAUSSEN H	12
Figure 8 : Situation de la région de Guelma dans le climagramme d'Emberger (1994-2008).....	13
Figure 9: le premier site de prélèvement S1.....	15
Figure 10 : le deuxième site de prélèvement S2.....	15
Figure 11: Prélèvement de l'échantillon.....	16
Figure 12: Étiquetage et conservation de l'échantillon.....	17
Figure13 : Glacière de conservation.....	17
Figure 14 : Un PH mètres de poche	18
Figure 15 : Un multi paramètres De marque HANNA.....	18
Figure 16: Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des germes revivifiables.....	23

Figure 17 : Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des <i>Streptocoques fécaux (Enterococcus)</i>	27
Figure 18 : Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des <i>Streptocoques fécaux (Enterococcus)</i>	30
Figure 19 : Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (<i>clostridium</i>).....	32
Figure 20 : Représentation du mode opératoire de recherche des germes pathogènes.....	34
Figure 21 : Représentation du mode opératoire de Recherche de <i>salmonella</i>	36
Figure 22 : Variation de la température de l'eau de lac souterrain Bir Osman	50
Figure 23 : Variation du pH de l'eau de lac souterrain Bir Osman.....	51
Figure 24 : Variation de la conductivité électrique de l'eau de lac souterrain "Bir Osman".....	52
Figure 25 : Estimation de nombre des germes totaux à 22°C et à 37°C	52
Figure 26 : Dénombrement des coliformes totaux dans la station 01 par la méthode de NPP.....	53
Figure 27 : Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de lac souterrain : Bir Osma.....	53
Figure 28 : Test de la présence de l'indole sur le milieu eau peptonée exempte d'indole.....	54
Figure 29 : Estimation des coliformes fécaux/ml dans l'eau de lac souterrain Bir Osman.....	54
Figure 30 : Dénombrement des Streptocoques fécaux dans la station 01 par la méthode de NPP	55
Figure 31: Estimation des Streptocoques fécaux /ml dans l'eau de lac souterrain Bir Osman.....	55

Figure 32 : Dénombrement des ASR dans la station 01 et 02	56
Figure 33 : Estimation des ASR dans l'eau de lac souterrain Bir Osman	56
Figure 34 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B, C) des colonies sur gélose Hectoen.....	58
Figure 35 : Aspect macroscopique (A, B) et microscopique (C) des colonies sur gélose SS.....	58
Figure 36 : Aspect des colonies sur gélose Mac conkey	58
Figure 37 : Aspect des colonies sur gélose GNAB	59
Figure 38 : Aspect macroscopique (A, B) et microscopique (C) des colonies sur gélose Chapman	59
Figure 39: Profil biochimique de la souche <i>Serratia odorifera</i> l	60
Figure 40 : Profil biochimique de la souche <i>Klebsiella oxytoca</i>	60
Figure 41: Profil biochimique de la souche <i>Vibrio vulnificus</i>	60
Figure 42 : Profil biochimique de la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figure 43 : Aspect des colonies sur gélose Sabouraud	61
Figure 44 : Profil biochimique de la souche <i>Trichosporon cutaneum</i>	61
Figure A-1: Quelques espèces de végétation qui se trouvent au niveau de la grotte de "Bir Osman.	

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Répartitions des ressources en eau sur l'ensemble du territoire algérien....	02
Tableau 02 : Les principaux indicateurs microbiologiques de la pollution.....	08
Tableau 03 : présentation des sites et période de prélèvement	15
Tableau 04 : Paramètres physicochimiques mesurées <i>in situ</i>	17
Tableau 05 : Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température...	19
Tableau 06 : classification des eaux d'après leur PH	19
Tableau 07: Qualité des eaux en fonction de la conductivité électrique	20
Tableau 08 : caractères d'identification biochimique de shigella	37
Tableau 09 : lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI	45
Tableau 10 : Aspects macroscopique et microscopique des colonies bactériennes isolées dans lac souterrain Bir Osman.....	57
Tableau 11 : Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique	59
Tableau 12 : Les espèces identifiées par l'API20E et l'API20NE et l'API staph.....	60
Tableau A-1: Tables de Mac Grady utiliser en technique de numération en milieu liquide	
Tableau A-2: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée api 20E	
Tableau A-3: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée api 20 NE	
Tableau A-4: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée api® Staph	

Introduction

L'eau est l'âme de notre terre, dans toute sa diversité [Niemeyer, 2005]. L'élément indispensable à fixer en un lieu toute population, la source des activités agricoles, la substance la plus consommée par les industries et l'économie domestique au quotidien [Musy, 2004]. Alors que l'eau est essentielle au bon fonctionnement de notre organisme, source contaminées, manque d'hygiène et pollution peuvent la rendre dangereuse pour notre santé [Niemeyer, 2005].

Les ressources en eau proviennent des eaux de surface et des eaux souterraines renouvelables et non dont leur sauvegarde est au premier rang de priorités [Benamira et al., 2012]. Les eaux souterraines représentent 60% des eaux continentales, leur écoulement est estimé à 12000 milliards de m³ /an, soit 30% du débit des fleuves. Leur renouvellement total est de 5000 ans en moyenne est de 300 ans pour les nappes superficielles les plus vives [Chibani, 2009]. En effet, les eaux souterraines représentent une part importante du cycle de l'eau et participent de ce fait aux équilibres naturels. Elles constituent également une formidable ressource renouvelable, exploitée pour l'approvisionnement en eau potable, l'usage industriel ou agricole [15].

D'autre part, une pollution des eaux souterraines est une dégradation de leur qualité du fait des activités humaines, et /ou une dégradation naturelle liée à la nature géologique des aquifères [02].

Les eaux souterraines en Algérie constituent un capital essentiel en ce que concernent les réserves d'eau, parallèlement à leur surexploitation en débit, la pollution des principes nappes d'eau souterraine de nord de pays atteint un seuil critique au point de devenir une source de périls. Pour la santé humaine ces pollutions définissent des risques de maladies infectieuses d'origine bactérienne ou virale, ainsi que des risques de toxicité chronique ou aiguë [15].

Pour cela, on a effectué ce travail qui s'intéresse à l'étude de la qualité de l'eau du lac souterrain: Bir Osman à Hammam Debeh-Guelma. Un suivi de paramètres microbiologiques de deux points représentatifs du site est réalisé afin de déterminer la qualité de l'eau de ce lac et de préciser le degré de la pollution (microbiologique) et d'en déterminer l'origine.

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I

Etude générale

1-L'eau :

L'eau est un élément qui possède des propriétés particulières compliquées par les teneurs en substances dissoute [Musy, 2004]. Il existe naturellement à l'état solide, liquide et gazeux et passe constamment de l'un à l'autre [Niemeyer, 2005], a un volume considéré comme fini, d'environ $1,5 \cdot 10^9 \text{ km}^3$ [Cosandey, 2003]. Les changements de leurs états dépendent essentiellement de la température et de la pression mais aussi des composés chimiques présents dans l'atmosphère [17].

Le bilan hydrologique moyen annuel de l'Algérie du Nord fait ressortir un déficit d'écoulement qui atteint 87 % alors que 13 % seulement des précipitations profitent à l'écoulement (Tableau 1).

Tableau 01: Répartitions des ressources en eau sur l'ensemble du territoire Algérien [11].

	Régions Nord	Régions Sahariennes
Quantité approximative (milliard m³)	12	5.2
Ecoulements superficiel (milliard m³)	10	5
Ressources souterraines (milliard m³)	2	0.2

Les structures en bassins sédimentaires du Sahara, sont favorables à de grands réservoirs profonds, dont l'alimentation remonte aux périodes pluvieuses du Quaternaire. La nappe du Continental Terminal (100 – 400 m de profondeur), et la nappe du Continental Intercalaire dite "albienne" (1000-1500 m de profondeur) renferment d'importantes réserves (de 30 000 à 40 000 milliards m³) mais en raison du très faible taux de renouvellement, les potentialités exploitables sont très limitées (5 milliards m³/an) [11].

2- Les eaux souterraines :

2-1- Définitions :

2-1-1- Les eaux souterraines :

Elles sont un agent géologique général, jouent un rôle actif dans les processus géodynamiques, grâce à la large distribution spatiale de leur écoulement et à leur forte capacité à interagir avec l'environnement [Gilli et al., 2004]. Ce sont les eaux qui ne sont ni ré évaporées, ni retournées à la mer par ruissellement, s'infiltrant dans le sol et dans le sous-sol et s'y accumulées [Chibani, 2009].

Les écoulements souterrains et en rivière font explicitement référence à la notion de débit, à savoir à un volume d'eau traversant une section par unité de temps [Musy et al., 2004].

2-1-2- Nappe aquifère :

L'aquifère (du latin *aqua fero* : porter l'eau) est une structure géologique perméable contenant de l'eau, comme des alluvions de rivière, des granites fissurés, un plateau calcaire, ...etc. [Gilli et al., 2004]. La nappe aquifère formant roche-magasin limitée à la partie inférieure par une roche imperméable formant le fond du réservoir [Chibani, 2009]. Elle permet un stockage plus ou moins important et plus ou moins long de l'eau infiltrée; le transit peut aller de quelques heures à plusieurs centaines de milliers d'années [Gilli et al., 2004].

Issue de l'infiltration, l'eau contenue dans un aquifère circule dans le sous-sol et nourrit une ou plusieurs sources, ou se déverse de façon occulte dans un milieu récepteur, mer, lac, cours d'eau ou autre aquifère [Gilli et al., 2004].

2-2- Les stocks d'eau souterraine :

Au-dessous de la surface du sol, deux zones peuvent être identifiées de haut en bas:

- **La zone non saturée**, système à trois phases (solide, liquide, gaz) où seule une partie des espaces lacunaires sont remplis d'eau, le reste étant occupé par l'air du sol,
- **La zone saturée**, système à deux phases (solide, liquide) où tous les pores sont remplis d'eau [05] (Figure1).

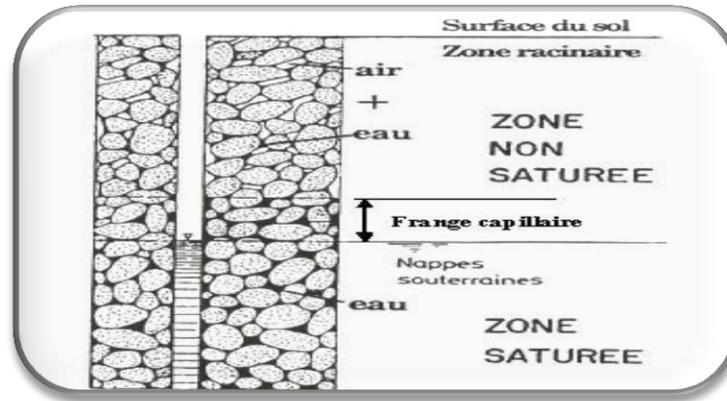


Figure 1 : Distinction entre la zone non saturée et la zone saturée [Collin, 2004].

La distinction fondamentale entre la zone saturée et la zone non saturée réside dans le comportement hydrodynamique de l'eau dû à l'effet de l'air et se traduit notamment par une conductivité hydraulique différente. Cependant, les zones saturées et non saturées ne sont pas des domaines séparés, mais font partie d'un système d'écoulement continu [05].

Pour faciliter l'étude de l'eau souterraine, nous distinguons toutefois :

➤ **L'eau du sol**, assimilée à celle se trouvant dans la zone non saturée. La zone de l'eau du sol est le siège des racines des végétaux et constitue surtout une limite supérieure importante des nappes (alimentation, évaporation) ; elle est également le lieu de transit de matières et de substances. Ces processus font partie du continuum sol-plante-atmosphère [Collin, 2004].

➤ **L'eau du sous-sol** correspondant à celle de la nappe. L'infiltration renouvelle l'eau du sous-sol et des réservoirs souterrains et entretient, par son circuit dans les aquifères, le débit de l'écoulement souterrain (débit de base). Celui-ci alimente les sources et les cours d'eau. Le niveau de l'eau souterraine est influencé par le régime de percolation de la pluie ou de l'eau d'irrigation à travers la zone non saturée. L'étude des réservoirs souterrains intéresse l'hydrogéologie [Collin, 2004].

3-La pollution des eaux souterraines :

Eau souterraine peut devenir contaminée par plusieurs des mêmes contaminants qui contaminent l'eau de la surface. Pollution d'eau souterraine arrive quand les contaminants sont rejetés dans, déposé sur, ou lessivés de la surface du sol au-dessus de l'eau souterraine [12].

3-1-Les origines des pollutions :

Il nous reste à faire un classement large des causes des pollutions. Tout d'abord il y a lieu de considérer séparément les pollutions biologiques, les pollutions chimiques et les pollutions radioactives, car chacun de ces groupes requiert un traitement particulier.

Les origines peuvent être ainsi classées :

3-1-1- Habitats humains:

Pollution essentiellement biologique excréments, fosses d'aisance, puits perdus, décharge des villes, puits, ...etc, conduites d'eau d'égout, eaux résiduaires, bassins de purification [03] (Figure 2).



Figure 2 : La zone urbaine environ 150m proche de la grotte (à gauche) et la zone d'agriculture (du blé) dessous du lac souterrain de Bir Ben Osman.

3-1-2- Fermes:

Pollution essentiellement biologique habitats, animaux, fumier, fosse à purin, puits ...etc. [03] (Figure 2).

3-1-3- Cultures:

Pollution biologique, par épandage de fumier, de gadoues, par irrigation d'eau d'égouts; pollution chimique, par épandage d'engrais minéraux chlorures et sulfate et nitrate de potassium, sels ammoniacaux, nitrate, phosphates etc.; par irrigation amenant une augmentation de la salure par évapotranspiration, salure qui se transmet aux nappes par infiltration; par traitements antiparasitaires, pesticides... etc. [03] (Figure 2).

3-1-4- Eaux de surfaces contaminées :

Eau de rivières, canaux de navigation, canaux d'adduction, lacs, barrages, recharges artificielles et eau de mer [03] (Figure 3).



Figure 3 : Oued Seybouss qui traverse la région de Hammam Debagh-Guelma

3-1-5- Industrie:

Les pollutions chimiques et biologiques vont souvent de pair mais on peut mettre à part les usines atomiques. Industries des produits pétroliers forages, raffineries, réservoirs, oléoductes, réservoirs souterrains, postes de pompes à essence...etc., déchets des Mines, par exemple de sels de sodium ou de potassium arrivant à saler dangereusement les nappes superficielles, terrils, exhaurage etc. industries métalliques; industries chimiques; papeterie; sucrerie; distillerie; laiterie; teinturerie; lavage de laine...etc.; usines atomiques à déchets liquides et déchets solides...etc. [03].

3-2-Les principaux indicateurs de pollution :

3-2-1-Les inducteurs physico-chimiques :

Les indicateurs physico –chimique (pH, O₂dissous, DBO5, DCO, NH₄, POS₄, NO₃, NO₂) ont une influence important sur la qualité de l'eau si elles dépassent un certain seuil [Dardar, 2010].

- **Composés azotés** : L'eau d'une nappe ne contient naturellement pas de composés azotés: ceux-ci, provenant de la décomposition de la matière vivante par les micro-organismes [15].
- **Métaux** : La pollution par composés métalliques est généralement d'origine industrielle mais elle peut également provenir de la lixiviation des déchets solides ménagers [15].
- **Autres corps** : De nombreux corps minéraux, toxiques ou non, produits par l'industrie et utilisés par l'agriculture peuvent être des polluants ponctuels des nappes: chlorures, sulfates, cyanures, sels d'arsenic...etc. [14].
- **Produits de dégradation de la matière vivante** : La décomposition de la matière organique par les micro-organismes libère des nitrites, nitrates, ammonium, méthane et hydrogène sulfuré; la matière organique résiduelle persistant dans l'eau constitue un milieu favorable au développement des germes qui peuvent être pathogènes [15].
- **Hydrocarbures** : La contamination de la nappe est généralement accidentelle (fuite de cuve d'essence, de mazout, rupture de canalisation...) Les hydrocarbures légers, non miscibles à l'eau, s'étendent à la surface de la nappe; ils confèrent à l'eau un goût caractéristique même à très faible teneur qui la rend imbuvable. Les hydrocarbures lourds se rassemblent à la base de la nappe; ils diffusent moins [16].
- **Substances de synthèse** : Les détergents sont en général biodégradés dans le sol ou adsorbés sur les argiles. Certains atteignent la nappe à partir des puisards ou à partir des rivières polluées dans les nappes alluviales. Leur toxicité est faible mais en tant que produits mouillants ils favorisent la dispersion d'autres produits indésirables comme les pesticides [15].

Les polychlorobiphényles (PCB) et les phtalates se retrouvent rarement dans les nappes. Les solvants chlorés (trichloréthylène, tétrachloréthylène, tétrachlorure de carbone)

sont peu biodégradables et peu retenus dans le sol: leur transfert à la nappe est donc aisé. Ce type de pollution est observé dans les zones urbaines et industrielles et dans les décharges non contrôlées [15].

3-2-2-Les inducteurs microbiologiques :

Les micro-organismes sont peu nombreux dans les eaux de nappe du fait des conditions généralement anaérobies et des faibles quantités de nutriments disponibles. Le transfert de matière organique dans la nappe favorise leur prolifération. Les milieux fissurés, surtout karstiques, présentent des conditions favorables à la survie et la multiplication des germes: pénétration facile de matière organique, conditions aérobies, pas de filtration. Les germes pathogènes sont généralement associés aux coliformes et streptocoques fécaux: la présence de ces derniers indique une pollution par les eaux vannes, les eaux de station d'épuration, les rejets d'élevages industriels... et la possibilité d'occurrence de germes pathogènes [15].

