

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

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



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

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

Thème

Thème : Etude bactériologique de l'eau de la retenue collinaire

"Hadjar Gafta" de la commune Nechmaya (Wilaya de Guelma)

Présenté par : AMIRI Feyrouz

BOUALLEG Wafa

Devant le jury composé de :

Président :	GUETTAF Mohamed	M.A.A	Université de Guelma
Examineur:	AISSAOUI Riad	Dr	Université de Guelma
Encadreurs :	MERZOUG Abdelghani	M.A.A	Université de Guelma
	MERZOUG Seyf Eddine	Attaché de recherche	CRBt Constantine

Juin 2014

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous tenons à remercier Monsieur Mr Guettaf Mohamed, de nous avoir accordé le privilège de présider ce jury.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur Mr Aïssaoui Riad, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération.

Nos remerciements s'étendent également à notre encadreur Mr. Merzoug abdelghani Maître Assistant au Département de Biologie à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma, pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche dans l'accomplissement de ce modeste travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur Mr. Merzoug seyf eddine attaché de recherche au Centre National de Recherche en Biotechnologie à Constantine (CRBT), qui en tant que directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu dont il a su faire preuve malgré ses charges professionnelles me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Sans oublier nos sincères remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont enseigné surtout Mr Houhamdi ; Mme Bousaadia ; Mme Benhalima ; Mr Djekoun ; Mr Atoussi ; Mme Bediouï et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avant tout, louange à « Allah » tout puissant qu'il m'a guidé tout au long de ma vie, qu'il m'a donné courage et patience pour passer tous les moments difficiles, qu'il m'a permis d'achever ce travail et de pouvoir le mettre entre vos mains aujourd'hui.

Je dédis le fruit de 18 ans de mes études surtout à :

A mes très chères parents, «mon père Salah, et ma mère Dalila », qui m'ont entouré de tout pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien moral et matériel durant toutes les étapes de ma vie.



« Je vous remercie, mes parents »

A ma grande mère aussi Fatima que dieu Le garde.

A mes frères : fouad, Messaoud et Ali ainsi que leurs épouses et leur enfants.

A mes chères sœurs : wahiba, Naima, latifa leur époux et leurs enfants.

A mes très chères sœurs: Rima et Chaïma

A ma chère amie Amel qui est aussi une Sœur pour moi, que dieu protège notre amitié.

A toute ma famille Boualleg et Ben mars.

A tous mes amis(es) avec lesquels(les) j'ai partagé des moments exceptionnels de joie et de bonheur. Sans oublier d'adresser mes remerciements les plus chaleureux à toutes les personnes qui ont m'aidé de près ou de loin par le fruit de leurs Connaissances, de leur Savoir pendant toute la durée de mon parcours instructif.

Wafa

Dédicaces

Je dédie ce travail, fruit de recherche et d'étude :

Tous d'abord, louange à Allah qui m'a donné la capacité d'écrire et

De réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur

*A mes plus chers être au monde mon cœur, mon très chère père Mouloud et ma très chère
mère Fatiha qui ont toujours crus en moi et encouragée ; qui ont été toujours là pour
moi ; qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort. Et qui me donner le soutien moral*

A mes chers frères : Abdo, Hossin et Mohamed

A ma chère sœur : Warda, Karima, salima

A ma chère Mohamed et ma mère Sakina et mon père Abd Arahman

A tous les anges de la maison : Amira, Raid, Tamer, Silia, aniss, Lojeine et Hadil

A toute ma famille Amiri et Kamouche et Touhara

A tout mes chères amies

*A Seyf qui nous a encadrés, conseillés et suivi notre travail je te remercie de tout mon
cœur*

A toute la promotion (Master 2 SEE de l'Université de Guelma).

Feyrouz

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Première partie : étude bibliographique

Chapitre I : Description du site

1. Présentation de la wilaya de Guelma.....	2
2. Situation de la commune de Nechmaya	2
3. Présentation du site d'étude (Retenue collinaire de Hadjar Gafta).....	3
3.1. Hydrographie de la région d'étude.....	5
3.2. Etude climatique.....	7
3.2.1. La température	8
3.2.2. Les précipitations (Pluviométrie).....	9
3.2.3. L'humidité.....	9
3.3. Synthèse climatique.....	9
3.3.1. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен.....	9
3.3.2. L'indice pluviométrique d'Emberger.....	10
3.4. Exploitation du site.....	11

Chapitre II : Les maladies à transmission hydrique

1. Définition des maladies hydrique.....	14
2. Les principales maladies d'origines hydrique.....	14
2.1. Maladies d'origine bactérienne	16
2.1.1. Fièvres typhoïde et paratyphoïdes.....	16
2.1.2. Choléra	16
2.1.3. Gastroentérites aiguës et diarrhées.....	16
2.2. Maladies d'origine virales.....	17
2.2.1. L'hépatite A.....	17
2.2.2. L'hépatite E.....	18
2.2.3. Gastroentérites virales	19
2.3. Maladies d'origine parasitaire	19
2.3.1. Les protozoaires.....	20
2.3.2. Les helminthes	21

Deuxième partie : étude expérimentale

Chapitre III: Matériel et méthodes

1. Présentation des stations de prélèvement	23
2. Mode de prélèvement.....	24
3. Enregistrement et étiquetage des échantillons.....	25
4. Transport et conservation des échantillons.....	25
5. Analyses effectués.....	26
5.1. Mesures <i>in situ</i>	26
5.2. Analyse bactériologique.....	27
5.2.1. Recherche et dénombrement des germes revivifiables à 22 et 37 °C.....	27
5.2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale.....	30
5.2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux avec identification d' <i>Escherichia coli</i> en milieu liquide (méthode de NPP).....	30
5.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (<i>Enterococcus</i>).....	33
5.2.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR)	35
5.3. Recherche des germes pathogènes.....	37
5.3.1. Recherche des staphylocoques.....	38
5.3.2. Recherche de <i>Shigella</i>	39
5.3.3. Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
5.3.4 Recherche de <i>Salmonella</i>	42
5.3.5. Recherche de <i>Vibrio cholérique</i>	44
6. L'identification.....	46
6.1. Examen macroscopique des caractères cultureux.....	46
6.2. Examen microscopique.....	47
6.3. Examens liés aux caractères biochimiques et enzymatiques.....	48
6.3.1. Caractères enzymatiques.....	48
6.3.2. Caractères biochimiques.....	50

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Paramètres physico-chimiques mesurés <i>in situ</i>	58
1.1. Température.....	58
1.2. pH.....	59
1.3. Conductivité électrique.....	60
1.4. Oxygène dissous.....	61
2. Analyses bactériologiques.....	63
2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux.....	63
2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	65
2.2.1. Coliforme totaux.....	65
2.2.2. Coliforme fécaux.....	66
2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	67
2.4. Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-reductrices (ASR).....	69
2.5. Identification bactériennes.....	70
2.5.1. Caractères morphologique et coloration de Gram.....	71
2.5.2. Résultats de l'identification biochimique.....	74
Conclusion.....	78

Références bibliographiques

Résumé

Abstract

ملخص

Annexes

Liste des abréviations

(+): Caractère positif

(-): Caractère négatif

ADH: Arginine DiHydrolase

ASR: Anaérobies sulfito-réducteurs

BCPL : Bouillon lactose au pourpre de bromocrésol

CDN : commune de Nechmaya

CE:collaboration Européenne

CE : conductivité électrique

CF : Coliforme fécaux

CF/ml : coliforme fécaux par millilitre

CIT : Citrate

CNRDPA : Centre national de recherche et developpement de la peche et l'aquaculture

CT/ml : coliforme totaux par millilitre

CT : Coliforme totaux

DA : Dinars Algérien

DGF : direction générale du foret

D.P.A.T.: Direction De La Planification Et De l'Aménagement Du Territoire

D.S.A : Direction Des Services Agricoles

E.coli : *Escherichia coli*

EPA : Eau Peptonée Alcaline

Fe²⁺: Fer ferreux

Fe S : sulfate de fer

GEL : Gélatinase

GLU : Glucose

GNAB:gélose nutritive alcaline de billé

GN : gélose nutritive

Ha : hectare

Hm³: Hectomètre cube

H₂S : Hydrogène sulfuré

IND: Indole

°K : Kalvan

Km : Kilomètre

Km² : Kilomètre carré

LDC: Lysine Décarboxylase

Max: maximum

NaCl:Chlorure de Sodium

Na₂SO₃ : Sulfite de sodium

NO₂⁻ : nitrite

NO₃⁻ : nitrate

NPP : nombre plus probable

ODC:Ornithine Décarboxylase

OMS : organisation mondial de santé

ONPG: Ortho-Nitrophénol-B-D-Galactosidase

P : précipitation

pH : potentiel Hydrogène

Q₂ : Quotient pluviométrique d'Emberger

RM:Rouge de Méthyle

S1 : Station 1

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S/C : simple concentration

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

SFB:Bouillon Sélénite Cystéine

SF/ml :streptocoque fécaux par millilitre

SS:*Salmonella-Shigella*

S. saprophyticus : *Staphylococcus saprophyticus*

TDA:Tryptophane Décarboxylase

TGEA : Tryptone – Glucose – Extrait de levure – Agar

TSI: Triple SugarIron

UFC : unité formant colonie

URE : Urée

VF: Viande Foie

VP : Voges-Proskauer

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Fig.1	Situation géographique de la wilaya de Guelma et de ces communes	3
Fig.2	Photos de retenue collinaire Hadjar Gafta en mois d'Avril	4
Fig.3	Image satellitaire de retenue collinaire de Hadjar Gafta	5
Fig.4	localisation géographique des retenues de la wilaya de Guelma	7
Fig.5	Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussens de la région de Guelma. (2002 - 2013)	10
Fig.6	Situation de la wilaya de Guelma dans le climagramme d'Emberger. (2002 – 2013)	11
Fig.7	L'utilisation des eaux de la retenue collinaire Hadjar Gafta dans l'irrigation	12
Fig.8	Les pêcheurs au niveau de la retenue collinaire Hadjar Gafta « Station 2 »	13
Fig.9	Le pâturage dans les surfaces avoisinant des eaux de la retenue collinaire Hadjar Gafta	13
Fig.10	Localisation des stations de prélèvements	23
Fig.11	La station 1 au mois de Mars	24
Fig.12	La station 2 au mois d'Avril	24
Fig.13	Flacon d'échantillonnage munis d'une étiquette	25
Fig.14	Multi paramètre de terrain de marque WTW (Multi 1970i)	27
Fig.15	Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à 22 et à 37°C dans les eaux	30
Fig.16	Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes Thermotolérants par la méthode de NPP	33
Fig.17	Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	35

	dans les eaux par la méthode de NPP	
Fig.18	Protocole de recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans les eaux	37
Fig.19	Protocole de recherche de <i>Staphylococcus</i> dans les eaux	39
Fig.20	Protocole de recherche de <i>Shigella</i> dans les eaux	41
Fig.21	Protocole de recherche de <i>Pseudomonas</i> dans les eaux	42
Fig.22	Protocole opératoire de la recherche de <i>Salmonella</i> dans l'eau	44
Fig.23	Protocole opératoire de recherche et identification de <i>Vibrio</i> dans les eaux	46
Fig.24	Procédure de la coloration de Gram	48
Fig.25	Exemple d'un test catalase	49
Fig.26	Exemple d'un test oxydase	49
Fig.27	Test coagulase	50
Fig.28	Présentation d'une galerie API 20 E	55
Fig.29	Présentation d'une galerie API 20 NE	56
Fig.30	Présentation d'une galerie API Staph	57
Fig.31	Variations de la température de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014)	58
Fig.32	Variation du pH de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014)	60
Fig.33	Variations de la conductivité électrique de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014)	61
Fig.34	Variation de l'oxygène dissous de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Avril 2014)	62
Fig.35	Evaluation des germes revivifiables à 22 °C de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars 2014)	64
Fig.36	Evaluation des germes revivifiables à 37 °C de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars 2014)	64
Fig.37	Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar	65

	Gafta (Mars – Avril 2014)	
Fig.38	Résultat de la Recherche des coliformes totaux et fécaux dans la retenue de Hadjar Gafta	66
Fig.39	Estimation des coliformes fécaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2013)	67
Fig.40	Réaction d'Eva litsky pour la recherche des streptocoques fécaux dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta	68
Fig.41	Estimations des streptocoques fécaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta. (Mars – Avril 2014)	68
Fig.42	Résultats des ASR trouvés dans l'eau de la retenue	69
Fig.43	Observation microscopique des formes sporulantes et végétatives des ASR (Grossissement ×100).	70
Fig.44	Aspect des colonies sur géloses : A : SS et B : Mac Conkey	73
Fig.45	Aspect des colonies sur gélose GNAB	73
Fig.46	Coccobacille à Gram négatif	73
Fig.47	Aspect des colonies sur gélose Hektoen	73
Fig.48	Coccobacille à Gram négatif	73
Fig.49	Aspect des colonies sur milieu Chapman (Station 2)	74
Fig.50	Cocci à Gram positif en amas (Grossissement ×100)	74
Fig.51	Test de staphylocoagulase négatif	75
Fig.52	Image de l'identification par la galerie biochimique classique	76
Fig.53	Profil biochimique de la souche <i>Shigella spp</i>	77
Fig.54	Profil biochimique de la souche <i>Photobacterium damsela</i>	77
Fig.55	Profil biochimique de la souche <i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Mannheimia</i>	77
Fig.56	Profil biochimique de la souche <i>Chryseobacterium indologenes</i>	77

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tab.1	Caractéristiques techniques de la retenue collinaire Hadjar Gafta	4
Tab.2	Liste des exploitations agricoles pouvant irriguer à partir des retenues collinaires existantes	6
Tab.3	Données climatiques de la station météorologique de la wilaya de Guelma (2002 - 2013).	8
Tab.4	Historique de l'ensemencement des espèces des poissons	12
Tab.5	Les principales maladies d'origine hydrique et leurs agents responsables.	15
Tab.6	Présentation des stations de prélèvement	24
Tab.7	Tableau de Mac GRADY.	Annexe 1
Tab.8	Les principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de <i>Staphylococcus</i>	Annexe 2
Tab.9	Caractères d'identification biochimique de <i>Shigella</i> .	40
Tab.10	Lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI.	51
Tab.11	Lecture d'API 20 E	Annexe 3
Tab.12	Lecture d'API 20 NE	Annexe 4
Tab.13	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API Staph	Annexe 5
Tab.14	Température de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (°C).	58
Tab.15	Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température.	59
Tab.16	Le pH de l'eau de la retenue Hadjar Gafta.	59
Tab.17	La conductivité électrique de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (µs/cm).	60
Tab.18	La grille de la qualité des eaux des rivières selon la conductivité électrique	61

Tab.19	L'oxygène dissous de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (mg/l).	62
Tab.20	Qualité des eaux en fonction du pourcentage de saturation en oxygène dissous.	63
Tab.21	Dénombrement des germes revivifiables à 22 °C et à 37 °C (UFC/ml)	63
Tab.22	Dénombrement des coliformes totaux (CT/ml).	65
Tab.23	Dénombrement des coliformes fécaux (CF/ml).	66
Tab.24	Dénombrement des streptocoques fécaux (SF/ml).	68
Tab.25	Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR/20 ml).	69
Tab.26	Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées dans l'eau de la retenue	71
Tab.27	Résultats du profil biochimique des <i>Staphylococcus</i> isolés.	74
Tab.28	Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.	75
Tab.29	Les espèces identifiées par l'API 20 E et l'API 20 NE.	76

Etude bibliographique

Introduction

L'eau est une ressource naturelle précieuse et essentielle pour de multiples usages (domestiques, industriels et agricoles). Sa qualité est un facteur influençant l'état de santé et la mortalité à la fois chez l'homme et chez les animaux **(El Moustaine et al., 2013)**

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cinq millions de nourrissons et d'enfants meurent chaque année de maladies diarrhéiques dues à la contamination des aliments ou de l'eau de boisson. **(Coulibaly, 2005)**

La qualité de l'eau dépend de plusieurs facteurs : physiques, chimiques, biologiques et humains. La contamination des eaux de surface par des agents pathogènes est un problème de pollution remonte très loin dans le temps. Elle est à l'origine de différentes maladies hydriques qui ont été responsables de vastes épidémies de dysenteries, fièvre typhoïde, cholera et autre. **(Rodier et al., 2005)**

Vue cette importance majeure, nous avons essayé d'étudier et de déterminer la qualité bactériologique des eaux de la retenue collinaire de Hadjar Gafta qui se situe dans la région de Guelma et ceci dans le but d'évaluer sa qualité, son impact sur l'environnement et si cette retenue peut être utilisée pour l'irrigation.

Pour cela nous nous somme intéressé sur :

- La rechercher et le dénombrer des Germes indicateurs de contamination fécale qui regroupent : les Coliformes totaux, les Coliformes, les Streptocoques fécaux et les anaérobies Sulfito-réductrices.
- La rechercher des bactéries pathogènes telles que les Entérobactéries pathogènes, Vibriion cholériques et Staphylocoques pathogènes.

Notre mémoire est partagé en deux parties, une bibliographique et l'autre pratique :

- La partie bibliographique, devisée en deux chapitres, le premier présente une description du site d'étude et le second rassemble quelques maladies à transmission hydrique.
- Dans la partie pratique, le troisième chapitre consacrée à la présentation du matériel et la méthodologie suivie pour la réalisation des analyses bactériologique de l'eau de la retenue. Par contre le dernier chapitre, explique les différents résultats obtenus au cours de notre étude, avec une discussion de ses résultats.
- Enfin, une conclusion pour clôturer ce travail.

Chapitre I

Description du site

1. Présentation de la wilaya de Guelma

La wilaya de Guelma est située au Nord-Est de l'Algérie à 60 km environ de la Méditerranée. Elle est limitée au Nord par la wilaya d'Annaba, au Nord-Ouest par la wilaya de Skikda, au Nord-Est par la wilaya d'El Tarf, à l'Ouest par la wilaya de Constantine, au Sud-Ouest par Oum-El Bouagui et au Sud-Est par la wilaya de Souk Ahras (**Fig. 1**). Elle s'étend sur une superficie de 3686,84 Km².

Sur l'aspect administratif : la Wilaya de Guelma a été créée en 1974, comprend 10 Dairas et 34 Communes. (**DPAT, 2008**).

Ci-dessous, nous allons présenter la commune de Nechmaya, qui appartient à la Daïra de Guellat Bou Sbaa où nous trouvons notre site d'étude.