Il y a plusieurs classes de pollution de l'eau, dans les quels les agents provoquant des maladies sont les bactéries, les virus, les protozoaires et les parasites (Tableau 2), qui se développent dans les égouts et les eaux usées non traitées [Dardar, 2010].

Tableau 02: Les principaux indicateurs microbiologiques de la pollution [Dardar, 2010].

Germes pathogène		Maladies causées
Bactérie	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella paratyphi</i>	Fièvre typhoïde, Fièvre paratyphoïde
	<i>Shigella sp</i>	Shigellose (infection intestinale)
	<i>Vibrio cholérique</i>	Choléra
	<i>Escherichia coli</i>	Diarrhée gastro – intestinale infection urinaire, méningites et septicémies
Parasites	<i>Entamoeba estolytica</i>	diarrhée
	<i>Cryptosporidium</i>	diarrhée
	<i>Ascaris lombricoides</i>	Ascariotose
Virus	<i>Virus hépatite A(VHA)</i>	hépatite A
	<i>Virus hépatite E(VHE)</i>	hépatite E

Chapitre II

Présentation du site

1- Localisation et description du site :

1-1- Localisation géographique :

Willaya : Guelma

Daïra : Hammam Debagh

Commune : Hammam Debagh

Longitude : E 007⁰16.493

Latitude : N 36⁰26.454

Altitude : 425.6 m

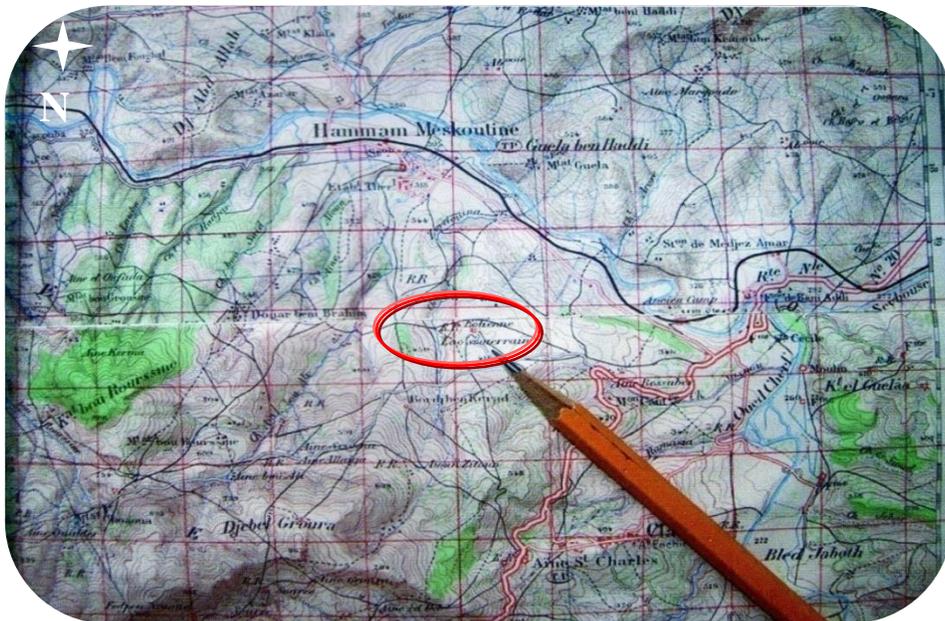


Figure 4 : Carte de situation géographique du lac souterrain :Bir Osman à Hammam Debagh-Guelma [09].

1-2- Description générale du site :

Le lac souterrain de Bir Ben Osman, près de Guelma [09], distant de 4 km seulement de Hammam Debagh, une région réputée pour ses sources thermales et ses cascades, non loin de la RN 20 (Guelma-Constantine), ce lac aussi "mystérieux" qu'il soit, n'en continue pas moins d'abreuver abondamment les habitants de la localité[08],et son probable écoulement sur l'une des plages de la wilaya de Skikda [13].L'entrée de la grotte est une cassure dans la falaise (Figure 5).



Figure 5 : L'entrée de la grotte



Figure 6 : L'escalier de la grotte

Un escalier rudimentaire permet de descendre la pente conduisant à l'espace intérieur. Par des passages pouvant être glissants à certains endroits, on arrive jusqu'au niveau de l'eau [09] (Figure 6).

Le périmètre attribué au site dépasse les 4 ha et comprend, également, des vestiges des temps géologiques et d'autres de l'époque antique [09]. Probablement, c'est le plus grand lac souterrain accessible à l'échelle nationale [Benamira, 2012].

De plus, on trouve plusieurs espèces de végétation à l'extérieur et à l'entrée de la grotte. (Figure A-1).

2-Historique et origine naturelle de la formation du lac :

C'était au mois de juillet 1878, par une journée orageuse, qu'un affaissement du sol, en forme de circonférence offrant environ 30 mètres de diamètre, s'est produit avec fracas, attirant l'attention des bergers du voisinage, et assourdissant leurs oreilles d'un bruit comparable à la décharge de plusieurs pièces d'artillerie [14].

Dès l'affaissement, la grotte était explorée et le mystère expliqué, au moins en partie. En descendant à une quinzaine de mètres de profondeur sur des blocs éboués, les explorateurs se trouvèrent en présence d'une masse d'eau considérable formant un lac d'environ 50 mètres de longueur sur 30 de largeur, recouverte d'une voûte calcaire, que des racines d'oliviers traversaient comme des sortes de stalactites suspendues à une dizaine de mètres de hauteur [15].

Sur le côté droit de la caverne, un chenal de 2 à 3 mètres de largeur amenait avec fracas une quantité considérable d'eau. Pendant environ six semaines cet écoulement continua

sans intermittence, pour cesser brusquement un jour. Le problème devenait ainsi très clair. On se trouvait en présence d'une de ces cavités comme le sol des environs d'Hamam-Meskoutin. Plus haut, à une distance quelconque se trouvait une nappe d'eau, qui, rompant brusquement ses digues sous une influence inconnue, s'engagea par des conduits plus ou moins tortueux, plus ou moins étroits, dans la direction de la grotte et vint s'y engouffrer avec violence. Sous cet assaut, une partie des piliers naturels soutenant la croûte supérieure de la grotte ne tarda pas à s'affaisser et à produire l'écroulement du sol lui-même. La grotte s'emplit peu à peu; l'écoulement continua jusqu'à parfait équilibre des deux vases communicants ; le lac souterrain était formé [14].

La crevasse, toutefois, ne contient que de l'eau froide (à 21°) sur une superficie de 2.500 à 3.000 mètres carrés. La cavité a été vidée entièrement, quand le complexe a été contraint de lui pomper tout son contenu pour l'alimentation des curistes [09].

3-Les conditions climatiques et l'occupation du sol de la zone d'étude :

3-1- Etude climatiques :

La détermination du climat s'effectue généralement à l'aide de moyennes établies à partir de mesures statistique, annuelles et mensuelles, sur des données atmosphériques locales de séries vingtenaires ou plus : température, précipitation, ces paramètres vont influencer directement les cycles biogéochimique de l'eau, du carbone et de l'azote, décrits précédemment [Bouchelaghem et al., 2010].

Guelma, ville du Nord –Est algérien se situe entre 36° et 28° de latitude Nord et 7° et 25° de longitude Est. Elle occupe une position médiane entre le Nord, les hauts plateaux et le sud du pays. Le climat de Guelma est celui de l'arrière littoral montagne, déterminé par des hivers plus froids et plus longs et des étés chauds et moins humides que ceux des littorales [Hamlaoui et al., 2011].

L'interprétation des données météorologiques de Guelma sur une période de dix ans, et l'établissement de son diagramme solaire s'avère être indispensable pour mieux caractériser son climat. Ainsi, que pour définir les climats on devra s'appuyer constamment sur les données moyenne et extrêmes ; d'où peuvent se mesurer les amplitudes moyennes des températures annuelles entre le mois le plus chaud et le mois le plus froid, et amplitude des

extrêmes absolues de températures quotidiennes (entre le maximum diurne et minimum nocturne) [Hamlaoui et al., 2011].

3-1-1- La relation température-précipitation :

3-1-1-1- Diagramme pluvio-thermique Bagnouls et Gausсен:

Le diagramme pluvio-thermique Bagnouls et Gausсен nous permet de mettre en évidence la période sèche de notre zone d'étude. Il est tracé avec deux axes d'ordonnées où les valeurs de la pluviométrie sont portées à une échelle double de celle des températures [Bagnouls et al., 1957].

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

- La première froide et humide qui s'étale sur 8mois, du 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 (Figure 07).

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

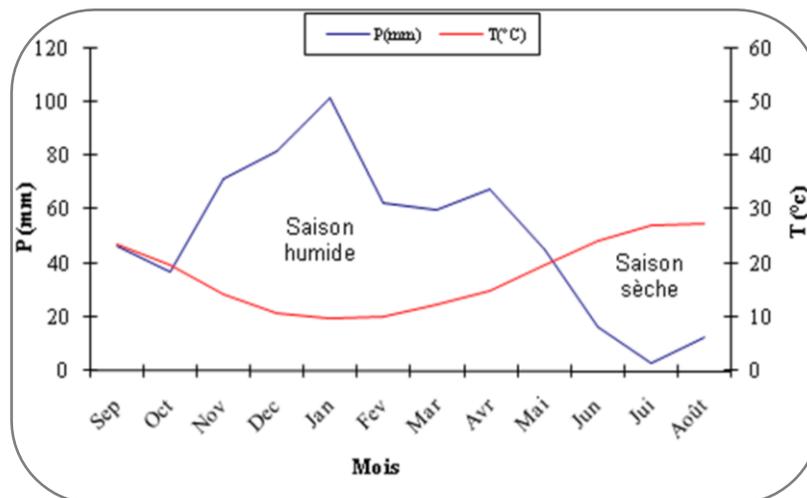


Figure 7 : Diagramme pluvio-thermique de BAGNOULS et GAUSSEN de la région de Guelma [Aouissi, 2010].

3-1-1-2- Quotient pluviométriques et étages bioclimatiques d'Emberger :

Emberger a classé toutes les stations météorologiques suivant deux coordonnées : d'une part, les valeurs de ce coefficient et d'autre part, la moyenne des températures du mois le plus froid, et montre que le bassin méditerranéen dans son ensemble peut être subdivisé en cinq étages bioclimatiques : aride, semi-aride, sub-humide, humide et per-humide. Le calcul du quotient pluvio-thermique "Q2" d'Emberger est nécessaire pour déterminer. L'étage bioclimatique de chaque région. La formule utilisée pour le calcul est la suivante :

$$Q2 = 1000. P / \frac{(M+m).(M-m)}{2}$$

Q2: Quotient pluviométrique d'Emberger.

P : Précipitations annuelles en mm ;

M : Moyenne des maxima du mois le plus chaud en degré de Kelvin (°K) ;

m: Moyenne des minima du mois le plus froid en degré de Kelvin (°K).

Le quotient pluviométrique d'Emberger indique que la Numidie occidentale appartient à l'étage bioclimatique de végétation semi-aride (Figure 8) [Aouissi, 2010].

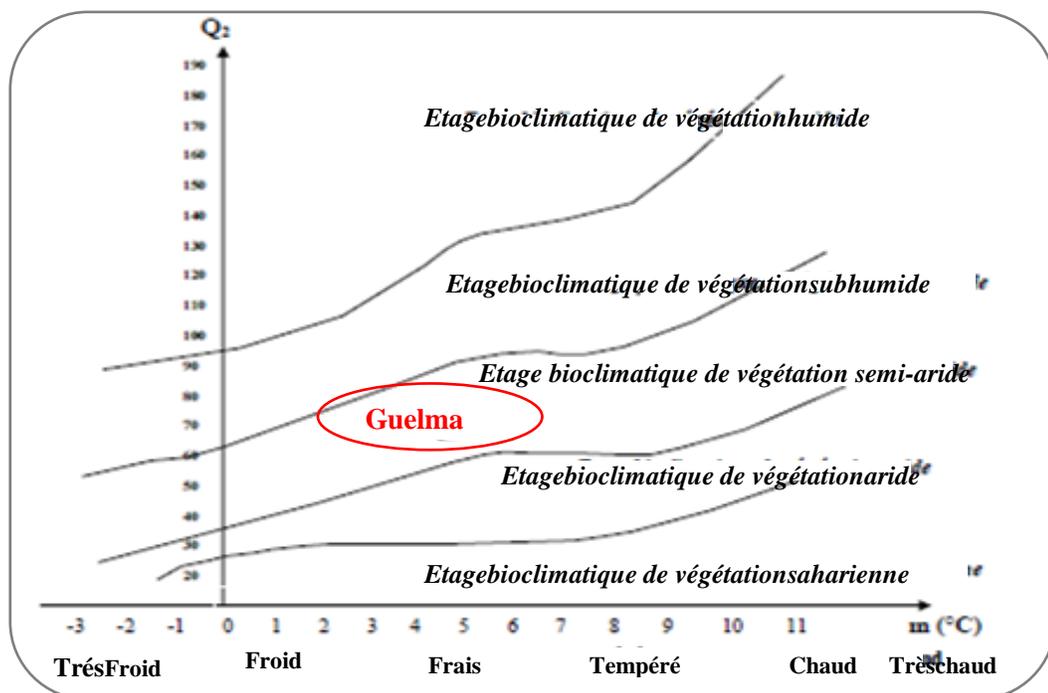


Figure 8 : Situation de la région de Guelma dans le climagramme d'Emberger (1994-2008) [Aouissi, 2010].

3-2- Occupation du sol :

Les terres qui entourent le lac sont exploitées par les agriculteurs pour la culture maraichère (tomate, céréales pastèque et melon) [Merzoug, 2009]. Au cours de ces dernières années, l'agriculture a complètement évolué et le paysage rural sur la région d'étude s'est profondément modifié. Cette modification pose de nombreux problèmes dans la gestion de l'eau [Aouissi, 2010]. L'agriculture serait responsable de 2/3 des rejets azotés et produirait, via les déjections animales et les engrais, 22% de la pollution par le phosphore. La contamination par les phytosanitaires est très importante [Bouchelaghem et al., 2010].

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

1- Choix des stations et période de prélèvement :

Ce travail est une étude de la qualité microbiologique de l'eau du lac. Elle est réalisée sur une période de deux mois (Mars et Avril 2013), avec deux prélèvements (S_1 et S_2) par mois (Tableau3).

Tableau 03 : Présentation des sites et période de prélèvement.

Nature du prélèvement	Sites de prélèvement	Date et temps de prélèvement		Type des analyses effectuées
Eau	Site 1	Prélèvement 1	19/03/2013 à 09 : 34h	Mesures <i>in situ</i> Analyse microbiologiques
		Prélèvement 2	21/04/2013 à 09 : 39h	
	Site 2	Prélèvement 1	19/03 /2013 à 10 : 00h	
		Prélèvement 2	21/04/2013 à 10 : 10h	

Chaque prélèvement se fait à partir d'un site, le premier est effectué dans la lumière en face de l'ouverture de la grotte (Figure 9) et le deuxième dans l'obscurité (Figure 10).

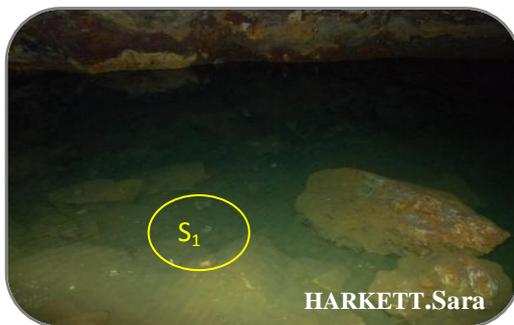


Figure 9: Premier site de prélèvement S1



Figure 10: Deuxième site de prélèvement S2

2-L'échantillonnage :

Un examen microbiologique ne peut être valablement interprété que s'il est effectué sur un échantillon correctement prélevé, selon un mode opératoire précis évitant toute contamination accidentelle, correctement transporté au laboratoire et analysé sans délai ou après une courte durée de conservation dans des conditions satisfaisantes [Rodier et al., 2005].

2-1- Matériel de prélèvement :

La verrerie destinée aux prélèvements d'eau doit être munis d'un nettoyage avec un détergent puis rinçage avec l'eau propre (eau douce), puis un rinçage final avec l'eau distillée [Foot, (2002), Guiraud, (1998)]. Il faut utiliser de préférence des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon à visse métallique stérilisés à autoclave à 120°C durant 20minutes, soit au four pasteur à 170°C durant 1heure [Rodier et al., 2005].

2-2- Méthode de prélèvement :

Nos prélèvements ont été effectués au niveau de l'eau du lac souterrain : Bir Osman Hammam Debagh-Guelma.

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse .Les techniques de prélèvement sont variables en fonction du but recherché et de la nature de l'eau à analyser. [Abdellioui et al., 2012]

Le prélèvement de nos échantillons a été effectué manuellement sur des points de prélèvement fixe en utilisant des flacons stériles de 250 ml en verre, bouchés émeri ou téflon. Rincés au moment de l'emploi avec l'eau à examiner. Ce flacon qui est débouchés dans l'eau est immergé complètement en position verticale à une distance du fond (30 - 50cm). Ils sont alors retournés jusqu'à ce que l'ouverture soit légèrement plus haute que le fond et dirigée dans le sens contraire du courant (artificiel), ils seront fermés hermétiquement (Figure 11).



Figure 11: Prélèvement de l'échantillon.

2-3-Étiquetage, transport et conservation des échantillons avant l'analyse :

Après le prélèvement, les flacons contenant l'échantillon doivent être soigneusement rebouchés et étiquetés (Figure 12) sont placés dans une glacière (Figure 13) contenant de la glace et conservés à 4°C seront transportés jusqu'au laboratoire [Rodier et al., 2005]. Avec un délai maximum à 8 heures avant l'analyse .mais en générale, on peut prendre un délai de 24 heures maximum à 4°C, qu'il est préférable de raccourcir si l'eau est présumée très polluée [Rejsek, 2002].



Figure 12: Étiquetage de l'échantillon.



Figure 13 : Glacière de conservation l'échantillon.

3- Les analyses physicochimiques mesurées *in situ* :

Les mesures *in situ* (Tableau 4) sont des analyses réalisées sur place, et se sont très variables aux conditions du milieu. Ils permettent une première estimation de la qualité générale de l'eau. En effet, ces paramètres sont très sensibles aux conditions du milieu et sont susceptibles de changer dans des proportions importantes s'ils ne sont pas mesurés sur site [Abdellioui et al., 2012].

Tableau 04 : Paramètres physicochimiques mesurées *in situ*.

Paramètres	Appareillages	Unités de mesure
La température	Un multi paramètres (Figure14)	Degré Celsius (C ⁰)
Le potentiel d'hydrogène (pH)	Un pH mètres de poche (Figure15)	
La conductivité électrique (CE)	Un multi paramètres (Figure14)	Siemens par mètre(S/m)



Figure 14 : Un pH mètres de poche



Figure 15 : Un multi paramètres de marque

HANNA

3-1- La couleur apparente :

L'origine de la couleur d'une eau doit être recherchée, surtout si elle est inhabituelle [Dardar, 2010]. La couleur des eaux de surface ou des eaux souterraines est due, généralement, à des substances colorées d'origine variées.

- La substance humique ou fulviques provenant de la décomposition de la matière végétale.
- Algues pouvant donner une coloration variable en fonction pigments qu'elles contiennent.
- Substances minérales en particulier le fer et le manganèse dont les formes précipitées sont colorées.
- Rejet industriel, par exemple de teinturerie pouvant aussi colorés l'eau [Rejsek, 2002].

3-2- La température :

La température a une grande importance dans l'étude et la surveillance des eaux qu'elles soient souterraines ou superficielles (Tableau 05) [Dardar, 2010]. La mesure de la température est effectuée sur le terrain [Rodier et al., 2005]. On utilise souvent dans ce but un thermomètre ou un multi paramètres. La lecture est faite après une immersion de 10 minutes [Boukrouma, 2008].

Tableau 05: Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température [Monod ,1989].

Température	Qualité
< 20°C	Normale
20°C-22°C	Bonne
22°C-25°C	Moyenne
25°C-30°C	Médiocre
> 30°C	Mauvaise

3-3- Le pH :

Le terme pH désigne le rapport (acide /base). Existant dans l'eau. Le pH d'équilibre est le point neutre. Il a comme valeur 7 et se trouve au milieu de l'échelle qui va de 0 à 14, en dessous de 7 le pH est acide, au-dessus est basique [Dardar, 2010]. Il est en relation avec la concentration en ions hydrogène H^+ présents dans une eau [Rejsek, 2002].

Le pH des eaux naturelles est lié à la nature des terrains traversés et varie habituellement entre 7,2 et 7,6. Les eaux très calcaires ont un pH élevé et celles provenant de terrains pauvres en calcaire ou siliceux ont un pH faible, de l'ordre de 7 et parfois un peu inférieur (Tableau 06). En pratique, les eaux ayant un pH supérieur à 8 ou inférieur à 6 sont rares mais on peut rencontrer des pH plus élevées dans des situations d'eutrophisation d'eau stagnante [Rejsek, 2002]. La mesure de pH est effectuée sur le terrain à l'aide de pH mètre.

Tableau 06: Classification des eaux d'après leur pH [Hakmi, (2002), Agrigon, (2000)].

pH	Nature de l'eau
pH<5	Acidité forte : présence d'acides minéraux ou organiques dans les eaux naturelles
pH=7	pH neutre
7 < pH < 8	Neutralité approchée : majorité des eaux de surface
5,5 < pH < 8	Majorité des eaux souterraines
pH>8	Alcalinité forte, évaporation intense

3-4- La conductivité électrique:

La conductivité électrique d'une eau est le résultat de sa concentration en sels dissous. Son élévation entraîne souvent des pH hors norme, une salinité élevée, lorsqu'elle est due à l'excès d'ion de calcium [Dardar, 2010].

D'autre part, elle est la propriété que possède une eau de favoriser le passage d'un courant électrique. Elle est due à la présence dans le milieu d'ions qui sont mobiles dans un champ électrique. La température et la viscosité influent également sur la conductivité car la mobilité des ions augmente avec l'augmentation de la température et diminue avec celle de la viscosité (Tableau 07) [Rejsek, 2002]. L'unité de conductivité est le siemens par mètre et elle est l'inverse de la résistivité électrique [Rodier et al., 2005].

Tableau 07 : Qualité des eaux en fonction de la conductivité électrique [Merzoug, 2009].

Conductivité électrique (US/CM)	Qualité des eaux
CE<400	Bonne
400<CE< 750	Bonne
750<CE<1500	Passable
1500<CE<3000	Médiocre

4- Les analyses microbiologiques :

Le principe général des techniques des analyses microbiologiques des eaux consiste à ensemencer une quantité connue d'eau à analyser sur un milieu de culture adapté, solide ou liquide. On suppose que, pendant l'incubation, chaque microorganisme présent se développe pour donner soit une colonie visible sur un milieu solide, soit des changements d'apparence dans un milieu liquide essentiellement un trouble de celui-ci [Rejsek, 2002]. Le choix des méthodes d'examen microbiologique des eaux dépendra de la nature de l'échantillon mais aussi de la sensibilité et de la précision souhaitées [Rodier et al.,(2005), Abdellioui et al.,(2012)].

Avant chaque prise d'essai, l'échantillon doit être homogénéisé soigneusement par agitation du flacon. Il est procédé dans un premier temps au dénombrement des microorganismes revivifiables, puis aux autres dénombrements [Rejsek, 2002].

4-1- Matériel de laboratoire :

Au laboratoire, on a utilisé le matériel classique d'un laboratoire de microbiologie : appareil de stérilisation (Four pasteur, Autoclave), des appareils d'incubation (des étuves à 37°C, 22 °C et à 44°C), réfrigérateur, bec Bunsen.

Les géloses utilisées sont : Mac Conkey, Chapman, Hektoen, *Salmonella-Shigella*, Cétrimide, viande foie (VF), Tryptone-Glucose, Extrait de levure-Agar (TGEA), Sabouraud. Les milieux d'enrichissement employés sont : Sélénite cystéine (SFB), eau peptonée alcaline (EPA). Pour le dénombrement des germes de contamination fécale on a utilisé les milieux liquides de dénombrement (BCPL, Rothe) et les milieux liquides de confirmation (bouillon Eva Litsky, bouillon Schubert et/ou eau peptonée exempte d'indole).

Pour l'examen microscopique on a utilisé : un microscope optique, violet de gentiane, fuschine, lugol, alcool, huile de cèdre, lames et lamelles, ruban adhésif.

Dans l'identification on a utilisé : la galerie biochimique classique ou les API.

Et utilisé le matériel usuel de paillasse : eau distillée, eau physiologique, pipette pasteur, anse de platine, boîte de pétrie...etc.

4-2-Recherche et dénombrement des germes revivifiables à 37°C et à 22°C :

Le dénombrement des germes revivifiables, nommés également mésophile aérobies en fonction de leurs conditions de développement, est utilisé comme indicateur de pollution. Il s'agit d'une technique de numération des microorganismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillon ou de ces dilutions dans un milieu gélosé [Rejsek, 2002].

4-2-1-Mode opératoire :

A partir de l'eau à analyser, et des dilutions décimales 10^{-1} , 10^{-2} , porter aseptiquement deux fois 1ml dans deux boîtes de pétri vides, numération et préparées à cet usage [Abdellioui et al., 2012].

Ajouté ensuite dans chacune des boîtes environ 15 à 20ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à 44°C +2°C. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de 8 sur une surface horizontale pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose [Lebres, 2002].

Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans la boîte et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 minutes. Laisser solidifier les boîtes sur paille [Merzoug, 2009].

Les boîtes seront partagées en deux séries distinctes :

- La première série sera incubée, couvercle en bas à $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 72 ± 3 heures.
- La seconde série sera incubée, couvercle en bas à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 48 ± 1 heures.

➤ **Lecture :**

Les colonies des micro-organismes revivifiables apparaissent sous formes lenticulaires poussant en masse.

➤ **Dénombrement :**

Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies. Les résultats sont calculés par la moyenne des deux boîtes de la même série de dilution (incubées soit à 37°C , soit à 22°C) [Rodier et al., 2005], à l'aide de l'équation suivante :

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

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

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

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs après la virgule. Le résultat final de microorganismes revivifiables dénombrés à 22°C et à 37°C par ml d'eau est noté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x où x est la puissance appropriée de 10 [Labres et al., 2008]. Exprimer les résultats en UFC [Rodie et al., 2009].

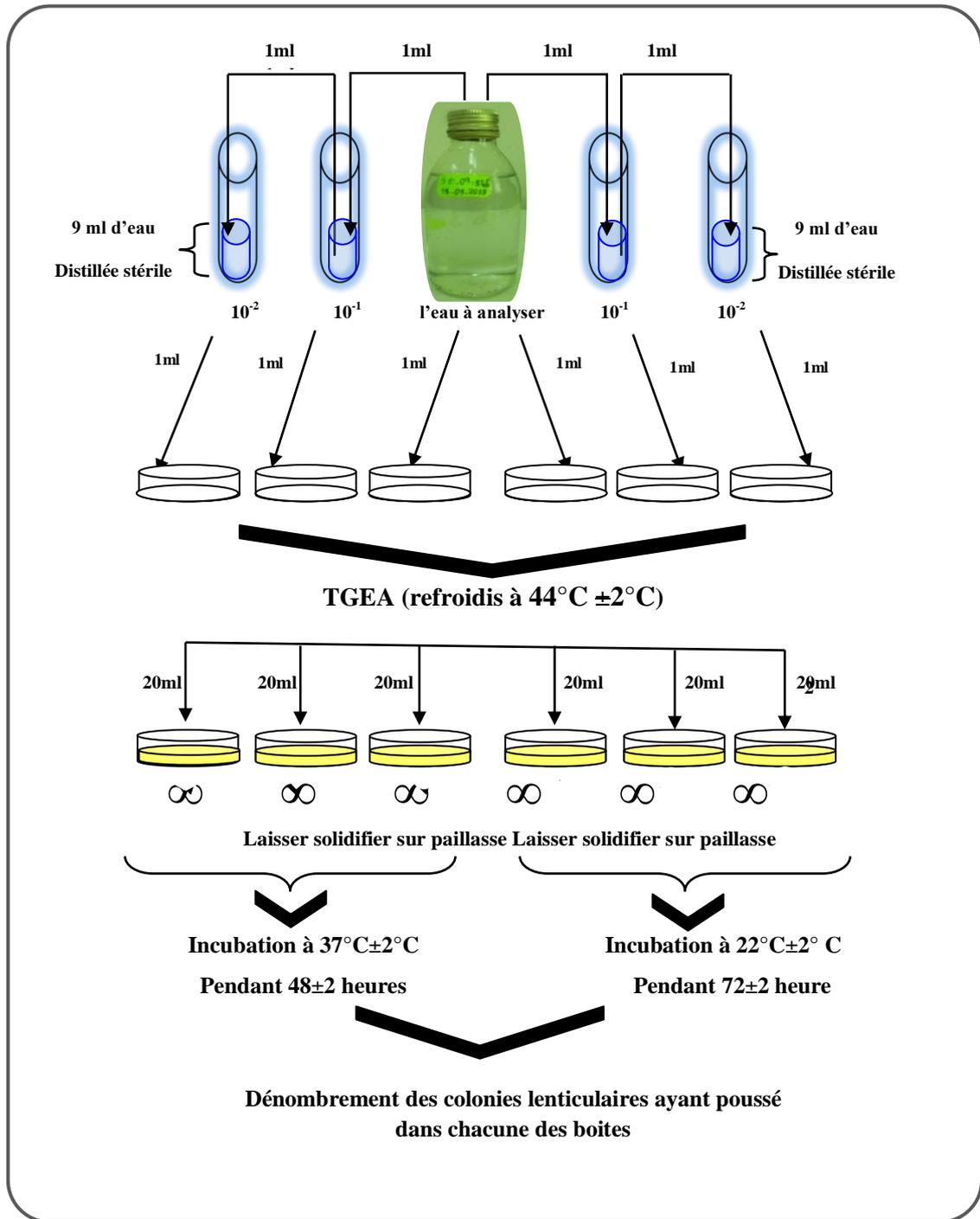


Figure 16 : Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des germes revivifiables

4-3-Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale :

La population microbienne qui se trouve dans l'eau peut avoir plusieurs origines ; soit elle est purement aquatique, terrestres (vint du sol, des végétaux au voisinage du cours d'eau), ou bien d'origine humaine ou animale (contamination fécale) [Abdellioui et al., 2012].

Les coliformes totaux sont des indicateurs de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable. Une eau traitée ou une eau souterraine bien protégée ne devraient pas contenir de coliformes totaux, mais leur présence ne constitue pas un risque immédiat pour la santé [09].

4-3-1-Recherche et dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants:

Sous le terme de "Coliforme" est regroupé un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant en fait à la famille des *Enterobacteriaceae* [Rodier et al., 2005], correspond à des organismes en bâtonnets(bacilles) , non sporogènes , Gram négatif , oxydase négative , aérobies ou anaérobies facultatifs , capables de croître en aérobiose à 37 °C±1 , en milieu liquide bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol(BCPL) [Rejsek, 2002], et capable fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48heures, à des températures de 35 à 37 °C [Rodier et al., 2005].

Le dénombrement de coliformes à 37°C est souvent désigné sous l'expression de «dénombrement des coliformes totaux» [Rodier et al., 2005]. Les coliformes totaux comprennent autres les genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia* [Rejsek, 2002].

Le terme de «coliformes totaux » ou de « coliformes thermotolérants »correspond à des coliformes qui présentent les mêmes propriétés (caractéristiques des coliformes) après incubation à la température de 44°C [Rodier et al., 2005]. l'espèces la plus fréquemment associées à ces groupe bactérien est *Escherichia coli* et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter* ,*Enterobacter* et *Klebsiella* [09].

Escherichia coli fait partie des coliformes thermo-tolérants qui produisent de l'indole à partir de tryptophane, et possèdent les caractères biochimiques spécifiques de cette espèce [Rejsek, 2002].

➤ **Mode opératoire :**

La recherche et le dénombrement des coliformes totaux, fécaux et l'identification d'*E. coli* dans les eaux en milieu liquide ont été effectués par la méthode du nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie [Hamlaoui et al, 2011]. Se fait en deux étapes consécutives :

- Le test présomptif : réservé à la recherche des coliformes totaux.
- Le test confirmatif : réservé à la recherche des coliformes fécaux (thermotolérants) et *E. coli* [Lebres, (2002), Khaled, (2009)].

a-Test de présomption :

Il est effectué en utilisant le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol simple concentration (BCPL S/C).

On prend 1ml de l'eau à analyser à l'aide d'une pipette pasteur stérile et on l'introduit au tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10^{-1} [Rejsek, 2002]. Après avoir bien homogénéisé la dilution 10^{-1} nous avons réalisé quatre dilutions décimales successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) avec cinq répétition par dilution sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques [Khaled, 2009].

Nous prenons les tubes de BCPL (bouillon lactose au pourpre de bromocrésol), simple concentration, munis d'une cloche de durham :

-Prélever 1ml de la dilution 10^{-1} à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la porter dans le premier tube de la première série contenant 9 ml de BCPL;

-Ensuite nous prélevons 1ml de la dilution 10^{-2} et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL;

-Puis nous prélevons 1ml de la dilution 10^{-3} et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL;

-Après nous prélevons 1ml de la dilution 10^{-4} et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL;

-Puis nous prélevons 1ml de la dilution 10^{-5} et l'ajouter à un tube contenant 9ml de BCPL;

-Refaire la même technique pour les 4 séries restant de BCPL afin d'obtenir 5 séries de BCPL.

-L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures [Rejsek, (2002), Lebres, (2002), Delarras, (2007)].

➤ **Lecture :**

Seront considérés positifs les tubes où il se produit simultanément :

- Un dégagement de gaz (supérieur au $1/10^{\text{ème}}$ de la hauteur de la cloche).
- Un trouble microbien accompagné d'un virage de la couleur du milieu vers le jaune ce qui indique une fermentation du lactose du milieu (la production d'acide suite à la fermentation du lactose ce qui entraîne le virage du bromocrésol pourpre au jaune) [Delarras, 2007].