2. Situation de la commune de Nechmaya

Sur le plan administratif la commune de Nechmaya appartient à la daïra de Guellat Bou Sbaa et à la wilaya de Guelma, elle a été créée en 1855. La ville compte 9 964 habitants d'après le dernier recensement de la population en 2013. Elle est délimitée au Nord par la commune d'Aïn Berda (Wilaya d'Annaba), au Sud par la commune de Guellat Bou Sbaa et Djeballah Khmissi, à l'Est par la commune d'Ain Ben Beida et vers l'Ouest par la commune de Bouati Mahmoud et Heliopolis (**Fig. 1**). La commune de Nechmaya est distante de la wilaya de Guelma de 20 Km. **[1] (C.D.N, 2014)**

Ses coordonnées géographiques sont :

Latitude : 36° 36' 41 " Nord

Longitude : 7° 30' 48 " Est

Altitude : 254 m

Chapitre I I
Les maladies à
transmission hydrique

Au cours du 19^e siècle, les maladies d'origine hydrique ont été responsables dans le monde de vastes épidémies de dysenteries, fièvre typhoïde, choléra...etc. Aujourd'hui, l'O.M.S considère que la mauvaise qualité microbiologique des eaux consommées reste la première cause des problèmes de santé. **(Lesne, 1998)**

Les maladies d'origine hydrique sont le plus souvent transmises par voie féco-orale et la contamination de l'homme se réalise alors soit par consommation d'aliments contaminés par l'eau, soit lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif. **(Guiraud, 1998)**

Toutefois les maladies à transmissions hydriques recouvrent un large éventail de manifestations pathologiques d'origine bactérienne, parasitaire ou virale. Ces infections se propagent rapidement dans les pays ne disposant pas de bonnes conditions et de système de traitement des eaux. **(Kreisel, 1991; in Aouissi, 2009 ;)**

1. Définition des maladies hydriques

Les maladies hydriques sont n'importe quelles maladies causées par la consommation d'eau contaminée par des fèces animales ou humaines, qui contiennent des microorganismes pathogènes. Les maladies hydriques s'étalent par la contamination des systèmes de distribution d'eau potable par l'urine et les fèces des personnes ou animaux infectés. **(Kreisel, 1991 ; in Rouiguia et Cheriet, 2010)**

2. Principales maladies d'origine hydrique

Les organismes microbiens responsables de ces maladies prennent quant à eux le nom d'agent pathogènes. Ceux ci peuvent être de trois types : bactéries, virus, parasites. **(Tab. 5)**
(Aouissi et al., 2007)

	<i>Coronavirus</i> <i>Entérovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Reovirus</i>
Origine parasitaire	<i>Entamoeba histolytica</i>
Dysenterie amibienne	<i>Girardia lambila</i>
Gastro-entérites	<i>Cryptosporium</i>

2.1. Maladies d'origine bactérienne:

2.1.1. Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes :

Ce sont des véritables septicémies dues à des salmonelles : *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* A, B et C. (Délarras, 2008)

La contamination se fait par voie digestive à partir d'eaux contaminées par des matières fécales, d'aliments avariés ou encore par des mains sales.

Elles sont caractérisées par une fièvre, céphalées, diarrhée, douleurs abdominales, accompagnée d'un abattement extrême (le tufhos) et peuvent avoir des complications graves, parfois mortelles : hémorragie intestinales, collapsus cardiovasculaire, atteintes hépatiques, respiratoires, neurologiques. (Roland, 2003)

2.1.2. Choléra :

Le choléra est une [toxi-infection entérique](#) contagieuse, aiguë et strictement humaine, causée par une entérotoxine de *Vibrio cholerae*, ou bacille virgule.

Choléra est une maladie très virulente qui touche les enfants et les adultes, et sans traitement, la mortalité peut atteindre 50%. La contamination est orale, d'origine fécale par l'eau de boisson ou des aliments souillé.

Appelée maladie de la misère, accentuée par la malnutrition, principalement répandue, de nos jours, dans les pays en voie de développement. La maladie sévit de façon endémique dans

les zones tropicales humides d'Afrique et d'Asie et de façon épidémique dans les zones sèches (sahel). (**Bazine et al., 2011**)

Est une maladie à incubation courte allant de quelques heures à 5 jours, caractérisée avant tout par une diarrhée aqueuse qui s'accompagne par une déshydratation extrême, d'où son caractère de gravité en l'absence de traitement de réhydratation. (**Leclerc, 1994 ; Prescott et al., 2003**)

2.1.3. Gastroentérites aiguës et diarrhées :

Une gastro-entérite est une infection inflammatoire du système digestif pouvant entraîner de la nausée, des vomissements, des crampes abdominales, des flatulences et de la diarrhée, ainsi que de la déshydratation, de la fièvre et de la céphalée (mal de tête). Elles peuvent être d'origine bactérienne, virale, ou dues à des parasites internes, protozoaires ou amibes pathogènes. [2]

Les gastroentérites sont causées généralement par la consommation de poisson ou de fruit de mer contaminée, ou bien par l'ingestion accidentelle d'eau contaminée par des matières fécales. [2]

On distingue deux types de gastroentérites :

Gastroentérite inflammatoire :

Les germes pénètrent dans la muqueuse de l'intestin provoquant des ulcérations (perte de substance de la muqueuse) susceptibles d'entraîner un saignement et une inflammation. Celle-ci s'accompagne d'une hypersécrétion (sécrétion exagérée) de liquide à l'intérieure de l'estomac : l'exsudat, liquide riche en minéraux et en protéines.

On constate la présence dans les selles d'une variété de globules blancs : les leucocytes, contrairement à la gastro-entérite aigue non inflammatoire. [3]

Gastroentérite non inflammatoire :

Les germes sont ingérés avec les aliments contaminés et se multiplient dans l'organisme, entraînant un mauvais fonctionnement de l'intestin grêle. Dans ce cas les globules blancs ne sont pas présents dans les selles. [3]

2.2. Maladies d'origine virales :

Les virus responsables d'infection hydriques sont excrétés dans les selles d'individus infectés. Il a été démontré que plus de 130 virus pathogènes, que l'on peut dénommer virus entériques, peuvent être éliminés dans les fèces humaines. **(Rodier et al., 2005)**

2.2.1. L'hépatite A :

Le virus de L'hépatite A (VHA) est un virus à ARN appartenant à la famille de picornaviridae. C'est un virus nu (non enveloppé) donc très résistant dans le milieu extérieur et aux agressions physico-chimique. **[4]**

Il se transmet par voie digestive oro-fécale soit indirectement par l'eau souillée, contaminée par des selles infectées par virus d'où une plus forte incidence dans les pays où les réseaux d'eau potable et les stations d'épuration sont de qualité insuffisante causant l'hépatite A; qui est une maladie infectieuse du foie, considéré comme la plus fréquente des hépatites virales.

L'évolution clinique de l'infection varie des maladies anictériques à l'ictère hépatique sévère et prolongé.

Après une courte phase pré-ictérique, de l'ordre d'une semaine, caractérisée par de la fièvre, de la fatigue, myalgies, nausées vomissements, survient la phase ictérique avec urines brun-doré, sombre en raison de la présence de bilirubine, se continuant de un à plusieurs jours plus tard par des selles décolorées avec coloration jaune de la conjonctive et de la peau. La durée des symptômes est de 4 à 8 semaines. **(Roland, 2003)**

Plusieurs complications peuvent accompagner l'affection :

Méningo-encéphalite, atteintes rénale et cardio-vasculaire. Dans 5 à 20% des cas, la maladie peut conduire à une hépatite fulminante avec détérioration des fonctions hépatiques, encéphalopathie et coma. Dans ces conditions, la mortalité est de l'ordre de 1% après 40 ans. **(Roland, 2003)**

2.2.2. L'hépatite E:

L'hépatite E est une infection aigue due au virus de l'hépatite E. Son individualisation s'est faite progressivement depuis 1980 sur le continent asiatique, à la suite d'épidémies massive affectant des sujets ayant déjà l'immunité vis-à-vis du virus A. **(Hasly et Leclerc, 1993)**

L'hépatite E peut également se manifester par un syndrome gastrique fébrile. Dans la forme fulminante le taux de létalité est de l'ordre est de 1 à 2 % au cours des épidémies, mais il

peut atteindre de 20 à 30 % chez les femmes enceintes au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse elle n'évolue jamais vers la chronicité. Elle n'a pas été observée en France et n'a été rencontrée que dans les pays où les conditions d'hygiène sont très défectueuses. **(Hasly et al., 1993)**

Dont, elle touche essentiellement les voyageurs de retour de pays d'endémie. **(Roland, 2003 ; Bazine et al., 2011)**

2.2.3. Gastroentérite virales:

Les virus responsables de ce type d'infection sont :

❖ Rotavirus :

Les gastro-entérites à rotavirus sont actuellement largement décrites et elles représentent la grande majorité des épidémies de gastro-entérites des enfants mais, elles peuvent affecter également les adultes. **(Hasly et al., 1993)**

Elles se présentent sous forme de diarrhée sévère, persistante, durant 5 à 8 jours accompagnée de fièvre et de vomissement et quelque fois de déshydratation, nécessitant une hospitalisation. **(Hasly et al., 1993)**

L'excrétion atteint 10^{10} virales par gramme de matière fécale.

La mort est généralement due à la déshydratation et au déséquilibre électrolytique. **(Rodier, 2003)**

❖ Virus de Norwalk :

Le virus de Norwalk constitue le prototype de la souche la plus largement étudiées de virus non cultivable dénommés « Norwalk_like ».il est responsable d'une gastro-entérite, qui à été survenu la première fois dans une école primaire de Norwalk dan l'Ohio. **(Rodier, 2003)**

La gastro-entérite ; spécifiquement épidermique, est explosive, bénigne et de courte durée (24 à 48 heures) ; elle est caractérisées par des diarrhées, des vomissements, des crampes, abdominales, des nausées, des maux de tête, et une fièvre peu élevée. **(Hasly et al., 1993)**

L'excrétion du virus dans les selles dure de l'ordre de 3 jours avec des quantités de particules supérieures à 10^6 par gramme. **(Rodier, 2003)**

2.3. Maladies d'origine parasitaire :

On distingue deux types différents d'organismes impliqués dans ces infections :

2.3.1. Les protozoaires :

Organismes unicellulaires eucaryotes dont plusieurs sont des agents d'épidémies hydriques. Ces dernières années, des épidémies de ce type ont fait leur apparition dans les pays industrialisés, ce qui a bouleversé complètement non seulement la notion même des transmissions par voie hydrique mais aussi le traitement de potabilisation nécessaire pour leur élimination (**Hasly et al., 1993**)

❖ Amibiase :

L'amibiase est une parasitose due à un protozoaire, Rhizopode *Entamoeba histolytica*, localisée primitivement au niveau de l'intestin, l'amibe peut migrer secondairement vers d'autres organes (foie, poumon, cerveau ...).

L'agent de transmission : c'est *Entamoeba histolytica* sous sa forme kystique (forme de résistance dans le milieu extérieur). Le réservoir de parasites : c'est l'homme (le porteur sain est plus dangereux pour la société que le malade). L'infestation se fait par de l'eau de boisson contaminée par des kystes. (**Derraz et al., 1984**)

On distingue principalement l'amibiase colique (dysenterie amibienne) et l'amibiase hépatique. La dysenterie amibienne se caractérise par un embarras gastrique : perte de l'entrain et de l'appétit, langue saburrale et diarrhée banale s'accompagnant de soif intense et de fatigue générale sans fièvre notable. Puis en quelques jours, on arrive à la période d'état avec son syndrome dysentérique typique caractérisé par la tétrade symptomatique : épreintes (coliques), faux besoins, selles a fécales et ténésme. (**Jacquemin, 1994**)

❖ Le Paludisme :

Le paludisme est une parasitose due à un protozoaire de genre *Plasmodium*. Il existe quatre espèces de *Plasmodium* spécifiquement humain dont la pathologie et l'évolution sont très différentes. [4]

Cette maladie, transmise à l'homme par la simple pique de moustique infecté : l'anophèle (femelle) porteur de parasite. Cette transmission est facilitée lorsqu'un grand nombre de personne dorment à l'extérieure par temps chaud, ou dorment dans leur maison sans protection contre les moustiques. [4]

Le paludisme se caractérise par une fatigue extrême, vomissement et par des accès fiévreux paroxystiques, céphalées, accompagnées éventuellement d'insuffisance respiratoire ou rénale. Après l'incubation, durant 1 à 2 semaines suite à l'inoculation, survient la phase d'invasion du sang par les Schizontes et caractérisée par la fièvre, puis le passage répétés du *Plasmodium* de la fois dans le sang donnent la fièvre intermittente à rythme tierce ou à rythme quatre selon l'espèce. Une anémie par hémolyse et une splénomégalie accompagnent cette fièvre. De même les découvertes récentes sur le génome « séquencé » du parasite vecteur du paludisme permettent d'espérer la création d'un vaccin contre cette maladie, même si son élaboration n'est pas concevable avant cinq ans tandis que se pose le problème de la résistance des moustiques aux antipaludéens classiques. (Khiati, 1998)

2.3.2. Les helminthes :

Organismes pluricellulaires de type vers. Les infections causées par ce type d'organismes constituent un problème de santé publique dans le monde entier, notamment d'organismes constituent un problème dans les pays en voie de développement ou elles causent de nombreux décès et invalidités. (Rodier et al., 2005)

❖ Bilharziose :

Seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme, la bilharziose ou schistosomiase est une maladie chronique et débilitante dont la prévalence atteint les 180 millions d'individus. Un des parasites responsable, *Schistosoma haematobium*, a été identifié en 1851 par le parasitologiste allemand Théodore Bilharz, d'où le nom de la maladie. [5]

L'homme rencontre les bilharzies au contact de l'eau qui permet le passage à travers la peau des larves du parasite. Cette contamination se traduit par des réactions cutanées : rougeurs, prurit puis trois semaines plus tard apparaissent une fièvre et une éruption cutanée. [6]

Cette maladie touche environ 200 millions d'habitants des zones rurales à travers le monde. La gravité de la maladie se mesure par le nombre d'œufs retrouvés par gramme de selle. [5]

❖ *Filariose* :

Les filarioses sont des maladies parasitaires engendrées par différentes espèces de vers ronds non segmentés et à sexes séparés connus sous le nom de filaires. Les embryons rencontrés dans le sang ou dans les tissus sous-cutanés portent le nom de microfilaires. [7]

Les espèces filariennes décrites chez l'homme sont au nombre de neuf et se répartissent selon leurs impacts en santé publique en filarioses majeures (pathogènes) et en filarioses mineures (peu ou pas pathogènes) qu'il est important de ne pas confondre avec les majeures souvent plus sensibles aux thérapeutiques classiques. [6]

Ce sont des maladies largement répandus, dont 300 millions de personnes sont infectées dans les régions tropicales et subtropicales. [7]

Etude expérimentale

Chapitre III
Matériel et méthodes

L'eau est un élément essentiel de la vie et intervient dans les différentes activités humaines. Elle participe à toutes les activités quotidiennes notamment, domestiques, industrielles et agricoles ce qui la rend un élément récepteur exposé à tous les genres de pollution. (Rejsek, 2002)

1. Présentation des stations de prélèvement

Pour suivre l'évolution bactérienne des eaux de la retenue collinaire de Hadjar Gafta, nous avons choisi deux stations de prélèvement. (Fig. 10)

Notre étude se porte à la recherche et l'identification des bactéries indicatrices de contamination fécale dans l'eau de cet écosystème aquatique, pour cette étude quatre prélèvements ont été effectués dans les mois de Mars et Avril (Tab. 6)



Figure 10: Localisation des stations de prélèvements

(Source: Google Earth, 2014)



Figure 11: La station 1 au mois de Mars



Figure 12: La station 2 au mois d'Avril

(Photos prise par Boualleg Wafa le 13/04/2014)

Tableau 6 : Présentation des stations de prélèvement.

Némuro	Date des prélèvements	Heure de prélèvement	Les coordonnées G.P.S	Caractéristiques et observations
Station 1	Prélèvement 1 02/03/2014.	8 :13 h	X: 36° 35' 58.75" N Y : 7° 29' 14.72" E	<ul style="list-style-type: none"> - Situé au Nord-est de la retenue. - Présence des huiles des voitures - Très proche du lieu de lavage de la laine
	Prélèvement 2 13/04/2014.	8 :20 h	Z : 300 m	
Station 2	Prélèvement 3 02/03/2014.	8.20 h	X : 36° 35' 53.48" N Y : 7° 29' 15.92" E	<ul style="list-style-type: none"> -Situé à Sud de la retenue. -Très proche de la route de Nechmaya - Hammam Ouled Ali.
	Prélèvement 4 13/04/2014	9.00 h	Z : 301 m	

2. Mode de prélèvement de l'eau

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Il faut utiliser de préférence des flacons en verre Pyrex munis d'un large col et d'un bouchon à visse métallique. Les techniques de prélèvement sont variables en fonction du but recherché et de la nature de l'eau à

analyser. Pour une eau de surface (eau superficielle), les flacons stériles sont prolongés à une distance qui varie de 25 à 30 cm de la surface assez loin des bords, ainsi que des obstacles naturels. Les flacons sont ouverts sous l'eau et sont remplis jusqu'au bord, ensuite le bouchon est également placé sous l'eau de telle façon qu'il n'y est aucune bulle d'air et qu'il ne soit pas éjecté au cours du transport. (Rodier, 2005)

3. Enregistrement et étiquetage des échantillons

Pour faciliter le travail et l'exploitation des résultats tout en évitant les erreurs, il est essentiel que les échantillons soient clairement étiquetés immédiatement avant les prélèvements et que les étiquettes soient lisibles et non détachables. Dans ces derniers, on doit noter avec précision : la date, l'heure, les conditions météorologiques, un numéro et toutes circonstances anormales. (Lightfoot, 2002)

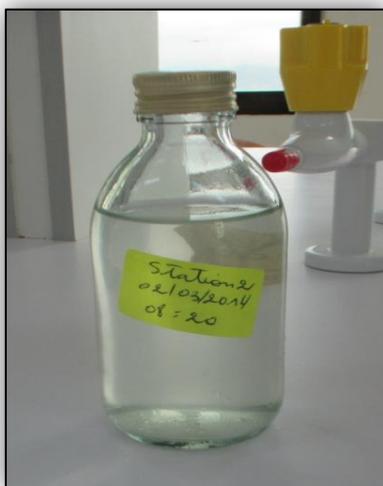


Figure 13: Flacon d'échantillonnage muni d'une étiquette.

(Photo prise par Amiri Feyrouz le 02/03/2014)

4. Transport et conservation des échantillons

La teneur initiale en germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon après le prélèvement. C'est pour cela que toute analyse doit être effectuée le plus rapidement possible. (Rejsek, 2002). L'évolution est d'ailleurs assez difficile à prévoir et dépend de nombreux facteurs : température, concurrence bactérienne des espèces présentes, composition chimique de l'eau. (Rodier et al., 2009). Pendant le transport, il faut éviter surtout la destruction de l'échantillon, ou, inversement la surcroissance de micro-organismes à l'intérieur de l'échantillon. Ceci peut être obtenu en mettant l'échantillon à l'abri de la lumière visible ainsi que dans des températures ambiantes. Habituellement, cette protection est obtenue grâce à

l'utilisation d'une glacière contenant des poches de glace. On conserve généralement les échantillons à une température inférieure ou égale à +4°C. (Mayat, 1994)

5. Analyses effectués

5. 1. Mesures *in situ* :

Les mesures *in situ* sont des analyses réalisées sur place à l'aide d'un multi-paramètre de type WTW 1970i (Fig. 14). Ces paramètres incluent : La température, le pH, la conductivité, et l'oxygène dissous et la salinité.

Température :

La température est un paramètre important parce qu'elle a beaucoup d'effet sur le processus biologiques. (Guarino, 1975). Elle joue un rôle dans la solubilité des sels et des gaz, en particulier dans la conductivité électrique et dans la variation du pH (Leclerc, 1996)

pH :

Le potentiel hydrogène, plus connu sous le nom de pH est la valeur qui détermine si une substance est acide, neutre ou basique, il est calculé à partir du nombre d'ions hydrogène présent. Sa mesure était à l'aide d'un multi-paramètre de terrain. (Rodier, 1996)

Oxygène dissous :

La réduction de l'O₂ au niveau d'une cathode convenable engendre un courant proportionnel à la pression partielle d'O₂ dans l'eau (Rejsek, 2002)

Conductivité électrique :

C'est la propriété qui possède une eau de favoriser le passage d'un courant électrique, la température et la viscosité influent également sur la conductivité car la mobilité des ions augmentent avec l'augmentation de la température et diminue avec celle de la viscosité (Rejsek, 2002)



Figure 14 : Multi paramètre de terrain de marque WTW (Multi 1970i).