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du Npp [Lebres, 2002]. Pour obtenir le nombre le plus probable de coliformes totaux présents dans 1ml d'eau à analyser.

b- 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*. [Khaled, 2009]

Repiquer chaque tube de BCPL trouvé positive avec une anse bouclée ou une pipette pasteur stériles dans le (ou les) milieu(x) de confirmation [Rodier et al., 2009]. Comme milieu de confirmation, on a utilisé: le milieu eau peptonée exempte d'indole.

L'incubation fait cette fois-ci à 44°C pendant 24 à 48 heures [Rejsek, (2002), Lebres, (2002), Delarras, (2007)].

➤ **Lecture**

Dans les tubes montrant un trouble microbien ajouter quelques gouttes de réactive kovacs, une réaction considérée positive correspond à la formation d'anneaux rouges à la surface de tube autrement dit présence de Coliformes fécaux <<*E. coli*>>.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du Npp [Rodier et al., 1996].

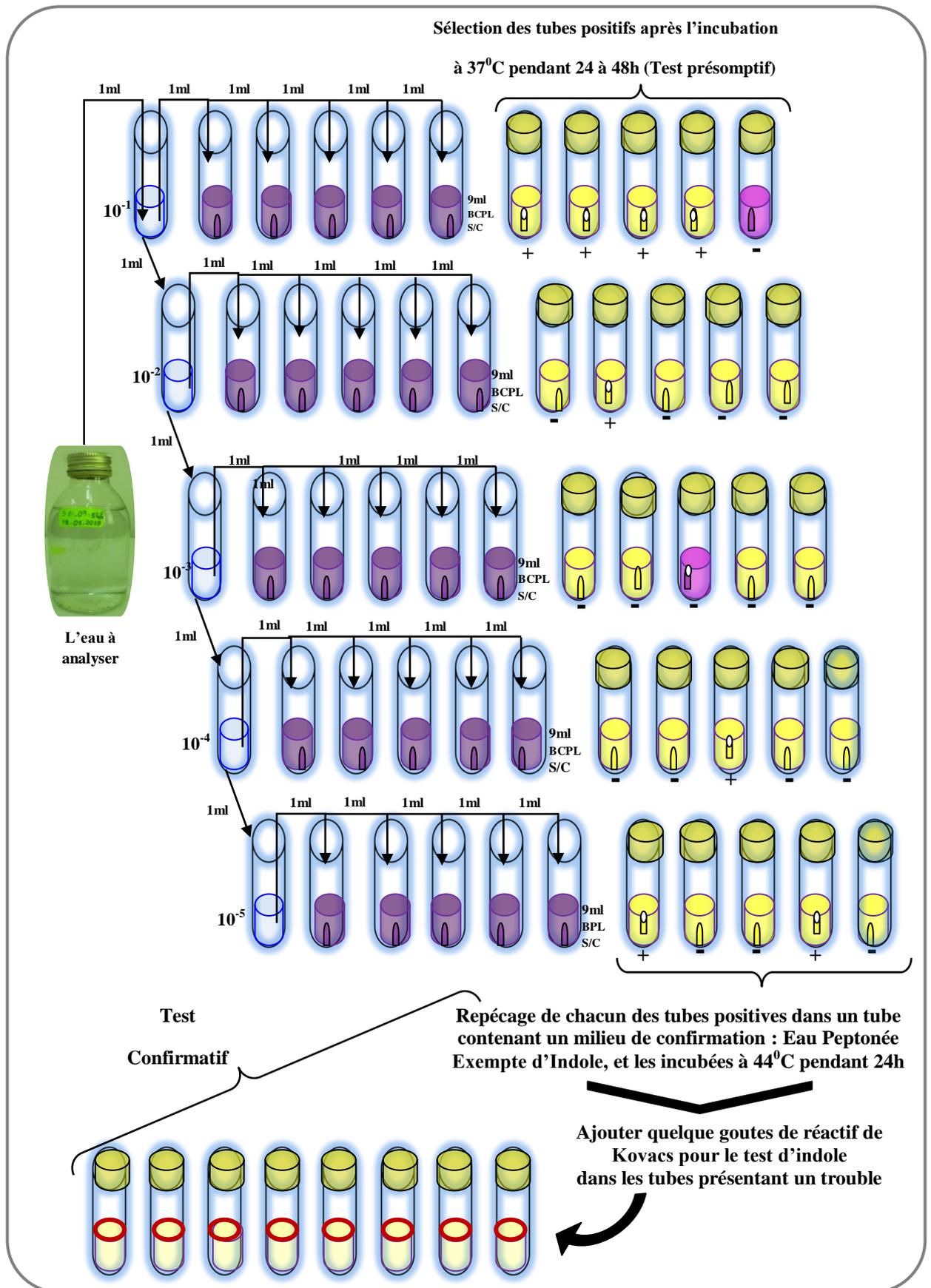


Figure 17 : Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants.

4-3-2-Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (*Enterococcus*) :

Les Streptocoques du groupe D de la classification de Lancefield, sont des bactéries Gram positif, sphériques à ovoïdes, formant des chainettes catalase négative et possédant l'antigène de groupe D. cultivant en anaérobiose à 44°C, et à PH 9,6 et capables d'hydrolyse l'esculine en présence de 40°/°de bile. [Rejsek, 2002].

Ce sont des germes très ubiquitaires, certains groupe sont rencontrés dans le sol, dans l'air, dans l'eau et en distingue deux genres : *Streptococcus*, *Enterococcus*.

➤ Mode opératoire :

La recherche et le dénombrement des streptocoques du groupe "D" dans les eaux, en milieu liquide par la technique du NPP, se fait aussi en deux étapes consécutives :

-Le test de présomption : réservé à la recherche présomptive des streptocoques.

-Le test de confirmation : réservé à la confirmation réelle des streptocoques du groupe "D".

a. Test de présomption :

La recherche se fait en bouillon Rothe D/C (bouillon à l'azide de sodium double concentration) :

-On prépare aseptiquement deux séries de dilution décimale (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) avec la même manière cité précédemment (Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux).

-Homogénéiser et prélever 10ml de la dilution 10^{-1} et l'introduire dans le premier tube de la première série contenant 9ml du milieu Rothe D/C [Rodier et al., 2009].

-Réfère la même méthode pour le reste des tubes des dilutions préparées, pour obtenir finalement deux série de cinq tubes.

- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures. [Lebres, 2002].

➤ Lecture

Seront considérés comme positif les tubes présentant un trouble microbien, seulement ces tubes doivent faire l'objet d'un repiquage sur milieu Eva Litsky.

b. Test de confirmation :

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

Après agitation les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une boucle dans des tubes contenant le milieu Eva Litsky. Bien mélanger le milieu et l'inoculum. [Lebres, 2002].

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

➤ Lecture

Seront considérés comme positifs les tubes présentant :

-Un trouble microbien.

-Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue également selon la prescription de la table du NPP. [Lebres, (2002), Khaled, (2009)].

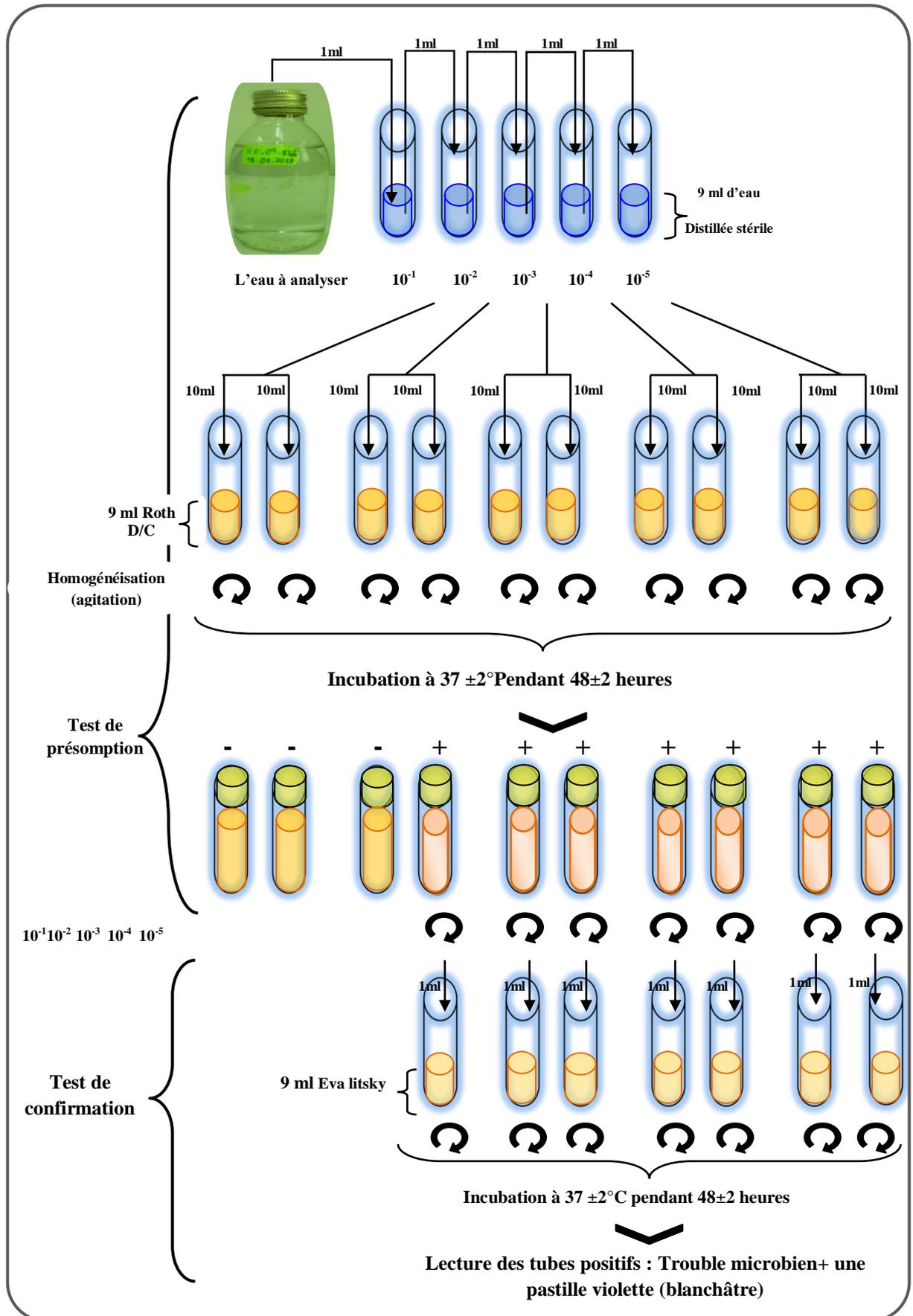


Figure 18: Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des *Streptocoques fécaux* (*Enterococcus*).

4-3-3-Recherche et dénombrement des spores des bactéries Anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridium*) :

Cette recherche concerne des bactéries anaérobies strictes. Ces bactéries ne peuvent pas vivre en présence d'oxygène : pour qu'elles se développent, il faut créer des conditions d'anaérobiose [Rejsek, 2002]. Les clostridium sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale ancienne. [Rodier et al., 2005].

➤ Mode opération

La recherche et le dénombrement des spores des ASR dans l'eau se fait par la méthode d'incorporation en gélose sur tube profonds :

-Après l'homogénéisation, prendre environ 25 ml d'eau à analyser dans un bécher stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80°C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes.

-Après chauffage, laisser refroidir.

-Répartir ensuite le contenu de ce bécher, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube [Lebres, 2002].

-Ajouter dans chacun d'eux environ 18 à 20 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à 45±1°C, additionnée de leurs additifs spécifiques [Rodier et al., 2009].

-Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air.

-Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ, puis incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures [Lebres, 2002].

➤ Lecture :

-La première lecture doit absolument être faite à 16 heures, la deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernières à 48 heures [Rejsek, 2002].

-Dénombrer sur les 04 tubes de culture, la totalité des colonies noires de 0,5 mm de diamètre, poussant en masse [Rejsek, 2002].

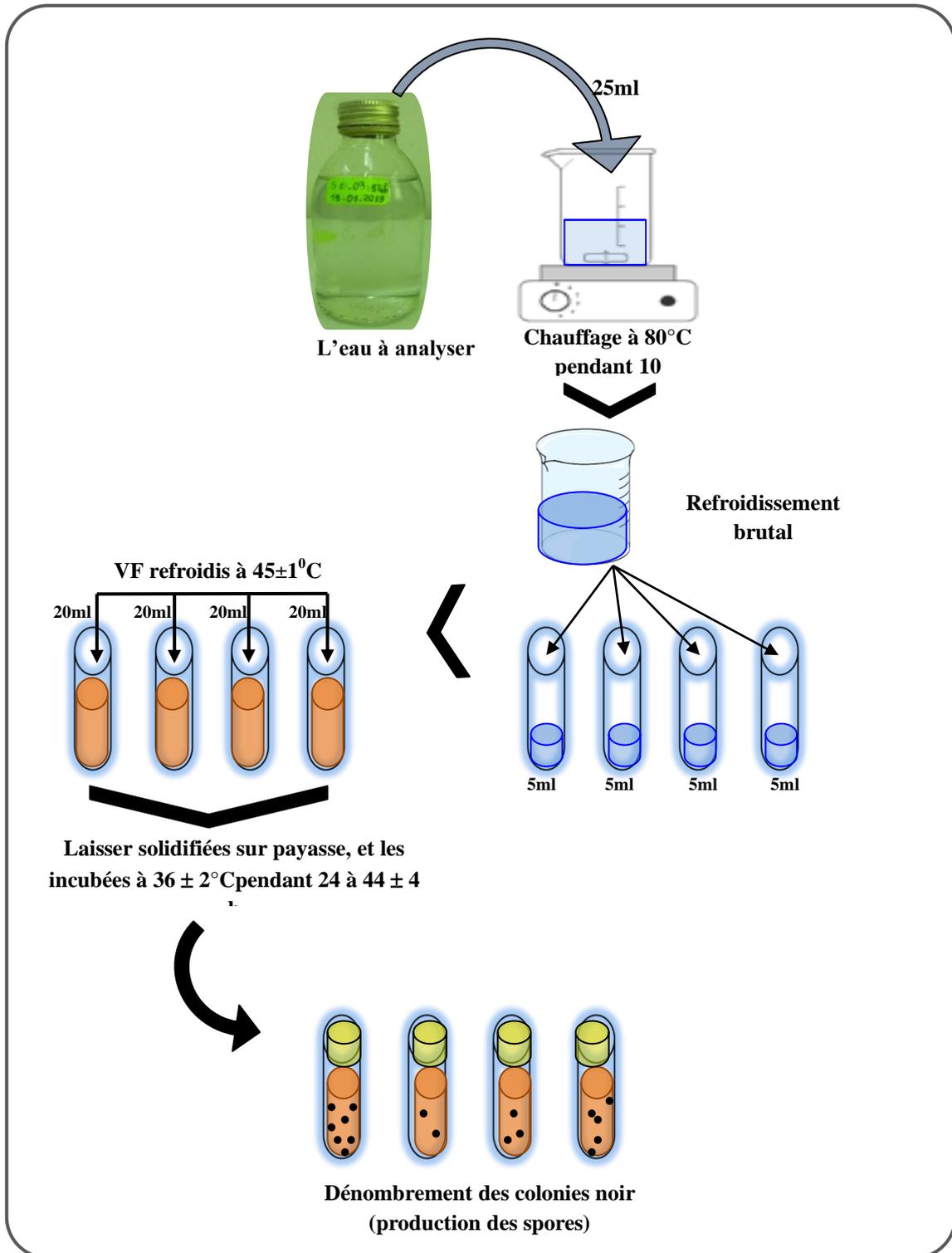


Figure 19: Représentation du mode opératoire de recherche et dénombrement des spores des bactéries Anaérobies Sulfito-Réducteurs (*Clostridium*).

4-4-Recherche des germes pathogènes :

Les bactéries pathogènes d'origine fécale peuvent être recherchées pour confirmer le danger mis en évidence par la présence, dans un échantillon d'eau, de bactéries indicatrices de contamination fécale. cette recherche est souvent pratiquée en liaison avec la déclaration de cas de maladie infectieuses dont on suspecte une origine hydrique .en pratique, de manière courant, on recherche seulement *Salmonella* et *Shigella* [Rejsek, 2002].

Cependant, il existe des microorganismes d'origine non fécale dont le risque sanitaire ne peut être évalué que par la recherche du microorganisme pathogène ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* [Rejsek, 2002].

Les géloses Hectoen , SS , Mac Conky, King A et King B, sont des milieu d'isolement des germes pathogène , bien que de nombreuses bactéries à gram négatif puissent se développer sur ces milieux[Khaled, 2009].

4-4-1-Recherche des *Staphylocoques* :

Les *Staphylocoques* sont des germes ubiquistes [Delarras, 2007], font partis de la famille des *Micrococcaceae*. Ce sont des coques à Gram positive, groupés en amas, catalase positive, et qui se développent à 37 ± 1 °C sur un milieu sélectif : Chapman sans distinction de coloration des colonies, qui possèdent une coagulase pour le plasma de lapin [Rejsek, 2002]. Le genre *Staphylococcus* est constitué de plusieurs espèce dont :*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*.

➤ Mode opératoire :

L'isolement des *Staphylococcus* se fait dans le milieu sélectif Chapman, permettant la croissance des germes halophiles. Ce milieu du fait de la haute concentration de chlorure de sodium (75g.l) à inhibe le développement des germes gram négatif et certaines bactéries [Aouissi, 2010].

-A partir de l'eau à analyser, et à l'aide d'une anse de platine stéril, ensemercer par stries sur des boites de pétri coulée de gélose Chapman [Benamira, 2012].

-L'incubation se fait à 37 ± 1 °C pendant 24 à 48 heures [Delarras, 2007].

-En cas de résultat négatif on laisse les boites 24h à la température du laboratoire [Delarras et al., 2008].

➤ **Lecture et interprétation:**

Les colonies jaunes entourées d'une zone jaune (halo), manitol⁺ sont des *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*... [Delarras, 2007].

Les colonies entourées d'une zone rouge ou pourpre, manitol⁻ sont des *Staphylococcus epidermis*, *S. hominis*... [Delarras, 2007].

-Dans tous les cas, observer les colonies présomptives des Staphylocoques recherchés (colonies jaunes entourées d'un halo jaune de *Staphylococcus aureus*) et procéder à leur identification biochimique [Delarras, 2007].

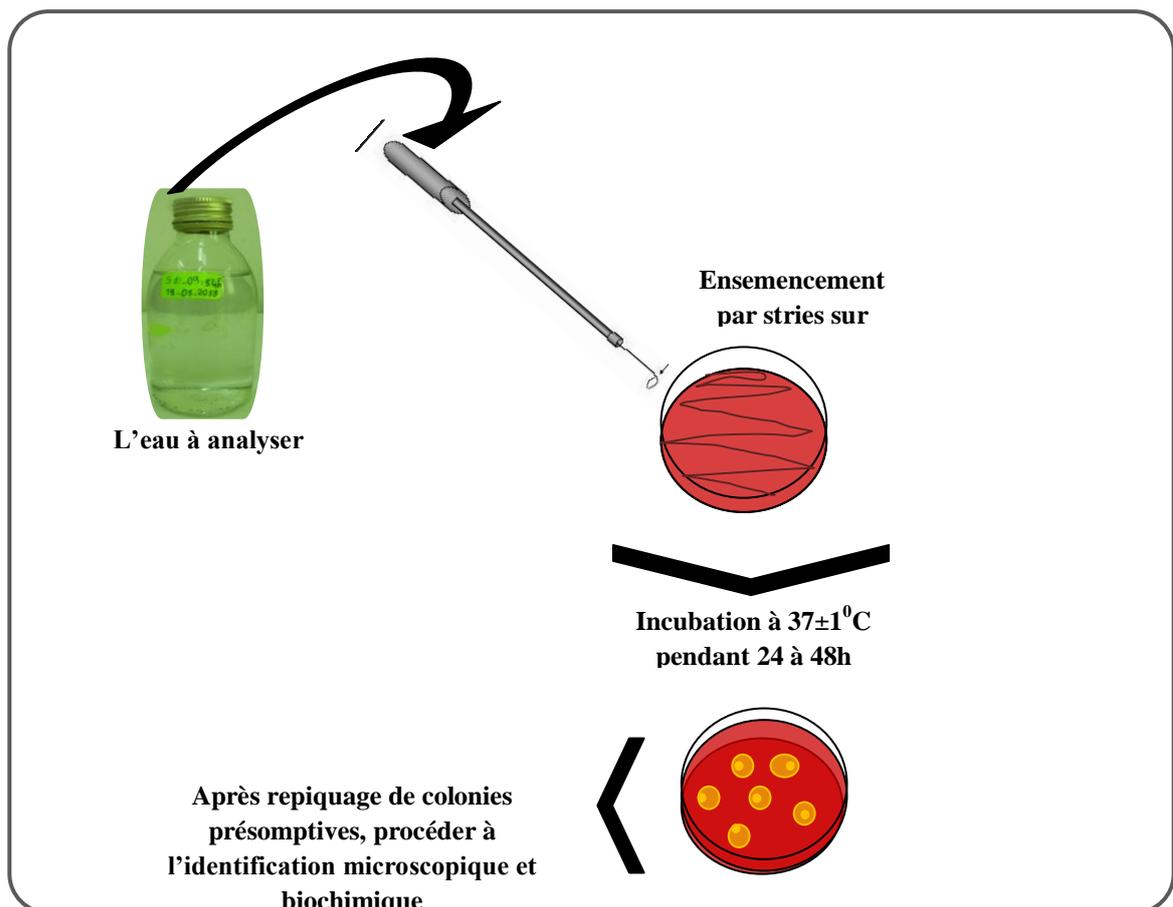


Figure 20: Représentation du mode opératoire de recherche des *Staphylocoques*.

4-4-2-Recherche de *Salmonella* :

Le genre *Salmonella* est l'un des 32 genres de la famille des *Enterobacteriaceae* [Labres et al., 2008]. Ce sont des bactéries à gram négatif, oxydase négatives, anaérobies facultatives, asporulées, en forme de bâtonnet, qui forment des colonies typiques sur milieu sélectif solide elle présente les caractères biochimique et sérologique de ce genre d'entérobactérie [Rejsek, 2002], mobiles pour la plupart avec des flagelles péritriches, ne fermentant pas le lactose, mais fermentant le glucose avec production de gaz et de H₂S [Labres et al., 2008].

➤ Mode opératoire

➤ Premier étape : enrichissement

Introduire 1ml de l'échantillon d'eau dans 10ml de sélénite cystéine (SFB), puis incubé à 37°C pendant une période allant jusqu'à 24 heures [Rodier et al., 2005].

➤ Deuxième étape : isolement

A partir du bouillon d'enrichissement, effectuer des isolements sur le milieu SS [Labres et al., 2008]. L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 à 48 heures [Abdellioui et al., 2012].

➤ Lecture des boîtes et identification :

Après l'incubation les colonies qui sont lactose négatif sur SS vont subir une identification morphologique et biochimique qui se déroule comme suit :

-Examen microscopique : état frais et coloration de gram (bacille gram négatifs).

-Ensemencement : soit d'une galerie biochimique classique qui sera incubé à 37°C, 24h, ou d'une galerie biochimique API 20E [Labres, 2002].

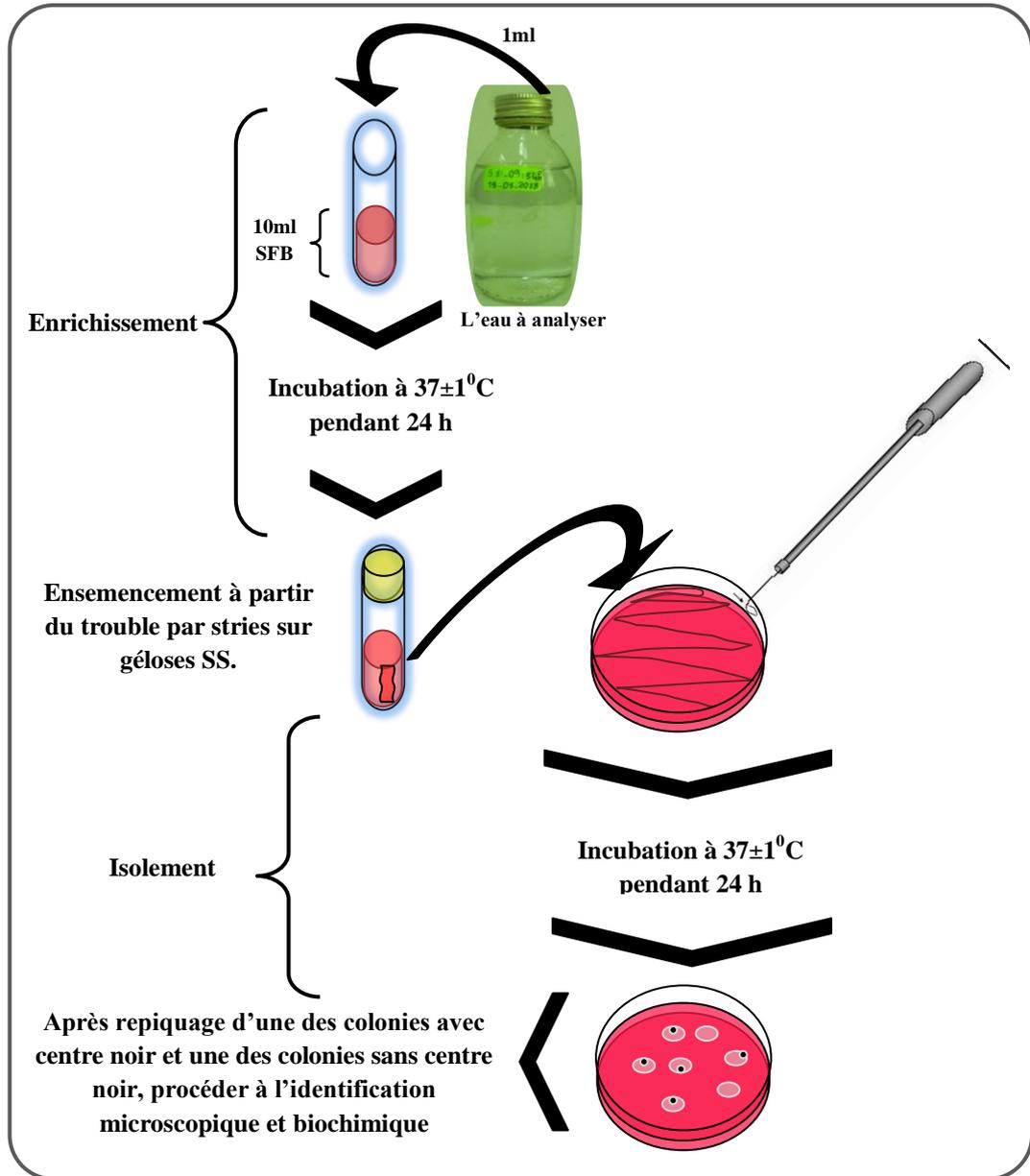


Figure 21: Représentation du mode opératoire de Recherche de *Salmonella*.

4-4-3-Recherche de *Shigella* :

Les Shigelles sont des *Enterobacteriaceae*, rencontrées exclusivement chez l'homme. Elles ne font partie d'aucune flore commensale chez l'homme, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif ; éliminées par les selles et dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps [Carbonnelle et al., (1988), Pechère et al., (1982)].

➤ Mode opératoire

Pour chercher du *Shigella*, à partir de l'échantillon mère on prélève 0.1ml et on l'étale sur la surface de gélose. L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 à 48 heures [Abdellioui et al., 2012].

➤ Lecture des boîtes et identification :

Après l'incubation les colonies qui sont lactose négatif sur SS vont subir un repiquage, et après, une identification morphologique et biochimique qui se déroule comme suit :

-Examen microscopique : état frais et coloration de gram (bacille gram négatifs).

-Ensemencement : soit d'une galerie biochimique classique ou d'une galerie biochimique API 20 E [Labres, 2002].

Tableau 08: Caractères d'identification biochimique de *shigella* [Sayad, 2008].

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

4-4-4-Recherche de *Pseudomonas* :

Microorganisme possédant une oxydase et se développant à 37±1°C sur milieu sélectif au cétrimide et l'acide nalidixique en donnant lieu à fluorescence sous une lampe à ultraviolets en 48 h. ils sont, de plus, capables de cultiver sur une gélose ordinaire à 42°C et de synthèses un pigment : la pyocyanine [Rejsek, 2002]. La gélose cétrimide permet à la recherche et l'isolement sélectif de *Pseudomonas aeruginosa* (bacilles pyocyanique) [Delarras, 2007].

➤ **Mode opératoire :**

• **Isolement :**

-Soit : ensemencer par stries sur boîtes de Pétri coulées de gélose cétrimide à partir de l'eau à analyser et incuber à 37°C pendant 24 à 48h [Delarras, 2007].

-Soit : ensemencer par stries sur un milieu de culture king A et king B à partir de l'eau à analyser et incuber à 37°C pendant 24 à 48h [Labres, 2005].

➤ **Lecture et identification :**

Les colonies pigmentées en vert pale sont présomptives de *Pseudomonas* [Delarras, 2007], et vont subir :

- Un examen direct entre lame et lamelle (état frais), il permet d'observer la mobilité des germes.

-Une coloration de Gram [Abdellioui et al., (2012), Labres et al., (2008)].

-Un test oxydase [Rejsek, 2002].

-**Recherche de la pyocyanine :** pigment bleu caractéristique de *pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue intense des milieux de culture : sa production est favorisée sur milieu de king A [Abdellioui et al., 2012].

-**Recherche de la pyoverdine :** présente une teinte vert fluorescent est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de king B [Labres et al., (2008), Abdellioui et al.,(2012)].

4-4-5-Recherche de *Vibrio cholérique* :

Les *Vibrionaceae*, sont des bactéries qui se présentent sous forme de bacilles Gram négatifs droits ou incurvés (BGN), très mobiles possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs, fermentent le glucose sans production de gaz ni d'H₂S, hautement pathogène [Pechère et al.,(1982), Pilet, (1987), Labres et al., (2008)].

➤ **Mode opératoire**

- **La première étape : enrichissement**

Le premier enrichissement s'effectue sur milieu eau peptonée alcaline (EPA), on ajoute aseptiquement 0.1ml d'eau à analyser au moment du prélèvement. Ce dernier sera par la suite incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures [Lebres, 2002].

- **La Deuxième étape : isolement**

Se fait dans des boîtes de pétris coulées avec de la gélose GNAB, avec repiquage des colonies présomptifs. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **La Troisième étape : lecture des boîtes**

Après incubation, les boîtes de gélose GNAB vont subir une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses, transparentes très caractéristiques [Hamlaoui et al., 2011].

➤ **Identification morphologique et biochimique :**

L'identification est faite sur des colonies provenant de l'une et de l'autre de ces boîtes. Pour chacun de ces prélèvements faire :

- Un examen microscopique entre lame et lamelle (Etat frais) pour examen la morphologie des bactéries : forme incurvée, flagelle polaire unique;
- Une recherche de l'oxydase(+);
- Un examen microscopique après coloration de Gram;
- Une galerie d'identification biochimique (API20 E) [Rodier et al, 2005].

4-5-Recherche des levures et moisissures :

Les levures sont des champignons unicellulaire, leur reproduction asexuée et se reproduisent par scissiparité ou par bourgeonnement [Abdellioui et al., 2012].

Les moisissures sont des organismes eucaryotes et la plupart sont pluricellulaires, qui se propagent par leurs spores. Ces microorganisme se développent en filament appelés hyphes, lesquels, en s'agglomérant, forment le mycélium [Raven et al., 2011].

L'isolement des levures et moisissures peut être pratique sur le milieu Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture [Khaled ,2009].

4-5-1-Caractéristique des colonies :

L'identification des levures est effectuée par une coloration simple entre lame et mamelle sur les cultures en milieu solide, ayant permis d'observer les caractères culturaux :

➤ **Les levures :**

- Colonie de contour bien défini,
- De couleur beige – rosé à bleu – vert,
- Colonie pouvant apparaitre en relief (3D),
- Normalement sans centre de couleur intense [Marzoug, 2009].

➤ **Les moisissures :**

- Larges colonies,
- Thalle aux contours diffus,
- Couleur variable (moisissures pouvant produire leur propre pigmentation),
- Thalles apparaissant plats,
- Le centre du thalle présente normalement une coloration intense [Marzoug, 2009].

5-L'identification :

5-1- Examen macroscopique des caractères culturaux :

Observer à l'œil nu ou à l'aide d'un loupe binoculaire les colonies développés sur les milieux gélosés et noter les caractéristiques suivantes :

- La taille : colonies petites (<1mm), moyennes (1, 5à3 mm), grosses (>3mm) ;
- La forme : bombée, plate, ombiliquée, surélevée ;
- Le contour : à bord circulaire, irrégulières et parfois envahissantes, déchiquetées et parfois envahissantes ;
- Elévation de la colonie : convexe, légèrement convexe, plate ;
- L'opacité : opaque, translucide, transparente ;
- Pigmentation.

5-2- Examen microscopique :

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

5-2-1-L'examen direct (Etat frais) :

L'examen microscopique à l'Etat frais permet d'apprécier à la fois la forme, le mode de regroupement et la mobilité des bactéries isolées.

➤ Technique :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine une fraction de la colonie testée.
- Effectuer une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique en incorporant l'inoculum.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulle d'air.
- L'observation s'effectue à faible luminosité à l'objectif x 10 puis x40 [Lightfoot, 2002].

5-2-2-Coloration de Gram :

La coloration de gram est qualifiée de coloration différentielle car elle permet dès le début de l'examen bactériologique, de cataloguer les bactéries en deux groupes distincts basés sur des propriétés de coloration : les Gram-positifs et les Gram-négatifs [Hamlaoui et al., 2011], donc aide à l'identification des bactéries.

➤ Les étapes de coloration de gram sont :

-Réaliser un frottis et le fixer.

-Réalises une coloration simple au violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.

-Laver la lame à l'eau distillée.

-Ajouter la solution de lugol et laissé agir pendant 1 minute.

-Laver à l'eau distillée.

-Décolorer 20 secondes à l'alcool.

-Rincer immédiatement à l'eau distillée

-Recolorer avec la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 30 secondes.

-Laver la lame avec l'eau distillée.

-Sécher la lame en la tamponnant avec du papier joseph.

-Observer avec un microscope optique à l'objectif x100 (à l'immersion dans l'huile de cèdre) et à pleine lumière [06].

➤ **Lecture:**

Les bactéries Gram positive (G+) sont bien colorées en violet, et Les bactéries Gram négative (G-) sont colorées en rose [Boukrouma, (2008), Carbonnelle, (1988)].