5.2. Analyse bactériologique :

De nombreuses bactéries pathogènes peuvent se trouver dans l'eau par souillure de cette dernière, par des excréments d'animaux et humains ou par des eaux d'égouts. (**Rajonson et al., 1992**)

La totalité de nos analyses bactériologiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Universités de Guelma. Cette étude, permet de mettre en évidence la contamination fécale de l'eau et représente également un bon moyen pour contrôler l'efficacité des mesures de traitement.

5.2.1. Recherche et dénombrement des germes revivifiables à 22 et 37 °C (germes totaux) :

❖ Principe :

Il s'agit d'une technique de numération des microorganismes après incorporation de volumes déterminés d'échantillon ou de ces dilution dans un milieu gélosé.

Ces germes n'ont pas d'effets directs sur la santé mais sont des indicateurs qui révèlent la présence possible d'une contamination bactériologique (**Carbonnelle et al., 1988**)

La méthode de référence pour l'analyse consiste en un dénombrement du nombre de germes pour 1mL d'eau :

- **Germes totaux à 22°C** = ce sont les bactéries autochtones qui sont adaptées à la température de l'eau. comptage des colonies obtenues après incubation à 22°C durant 68 ± 4 H.

- **Germes totaux à 37°C** = ce sont les bactéries potentiellement pathogènes car elles se développent à la température du corps humain. comptage des colonies obtenues après incubation à 37°C durant 44 ± 4 H. (**Carbonnelle et al., 1988**)

❖ **Mode opératoire :**

- A partir de l'eau à analyser (Solution mère = 1) et /ou des dilutions décimales 10^{-1} et 10^{-2} , porter aseptiquement 1ml en 2 répétitions dans deux boites de Pétri vides, numéroté et comme l'indique (**Fig. 15**)
- Compléter ensuite chacune des boites avec environ 20 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans la boite et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 minutes.
- Faire ensuite des mouvements circulaires en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, sur une surface fraîche et horizontale.

❖ **Incubation :**

Les boites seront partagées en deux séries distinctes :

- La première boite sera incubée, couvercle en bas à $22 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 68 ± 4 heures
- La seconde sera incubée couvercle en bas à $36 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 44 ± 4 heures. (**Lebres et al., 2006**).

❖ **Lecture :**

Les germes revivifiables se présentent dans les deux cas sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse :

- Première lecture à 24 heures.
- Deuxième lecture à 48 heures.
- Troisième lecture à 72 heures.

❖ **Dénombrement :**

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies, en tenant compte de deux remarques suivantes :

- Ne dénombrer que les boites contenant entre 15 et 300 colonies.
- Les résultats sont exprimés en nombre de micro-organismes revivifiables par ml d'eau à analyser à 22°C et 37°C .

Calculer ensuite la valeur du nombre N, de microorganismes revivifiables à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ à part et celle du nombre N de microorganismes revivifiables à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ à part, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum c}{1.1 \times d}$$

Où :

$\sum c$: est la somme des colonies dénombrées sur deux boites 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 37°C et celle de 22°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 unité formant colonie (UFC). (**Rodier et al., 2009**)

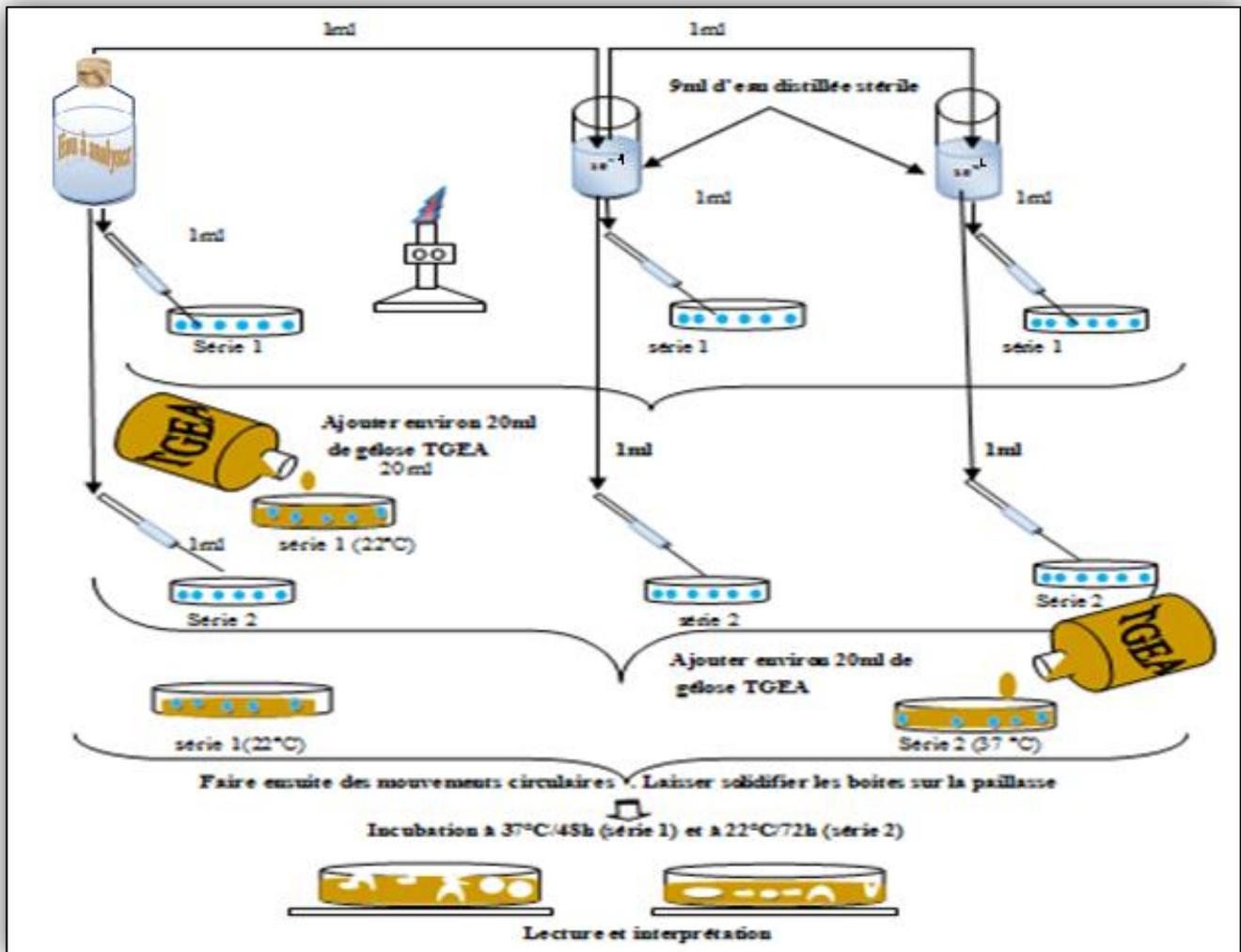


Figure 15 : Protocole de recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables à 22 et à 37°C dans les eaux.

5.2.2. Recherche et dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale :

5.2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux avec identification d'*Escherichia coli* en milieu liquide (Méthode de NPP):

✚ Les coliformes totaux :

Les coliformes totaux (CT) appartiennent à la famille des Entérobactéries ; ce sont des microorganismes en forme de bâtonnets, non sporogènes, à Gram négatif, ne possédant pas d'oxydase, aérobies ou anaérobies facultatifs (El Blidi *et al.*, 2006), capables de croître en présence de sels biliaires, ou autres agents de surface ayant des propriétés inhibitrices de croissance analogues et capables de fermenter le lactose avec production d'acide (ou d'aldéhyde) et de gaz en 24 à 48 heures à la température de 37°C (Merzoug, 2009)

✚ Les coliformes fécaux :

Les coliformes fécaux (CF), ou coliformes thermotolérants, sont un sous groupe des CT capables de fermenter le lactose à une température de 44 °C et qui donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyle. Dans certains tests, l'activité du β -D-galactosidase est utilisée pour détecter les CF Ils sont considérés comme plus appropriés comme indicateurs de contamination fécale que les CT. Ce groupe est majoritairement constitué d'*Escherichia coli* mais comprend aussi des *Klebsiella*, des *Enterobacter* et des *Citrobacter* (**Labres et al., 2008**)

La recherche et le dénombrement des coliformes et l'identification d'*E coli* ont été effectués par la méthode de nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie.

Le principe de cette méthode se divise en deux étapes :

❖ **Mode opératoire :**

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

- Le test de présomption: réservé à la recherche des coliformes.
- Le test de confirmation : réservé à la recherche des coliformes thermo-tolérants avec l'identification d'*Escherichia coli*. (**Labres et al., 2008**)

❖ **Test présomption :**

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon afin d'obtenir une répartition homogène des microorganismes, nous avons réalisé cinq dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) avec trois répétitions par dilution. Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. (**Rejsek, 2002**)

- Nous prenons les tubes de BCPL (bouillon lactose au pourpre de bromocrésol, simple concentration) munis d'une cloche de Durham.
- Nous Prélevons 1ml d'eau à analyser à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et la porte dans le premier tube de la série contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-1} .
- Nous prélevons 1ml de la dilution 1/10 précédente et l'ajouter à un tube contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-2} .
- Nous transférons 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube contenant 9 ml de BCPL, pour obtenir la dilution 10^{-3} .
- Refaire la technique pour 2 autres tubes de BCPL afin d'obtenir 5 tubes de BCPL, et refaire pour 2 autres séries. (**Délaras, 2008**)

❖ **Lecture :**

Après incubation seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10^{ème} de la hauteur de la cloche) ;
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu). **(Labres et al ., 2008)**

On retient le nombre caractéristique constitué par les trois chiffres écrit dans l'ordre des dilutions croissantes en commençant par le nombre correspondant à la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs.

Ce nombre caractéristique obtenu correspond d'après la table de Mac Grady au nombre de bactéries présentes (NPP) dans le prélèvement correspondant à la plus faible dilution prise en compte. Le calcul de concentration cellulaire dans la suspension initiale se fait en tenant compte les dilutions effectuées. **(Bourgeois, 1980 ; Leclerc, 1983)**

❖ **Test confirmatif :**

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

Repiquer chaque tube de BCPL trouvé positif avec une anse bouclée ou une pipette Pasteur dans le (ou les) milieu(x) de confirmation.

Comme milieu de confirmation, on a utilisé: le milieu eau peptonée exempte d'indole.

Mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait cette fois-ci à 44 °C pendant 24 heures. **(Rodier et al., 2009)**

❖ **Lecture :**

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacks. **(Fig. 17) (Rejsek, 2002)**

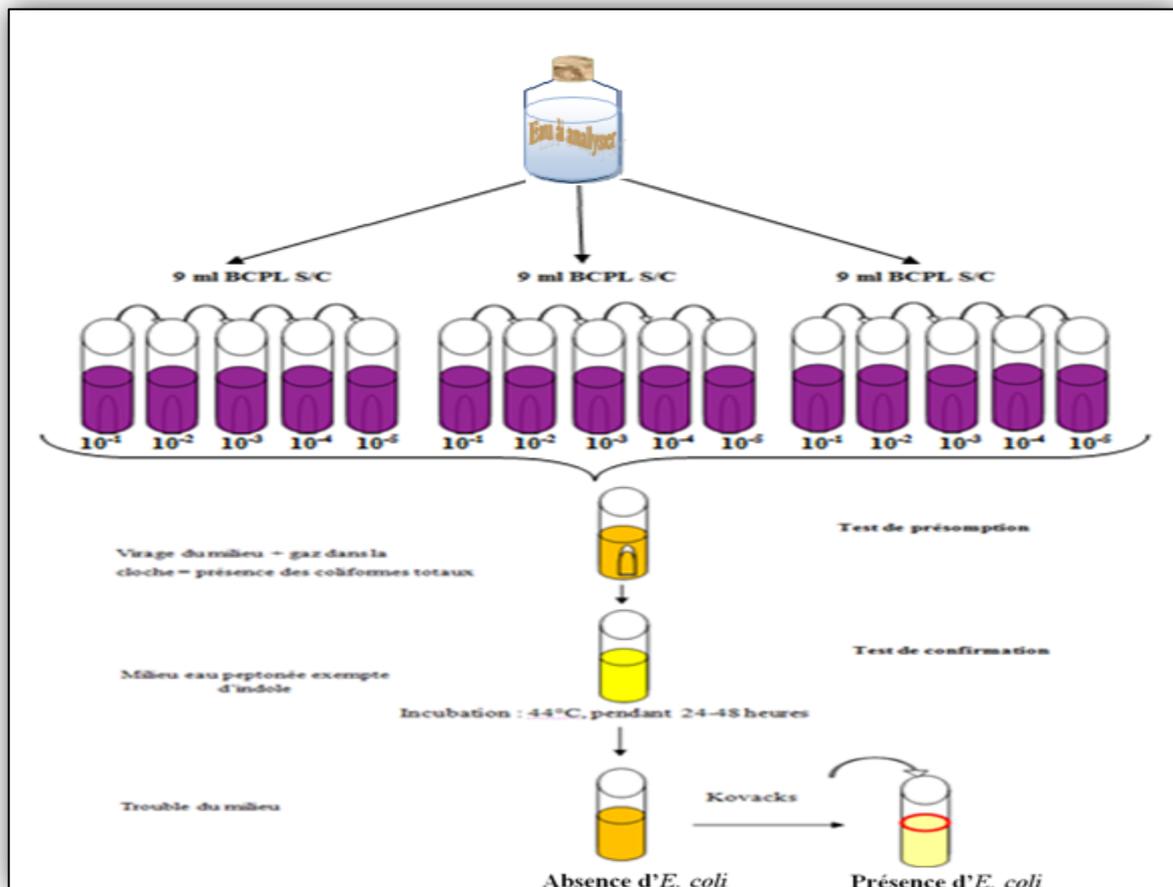


Figure 16: protocole de la recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux par la méthode de NPP.

5.2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

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

- Le test de présomption : réservé à la recherche des streptocoques.
- Le test de confirmation : réservé à la recherche des streptocoques du groupe (D).

a. Test de présomption :

❖ Mode opératoire

- A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement 1ml dans un tube contenant 9 ml de milieu Rothe S/C pour obtenir la dilution 10^{-1}
- Prélevé 1ml de tube précédent 10^{-1} et mettre dans le second tube Rothe pour avoir la dilution 10^{-2} .

- Transférer 1ml de la dilution 10^{-2} dans un tube contenant 9ml de milieu Rothe S/C, pour obtenir la dilution 10^{-3} .
- Refaire la technique 5 fois pour avoir 5 tubes de Rothe, et refaire 2 autres séries.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures. **(Lebres, 2002)**

❖ **Lecture :**

Seront considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien. **(Délarras, 2008)**

b. Test de confirmation :

❖ **Mode opératoire :**

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

Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'un ose bouclé dans un tube contenant le milieu Eva-Litsky, bien mélangé le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures. **(Délarras, 2008)**

❖ **Lecture :**

Seront considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien ;
- Une pastille violette ou blanchâtre au fond du tube. **(Lebres, 2006)**. La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP de Mac Grady **(Tab. 7) (Annexe 1)**.

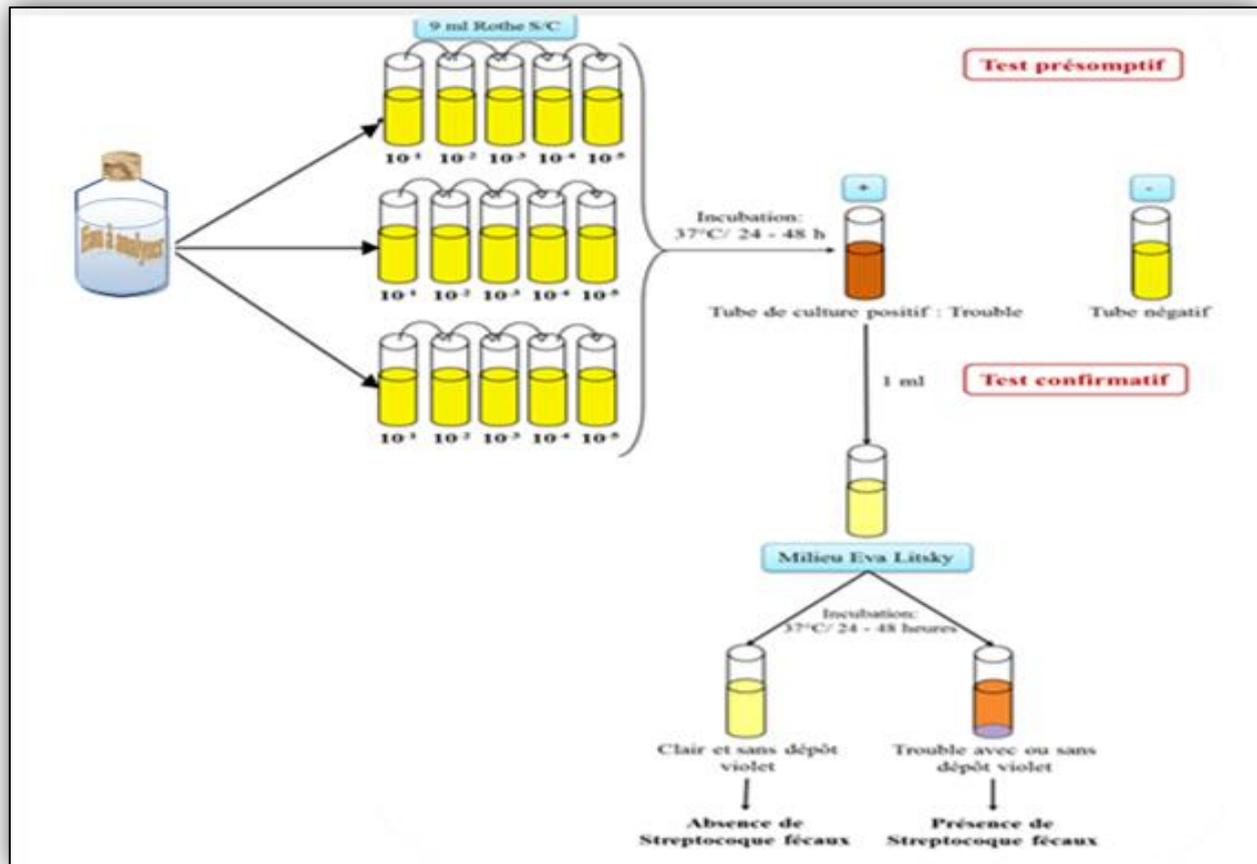


Figure 17 : Protocole de recherche et dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux par la méthode de NPP

5.2.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito- reductrices (ASR):

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) se présentent sous forme de bacilles à Gram positif et qui en se développant à une température de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ en 24 à 48 heures en gélose profonde gélose Viande Foie (VF), donnent des colonies caractéristiques qui sont de couleur blanche entourées d'une auréole noire. Cette dernière est le témoin de la réduction du sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire. (Labres *et al.*, 2008)

❖ Mode opératoire :

- A partir de l'eau à analyser homogénéiser soigneusement les flacons pour obtenir une répartition homogène des microorganismes.
- Répartir ensuite 20 ml de l'eau à analyser à l'aide d'une pipette stérile, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.

- Sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80 °C pendant 15 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des ASR éventuellement présentes. (**Fig. 18**)
- Après chauffage, refroidir immédiatement les tubes en question, sous l'eau de robinet.
- Ajouter environ 15 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à $47 \pm 1^\circ\text{C}$, additionnée de 1 ml de la solution de sulfite de sodium et 4 gouttes de la solution d'alun de fer.
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air
- Laisser solidifier sur pailleasse pendant 30 minutes environ, puis incubé à $36 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 24 à 48 heures. (**Rodier et al., 2009**)
-

❖ **Lecture et interprétation :**

Il est indispensable de procéder à une lecture après 24 heures : en présence de nombreuses colonies, une diffusion des halos peut conduire à une coloration noire uniforme du tube et tout dénombrement devient impossible après 48 heures. Par contre, s'il y a une faible quantité de colonies à la première lecture, et si les colonies sont petites, il peut y avoir un développement de nouvelles colonies dans les 24 heures suivantes.

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

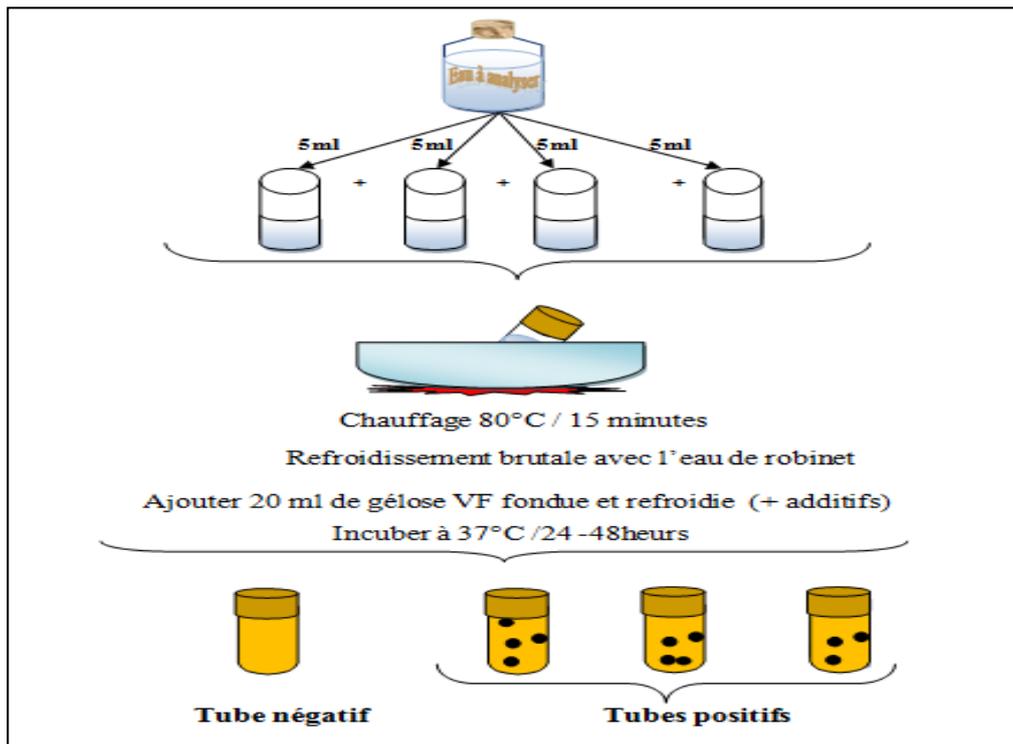


Figure 18 : Protocole de recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans les eaux .

5.3. Recherche des germes pathogènes :

Il existe une grande variété de bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes (opportunistes) pour l'homme dans tous les types d'eaux. Celles-ci vivent ou survivent dans l'environnement, soit provenant des rejets humains, éliminées par des sujets malades ou des porteurs sains, soit étant autochtones et pouvant s'adapter à l'homme. (Rodier *et al.*, 2009)

Les germes recherchés sont choisis, dans les limites des moyens disponibles. Les germes recherchés sont staphylocoques, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* et *Vibrio cholérique*.

Les milieux utilisés sont : Mac Conkey, Hektoen, milieu *Salmonella-Schigella* (SS), Chapman, et gélose nutritive (GN).

L'inoculum prélevé directement à partir de l'eau à analyser est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface de la boîte de Pétri. Les boîtes sont codées puis incubées à 37°C pendant 24 – 48 heures.

5.3.1. Recherche des staphylocoques:

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

- *Staphylococcus aureus*.
- *Staphylococcus epidermidis*.
- *Staphylococcus saprophyticus*.
- *Staphylococcus Intermedius* (**Délaras, 2008**)

❖ **Mode opératoire :**

Le milieu de Chapman est caractérisé par sa forte concentration en chlorure de sodium ce qui permet un isolement sélectif des staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré. (Le rouge de phénol). autour des colonies. (**Rodier, 2009**) (**Fig. 19**)

❖ **Isolement :**

A partir de la solution mère et à l'aide d'une anse de platine stérile, ensemer une boîte de milieu Chapman. Incuber à 37°C pendant 24 h.

❖ **Identification :**

Le milieu Chapman permet seulement une orientation pour l'identification de l'espèce (*Staphylococcus aureus*). les tests de confirmation sont obligatoires.

❖ **Tests de confirmation:**

- Etat frais et coloration de Gram
- Test de catalase
- Oxydase
- Mannitol
- Test staphylocogulase. (**Tab. 8**) (**Annexe 2**)

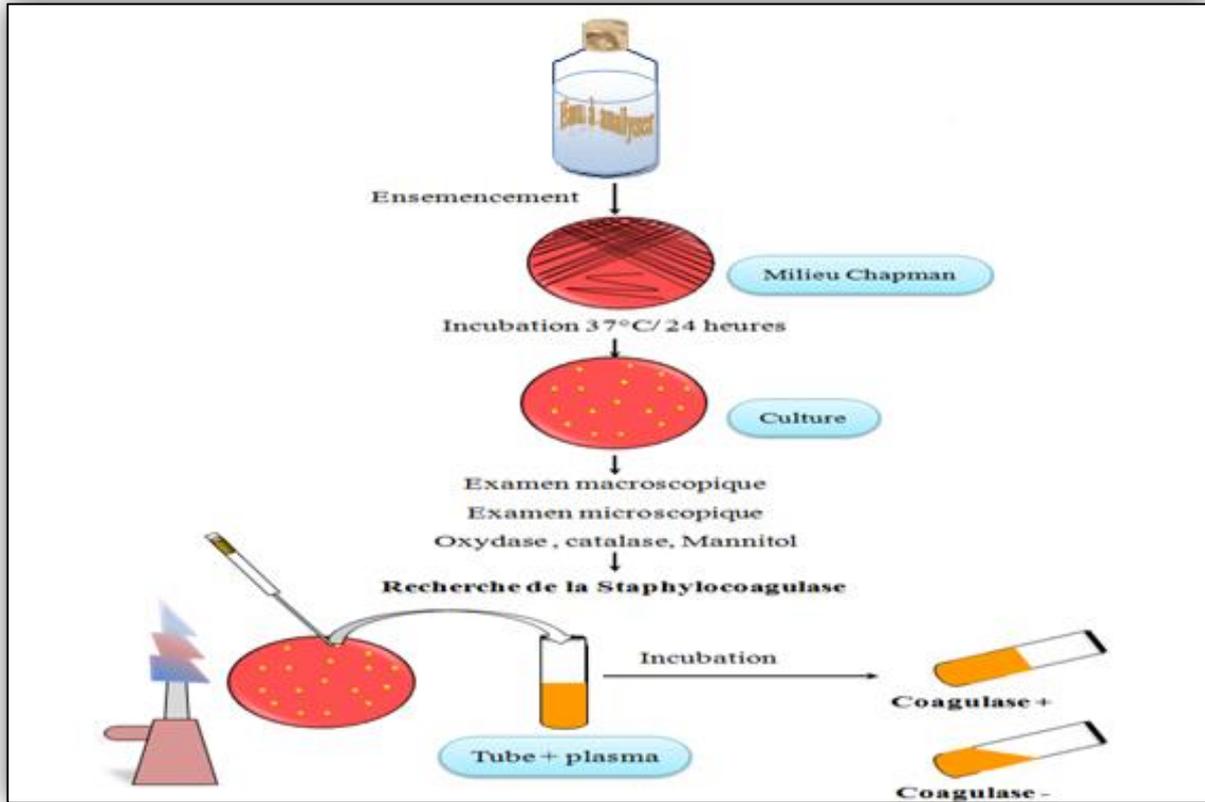


Figure 19: Protocole de recherche de *Staphylococcus* dans les eaux.

5.3.2. Recherche de *Shigella* :

Les Shigelles (genre *Shigella*), 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. Morphologiquement ce sont des bacilles Gram négatifs, immobiles ; dépourvus de spores et de capsules très proches du *E coli*. (Carbonnelle et al., 1988)

❖ Culture :

A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 1 ml et l'étaler à la surface de Gélose Mac Conkey, Gélose *Salmonella - Shigella* (SS), et Gélose Hectoén, par la méthode des quatre quadrants, puis les incuber à 36 ± 2 °C pendant 18 à 24 h. (Fig. 20)

❖ **Identification :**

Les *Shigella* sont caractérisées par de nombreuses réactions négatives :

- Etat frais
- Coloration de Gram (bacilles Gram négatifs)
- Ensemencement d'un tube de TSI qui sera incubé à 37°C pendant 24 h (Lactose, Saccharose, Glucose, Gaz et H₂S) (**Tab. 9**)
- Ensemencement : * Soit d'une galerie biochimique classique (ONPG, Oxydase, LDC, ODC, ADH, Urée, TDA, VP, RM ...),
* Ou d'une galerie biochimique API 20 E.

Tableau 9 : Caractères d'identification biochimique de *Shigella*. (Sayad, 2008)

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

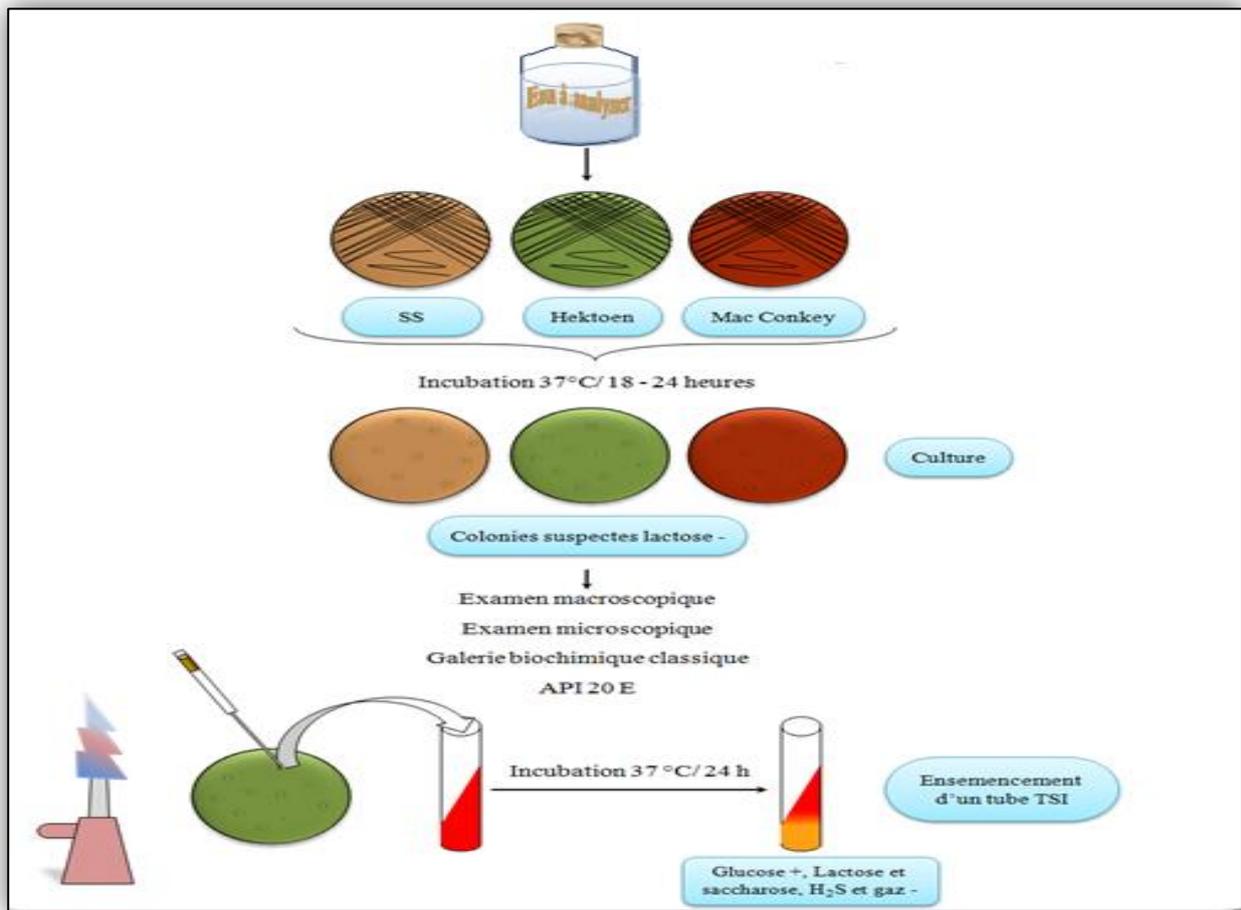


Figure 20 : Protocole de recherche de *Shigella* dans les eaux.

5.3.3. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*:

On entend par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie qui se présente sous forme de bacille à Gram négatif possédant l'enzyme oxydase ; et capable de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide et ne dégrade pas le lactose. (Labres et al., 2008)

❖ Mode opératoire :

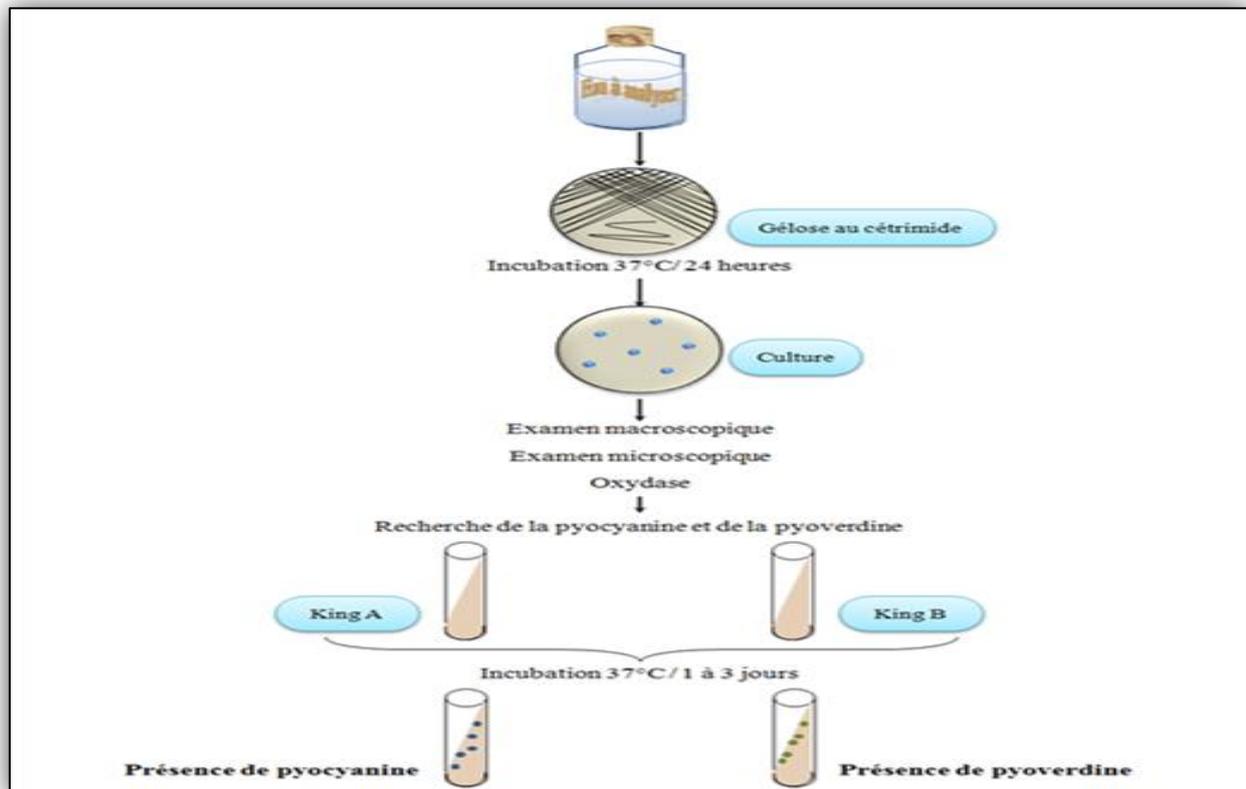
A partir de l'eau à analyser porter aseptiquement 1 ml et l'on étale à la surface de gélose Cétrimide, par la méthode des quatre quadrants, puis les incubent à 36 ± 2 °C pendant 18 à 24 h. (Fig. 21)

❖ Identification :

Considérer comme colonie caractéristique toute colonie présentant une fluorescence. Du fait de la sélectivité du milieu cétrimide, on peut suspecter les colonies présentes d'être *Pseudomonas*. Dans tous les cas, il faudra réaliser une identification de l'espèce (Rejsek, 2002)

❖ Confirmation :

- Deux examens microscopiques sont effectués : l'examen direct entre lame et lamelle (il permet d'observer la mobilité des germes) et la coloration de Gram.
- 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.
- Recherche de la pyoverdine : présente une teinte verte fluorescente est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de King B. (Pilet *et al.*, 1987) **Figure 21:**



Protocole de recherche de *Pseudomonas* dans les eaux.

5.3.4 Recherche de *Salmonella* :

On entend par *Salmonella*, des bactéries qui se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif et qui en se développant à température de $36 \pm 2^\circ\text{C}$ en 24 à 48 heures, sur milieu Hectoen, forment de petites colonies, lisses à contours réguliers, pigmentées en vert ou en bleu vert à centre noir.

Les *Salmonella* se divisent en deux grands groupes : les mineures et les majeures qui sont hautement pathogènes. (Labres *et al.*, 2008)

❖ **Mode opératoire :**

Jour 1 : Premier enrichissement

Introduire 1 ml de l'échantillon d'eau à analyser dans 10 ml de Sélénite Cystéine (SFB) en double concentration, puis incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures. **(Labres, 2008)**

Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement

Ce tube fera l'objet :

- D'une part, d'un deuxième enrichissement sur milieu SFB en tubes à raison de 1 ml ;
- D'autre part, d'un isolement sur les géloses Hectoen, SS et Mac Conkey. **(Labres, 2002)**

Jour 3 : Lecture des boîtes et identification

- D'une part, le tube de Sélénite fera l'objet d'un deuxième isolement
- D'autre part, les boîtes des géloses Hectoen, SS et Mac Conkey subira une lecture. **(Labres, 2002)**

Identification morphologique et biochimique

- Etat frais et coloration de Gram (bacilles Gram négatifs)
- Inoculation d'un tube de TSI qui sera incubé à 37°C, 24 h
- Inoculation : * Soit d'une galerie biochimique classique (ONPG, Oxydase, LDC, ODC, ADH, Urée, TDA, VP, RM ...)
* Ou d'une galerie biochimique API 20 E **(Fig. 22)**.