5-3-Examens liés aux caractères biochimiques :

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries [06].

5-3-1-Galerie biochimique classique :**➤ Teste à l'ONPG :**

Ce test est pratiqué pour toute bactérie lactose négatif en 24 h. Réaliser une suspension épaisse des bactéries en eau distillée. Ajouter avec une pince flambée et refroidie un disque imprégné d'ONPG. Incuber à 37°C pendant un temps variant entre 15 à 30 minutes et jusqu'à 24 heures au maximum. Le virage de la couleur du milieu au jaune indique un test positif (ONPG+). Et si le milieu reste incolore le test est dit négatif (ONPG-) [Delarras, 2007].

➤ Teste d'indole :

L'indole est le métabolite terminal de la dégradation du tryptophane présent initialement dans le milieu. Seules les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation de l'indole [Khaled, 2009].

Après incubation des tubes inoculés, la présence d'indole est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge dans la phase alcoolique du réactif de Kovacs, ajouté à raison de 0,5 ml par tube [04].

➤ Recherche d'une uréase :

La recherche de l'uréase consiste à constater l'alcalinisation (formation de carbonate d'ammonium) d'un milieu contenant de l'urée d'où l'utilisation de milieu urée-indole.

Nous réalisons à partir d'une culture sur Hektoen une suspension aussi dense que possible des bactéries à étudier dans 0,5 ml de milieu urée-indole. Nous incubons à 37°C pendant 12 à 18 heures.

-Uréase positive : virage de l'indicateur du jaune au rouge violacé ou rose rouge ;

-Uréase négative : pas de changement de coloration ou virage. [Sayad, (2008), Carbonnelle, (1988)].

➤ Utilisation de citrate de Simmons :

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

L'utilisation du citrate par les bactéries peut faire de façon très diverse, ce qui suivant le cas se traduit par alcalinisation du milieu [**Carbonnelle, 1988**].

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

-Bactérie citrate positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).

-Bactérie citrate négative : pas de culture (coloration verte du milieu inchangée) [**Sayad, 2008**].

➤ **La recherche de la TDA :**

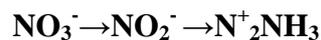
Ensemencer milieu Urée-indole et incubation 24heures à 37°C. Ajouter 2à3 gouttes de réactif TDA.

-Réaction positive virage instantané du milieu au rouge brique.

-Réaction négative milieu non changé [**Lebres, 2005**].

➤ **Le test de réduction du nitrate :**

Ce test permet de détecter si un organisme possède le nitrate réductase qui est une enzyme capable de réduire le nitrate (NO₃⁻) en nitrite (NO₂⁻) :



Nous avons ensemence le bouillon nitrate permettant de mettre en évidence, ce caractère par le germe étudié et incubé à 37 °C pendant 24heures.

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

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

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

-Ou bien les nitrates ont d'abord été réduits en nitrite mais la réduction s'est poursuivie.

-Ou bien les nitrates n'ont pas été réduits en nitrites et se trouvent donc dans le bouillon nitrite.

Dans ce dernier cas, nous provoquons la réduction chimique en ajoutant de la poudre de zinc, et si la couleur apparaitra, la bactérie est dite nitrate réductase négative [**Boulekroune, 2008**].

➤ **Milieu Mannitol-Mobilité:**

Nous avons ensemencé chaque tube du milieu mannitol par piqûre centrale à partir des milieux d'isolement. Incuber à 37°C pendant 24 heures [Aouissi, 2010].

La mobilité se caractérise par une migration des bactéries de la pique centrale vers le reste du milieu entraînant ainsi une turbidité.

La fermentation du mannitol se traduit par le virage de la couleur rouge du milieu au jaune [Bouchaala, 2010].

➤ **Le milieu TSI ou Triple Sugar Iron :**

Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose puis le culot est ensemencé par pique centrale [Denis et al., 2007] à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Incuber à 37°C pendant 24 heures [Abdellioui et al., 2012].

La lecture de ce milieu est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 09: Lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI [Abdellioui et al., 2012].

	Glucose		Lactose et / ou du saccharose		Production de gaz	Formation d'H ₂ S
Le culot	Rouge	Glucose non fermenté	-		Apparition de gaz dans le culot	Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la pique
	Jaune	Glucose fermenté				
La pente inclinée	-		Rouge	Lactose et saccharose non fermentés	-	
			Jaune	Lactose et / ou du saccharose fermenté(s)		

➤ **Test de catalase:**

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

Ce test sert notamment à différencier les bactéries de la famille des exemples : Micrococcaceae (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*....) catalase+, de celle des exemples : Stertococcaceae (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ...) catalase- [Delarras, 2003].

➤ **Recherche de l'oxydase :**

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

La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. La présence d'une oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette [Carbonnelle, 1988].

5-3-2-La Galerie biochimique moderne : API 20 E :

➤ **But:**

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles Gram (-), utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données (un logiciel API).

➤ **Principe:**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs, la lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20 E [Aouissi, 2010].

➤ **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 [Aouissi, 2010].

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

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

-Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur, cupules avec l'huile de paraffine.

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

➤ **Lecture:**

-Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.

-Si le glucose est positif et / ou si 3 tests ou plus sont positif : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

-Test VP: ajouter une goutte de réactifs VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.

-Test TDA: ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.

-Test IND: ajouter une goutte de réactif de Kovacs. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.

-La lecture doit se faire selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E [Aouissi, 2010]. Ou à l'aide du logiciel d'identification API web.

5-3-3-La Galerie API 20 NE :

➤ **Principe :**

La galerie API 20 NE se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Elle est utilisée pour l'identification de certains bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, oxydase positif.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ **Technique :**

Préparation de la galerie:

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

-Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

-Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente.
- Eviter la formation de bulles.
- Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.
- Remplir les tubes et cupules des tests GLU à PAC.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE
- Incuber 24 heures à 30°C.

➤ Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

-Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats [Abdellioui et al., 2012].

➤ Identification :

Avec le tableau d'identification :

-Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

Avec le catalogue analytique :

- Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou4) est indiquée pour chacun.
- Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.
- On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification [Abdellioui et al., 2012].

Ou Avec un logiciel d'identification API web.

5-3-4-La Galerie API Staph :**➤ Principe:**

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitue les tests.

➤ Technique:**Préparation de la galerie:**

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

-Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

-Réaliser une pré-culture sur gélose Columbia au sang

-Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule API Staph Medium, d'opacité égale à 0,5 Mcfarland.

Inoculation de la galerie :

-Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation de bulles.

Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine.

Incuber 24 heures à 37°C [Abdellioui et al., 2012].

➤ **Lecture :**

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

➤ **Identification :**

Avec le tableau d'identification : Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

Avec le catalogue analytique : Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre à 7 chiffres qui sert de code d'identification [Abdellioui et al., 2012].

Ou avec un logiciel d'identification API web.

5-3-5-La Galerie API C AUX

API 20 C AUX est un système d'identification précise des levures les plus couramment rencontrées.

➤ **Principe :**

La galerie API 20 C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La préparation de la galerie API20 C AUX se fait de la même façon que l'API 20 E.

La lecture de ces réactions se fait par comparaison aux témoins de croissance et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification [Abdellioui et al., 2012].

Chapitre IV

Résultats et Discussion

La qualité de l'eau est appréciée par mesures des paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Dans le cas d'une détérioration jugée importante, l'eau ne sera plus considérée comme potable pour la consommation humaine. Elle pourra être telle quelle utilisée à d'autres fins (irrigation ...) ou devra subir un traitement approprié pour retrouver sa potabilité. L'eau des nappes n'est donc pas à l'abri de la pollution et l'autoépuration naturelle n'est pas complète dans toutes les nappes et vis-à-vis de certaines substances.

1-Les paramètres physicochimiques mesurés *in situ* :

1-1-La couleur apparente :

La coloration de l'eau peut être causée par la présence de minéraux naturels (le fer et le manganèse), des algues, des protozoaires, des produits de la décomposition des végétaux ainsi que des composés organiques et inorganique provenant d'effluents industriels et des eaux de ruissèlement des terres agricoles peuvent aussi teinter l'eau [Abdellioui et al.,2012] .

L'eau analysée pendant cette étude est claires, et ne présentent ni mauvaises odeurs ni mauvais gout.

1-2-La température :

La température varie d'un prélèvement à un autre selon le la position, le climat et l'heure de prélèvement.

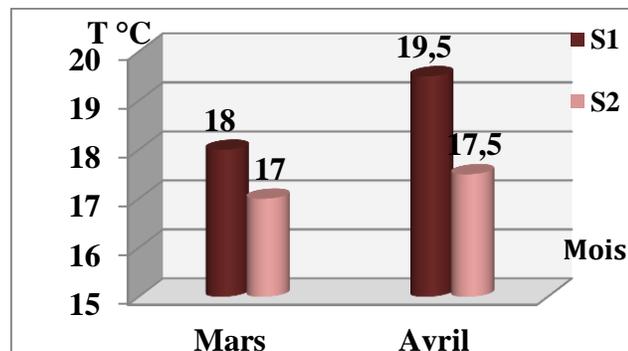


Figure 22: Variation de la température de l'eau de lac souterrain Bir Osman

La température supérieure à 15°C favorise le développement des microorganismes, ce qui intensifie les odeurs et les saveurs. Donc, elle est aussi un facteur écologique très important qui a une grande influence sur les propriétés physicochimiques de l'eau [Ramade, 1993].

D'après les résultats (Figure 22) la température moyenne mesurée *in situ* de l'eau de lac souterrain Bir Osman est 18°C, une température où les germes peuvent se multiplier et influencer la qualité de ce réservoir d'eau douce.

1-3- Le pH :

Le pH des eaux naturelles est lié à la nature des terrains traversés. Il donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité d'une eau. De point de vue sanitaire, un pH élevé peut provoquer un problème de corrosion alors qu'un pH faible peut modifier le goût de l'eau [Benamira et al., 2012].

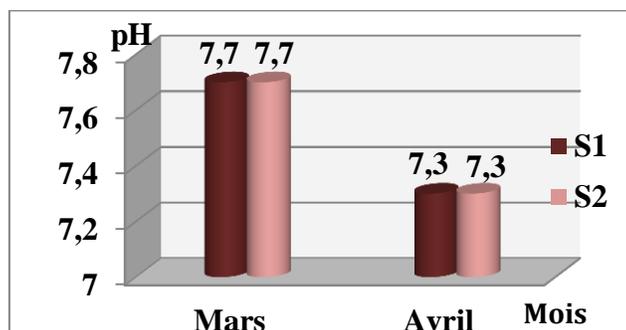


Figure 23: Variation du pH de l'eau de lac souterrain Bir Osman.

D'après les résultats (Figure 23) les valeurs du pH mesurées *in situ* de l'eau de lac souterrain Bir Osman varient entre 7.3 et 7.7, qui représentent un pH neutre et indiquent que la qualité d'eau concernant le pH est bonne.

1-4-La conductivité électrique:

La mesure de la conductivité électrique permet d'évaluer rapidement mais très approximativement la minéralisation globale de l'eau [Rodier, 2005].

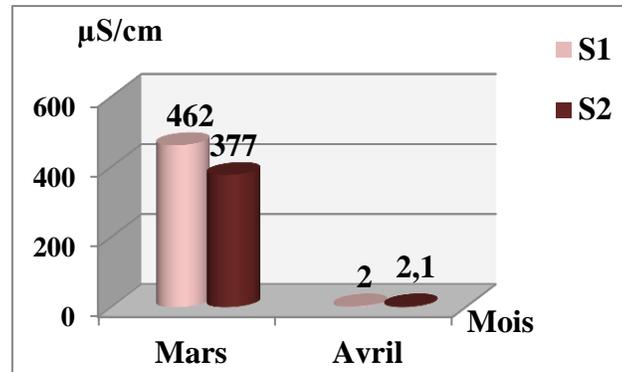


Figure 24: Variation de la conductivité électrique de l'eau de lac souterrain Bir Osman.

La figure 24 nous expose que les valeurs de la conductivité électrique mesurer, au mois de Mars ne dépassent pas la norme recommandée pour les eaux potable ($400 \mu\text{S}/\text{cm}$), indique que l'eau est moyennement minéralisée. Ainsi que, les valeurs mesurer au mois d'Avril montre que l'eau de ce lac est déminéralisée [01].

2- Les analyses microbiologiques :

2-1-Les germes revivifiables :

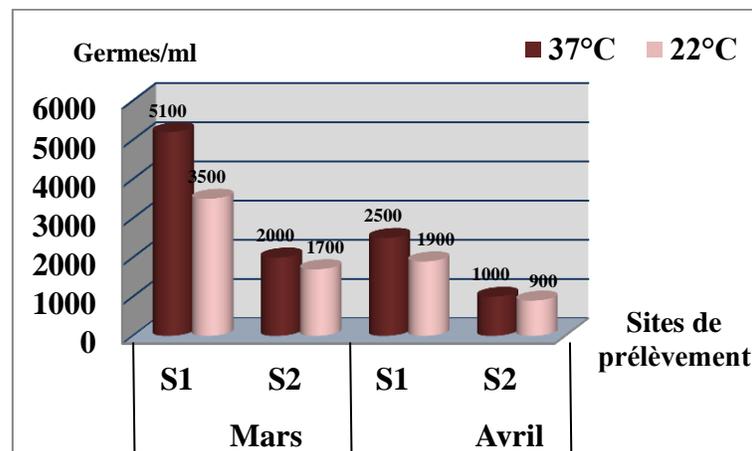


Figure 25: Estimation de nombre des germes totaux à 22°C et à 37°C

Les résultats (Figure 25) de dénombrement des germes totaux à 22°C et à 37°C , indiquent que les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans la première station (S₁) et plus particulièrement pendant le mois de Mars et à 37°C avec $5,1 \cdot 10^3$ germes/ml, la valeur

minimale $0,9.10^3$ germes/ml dénombrée à 22°C dans la deuxième station (S_2) pendant le mois d'Avril.

Ceci, peut être le résultat du phénomène de dilution survenu après les chutes de pluie (qui est instable cette année dans le mois de Mars), et de la température de l'eau.

2-2-Les germes indicateurs de la contamination fécale :

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

2-2-1-Les coliformes totaux :

Les résultats du dénombrement des coliformes totaux sont les figures ci-dessous.



Figure 26: Dénombrement des coliformes totaux dans la station 01 par la méthode de NPP

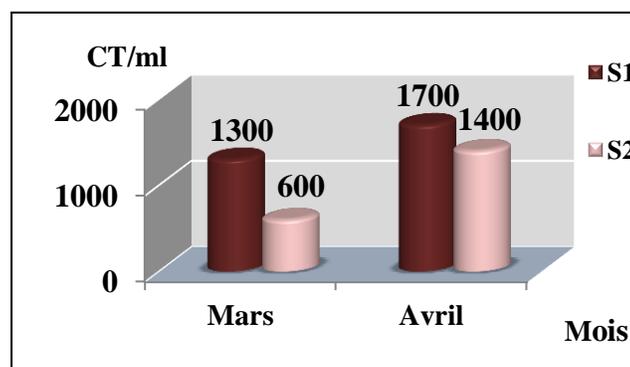


Figure 27: Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de lac souterrain : Bir Osman

D'après la figure 27, on observe que la valeur maximale est de $1,7.10^3$ CT/ml dans la station 1 pendant le mois d'Avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée dans la station 2 pendant le mois de Mars égale à $0,6.10^3$ CT/ml.

Ces valeurs sont élevées, du principalement aux taux important de précipitation pendant le mois d'Avril, et qui met le lac en contact avec une masse importante de germes provenant des déjections animales et humaines, et des germes d'origine terrestre ramenés de terrains agricoles avoisinant par les eaux de ruissèlement ainsi des excréments des chauves-souris héberge la grotte du lac.

2-2-2-Les coliformes thermotolérants:

Les résultats du dénombrement des coliformes fécaux ont les figures et le tableau ci-dessous .



Figure 28: Test de la présence de l'indole sur le milieu eau peptonée exempte d'indole .

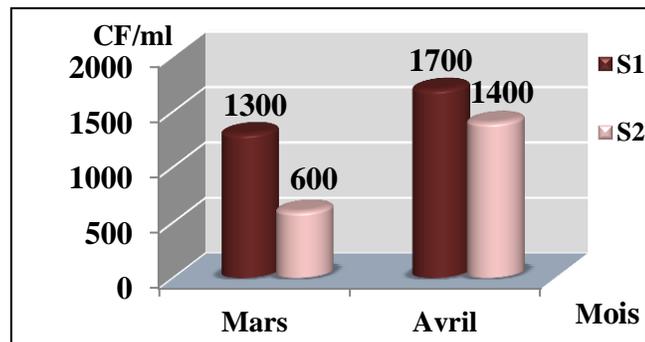


Figure 29: Estimation des coliformes fécaux/ml dans l'eau de lac souterrain Bir Osman

D'après la figure 29 d'estimation des coliformes fécaux, on observe que la valeur maximale est $1,7 \cdot 10^3$ CF/ml dans la station 1 pendant le mois d'Avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée dans la station 2 pendant le mois de Mars égale à $0,6 \cdot 10^3$ CF/ml.

La localisation du lac dans une zone de pâturage l'expose à une contamination fécale par les excréments et les des déchets des animaux.

2-2-3-Les streptocoques fécaux :



Figure 30:Dénombrement des Streptocoques fécaux dans la station 01 par la méthode de NPP.