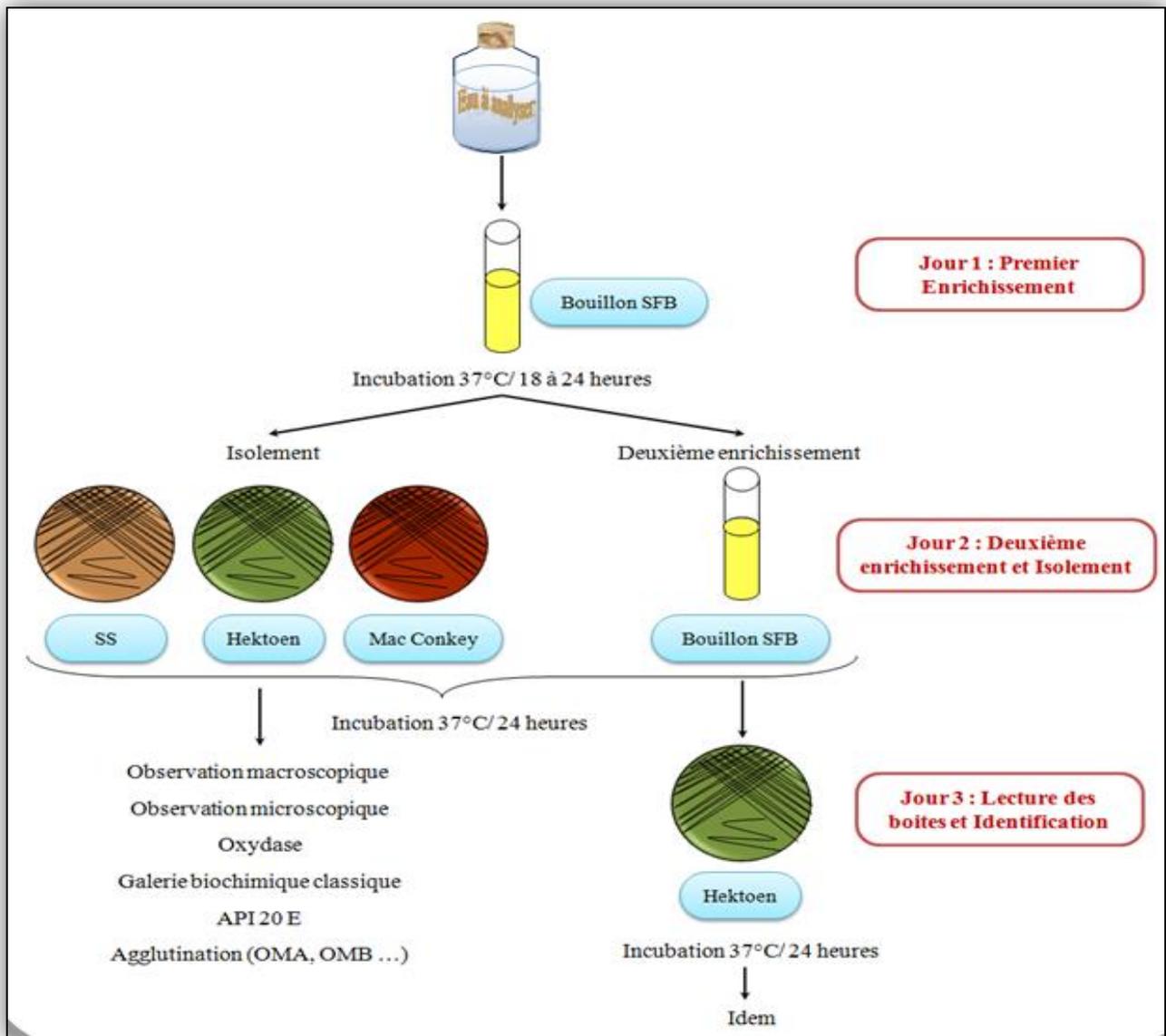


Figure 22 : Protocole opératoire de la recherche de *Salmonella* dans l'eau.

5.3.5. Recherche de *Vibrio cholérique* :

+ Définition :

Les Vibrionaceae sont :

- ✓ Bacille Gram négatif droits ou incurvés
- ✓ Très mobiles
- ✓ Oxydase (+)
- ✓ Fermentant le glucose sans production de gaz ni d' H_2S , Hautement pathogènes. (Pechère et al, 1982)

❖ Mode opératoire :

Jour 1 : Premier enrichissement

Le premier enrichissement s'effectue dans des tubes en portant 10 ml de milieu eau peptonée alcaline (EPA), ce dernier sera par la suite incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures, comme l'indique (Fig. 23). (Lebres, 2002)

Jour 2 : Deuxième enrichissement et isolement

Après incubation, le flacon constituant l'enrichissement primaire fera l'objet :

- d'un isolement sur gélose GNAB 1, l'incubation se fait à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 20 ± 4 heures. (Merzoug, 2009)

Jour 3 : Lecture des boîtes et identification

- le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur GNAB 2; qui sera incubé à son tour à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures ;
- D'autre part, les boîtes de gélose GNAB 1 subiront une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses et transparentes caractéristiques. (Lebres, 2008)

Identification morphologique et biochimique

Sur GNAB, les colonies sont rondes, plates, bords réguliers, surface lisse brillante, translucides sous forme de goutte de rosée. (Patrick et al., 2009)

Une identification morphologique et biochimique basée essentiellement sur :

- Etat frais et coloration de Gram
- Oxydase (+)
- Ensemencement d'une galerie biochimique classique ou bien galerie API 20 NE

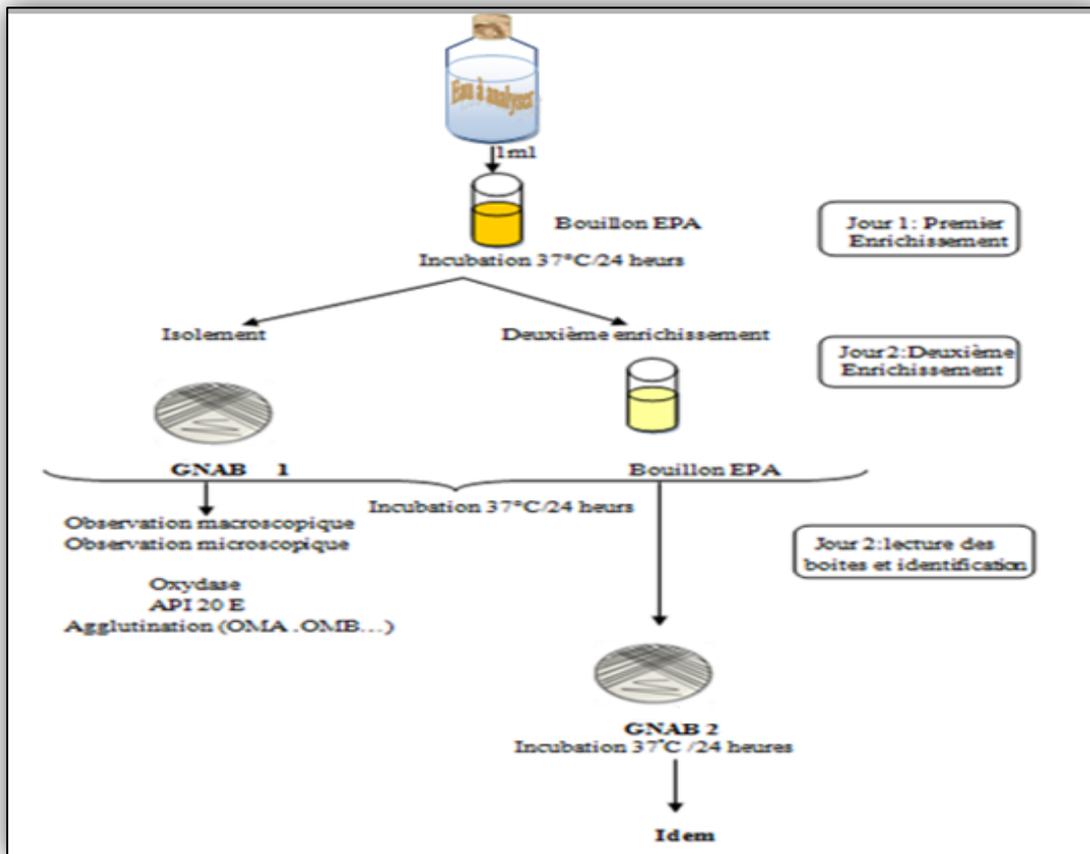


Figure 23 : Protocole opératoire de recherche et identification de *Vibrio* dans les eaux.

6. L'identification

6.1. Examen macroscopique des caractères cultureux :

Pour l'examen macroscopique des bactéries, les souches doivent être cultivées sur un milieu gélosé solide en boîte de Pétri.

Dans les conditions données, chaque espèce bactérienne développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristiques. L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

- La taille : (des colonies petites, moyennes, grosses)
- La forme: bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé
- Le contour : à bords circulaires, irréguliers et parfois envahissantes, déchiquetées
- L'aspect de la surface: lisse, rugueux
- L'opacité : opaque, translucide, transparent

- La consistance : grasse, crémeuse, sèche, muqueuse
- Pigmentation. (**Rouaiguia et al., 2010**)

6.2. Examen microscopique :

L'examen microscopique peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais) ou bien après coloration de l'échantillon ou encore après réaction d'immunofluorescence.

◆ L'examen direct (Etat frais) :

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool. Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupements, leur abondance et leur mobilité.

L'examen direct proprement dit se réalise en déposant, sur la lame une goutte du liquide ou de la suspension microbienne à examiner. Cette goutte est recouverte d'une lamelle. Observer au microscope optique à l'objectif $\times 40$. (**Carbonnelle et al., 1988**)

◆ Les étapes de coloration de Gram :

- Fixer de frottis.
- Recouvrir le frottis de la solution de violet de gentine. Laisser agir 1 minute.
- Rejeter le colorant. Laver à l'eau.
- Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir 1.30 minute.
- Rejeter le Lugol. Laver à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 95° pendant 10 secondes.
- Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute.
- Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres.
- Observer au microscope :
 - ✓ Les bactéries Gram négatif sont roses.

- ✓ Les bactéries Gram positif ont de coloration violette (**Bourdon et al., 1981**)

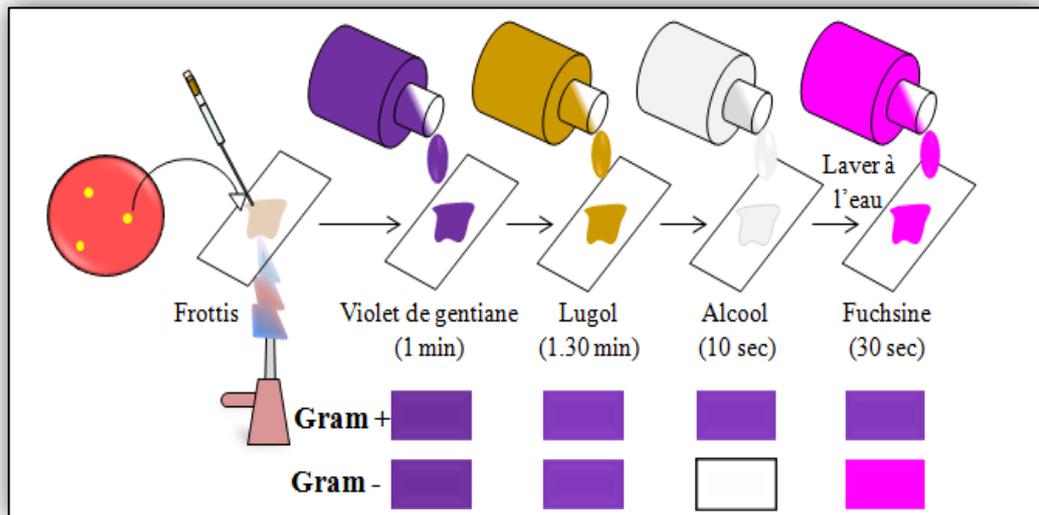


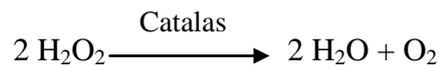
Figure 24: Procédure de la coloration de Gram.

6.3. Examens liés aux caractères biochimiques et enzymatiques :

6.3.1. Caractères enzymatiques :

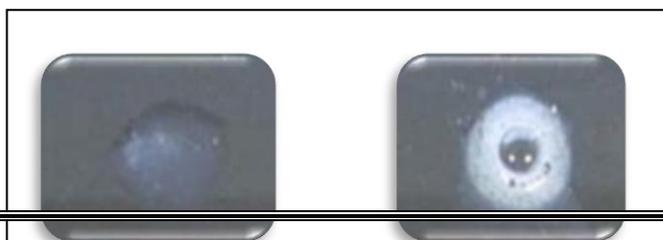
❖ Test de catalase :

La catalase est une enzyme qui détruit les peroxydes toxiques pour les bactéries. Elle catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en eau avec libération d'O₂.



- ✓ Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram +

La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on introduit ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme catalase. (**Carbonnelle et al., 1988**)



Négatif (-)

Positif (+)

Figure 25 : Exemple d'un test catalase

❖ **Test d'oxydase :**

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. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet. **(Fig. 26) (Carbannelle et al., 1988)**

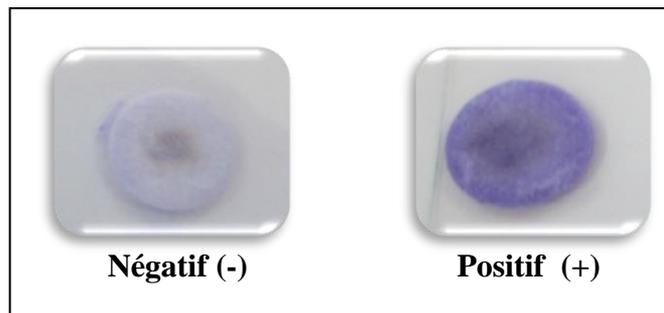


Figure 26 : Exemple d'un test oxydase

❖ **Test à la coagulase libre :**

Elle est principalement réalisée pour *S. aureus*.

Après incubation, prendre aseptiquement une demi-colonie dans un tube stérile à hémolyse contenu 0,3 ml de plasma de lapin (ou de l'homme), et incuber de nouveau à 36 ± 2 °C pendant 2 à 6 h. Examiner la coagulation du plasma de lapin sinon ré-incuber et examiner de nouveau à 20 ± 4 heures.

Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quart du volume initialement occupé par le liquide. **(Lebres et al., 2008) (Fig. 27).**

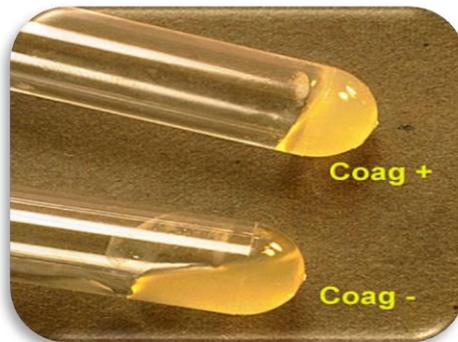


Figure 27: Test coagulase.

6.3.2. Caractères biochimiques :

✚ La galerie classique :

L'identification et la classification des espèces, sont basées essentiellement sur l'étude des caractères suivants : Recherche de l'ONPG, recherche de l'oxydase, milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar), milieu mannitol – mobilité, milieu au Citrate de Simmons, recherche des VP – RM, milieu urée-indole, quelques acides aminés et quelques sucres. (Lebres, 2004)

∅ Le test à l'ONPG :

La recherche de B-galactosidase ou test ONPG (Ortho-nitro phényle B-D galactosidase) permet de détecter l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose positive, des bactéries lactose négatives.

Son principe repose sur le fait que comme le lactose, l'ONPG composé incolore, est scindé par l'enzyme en libérant de l'ortho-nitro-phénol, composé soluble jaune.

- Déposé un disque imprégné d'ONPG dans une suspension bactérienne qui à été préparé par un prélèvement d'une culture de bactérie sur un milieu Hektoén et mélangé avec 5 ml d'eau distillée.
- Placer Les tubes dans l'étuve à 37 °C.
- Faire la lecture des tubes après 15mn, 30mn, 1h, et 24h d'incubation. Normalement la majorité des réactions positives sont observées entre 15 et 30 mn.
- réaction ONPG⁺ : coloration jaune; réaction ONPG⁻ : pas de coloration. (Sayad, 2008)

∅ Utilisation de TSI (Triple Sugar Iron Agar) :

Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères:

- Fermentation du Glucose, Lactose et Saccharose
- Production de Gaz
- Production d'hydrogène sulfureux (H₂S). (**Lebres, 2004**)

Ensemencé le milieu TSI a l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. Nous avons incubé les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 heures. (**Tab. 10**)

Tableau 10 : Lecture et interprétation des tests biochimiques du milieu TSI.

Paramètres	La pente	Le culot
Lactose	Jaune : fermentation de lactose et/ou saccharose	-
Saccharose	Rouge : pas de fermentation	
Glucose	-	Jaune : fermentation du glucose Rouge : pas de fermentation
H₂S	Apparition d'un noircissement entre le culot et la pente	
Gaz	-	Présence des bulles de gaz

∅ **Test de Citrate de Simmons :**

Le milieu Citrate de Simmons permet de mettre en évidence certaines bactéries qui sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent une citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate, ainsi qu'il possède un indicateur de pH « le bleu de bromothymol » dont il vire vers la couleur verte (à pH acide) et en bleue (à pH alcalin)

La pente du milieu est ensemencée par strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C. Après 24 heures, s'il y a une culture avec une alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu), la bactérie est de Citrate positive. S'il y a pas de culture et la couleur du milieu inchangée, la bactérie est de citrate négatif. (**Carbannelle et al., 1988**)

∅ **Le mannitol-mobilité :**

Est un milieu permet l'étude de la dégradation de mannitol qui est un produit de dégradation du mannose. L'ensemencement par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit, et incubé à 24 h à T° optimale. Ce milieu est utilisable uniquement pour la bactérie fermentative.

- Virage de milieu en jaune dit que mannitol⁺.
- Milieu rouge : mannitol⁻. (**Sayad, 2008**)

∅ **Test de l'Urée-Indole :**

Ce milieu synthétique permet de réaliser trois tests biochimiques qui interviennent dans la différenciation et/ou dans l'identification des entérobactéries. Le milieu urée – indole contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH

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

Ensemencer un milieu urée – indole avec une suspension bactérienne. Incuber 18 à 24 heures à 37 °C. (**Denis et al., 2007**)

Test de l'eau peptonée exempte 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. Ce dernier va réagir avec le réactif de Kovacks (acide nitrique nitreux) pour former un anneau rouge surnageant (nitrose indole).

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

La lecture de l'indole est immédiate :

- Réaction indole positive : anneau rouge ou rose.
- Réaction indole négative : anneau brunâtre. (**Carbonnelle et al., 1988**)

⊗ 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 (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-).



L'ensemencement du bouillon nitraté permet de mettre en évidence, ce caractère par le germe étudié et incubé à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, nous avons ajouté deux gouttes du réactif nitrate réductase I (solution naphthol a 6% dans l'alcool a 60%) et deux gouttes du réactif nitrate réductase II.

- Si le milieu devient rose ou rouge, la réaction est dite nitrate réductase positive.
- Si le milieu reste incolore, on a deux éventualités:
 - ✓ Les nitrates ont d'abord été réduits en nitrites mais la réduction s'est poursuivie.
 - ✓ Ou les nitrates n'ont pas été réduits en nitrites et se trouvent donc dans le bouillon nitrate.

Dans ce dernier cas, nous provoquons la réduction chimique en ajoutant de la poudre de zinc si la couleur apparaîtra, la bactérie est dite nitrate réductase négative. **(Boulekroune, 2008)**

⊗ Test VP (Voges-Proskawer) :

- Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de coude concentré (ou de potasse)
- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre quelque minute à une heure. Lorsque le milieu devient rouge le VP^+ , ou bien devient jaune VP^- . **(Boukrouma, 2008)**

⊗ La galerie API 20 E :

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. [8]

◆ 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 un tube d'eau distillée stérile (environ 5 ml), d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

✚ Inoculation de la galerie :

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

Remplir uniquement les tubes des autres tests.

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

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

◆ Lecture :

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif 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 Kovacks. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive. [8]

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20. (Tab. 11) (Annexe 3) [8]



Figure 28 : Présentation d'une galerie API 20 E. [8]

⊗ 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. 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 des réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. [8] (Fig.29)

❖ 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

✓ 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. [8]

❖ 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 (Tab. 12) (Annexe 4). [8]



Figure 29 : Présentation d'une galerie API 20 NE. [8]

⊗ API Staph :

❖ Principe :

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratés (**Fig. 30**). Le micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitues les tests.les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages coloré spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'indentification. [8]

❖ Mode opératoire :

- La préparation de la galerie API Staph et la préparation de l'inoculum s'effectue selon le même schéma que la galerie API 20 E.

❖ Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette pasteur en évitant la formation de bulles.
- Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.
- Incuber 24 heures à 37 °C. [8]

❖ 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 lecture de la galerie miniaturisé API Staph. voir (**Tableau. 13**) (**annexe 5**) [8]

❖ Identification :

L'identification des espèces est réalisée de la même manière que la galerie API 20E. [8]



Figure 30:Présentation d'une galerie API Staph

Chapitre IV
Résultats et discussion

Les résultats des paramètres physicochimiques mesurés *in situ* et les paramètres bactériologiques des échantillons de l'eau prélevés et que nous avons obtenues sont présentés sous forme de tableaux et de diagrammes exprimant les différents variations de tous les paramètres étudiés.

1. Paramètres physico-chimiques mesurés *in situ*

1.1. Température :

La température varie d'une station à une autre en fonction du climat et l'heure de prélèvement. (Tab. 14) (Fig. 31)

Tableau 14 : Température de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (°C).

	S1	S2
Mars	14.4	14.5
Avril	20.8	21.9

D'après les résultats, la température minimale obtenue est de 14.4 °C enregistrée dans la station 1 pendant le mois de Mars et la température maximale est de 21.9°C notée dans la station 2 pendant le mois d'Avril.

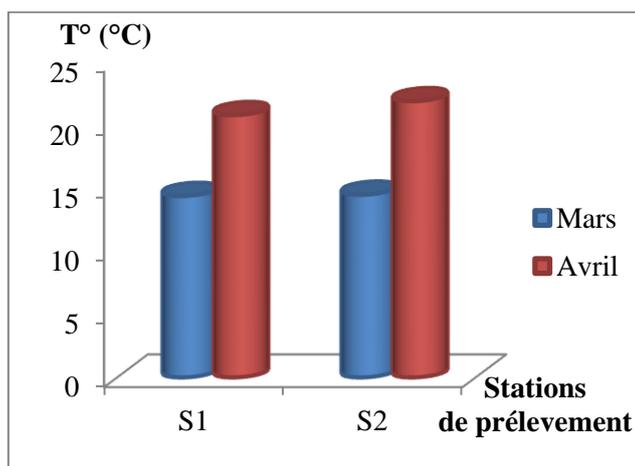


Figure 31: Variations de la température de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014).

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température (Merzoug, 2009), notre eau est de qualifiée de normale à bonne. (Tab. 15)

Tableau 15 : Grille d'appréciation de la qualité de l'eau en fonction de la température. (Merzoug, 2009 in Monod, 1989)

Température	Qualité	Classe
<20°C	Normale	1A
20°C-22°C	Bonne	1B
22°C-25°C	Moyenne	2
25°C-30°C	Médiocre	3
>30°C	Mauvaise	4

1.2. pH :

Le pH est un facteur très important sur la cinétiques des réactions chimiques (ammonification ; nitrification ; dénitrification). La dénitrification est complète lorsque le pH est supérieur à 7 avec une vitesse de réaction optimale au pH 8 à10. **(Halassi, 2009)**

Les résultats du pH obtenu sont présentés dans le tableau suivant

Tableau 16 : Le pH de l'eau de la retenue Hadjar Gafta.

	S1	S2
Mars	8.32	8.62
Avril	8.40	8.30

Les valeurs de pH oscillent entre 8.30 et 8.62 dans les deux stations pendant les 2 mois. **(Fig. 32)**

Un pH compris entre 7 et 10 permet un développement à peu près correct de la faune et de la flore aquatique. **(Nisbet et Verneaux, 1970)**

Selon la grille d'appréciation de la qualité de l'eau **(Ministère algérien des ressources en eau 2012)**, l'eau de la retenue Hadjer Gafta est bonne qualité (de 6.5 à 8.5).

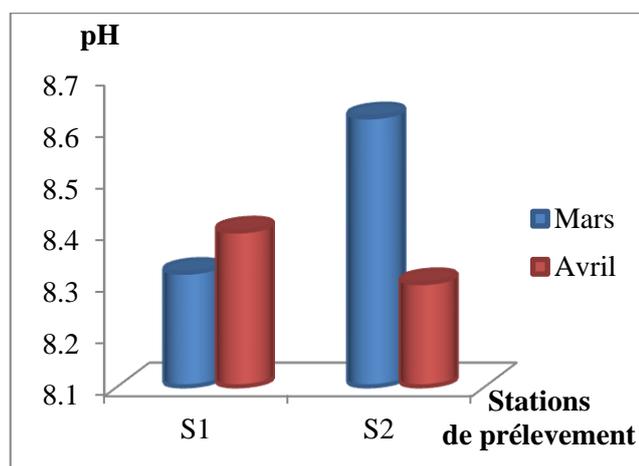


Figure 32: Variation du pH de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014).

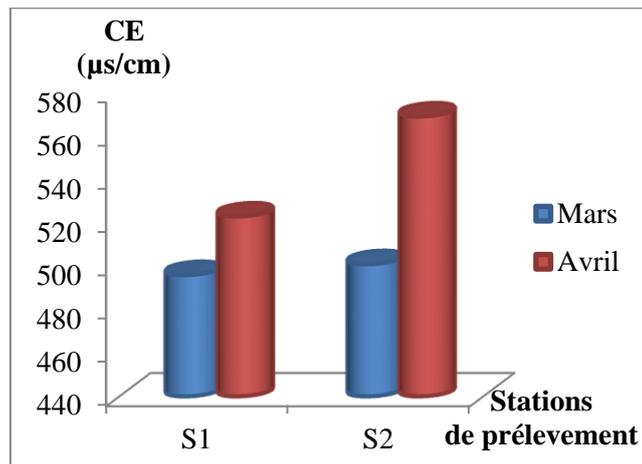
1.3. Conductivité électrique (CE):

La mesure de la conductivité permet d'évaluer rapidement la minéralisation globale de l'eau et d'en suivre l'évolution. (Rodier et al., 2009)

Les mesures de la conductivité montrent des variations remarquables d'une station à une autre. La valeur la plus faible est de 496 $\mu\text{s}/\text{cm}$ enregistrée à la station 1 pendant le mois de Mars et la plus élevée 569 $\mu\text{s}/\text{cm}$ a été enregistrée à la station 2 pendant le mois d'Avril, ceci est due à l'augmentation de la température qui entraîne l'évaporation de l'eau et donc l'augmentation de la salinité de l'eau. (Tab. 17), (Fig. 33)

Tableau 17 : Conductivité électrique de l'eau de la retenue Hadjar Gafta ($\mu\text{s}/\text{cm}$).

	S1	S2
Mars	496	501
Avril	523	569



**Figure 33 : Variations de la conductivité électrique de l'eau de la retenue Hadjar Gafta .
(Mars – Avril 2014).**

Selon la grille d'appréciation de la qualité des eaux en fonction de la conductivité (Monod, 1989), la qualité des eaux est bonne. (Tab. 18)

**Tableau 18 : Grille de la qualité des eaux des rivières selon la conductivité électrique
(Monod, 1989)**

Conductivité électrique CE _{20°C} (µS/cm)	Qualité des eaux	Classe
CE _{20°C} < 400	Excellente	1A
400 < CE _{20°C} < 750	Bonne	1B
750 < CE _{20°C} < 1500	passable	2
1500 < CE _{20°C} < 3000	médiocre	3

1.4. Oxygène dissous :

L'oxygène constitue un excellent indicateur du fonctionnement du plan d'eau à différents titre : sur le plan physique comme indicateur de pollution ; et biologique comme vital aux organismes vivants. (Sayad, 2008)

L'oxygène dissous enregistré pendant la période d'étude est représenté dans le tableau et dans la figure qui suit. La valeur maximale est obtenue durant le mois de mars dans la station 2 (3.67mg/l) et la valeur minimale est enregistrée pendant le mois d'Avril dans la station 1 (1.42mg/l).

Tableau 19 : Oxygène dissous de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (mg/l).

	S1	S2
Avril	1.42	1.89
Mars	3.01	3.67

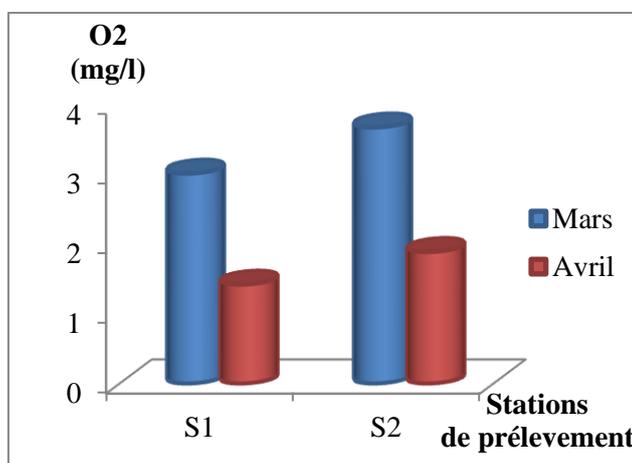


Figure 34 : Variation de l'oxygène dissous de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Avril 2014).

Les facteurs qui peuvent mener à une réduction de l'oxygène dissous sont l'augmentation de la température de l'eau et de la décomposition de la matière organique qui se trouve dans les rejets animal et aussi dans les rejets des résidus lors des activités agricoles.

Selon la grille d'appréciation de la qualité générale de l'eau (**Masson, 1988**), notre eau est de mauvaise qualité. (**Tab. 20**)

**Tableau 20 : Qualité des eaux en fonction du pourcentage de saturation en oxygène dissous.
(Merzoug, 2009 in Masson, 1988)**

% de saturation en oxygène	91 à 110	71 à 90	51 à 70	31 à 50	<30 >130
Qualité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise	Très mauvaise

2. Analyses bactériologiques

Notre travail a été effectué dans le laboratoire pédagogique de l'université de Guelma, consisté à rechercher et dénombrer les germes indicateurs de pollution qui sont :

- Les germes totaux. (germe revivifiable). à 37°C et 22°C
- Les coliformes totaux.
- Les coliformes fécaux (thermotolérants).
- Les streptocoques fécaux.
- Recherche des quelques germes pathogènes.

2.1. Recherche et dénombrement des germes totaux :

En ce qui concerne le dénombrement des germes totaux, deux prélèvements ont été réalisés mais suite à un défaut technique (absence de place dans l'étuve) on a pu avoir les résultats du premier prélèvement seulement (mois de Mars).

Tableau 21 : Dénombrement des germes revivifiables à 22 °C et à 37 °C (UFC/ml)

	T°C	S1	S2
Mars	22 °C	16000	25000
	37 °C	15000	22000

Pour les germes revivifiâbles à 22 °C, les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans la station 2 avec 2.5×10^4 UFC/ml et La valeur minimale étant de 1.6×10^4 UFC/ml dénombrée à la station 1. (Fig. 35)

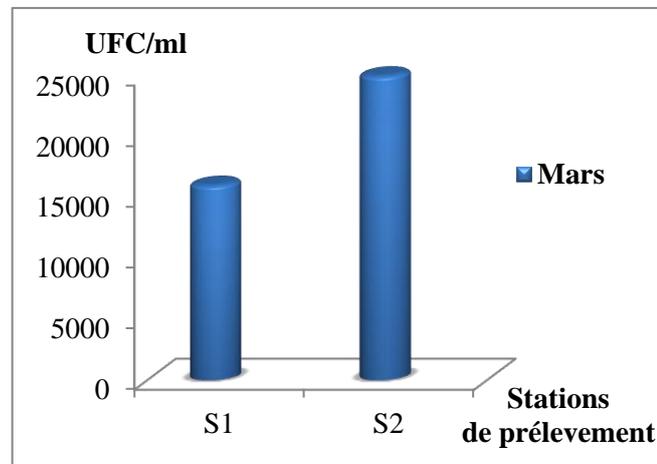


Figure 35 : Evaluation des germes revivifiâbles à 22 °C de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars 2014).

Et pour les germes totaux à 37 °C, les valeurs les plus élevées ont été enregistrées toujours dans la station 2 avec 2.2×10^4 UFC/ml. La valeur minimale est de 1.5×10^4 UFC/ml dénombrée dans la station 1. (Fig. 36)

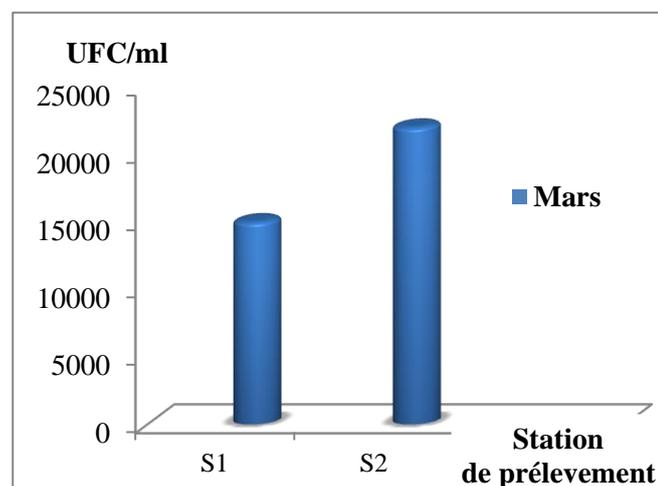


Figure 36 : Evaluation des germes revivifiâbles à 37 °C de l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars 2014).

Les résultats obtenus à 22°C sont plus élevés à ceux trouvés à 37°C pour les deux stations, cela se traduit par l'influence de la température sur la croissance de ces microorganismes.

Les bactéries revivifiâbles ne sont pas forcément d'origine fécale mais ont également un origine environnementale. Elles fournissent quelques informations, comme la prolifération de la

flore dans une eau riche en matière organique. Ces bactéries se développent principalement à des températures basses. (Rodier et al., 2009)

2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux :

2.2.1. Coliformes totaux (CT) :

La variation du nombre des bactéries dans les différentes stations de prélèvement est illustrés dans Le (Tab. 22) et la (Fig. 37).

Tableau 22 : Dénombrement des coliformes totaux (CT/ml).

	S1	S2
Mars	1700	1700
Avril	60000	120000

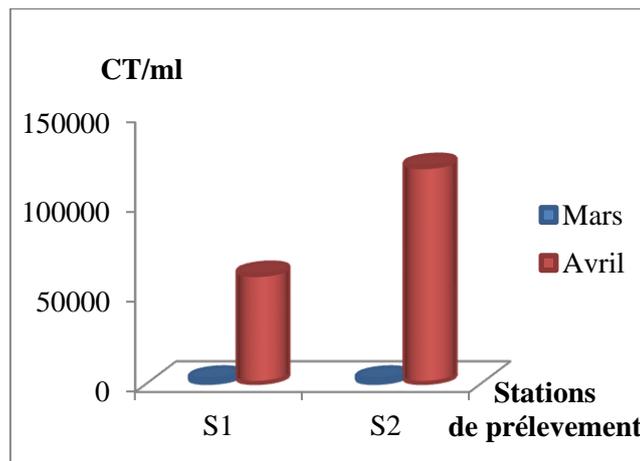


Figure 37 : Estimation des coliformes totaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2014).

D'après ces résultats, on observe que la valeur maximale obtenue est 1.2×10^5 CT/ml a la station 2 pendant le mois d'Avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée a la station 1 pendant le mois de Mars (1.7×10^3 CT/ml).

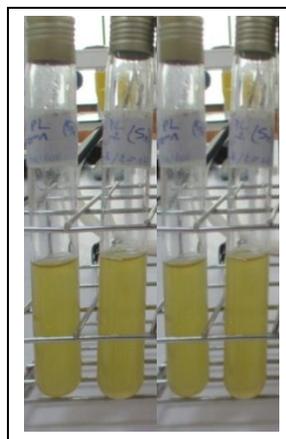
L'eau de Hadjar Gafta est riche en coliformes totaux durant toute la période d'étude cela peut se traduire par les conditions favorables tel que la température de l'eau et la disponibilité des nutriments.

2.2.2. Coliformes fécaux (CF):

Escherichia coli est le coliforme le bien représenté dans les matières fécales, sa recherche est donc extrêmement importante. L'évolution du nombre des coliformes fécaux dans l'eau de la retenue collinaire de Hadjar Gafta est présentée dans les (Fig. 38) et le (Tab. 23).



BCPL
(Test négatif)



BCPL
(Test positif)



Eau peptonée exempte d'indole
(Test positif)

Figure 38 : Résultat de la recherche des coliformes totaux et fécaux de l'eau de la retenue de Hadjar Gafta (Photos prise par Amiri et Boualleg, 2014)

Tableau 23 : Dénombrement des coliformes fécaux (CF/ml).

Stations Période	S1	S2
Mars	1400	1400
Avril	46000	80000

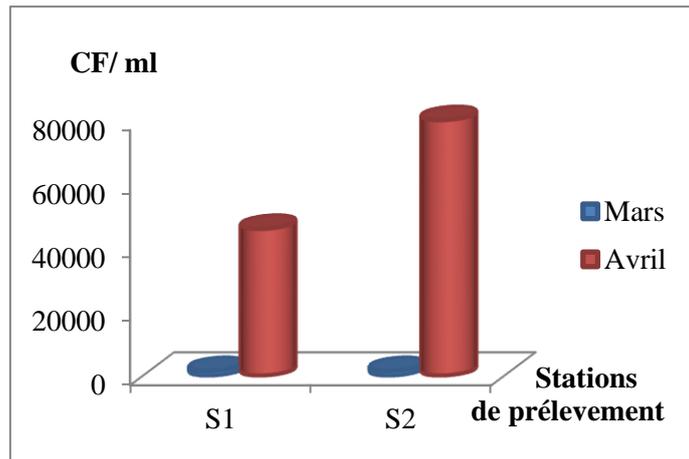


Figure 39 : Estimation des coliformes fécaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta (Mars – Avril 2013).