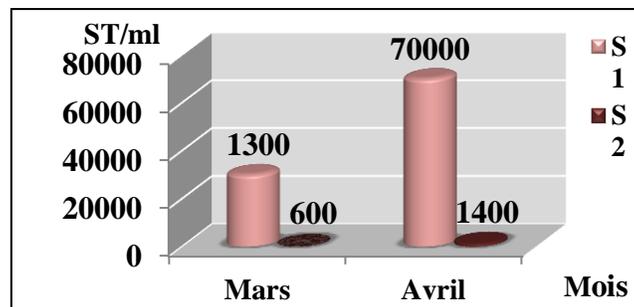


Figure 31:Estimation des Streptocoques fécaux /ml dans l'eau de lac souterrain Bir Osman.

Les effectifs des Streptocoques fécaux, dont le maximum est dénombré le mois d'Avril (Figure31) peut s'expliquer par le fait que le pâturage devient extensive durant cette période, suite à la disponibilité des tapis herbacés, formés par les plantes de prairie qui constituent clairement l'élément visuellement dominant de la pâture. Cet enrichissement est principalement dû au lessivage des terres agricoles avoisinantes chargées d'énormes quantités de fumier, et à l'élevage d'ovin et bovin.

Selon l'OMS, les streptocoques fécaux sont en grand partie d'origine humaine. Cependant, certaines bactéries de ce groupe proviennent également de fèces animales, ou se rencontrent même sur les végétaux.

2-2-4-Les Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) :

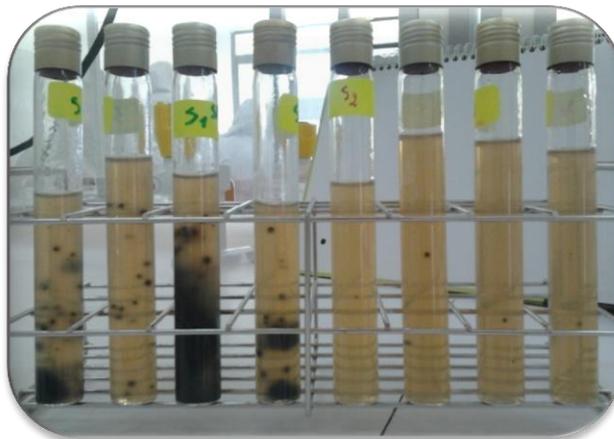


Figure 32: Dénombrement des ASR dans la station 01 et 02

Une absence totale de ces bactéries a été marquée durant le 2^{ème} prélèvement.

Les bactéries anaérobies sulfito- réductrices sont d'origine fécale et indiquent une contamination ancienne.

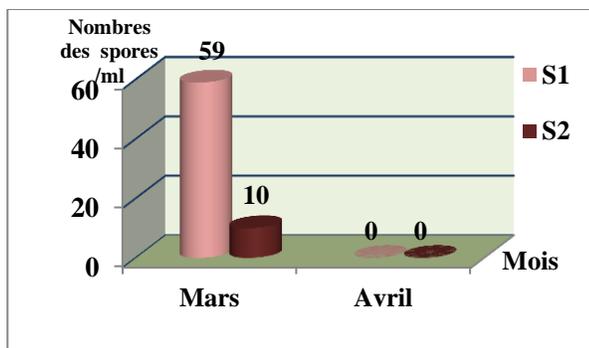


Figure 33 : Estimation des ASR dans l'eau de lac souterrain Bir Osman.

2-3-Identification des souches bactériennes :

Dans l'unique but de rechercher les germes pathogène ; on a effectué sur plusieurs milieux de culture , en utilisant de nombreuses méthodes , des repiquages successifs dans l'unique but de purifier les souches , ceci nous a permis de distinguer les différents caractères des colonies sur les milieux préférentiels d'isolement. Les résultats des aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées et leur identification biochimique, sont résumés dans le tableau et les figures ci-dessus.

2-3-1-Caractères morphologiques et coloration de Gram :

Tableau 10: Aspects macroscopique et microscopique des colonies bactériennes isolées dans lac souterrain Bir Osman.

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
Hectoen (Figure 34)	-Colonies petites, incolores, légèrement blanchâtre, circulaires, bombées, lisse, muqueuses -Colonies petites, rouge, régulier, circulaires, bombées, lisse, muqueuses	-Bacilles Gram négatif (Figure 34, B), -Coccies Gram négatif (Figure 34, C),
SS (Figure35)	-Colonies petites, incolores, sans centre noire circulaires, bombées, lisse. -Colonies petites, avec centre noire, circulaires, bombées, lisse, muqueuses.	-Bacilles Gram négatif, -Bacilles Gram négatif
Mac conkey (Figure 36)	-Colonies petites, jeune, circulaires, bombées, lisse, -Colonies petites, bleu, circulaires, bombées, lisse	-Bacilles Gram négatif (Figure 34, B), -Bacilles Gram négatif
GNAB (figure 37)	-Colonies incolores, circulaires, bombées, lisse, transparentes	-Bacilles incurvé, Gram négatif,
Chapman (Figure 38)	-Colonies jaune entourées d'un halo jaune, circulaire, bombées, lisse	-Coccies regroupés, Gram positive
King A et B	-Aucune colonie	
Citrimide	-Aucune colonie	

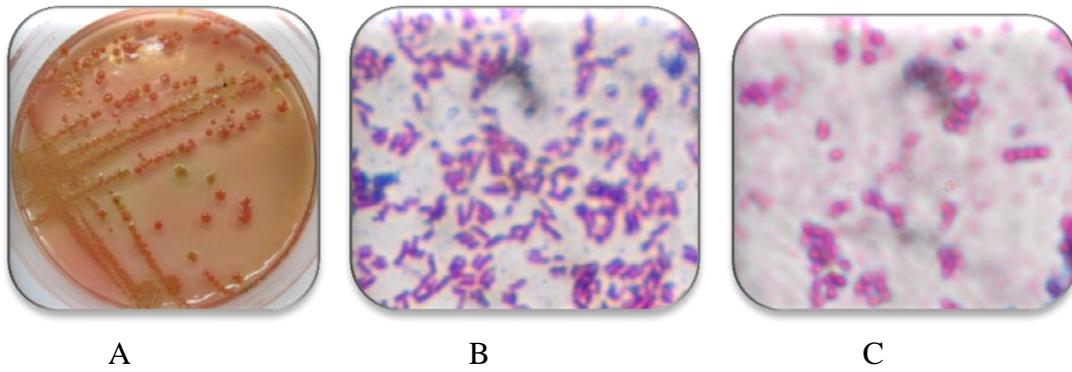


Figure 34: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B, C) des colonies sur gélose Hectoen.

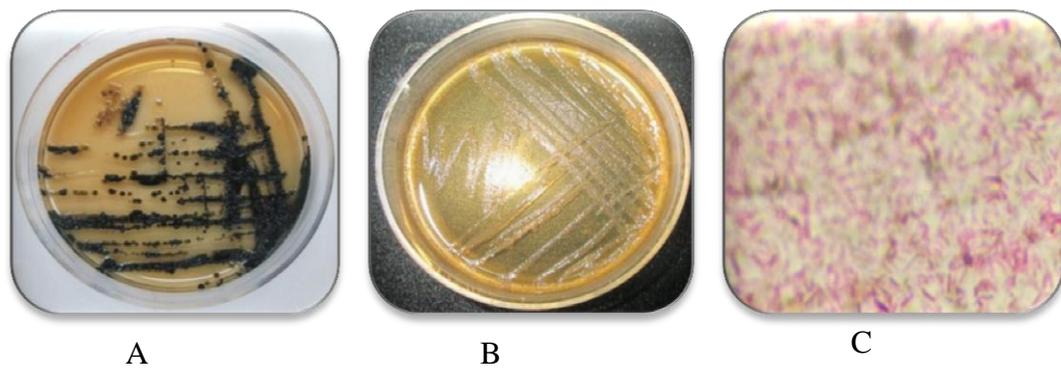


Figure 35: Aspect macroscopique (A, B) et microscopique (C) des colonies sur gélose SS.

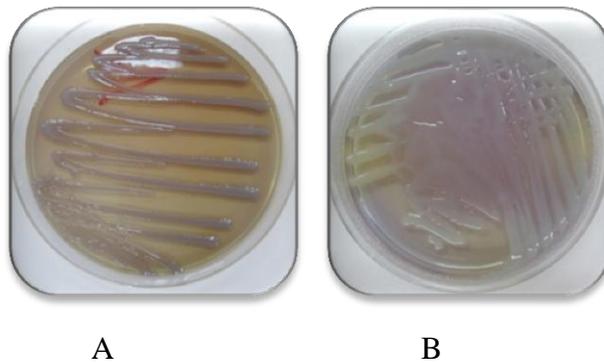
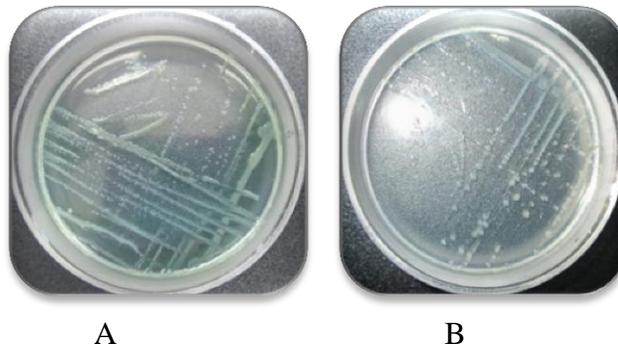
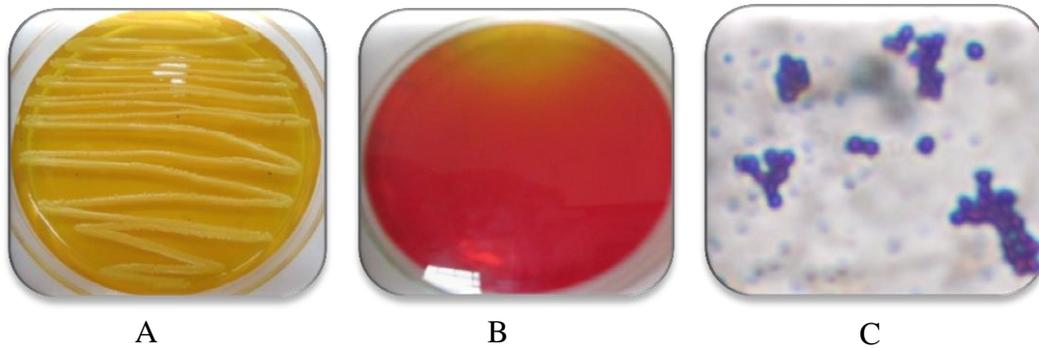


Figure 36: Aspect des colonies sur gélose Mac conkey.



A B
Figure 37: Aspect des colonies sur gélose GNAB.



A B C
Figure 38: Aspect macroscopique (A, B) et microscopique (C) des colonies sur gélose Chapman.

2-3-2-Résultats d'identification biochimique

➤ **Identification par la galerie biochimique classique :**

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

Tableau 11: Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.

Milieu de culture	Espèces bactériennes identifiés
Hectoen	- <i>Enterobacter cloacae</i> - <i>Salmonella arizonae</i>
SS	- <i>Salmonella paratyphi A</i> - <i>Salmonella arizonae</i>
Mac conkey	- <i>Morganella morgani</i> - <i>Klebsiella oxytoca</i>

➤ **Identification par les API systèmes :**

Les espèces bactériennes identifiées par les API système sont résumées dans le tableau et les figure ci-dessous.

Tableau 12: Les espèces identifiées par l’API20E et l’API20NE et l’API staph

Milieu de culture	API systèmes	Espèces bactériennes identifiées
-Hectoen	-API20E	- <i>Serratia odorifera</i>
-Mac conkey	-API20E -API20E	- <i>Klebsiella oxytoca</i> - <i>Serratia odorifera</i>
-GNAB	-API20NE	- <i>Vibrio vulnificus</i>
-Chapman	-API Staph	- <i>Staphylococcus aureus</i>



Figure 39: Profil biochimique de la souche *Serratia odorifera*



Figure 40: Profil biochimique de la souche *Klebsiella oxytoca*



Figure 41: Profil biochimique de la souche *Vibrio vulnificus*



Figure 42: Profil biochimique de la souche *Staphylococcus aureus*

2-5-Identification des levures et moisissures :

L'isolement de la microflore fongique de l'eau du lac souterrain "Bir Osman", sur un milieu de culture sélectif a montré une absence de moisissures, et présence de quelques colonies de levures (Figure39).

Apartir de ces colonies, on arrive à identifier la présence de l'espèce *Trichosporon cutaneum* à l'aide d'un "ApiC aux"(Figure40).



Figure 43: Aspect des colonies sur gélose Sabouraud

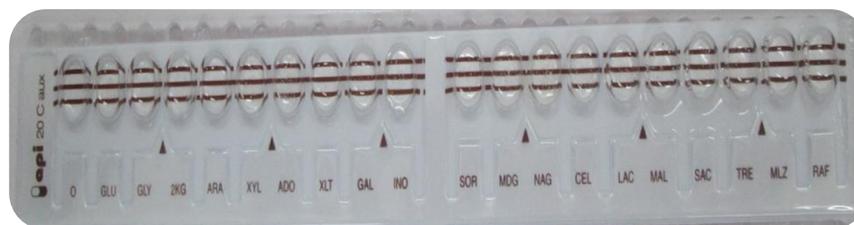


Figure 44: Profil biochimique de la souche *Trichosporon cutaneum*

Conclusion

Le risque de contamination des eaux de surface ou souterrain par des microorganismes d'origine fécale existe depuis très longtemps et constitue un problème environnemental croissant. Dans ce contexte, notre étude a été basée sur l'analyse microbiologique ainsi que quelques paramètres physico-chimiques mesurés *in situ* de l'eau du lac souterrain "Bir Osman" situé dans la région de Hammam Debagh dans la wilaya de Guelma. Cette étude est basée sur un suivi de deux mois (Mars et Avril).

En ce qui concerne les mesures *in situ* on constate que la qualité d'eau de l'eau de ce lac est bonne. Les analyses microbiologiques obtenues à travers les dénombrements réalisés ont permis de confirmer la contamination d'origine fécale de ces eaux par la présence d'un nombre élevé des organismes indicateur. Ainsi que la présence de certaines bactéries pathogènes. Ceci due grâce aux activités d'origine agricoles (application des engrais et fumier) et les déchets d'origine humaine animale entraînés par les eaux de pluies et lessivage des sols.

Cette étude nous a permis d'obtenir plus des informations et des connaissances sur cet écosystème aquatique, et cette réserve d'eau douce très important à l'échelle scientifique. En effet, beaucoup de questions se posent sur la source d'alimentation du lac, la nature de roche forme la grotte, ses liens avec d'autres réseaux hydrologiques, la faune qui héberge la grotte l'origine d'éventuelle contamination de ce site.

A cause des obstacles confrontés de manque du matériel, d'équipement spécialisé, et l'information, et le non disponibilité du temps laissent cette étude incomplète.

Références Bibliographiques

The image shows the title 'Références Bibliographiques' in a large, stylized, black serif font. The letters have a slight 3D effect with a dark shadow cast beneath them, making the text appear to float above a surface. The shadow is a lighter, semi-transparent version of the text, slightly offset downwards and to the right.

➤ **Bibliographie:**

-**Abdellioui et al(2012)**, *Qualité microbiologique d'un écosystème lotique cas de l'oued El Kebir Ouest (Skikda. Nord – Est Algérien)*. Mémoire de Masters. Université 8Mai 1945de Guelma, 76p.

-**Agrigon A, 2000**, *Annuaire de la qualité des eaux et des sédiments*, Dunod, Paris, 206 p.

-**Aouissi A, 2010**, *Microbiologie et physico-chimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord –Est de l'Algérie)*, Mémoire de magister en hydro-écologie, Université 8 Mai 1945de Guelma, 141p.

-**Bagnoules et gaussen H, 1957**, *Les climats biologiques et leurs classifications*, Ann. Géogr, France, 355p.

-**Benamira M, Halassi I, 2012**, *Evaluation de la qualité microbiologique et Physico-chimique de l'eau du lac souterrain : Bir Osman hammam Dabagh – Guelma*. Mémoire de Masters, Université 8Mai 1945de Guelma, 60 p.

-**Bouchaala L, 2010**, *Contribution à l'étude de la Qualité microbiologique et Physico-chimique de l'eau de l'Oued-Zénati (Guelma)*, Mémoire de Masters, Université 8Mai 1945de Guelma, 137p.

-**Bouchlaghem I, 2009**, *Evaluation de la qualité des eaux souterraines de la grotte Osman hammam Dabagh – Guelma*, Mémoire de Masters en qualité des produits et sécurité alimentaire, Université 8Mai 1945de Guelma, 88p.

-**Boukrouma N, 2008**, *Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel : cas de la retenue collinaire d'Ain Fakroune (W. d'Oum el-Bouaghi)*. Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945de Guelma, 64p.

-**Boukroune H, 2008**, *Contribution à l'étude biologique du pouvoir auto-épurateur de l'eau: cas du marais d'El-kennar*. Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945de Jijel, 56 p.

-**Carbonnelle D. Kouyoumdjian S., 1988**, *Bactériologie médicale techniques usuelles*. Méd. Mal. Inf. 251p.