D'après l'histogramme on observe que la valeur maximale est de 8×10^4 CF/ml notée à la station 2 pendant le mois d'Avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée à les stations 1 et 2 pendant le mois de Mars est de $1,4 \times 10^3$ CF/ml.

La présence de coliformes fécaux dans l'eau signifie une contamination récente du milieu aquatique par la matière fécale humain ou d'animaux à sang chaud c'est (le cas pour toutes les stations). (Ouanouki et al., 2009)

Les résultats sont la plus élevés pendent le mois d'avril cela est traduit par l'augmentation de la température pendent ce mois ça vu dire ce qui favorise la multiplication de microorganismes.

Globalement tous les chiffres obtenus sont supérieurs à la norme. Pour les eaux d'irrigation la valeur limite des coliformes fécaux ne doit pas dépassée 1000 CF/ml pour les cultures consommées crus. (Ouanouki et al., 2009)

2.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont aussi des excellents indicateurs de contaminations récentes par la matière fécale des animaux (Rodier, 1996). Les résultats de dénombrement de ces derniers sont présentés dans le (Tab. 24) et (Fig. 40).

Tableau 24 : Dénombrement des streptocoques fécaux (SF/ml).

Stations Période	S1	S2
Mars	0.9×10^3	1.4×10^3
Avril	1.1×10^3	4×10^3

D'après les analyses effectuées, on a obtenus des résultats avec une variation spatio-temporelle voire figure

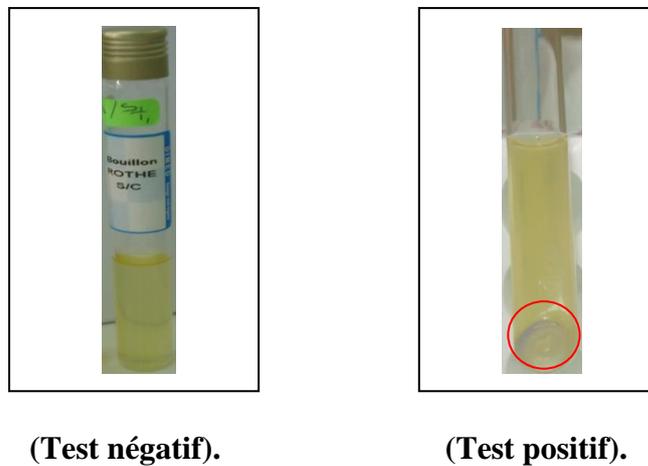


Figure 40 : Réaction d'Eva Litsky pour la recherche des streptocoques fécaux dans l'eau de la retenue d'Hadjar Gafta. (Photos prise par Amiri et Boualleg, 2014)

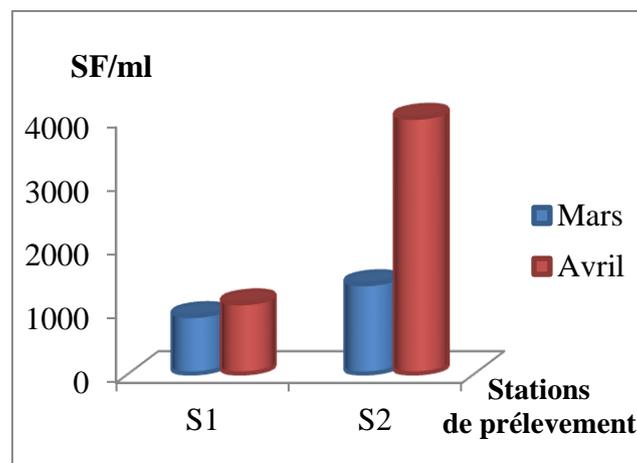


Figure 41 : Estimations des streptocoques fécaux/ml dans l'eau de la retenue Hadjar Gafta. (Mars – Avril 2014).

Le graphique des streptocoques D nous montre que la station 2 renferme le nombre le plus élevé avec une valeur maximale de 4×10^3 SF/ml pendant le mois d'Avril, tandis que la valeur minimale est enregistrée dans la station 1 pendant le mois de Mars avec 0.9×10^3 SF/ml.

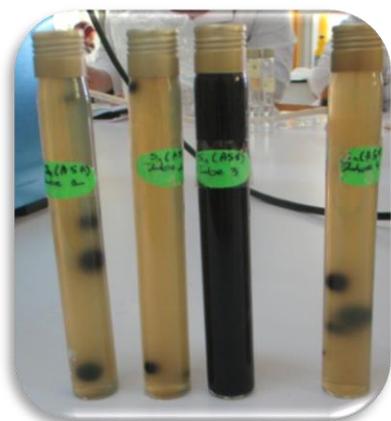
Les valeurs obtenues sont supérieures à celles citées pour l'irrigation (1000 SF/ml). (Ouanouki *et al.*, 2009)

2.4. Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) :

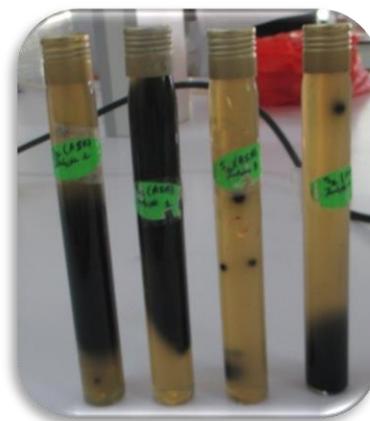
Les résultats de dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont résumés dans le tableau et les figures ci-dessous.

Tableau 25 : Dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR/20 ml).

	Station 1	Station 2
Mars	33	19
Avril	Absence	Absence



Photos des ASR à la station 1



Photos des ASR à la station 2

Figure 42 : Résultats des ASR trouvés dans l'eau de la retenue

(Photos prise par Amiri et Boualleg, 2014)

Dans le but d'identification de ces germes on a pris un tube positif (**Fig. 42**) suivi par une coloration de Gram ; l'observation microscopique des colonies montre la présence des bacilles Gram (+) sous deux formes : végétative et sporulantes (**Fig. 43**).

Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont d'origine fécale et indiquent une contamination ancienne, elles subsistent lors de l'utilisation volontaire des produits phytosanitaires par les agriculteurs, qui fait disparaître les autres bactéries non sporulées.

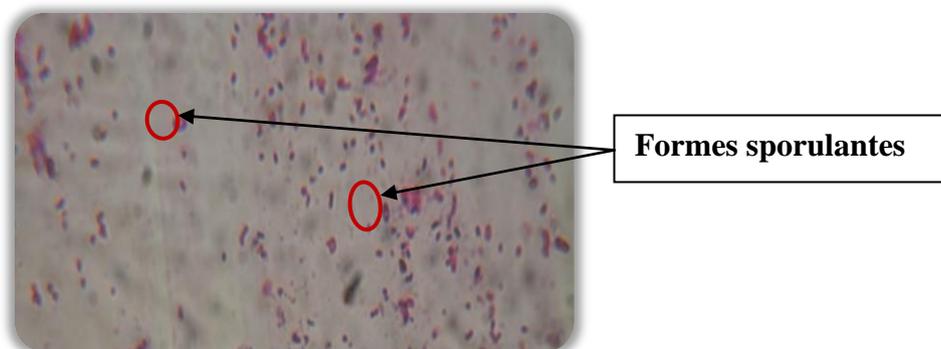


Figure 43 : Observation microscopique des formes sporulantes et végétatives des ASR (Objectif $\times 100$).

L'absence remarquée des germes sulfito-réducteurs durant le 2^{ème} prélèvement est traduits par le manque des réactifs (alun de fer et sulfite de sodium) au niveau du laboratoire.

2.5. Identification bactériennes :

Les résultats des indicateurs de contamination fécale sont confirmés par la présence d'une grande diversité microbienne. Ainsi pendant notre étude, nous avons isolé et identifié d'innombrables bactéries pathogènes qui peuvent être à l'origine des maladies à transmission hydrique. Ces bactéries sont souvent isolées avec des effectifs et des colonies assez importantes.

Deux étapes primordiales ont été suivies durant la recherche des germes pathogènes : l'observation macroscopique et microscopique des colonies isolées et une identification biochimique par la galerie biochimique classique, les API systèmes et autres tests. Les résultats sont résumés dans les tableaux et les figures ci-dessous.

2.5.1. Caractères morphologiques et coloration de Gram :

Les résultats des aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées sont résumés dans le (Tab. 26) et illustrés dans les figures suivantes.

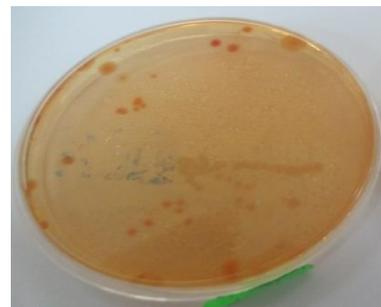
Tableau 26 : Aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées dans l'eau de la retenue

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> - Colonies petites, vertes, circulaires, bombées, lisses, opaques. (Fig. 47) - Colonies petites, marrons, avec centre foncées, irrégulières, bombées, lisses, opaques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coccobacilles, Gram négatif, isolés. (Fig. 48)
Milieu SS	<ul style="list-style-type: none"> -Colonies moyennes, roses, circulaires, bombées, lisses, opaques. - Colonies petites, incolores, plates, transparentes, régulières, lisses. -Colonies moyennes, marrons, bombées, rondes, irrégulières, lisses opaques. <p>(Fig. 44 : A)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles Gram négatif, isolés.
Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> -Colonies très petites, incolores, rondes, bombées, bords régulières, lisses <p>(Fig. 44 : B)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Bacilles, Gram négatifs, isolées ou regroupées. - Coccobacilles, Gram négatif, isolés.
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> -Colonies petites, jaunes, rondes, lisses à contours réguliers, opaques, translucides. (Fig.49) - Colonies grandes de 3 mm de diamètre, jaunes, muqueuses, bords irréguliers, opaques -Colonies petites, blanches, ronde, 	<ul style="list-style-type: none"> - Cocci Gram positif groupés en amas sous forme de grappes de raisin, immobiles. (Fig. 50) - Cocci, Gram positif, isolés ou regroupés en diplocoques ou en tétrades.

	bombées, réguliers, opaques - Colonies, bombées, muqueuses	- Bacilles, Gram positif
Cétrimide	- Colonies petites, incolores, circulaires, bombées, lisses, transparentes.	- Bacilles droits Gram négatif, isolés, mobiles, asporulés.
Milieu GNAB	-Colonies petites, incolores, circulaires, bombées, lisses, transparentes. (Fig. 45)	- Coccobacilles, incurvé, Gram négatif, isolés. (Fig. 46)
GN	-Colonies petites, brillante transparente Circulaire, lisse, plate, 1 mm de diamètre. - Colonies petites, jaune, 1 mm de diamètre, lisse, plate. à contours Irrégulière.	- Bacilles isolés, Gram négatif.



A



B

Figure 44:Aspect des colonies sur gélose :A:SS et B: Mac Conkey .

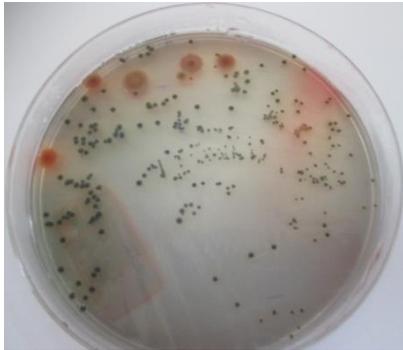


Figure 45 : Aspect des colonies sur gélose GNAB

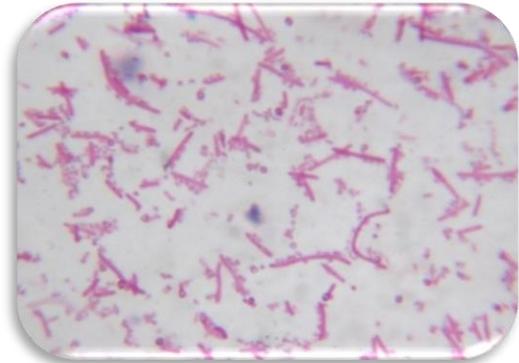
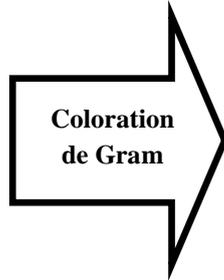


Figure 46 : Coccobacille à Gram négatif (Objectif ×100).

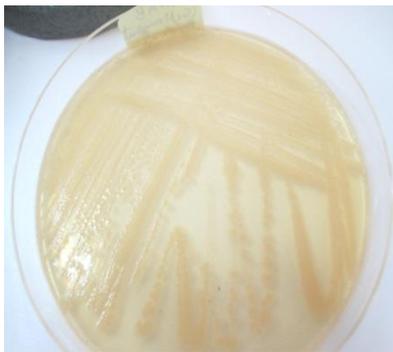


Figure 47 : Aspect des colonies sur gélose Hektoen

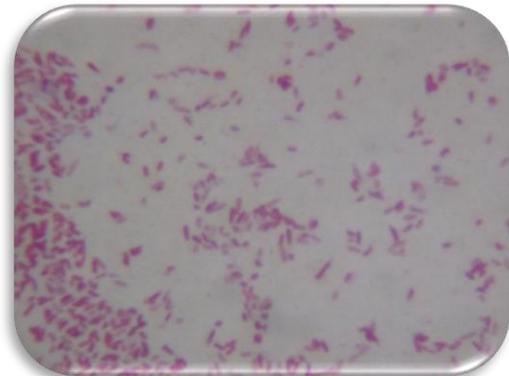
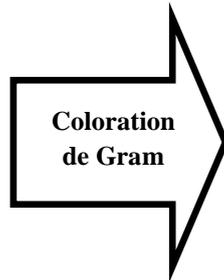


Figure 48 : Coccobacille à Gram négatif (Objectif ×100).

(Photos prise par Amiri et Boualleg, 2014)

2.5.2. Résultats de l'identification biochimique :

❖ Profil biochimique des Staphylocoques pathogènes :

L'aspect macroscopique et microscopique (coloration de Gram) des colonies isolées sur gélose Chapman sont présentées dans les figures suivantes :



Figure 49 : Aspect des colonies sur milieu Chapman (Station 2)

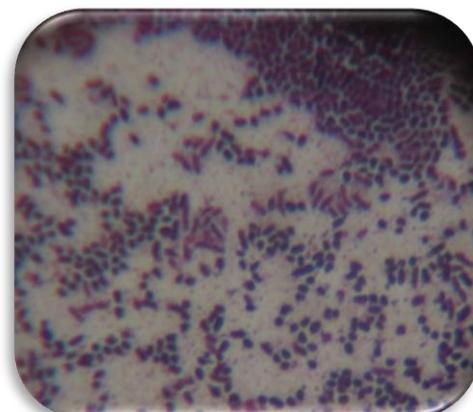
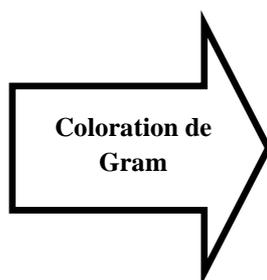


Figure 50 : Cocci à Gram positif en amas (Objectif ×100).

Les résultats des différents tests effectués sur les Staphylocoques sont représentés dans le (Tab. 27).

Tableau 27 : Résultats du profil biochimique des *Staphylococcus* isolés.

	Oxydase	Catalase	Mannitol	Staphylocoagulase	Espèces isolées
Station 01	-	+	+	-	<i>S. saprophyticus</i>
Station 02	+	+	-	-	<i>S. epidermidis</i>



Figure 51 : Test de staphylocoagulase négatif

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

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

Tableau 28 : Les espèces identifiées par la galerie biochimique classique.

Milieux de culture	Espèces bactériennes identifiée
Milieu SS	<i>Pantoea spp</i>
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
	<i>Grimontia hollisae</i>
Mac conkey	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
	<i>E.coli</i>
Hektoen	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>E.coli</i>
GNAB	<i>Serratia fonticola</i>
	<i>Citrobacter koeri</i>



Figure 52 : Image de l'identification par la galerie biochimique classique.

❖ **Identification par les API systèmes :**

Les espèces bactériennes identifiées par les API systèmes sont résumées dans les tableaux et les figure ci-dessous, ces identifications en été réalisées dans le laboratoire d'analyse de bactériologie de l'hôpital d'Ibn Zohr, Guelma.

Tableau 29 : Les espèces identifiées par l'API 20 E et l'API 20 NE.

API système	Espèces bactériennes identifiées	Le code	Milieux de culture
API 20 E	<i>Enterobacter sakazakii.</i>	3326173	GNAB
	<i>Shigella spp. (Fig. 53)</i>	0404000	Hektoen
	<i>Vibrio vulnificus</i>	3146001	Mac Conkey
	<i>Photobacterium damsela (Fig. 54)</i>	600000	Mac Conkey
	<i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Mannheimia. (Fig. 55)</i>	7152000	SS
	<i>Escherichia coli.</i>	7146572	SS
	<i>Stenotrophomonas maltophilia.</i>	7102000	Chapman
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	2102004	Mac Conkey
	<i>Escherichia fergusonii.</i>	7356013	Hektoen

API 20 NE	<i>Aeromonas hydrophila.</i>	7677745	GNAB
	<i>Pseudomonas luteola.</i>	3533660	SS
	<i>Vibrio vulnificus</i>	6672545	GNAB
	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (Fig. 56)	1750000	GNAB



Figure 53 : Profil biochimique de la souche *Shigella* spp.



Figure 54 : Profil biochimique de la souche *Photobacterium damsela*.



Figure 55 : Profil biochimique de la souche *Pasteurella pneumotropica Mannheimia*.



Figure 56 : Profil biochimique de la souche *Chryseobacterium indologenes*.

Conclusion

Au plan mondial, la question de l'approvisionnement en eau devient chaque jour plus préoccupant vu la croissance démographique importante, ce qui va nécessairement s'accompagner d'une explosion de la consommation en eau et d'une dégradation de sa qualité. Cela risque de mettre gravement en péril le ravitaillement en eau douce.

La retenue collinaire de Hadjar Gafta est considérée comme étant un petit barrage artificiel situé dans la commune de Nechmaya (wilaya de Guelma), et manifestement utilisé pour l'abreuvement des cheptels et utilisé pour l'irrigation des terrains agricoles avoisinantes, ce qui peut engendrer une altération et une détérioration considérable de cet écosystème aquatique.

Dans le but d'évaluer la qualité bactériologique ainsi de déterminer quelques paramètres physico-chimiques mesurés in situ de cette eau, on a mené notre étude au niveau de l'université de Guelma, sachant que c'est le premier projet de fin d'étude réalisée dans cette retenue.

Du point de vue bactériologique, on peut conclure que les résultats que nous avons obtenus durant le mois de Mars et Avril, révèlent que l'eau de la retenue est légèrement polluée car la contamination bactérienne, dans les deux stations de prélèvements, portée principalement par la présence de germes test de contamination fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les Anaérobies Sulfite-Réductrices ainsi que la présence de bactéries pathogènes tel que Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Serratia, Proteus, etc...Ce qui peut engendrer de graves maladies à transmission hydrique.