- Chibani S 2009**, *Contribution à l'étude de la Qualité Physico-chimique et microbiologique des eaux de surface et souterraine de la région de Ain Makhlouf (wilaya de Guelma)*, Mémoire de Masters, Université 8Mai 1945de Guelma, p107,
- Collin J, 2004**, *Les eaux souterraines*, brgm édition, La Sorbonne (Paris), 169p
- Cosandey, 2003**, *Les eaux courantes : Géographie et environnement*, édition S-belin, Paris, 240p.
- Dardar F., 2010**, *Evaluation de la qualité des eaux souterrains de la grotte Osman Hammam Dabagh -Guelma*. Mémoire de Magister, Université 8Mai 1945de Guelma, 60 p.
- Delarras C, et Trebaol B, 2003**, *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation- Prélèvement - analyses*. Paris, TEC &DOC, 249p.
- Delarras et C, et Trebaol B(2008)**. *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation – Prélèvement – analyses*. Paris : TEC &DOC .269p.
- Delarras, 2007** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle, sanitaire*, TEC &DOC, Paris, 159p.
- Denis F, 2007**, *Bactériologie médicale techniques usuelles*, Masson, Paris, 384 p.
- .**Gilli et, 2004**, *Hydrologie : Objets, méthodes, applications*, DUNOD, Paris, 303p.
- Guiraud J. P. (1998)**. *Microbiologie alimentaire*. Dunod. 615p.
- Hakmi A, 2002**, *Traitement des eaux « analyse de l'eau de source bousfer ORAN»*, Université des sciences et de la technologie Oran, 71p.
- Hamlaoui B. Behailil M., Laraisia H, 2011**, *Qualité bactériologique et Physico-chimique des eaux de sources de la région de Guelma*, Mémoire de Masters, Université 8Mai 1945de Guelma, 76 p.
- Khaled A., Meparki K 2009**, *Qualité Physico-chimique Et microbiologique Des deux écosystèmes aquatique des Nord-Est de l'Algérie cas du Lac des Oiseaux (EL Tarf) et de Garaet hadj Taher (Skikda) et isolement de Bdellovibrio bacteriovorus*, Mémoire de Masters, Université 8Mai 1945de Guelma, 67 p.

- Lebers E, 2005, *Manuel des travaux pratique : analyse des eaux*. Institut Pasteur d'Algérie, 60 p.
- Lebers E. & Mouffok F, 2008, *Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux*, Institut Pasteur d'Algérie, 53p.
- Lebers E. & Mouffok F, 2008, *Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux*, Institut pasteur d'Algérie, 53p
- Lebers E., Azizi D., Hamza., A. Taleb., F. et Taouchichet B. 2002. *Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments microbiologique des eaux, des boissons et des produits de la mer*. Institut Pasteur d'Algérie.
- Lightfoot nigel francis 2002, *Analyse microbiologiques des aliments de l'eau : directives pour l'assurance qualité* .Edition TEC et DOC. 71p.
- Merzoug, 2009, *Etude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'écosystème lacistre Garaet Hadj-Taher (Benazzouz, wilaya de Skikda)*. Mémoire de Magister en biologie, Université 8Mai 1945de Guelma, 114p.
- Monod T. 1989, *Méharées géographie*. France loisir. 233p Musy A, 2004, *Hydrologie*, Press poly techniques et universitaires Romandes, Lausan, 314p.
- Niemeyer M., 2005, *L'eau source de vie*, Grunod, Paris, 191p.
- Pechere J., 1982, *Reconnaitre traiter les infections*. 4^{ème} édition. Edisen ST Hyacinthe. Québec, Canada, 509p.
- Pilet C., Bourdon J-L., Toma B., Marchal N., Balbastre C. et Person J-M., 1987, *Bactériologie Médicale Et Vétérinaire: Systématique Bactérienne*. Doin. 372p.
- Raven P.H., Georges B., Kenneth A ., Jonathan B ., 2011, *Biologie*. Masson. Paris. 1406p.
- Rejsek F, 2002, *Analyse des eaux technique et aspects réglementaires*, Scérèn CRDP Aquataine, Bordeaux. 358p.
- Rodier J, et al., 2005, *L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer*. 8^{ème} édition. Paris : Dunod, 1383p.

-Rodier J., Legube B., Merlet N. et al., 2009, *L'analyse de l'eau*. 9^{ème} édition. Paris : Dunod, 1526 p.

-Rodier J., Bazin C., Chanbon P., Broutin J.P., Champsaur H., & Rodi L, 1996, *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer*. Paris, Dunod., 1383p.

-Sayad L., 2008, *Qualité Physico-chimique Et Bactériologique Des Eaux De L'écosystème Lacustre Lac des Oiseaux (Wilaya EL Tarf)*, Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar, Annaba, 110p.

➤ **Webgraphie:**

[01]. podcast.amarc.org/africa/ACDI_water/RDC/RKL/emission3.doc

consulté le 13/05/2013 à 22:32h

[02]. <http://echo2.epfl.ch/e-drologie/chapitres/chapitre6/main.html>

consulté le 21/02/2013 à 08 :55h

[03]. http://iahs.info/redbooks/a103/iahs_103_0001.pdf

consulté le 23/04/2013 à 14 :50.

[04]. <http://lycee-valin.fr/bgb/ftech/E1K.pdf> E1

consulté le 21/02/2013 à 09 :09h

[05]. <http://sfa.univpoitiers.fr/geosciences/sites/sfa.univpoitiers.fr@geosciences/IMG/pdf/Hydrogeologie-partie3.pdf>

consulté le 23/04/2013 à 18 :42.

[06]. http://stl.bgb.liberte.free.fr/microbio_fiches/gram1.pdf gram 1

consulté le 07/03/2013 à 18 :35h.

[07]. <http://www.agrireseau.qc.ca/lab/documents/test%20biochimiques.pdf>

consulté le 07/05/2013 à 21 :35h.

[08]. <http://www.elmoudjahid.com/fr/actualites/11299>

Consulté le 31/01/2013 à 17 :04h

[09]. http://www.guelma.org/francais/index2.php?rub=sejour&srub=promenades_guelma&goto=lac_souterrain_guelma

Consulté le 31/01/2013 à 15 :47h.

[10]. <http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/198-CartableEau/ColiformesFecaux.pdf>

Références bibliographiques

consulté le 04/05/2013 à 11 :35h.

[11].http://www.mre.gov.dz/eau/grands_projets_mre.htm

consulté le 18/02/2013 à 17:32h.

[12].<http://www.safewater.org/PDFS/knowthefacts/frenchfactsheets/EauSouterraine.pdf>

consulté le 17/05/2013 à 18 :18h.

[13].<http://www.sous-la-mer.com/newtopic-pagenum-8-1.html>

Consulté le 31/01/2013 à 17 :08h

[14].<http://www.scubalgeria.com/index.php/Exploration-du-lac-souterrain-de-Bir-Ben-Osmane/expedition-de-bir-ben-osmane-de-nouvellesdecouvertesbibliographiques.html>

consulté le 24/01/2013 à 09 :16h.

[15].<http://www.u-picardie.fr/beauchamp/cours.qge/du-8.htm>

consulté le 04/05/2013 à 15 :37.

[16].<http://www.webreview.dz/spip.php?article30>

consulté le 01/05/2013 à 19 :19h.

[17].<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/macgrady.htm>

consulté le 01/05/2013 à 18 :35h.

[18].www.joradp.dz/FTP/jo-francais/2012/F.2012016.pdf

consulté le 07/05/2013 à 17 : 53h.

[19].http://mas.stephanie.free.fr/microbiologie_bio1/fiches%20pdf/galerieAPI20E.pdf

consulté le 06/05/2013 à 17 :17h.

[20].<http://arnobio2.com/techniques2/20-ne.pdf>

consulté le 06/05/2013 à 17 :37h.

Annexes

Annex I



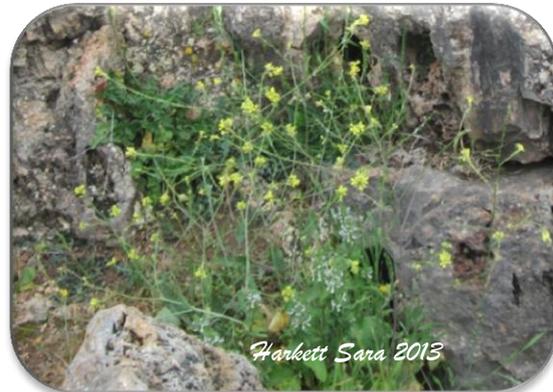
A



B



C



D



E

Figure 1: Quelques espèces de végétation qui se trouvent au niveau de la grotte de "Bir Osman"

Annex II

Tableau1: Tables de Mac Grady utiliser en technique de numération en milieu liquide [17].

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
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						
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

Annex III

Tableau 2: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée api 20e [19].

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase, Lysine décarboxylase, Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fe		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO₂⁻ / N₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annex IV

Tableau 3: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20 NE [20].

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5 mn	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-	β Dgalactopyranoside B-galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate	Assimilation	Transparence	Trouble
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
Ox	Tetraméthyl-pphenylène diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

Annex V

Tableau 4: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée api® Staph [05].

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

Annex VI

Composition chimique des milieux et réactifs utilisés :

- **Eau peptonée 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'indole10 g / l

Chlorure de sodium5 g / 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. (bouillon lactosé au bromocrésol-pourpre)** : Il permet de rechercher et de dénombrer les coliformes, par la fermentation du lactose et la production de gaz.

Il y a deux types:

✓ Double concentration:

Peptone10 g / l.

Extrait de viande6 g / l.

Lactose10 g / l.

Pourpre de bromocrésol0,05 g / l.

Eau distillée1000 ml

pH final = 6 autoclavage = 20 mn a 120C°

✓ Simple concentration:

Peptone5 g / l.

Extrait de viande 3 g / l.

Lactose 5 g / l.

Pourpre de bromocrésol..... 0,025 g / l.

Eau distillée 1000 ml

pH = 6,9 / autoclavage = 20 mn a 120C°

- **Milieu de Chapman** : Le milieu de Chapman mannité est un milieu sélectif pour la culture des staphylocoques Formule (en gramme par litre d'eau distillée)

Peptone bactériologique10 g / l.

Extrait de viande de bœuf.....	1 g / l.
Chlorure de sodium	75 g / l.
Mannitol.....	10 g / l.
Rouge de phénol	0,025 g / l.
Agar	15 g / l.
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.

- **Milieu de Mac Conkey :** L'utilisation de ce milieu est recommandée pour isoler et numérer les entérobactéries dans les eaux, le lait, les matières alimentaires, les urines. Il peut aussi être utilisé pour la recherche, dans les matières fécales, des *Salmonella*, *Shigella* et des *E. coli* entéropathogènes pour le nourrisson.

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

Peptone bactériologique	20 g / l.
Sels biliaires	1,5 g / l.
Chlorure de sodium	5 g / l.
Lactose.....	10 g / l.
Rouge neutre.....	0,03 g / l.
Cristal violet	0,001 g / l.
Agar	15 g / l.
PH : 7,1 (environ).	

❖ **Préparation :**

Verser 51,5 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Liquéfier au bain-marie bouillant et couler en boîtes de Pétri. Après solidification, laisser sécher à l'étuve à 37°C (couverture entrouverte).

- **Milieu de Hektoén:**

➤ **Composition g/l :**

Protéase poptone.....	12,0 g/l
Extrait de levure.....	3,0 g/l
Saccharose.....	12,0 g/l

Lactose.....	2,0g/l
Solicine.....	2, 0 g/l
Chlorure de sodium.....	5,0 g/l
Thio sulfate de sodium.....	5 g/l
Citrate ferrique ammoniacal.....	5 g/l
Sels biliaries..... ;	9, 0 g/l
Bleu de bromothynol.....	0,064 g/l
Fuchsine acide.....	0,04 g/ l

❖ **Préparation:**

- Dissoudre 75 g/l, ne pas autoclave
- Après refroidissement aux environs de 50C°, 15 mg/l Novobiocine peuvent être mélangés sous forme de solution aqueuse filtrée stérilement. Couler en boîtes pH = 7,7+ 0,1.

- **Viande foie (VF):** Préparé en deux étapes sont:

- Milieu de base:

Base viande foie.....	30g
Glucose.....	2g
Amidon.....	2 g
Agar.....	1g
Eau distillée.....	1000 ml

- Au moment de l'emploi:

Ajouter à 20ml de milieu de base fondé 0,5 ml d'une solution de sulfate de sodium a 5% 4 gouttes d'alun de fer commoniacol

- **Gélose nutritive :**

La gélose nutritive est un milieu qui convient à la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

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

Peptone	5 g / l
Extrait de viande	1g/ l
Extrait de levure	2g/l
Chlorure de sodium	5g / l

Agar15g

pH:7,4 (environ)

❖ **Préparation** : Verser 28 g dans un litre d'eau distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

• **Rothe (Bouillon Glucose l'acide de sodium)**: Il y a deux types:

✓ **Double concentration**

Tryptone.....40g

Glucose.....10g

Chlorure de sodium.....10g

Phosphate bi potassique.....5,4 g

Phosphate mono potassique.....5,4 g

Acide de sodium.....0,4g

Eau distillée.....1000 ml

Autoclavage = 15mn 121C° pH = 6,8

✓ **Simple concentration:**

Tryptone.....20g

Glucose.....5g

Chlorure de sodium.....5g

Phosphate bi potassique.....2,7 g

Phosphate mono potassique.....2,7 g

Acide de sodium.....0,2g

Eau distillée.....1000 ml

Autoclavage = 15mn 121C° pH = 6,8

• **Shubert (milieu indole mannitol)**:

Tryptone.....0,2 g

Acide glutamique0,2 g

Sulfate de magnésium.....0,7 g

Sulfate

d'ammonium.....0,4 g

Citrate de sodium.....0,5 g

Chlorure de sodium.....2g

Tryptone oxid.....10 g

Mannitol.....7,5 g

Annexes

Eau distillée.....500 ml
Tamp phosphate.....500ml

pH = 7,6

Autoclavage = 10 mn 115C°

- **Eva- Litsky:**

Peptone.....20g/l
Glucose.....5g/l
Chlorure de sodium.....5 g/l
Phosphate bi potassique.....2,7 g/l
Azothvate de sodium.....0,3 g/l
Ethyle- vliote.....5 g/l

pH = 7

- **TGEA (gélose numération: gélostryptone- glucose- Extrait de levure):**

Tryptone.....5g
Glucose.....1g
Extrait de levure.....2,5g
Gélose.....15g
Eau distillée.....1000ml

pH = 7 2.

- **🚪 Réactifs :**

- **Réactif TDA** : (#7040) pour la recherche de la tryptophane désaminase :

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

- **Réactif IND** : (#7041) pour la recherche de l'indole :

Paradim ethylamino benzaldéhyde.....5.0 g
Alcool isoamylique.....75.0 ml
HCL 37%.....25.0 ml

- **Réactifs de Voges Proskauer (VP)** : pour la recherche de l'acétoïne :

- ✓ **VP 1** (#7042) : Hydroxyde de potassium..... 40 g
Eau distillée..... 100 ml

- ✓ **VP 2** (#7043)

Alpha naphthol.....3...6 g
Ethanol.....100 ml

➤ **Réactif de Kovacs :**

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.....5 g

Alcool isoamylique75 mL

Acide chlorhydrique25 mL

ملخص:

البحيرة الجوفية المسماة: "بئر عصمان" متموقة في منطقة "حمام دباغ" بولاية قالمة, تشكل خزان طبيعي, وذلك مهم. بغية دراسة نوعية الأحياء الدقيقة لمياه هذه البحيرة, قمنا بإجراء تحاليل شهرية (شهر فيفري و مارس) 2013 لبحث وتقدير كمية الجراثيم المؤشرة للتلوث البرازي, و التعرف على بعض الجراثيم الممرضة.

نتائج التحليل الميكروبيولوجية المجراة, بينت تواجد الجراثيم البرازية و انواع أخرى ممرضة من البكتيريا و الفطريات. يعود سبب هذا التلوث إلى النشاطات و النفايات البشرية و الحيوانية.

الكلمات المفتاحية: البحيرة الجوفية: "بئر عصمان", حمام دباغ, ولاية قالمة, النوعية الميكروبيولوجية

Résumé :

Le lac souterrain Bir Osman localisé dans la région de hammam Debagh dans la wilaya de Guelma constitue un réservoir naturel d'eau douce, pour déterminer la qualité microbiologique et quelques paramètres physico-chimique de l'eau de cette lac, en va effectuer des analyse mensuelles (de mars à avril 2013). Afin rechercher et dénombrer des bactéries indicatrices de contamination fécale et identifie certains germes pathogènes.

Les résultats des analyses microbiologique montaient une présence des bactéries indicatrice de contamination fécale et des certaines bactéries pathogène et quelques moisissures. Les sources principales de cette contamination sont les déchets et les déjections d'origine animale ou humaines.

Mots clés :

Lac souterrain Bir Osman, hammam Debagh, wilaya de Guelma, qualité microbiologique.

Abstract:

The underground lake Bir Osman located in the area of steam Debagh in the province of Guelma is a natural fresh water tank to determine the microbiological quality and some physico-chemical parameters of the water of this lake, is conducting analysis Monthly (March-April 2013). To find and count indicator bacteria of fecal contamination and identifies certain pathogens.

The results of microbiological analyzes amounted presence of faecal indicator bacteria and some pathogenic bacteria and some moisissures. The main sources of this contamination are waste and animal manure or human origin.

Keywords:

Underground lake Bir Osman, steam Debagh, wilaya of Guelma microbiological quality.