Du point de vue physico-chimique, les résultats obtenus dans la mesure in situ, montrent que la qualité de nos eaux est moyenne à passable.

En fin, pour maintenir une qualité acceptable de l'eau de cette retenue, on recommande de faire des suivis réguliers concernant les contrôles microbiologiques ou physicochimiques et de veiller sur l'exploitation agricole de cette eau dans l'irrigation surtout en évitant l'utilisation des polluants eutrophisants et recommandant l'utilisation des engrais naturels et aussi planter des végétaux adaptés aux rives pour créer un véritable bouclier anti-polluant.

Références bibliographiques

Ait Hamlet S., (1998). Contribution à l'étude de la qualité de huiles Oueds de la wilaya d'El Taref : aspects microbiologiques et écologiques. Mémoire de Magister en microbiologie appliquée. Université d'Annaba. Algérie. 150 p.

Aouissi A., Fouzari A. et Meziane N., (2007). Qualité bactériologique de l'eau d'Oued Seybouse. Mémoire d'ingénieur. Université 8 mai 1945 Guelma. 57p.

Aouissi A., (2009). Microbiologie et physicochimie de l'eau des puits et des sources de la région de Guelma (Nord - Est de l'Algérie). Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945 Guelma. 164 p.

Bagnouls F. et Gaussen H., (1957). Les climats biologiques et leurs classifications. Annales de Géographie. France. Vol. 66. N° 355. pp 193-220.

Bazine N. (2011) Evaluation de la qualité bactériologique des eaux de l'Oued Messida (Parc National d'El kala , w 'El Taref)

Belabed B., (2010). La pollution par les métaux lourds dans la région d'Annaba source de contamination des écosystèmes aquatiques. Mémoire de Doctorat en sciences de la mer. Université Badji Moukhtar Annaba. Algérie. 230 p.

Beriche P., Gaillard J-L. et Simouet M. (1988). Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Flammarion Médecine Sciences. France. 660 p.

Bouchaala L., 2010. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued Zenati (Guelma). Mémoire de Magister. Université de 08 Mai 1945 de Guelma. Algérie. 135 p.

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 (Wilaya d'Oum El Bouaghi). Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945 Guelma. 64 p

Boukroune H., (2008). Contribution à l'étude biologique du pouvoir auto-épuration de l'eau : cas du marais d'El-Kennar. Mémoire de Magister. Université de Jijel. 119p.

Bourdon J.L et Marchal N. (1981). Technique bactériologique. *DOIN.335p.*

Bourgeois C. M., Leveau J. Y. (1980). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Tome 03. Lavoisier : Tec et Doc. 331 p.

Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., (1988). Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. France. 251 p.

Chaouch R., (2007). Identification et quantification des déchets solides encombrant les plages d'Annaba : aspect physicochimique et bactériologique des eaux. Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. 105 p.

C.D.N (2014), Rapport interne sur la situation de la commune de Nechmaya, (commune de Nechmaya)

Coulibaly K., (2005) .Etude de la qualité physico chimique et bactériologique de l'eau des puits de certains quartiers du district de Bamako. Thèse de doctorat. Université de Bamako. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie).42p.

Dajoz R., (2000). Précis d'écologie: Cours et exercices résolus.7^{ième} édition. Dunod, Paris. 613p.

Dégrément., (1998). Mémento technique de l'eau 8ème édition *Tec et Doc*. Paris 986p.

Dellarras C., Trébaol B., (2003). Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation, prélèvements, Analyses. Lavoisier : Tec & Doc. Paris. 249 p.

Dellarras C., (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Lavoisier : Tec & Doc. Paris. 463 p.

Délarras C., (2008) .surveillance sanitaire Et Microbiologique des eaux : Règlementation-Prélèvements-Analyses.*TEC & DOC*.269p.

Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E., Quentin R., (2007). Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Elsevier Masson. 594 p.

Direction d'hydraulique de Guelma, (2014)

Direction de la pêche et des ressources halieutique, Guelma 2014.

D.G.F (2014). Direction générale des forêts de la wilaya de Guelma

D.P.A.T (2008). Direction De La Planification Et De l'Aménagement Du Territoire. Rapport Interne, Monographie De La wilaya De Guelma. 36 p.

D.S.A (2014). **Direction Des Services Agricoles de la wilaya de Guelma.** Programme de l'économie de l'eau .Diagnostique Sur La Situation de L'hydro-Agricole.

El Blidi S., Fekhaoui M., Serghini A. et El Abidi A., (2006). Rizières de la plaine du Gharb (Maroc) : qualité des eaux superficielles et profondes. *Bulletin de l'Institut Scientifique.* (28). 55-60.

El Moustaine R., chahlaoui A., Bengoumi D et Belghiti L., (2013). Contribution a la connaissance de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau des puits en élevage avicole dans la région de Meknes (Maroc).22p.

Emberger L., (1955). Une classification biogéographique des climats. Rev. Trac. Bot. Géol. Zool. Fase. Sci. Montpellier. France. 343 p.

Euzéby J. P., (2007). Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. France. 20 p.

Guiraud J-P., (1998). Microbiologie alimentaire. *Dunod.*625p.

Halassi I., (2009). Degré de contamination du Lac des Oiseaux et contribution à l'étude du pouvoir auto-épurateur de l'eau : Isolement et étude de *Bdellovibrio bacteriovorus*. Mémoire de Magister. Université 08 Mai 1945 de Guelma. 22 p.

Hasly C., leclerc H., (1993).Microbiologie des eaux d'alimentation .Editions Tec et Doc.p:153-192

Kreisel W., (1991). Water Quality And Health. Dunod. 209p.

Lassoued K. et Touhami N., (2008). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau du Barrage de Hammam Debagh. Mémoire d'Ingénieur d'état en Génie biologique. Université de Guelma. 44p.

Lebres E., (2004). Identification biochimique des micro-organismes, Institut Pasteur d'Algerie.

Lebres E. (2006). Manuel des travaux pratique : analyse des eaux, *Institut Pasteur d'Algérie*.60p.

Lebres E. et Mouffok F., (2008). Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. *Institut Pasteur d'Algérie*. 53p.

Leclerc., (1996). Microbiologie générale. Doin. 368p.

Lesne J., (1998). Hygiène publique, microbiologie et gestion de l'eau. Ecole nationale de la santé publique, Rennes, France, 7p.

Lightfoot N. F., (2002). Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. 387 p.

Masson J. P., (1988). Suivi de la qualité des eaux superficielles: l'expérience française. In : la qualità della acqua superficial; Criteria per una metodologia omogenea di valutazione, atti del convegno interazione. *Palazzo dei congressi*. (28-29 Aprile), 99-110p

Mayat S., (1994). Techniques de traitement: aliments et eaux, *1ère édition, Edisem*, 195p.

Merzoug S., (2009). Etude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'écosystème lacustre Garaet Hadj-Taher (Benazzouz, Wilaya Skikda). Mémoire de Magister. Université 08 Mai 1945 de Guelma.113p.

Ministère Algérien des ressources en eau, (2012). Qualité des eaux superficielles dans le bassin hydrographique constantinois-Seybouse-Mallegue. *DHWCNE*.

Monod T., (1989). Méharées géographiques (N.A.N.I) normes Algérienne et normes international (2002). France loisir. 233 p.

Nisbet M. et Verneaux J., (1970). Composantes chimiques des eaux courantes; discussion et proposition de classe en tant que base d'interprétation des analyses chimique. *Ann de limnologie*. Tome 6, 161-190.

Ouanouki B., Abdellaoui N., Ait Abdallah N., (2009). Application in agriculture of treated wasterwater and sludge from a treatment station. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 27. N° 4. France. p 602 - 619.

Patrick R., Murray K., Rosenthal S., Michael A. P., (2009). Medical Microbiology. 6th edition. Mosby Elsevier. Canada. 960 p.

Pechère J. C., Acar J., Grenier B. et Nihoul E., (1982). Reconnaître, comprendre et traité les infections. 4^{ème} édition. Edisem ST-Hyacinthe. Québec. Canada. 509 p.

Pilet C., Bourdon J. L., Toma B., Marchal N., Balbastre C., Person J. M., (1987). Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne. Doin. France. 371 p.

Raggam A., (2010). Evaluation de la Qualité Physico – Chimique et Bactériologiques des Eaux Potables : Cas de la Station de Traitement de Hammam Debagh-Guelma , Mémoire de Master. Université de 08 Mai 1945 Guelma, 91p.

Rajonson J., Rasolofonirina N., Ratoaveloson J., Ravaonindriana N., (1992). Qualité des eaux. Emouard (4). 135-166p.

Rejsek F., (2002). Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358 p.

Raymond., (1977). Le traitement des eaux. 2^{ème} édition. Dunod, France. 387 p.

Rodier J., Legube B., Merlet N., et al., (2009). L'Analyse de l'eau. 9^{ème} édition. Dunod. Paris. 1579 p.

Roland vilaginés., (2003) 2^{ème} édition .Eau, environnement et santé publique. Édition médicales internationales P 43-138

Rouaiguia M., Cheriet M., (2010). Qualité microbiologique de l'eau de Oued Messida. Mémoire de Master . Université 8 mai 1945 Guelma. 120p.

Sayad L., (2008). Qualité physicochimique et bactériologie des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux (wilaya de Taraf). Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 125 p.

Singleton P., (1999). Bacteria in Biology. Biotechnology and Medicine. 4th edition. John Wiley and Sons. Chichester . Etat Unis. 233 p.

Soltner D., (1999). Les Bases De La Production Végétale. Sciences & Techniques Agricoles, Tome 2. France. 396 p.

Zeddouri A., (2003). Contribution à L'étude Hydrogéologique Et Hydro-chimique De La Plaine Alluviale De Guelma (Essai De Modélisation), Guelma, NE Algérien. Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar, Annaba. 107 p.

Webographie:

[1] www.annuaire-mairie.fr/ville-nechmaya.html (Consultée le 24/02/2014) (Situation de la commune de Nechmaya)

[2] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Gastro-ent%C3%A9rite> (Consulté le 12/03/2014)
(Gastroentérites aiguës et diarrhées)

[3] <http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/vaccination/articles/8972-vaccin-gastro-enterite-aigue-diarrhees.htm> (Consultée le 12/03/2014) (Gastroentérite inflammatoire et Gastroentérite non inflammatoire)

[4] http://www.memoireonline.com/02/11/4267/m_Contribution--l'amélioration-de-la-qualité-de-l'eau--usage-domestique-dans-le-5eme-arrond2.html (Consultée le 12/03/2014) (L'hépatite A, Le Paludisme)

[5] <http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/du-lyon/2014-DUCIV-Lyon>
DEBORD PALUDISME. (Consultée le 30/03/2014) (*Bilharziose*)

[6] <http://www.vulgaris.medical.com/encyclopedie/bilharziose-745.html>
(Consultée le 16/04/2014) (L'homme rencontre les bilharzies) (Les espèces filariennes)

[7] <http://coursdeparasitologie.ifrance.com/parasites/firiose.htm> (Consulté le 16/04/2014) (Les filarioses)

Google earth, (2014). Europa Technologies. Tele Atlas.
www.googleearth.com

Resumés

La retenue collinaire de Hadjar Gafta est un petit barrage artificiel situé dans la commune de Nechmaya, Wilaya de Guelma.

Ce barrage est considéré comme une eau superficielle, elle joue un rôle important dans l'irrigation des terrains agricoles avoisinantes.

La contamination des eaux de surface par des agents pathogène est un problème sérieux. Elle est à l'origine de différentes maladies hydriques.

Notre étude consiste à évaluer la qualité bactériologique de ces eaux durant le mois de Mars et Avril 2014.

Les résultats obtenus révèlent que l'eau de la retenue est légèrement polluée par la présence de germes témoignant d'une contamination fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les anaérobies sulfite-réducteurs ainsi que la présence de bactéries pathogènes tel que *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Proteus*, etc... Cette contamination est due principalement au pâturage intensif et l'exploitation agricole des riverains.

Mots clés : Retenue collinaire, Nechmaya, Analyse bactériologique, contamination.

The hill reservoir of Hajar Gafta is an artificial dam in the town of Nechmaya, Wilaya de Guelma.

This dam is considered a body of water, it plays an important role in the irrigation of nearby farmland.

Contamination of surface water by pathogenic agents is a serious problem. It is the source of various waterborne diseases.

Our study is to assess the bacteriological quality of the water during the month of March and April 2014.

The results show that the reservoir water is slightly polluted by the presence of bacteria indicating fecal contamination namely total coliforms, faecal coliforms, faecal streptococci and sulphite-reducing anaerobes and the presence of bacteria pathogens such as *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Proteus*, etc ... This contamination is mainly due to intensive grazing and farm residents.

Keywords: Hold hill, Nechmaya Analysis bacteriological contamination.

خزان حجر قفطة هو سد اصطناعي صغير يقع في بلدية النشماية - ولاية قالمة، يصنف ضمن المياه السطحية يلعب دورا هاما في ري الأراضي الزراعية القريبة.

يعتبر تلوث المياه السطحية مشكلة خطيرة تهدد الصحة العمومية، فهو مصدر العديد من الأمراض المنتشرة عن طريق المياه.

قمنا باجراء دراسة لتقييم الجودة البكتريولوجية لهذه المياه خلال شهري مارس وأبريل عام ٢٠١٤ .

أظهرت النتائج المحصل عليها أن مياه السد ملوثة بنسبة قليلة لوجود مؤشرات التلوث البرازي منها: مجموع القولونيات، القولونيات البرازية، العقديات البرازية واللاهوائيات، بالإضافة الى العديد من البكتيريا الممرضة مثل السالمونيلا والشيجلا، المكورات العنقودية، السراتية، بروتئوس الخ... يرجع هذا التلوث أساسا إلى الرعي المكثف والاستغلال الزراعي الغير منظم من طرف السكان.

الكلمات المفتاحية : عقد التل، النشماية، تحليل البكتريولوجي، تلوث.

Annexes

Tableau 7 : Tableau de Mac Grady

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

Tableau 8 : Les principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de *Staphylococcus* (Denis et al., 2007; Sayad, 2008 ;Grosjean et al., 2009)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. Intermedius</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol	+	-	+	-
Résistance à la Novobiocine (5 µg)	S	S	R	S

Tableau 11 : Lecture d'API 20 E

Tests	Composants	QTE (mg/cup.)	Réactifs / Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- β Dgalactopyranoside	0,223	β -galactosidase (Ortho NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
CIT	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu
H₂S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	TDA / immédiat	
				jaune	marron- rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				incolore / rose pâle	rose / rouge
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation oxydation(GLUcose)	bleu / bleu- vert	jaune / jaune gris

MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol)	bleu / bleu- vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol)	bleu / bleu- vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol)	bleu / bleu- vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose)	bleu / bleu- vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose)	bleu / bleu- vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose)	bleu / bleu- vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline)	bleu / bleu- vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARABinose)	bleu / bleu- vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Tableau 12 : Lecture d'API 20 NE

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO ₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
		en nitrites	Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates	ZN / 5 mn	
		en azote	Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose Fermentation	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/ rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/ rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/ noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βD galacto pyranoside	β-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			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-pphenylène diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

Tableau 13 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API Staph

Tests	Composant actifs (Substrat)	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	—
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FER	D-fructose	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	acidification (D-ManNosE)		
MAL	Maltose	acidification (MALtose)		
LAC	lactose	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	acidification (D-MELibiose)		
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites		
PAL	β-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B /10	
			Incolore/ Rose	Violet /Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl Méthyl-carbohydate	VP 1 +VP 2 / 10 mn	
			Incolore /Rose	Rouge
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			

MDG	α -Méthyl-D-Glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange / rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge /violet

Milieux utilisés

[M1]- Eau peptonée exempte d'indole : pH = 7.2

Peptone exempte d'indole aquatique	10 g/l
Chlorure de sodium aquatique.....	5 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M2]- Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol S/C (BCPL) : pH = 6.9

Peptone	5 g/l
Extrait de viande	5 g/l
Lactose	5 g/l
Pourpre de bromocrésol	0.025 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M3]- Milieu de Rothe S/C : pH = 6.8

Tryptone	20 g/l
Glucose	5 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Phosphate bi potassique	2.7 g/l
Phosphate mono potassique	2.7 g/l
Acide de sodium	0.2g/l
Eau distillée	1000 ml

[M4]- Milieu Schubert : pH = 7.4

Tryptophane	0.4 g/l
Acide glutamique	0.4 g/l
Sulfate de magnésium	1.4 g/l
Sulfate d'ammonium	0,4 g/l
Citrate de sodium	0,5 g/l
Chlorure de sodium	4,0 g/l
Peptone	20,0 g/l
Mannitol	1.5 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M5]- Milieu de litsky : pH = 6.8

Peptone	20 g/l
Glucose	5 g/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
Eau distillée	1000 ml

[M6]- Bouillon nitrate : pH = 7.2

Infusion cœur-cervelle.....	25.0 g/l
-----------------------------	----------

Nitrate de sodium 10.0 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M7]- Clark et Lubs (Bouillon) : pH = 7.5

Peptone 5.0 g/l
Glucose 5.0 g/l
Hydrogénophosphate de potassium 5.0 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M8]- Eau Peptonée Alcaline (EPA) : pH = 8.6

Peptone 20 g/l
Sodium chlorure 30 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M9]- Gélose tryptone- glucose- extract agar (TGEA): pH = 7

Tryptone 5 g/l
Glucose..... 1 g/l
Extrait de levure 2.5 g/l
Gélose..... 15 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M10]- Chapman: pH = 7.5

Peptone bactériologique 10 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
Eau distillée 1000 ml

[M11]- Mac conkey: pH = 7.1

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
Eau distillée 1000 ml

[M12]- Gélose viande foie (VF) : pH = 7.1

Peptone pepsique de viande et de foie 30 g/l
Glucose..... 2 g/l
Peptone de gélatine..... 16.0 g/l
Peptone de caséine..... 10.0 g/l

Bromure de tétradonium (cétrimide)	0.2 g/l
Acide nalidixique	15.0 mg/l
Sulfate de potassium.....	10.0 g/l
Chlorure de magnésium.....	1.4 g/l
Agar	10 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M13]- Gélose nutritives (GN) : pH = 7.6 à 7.8

Eau distillée + extrait de viande	1000 ml
Peptone trypsine	15 g/l
NaCl ou KCl	5 g/l
Agar	15 à 20 g/l

[M14]- Milieu Hektoen : pH = 7.5

Peptone pepsique de viande	12 g/l
Extrait de levure	3 g/l
Sels biliaires	9 g/l
Lactose	12 g/l
Saccharose.....	12 g/l
Salicine.....	2 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Hyposulfite de sodium.....	5 g/l
Citrate de fer ammoniacal	1.5 g/l
Bleu de bromothymol.....	0.0064 g/l
Fushine acide.....	0.04 g/l
Gélose	14 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M15]- Gélose *Salmonella-Shigella* (SS) : pH = 7

Extrait de viande de bœuf	5 g/l
Bio-polytone.....	5 g/l
Sels biliaires	8.5 g/l
Lactose	10 g/l
Citrate de sodium	8.5 g/l
Thiosulfate de sodium	8.5 g/l
Citrate ferrique	1 g/l
Vert brillant	0.330 mg/l
Rouge neutre	0.025 g/l
Agar.....	13.5 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M16]- Gélose Cétrimide : pH = 7,1

Peptone de gélatine	16 g/l
Peptone de caséine.....	10 g/l
Bromure de tétradonium (cétrimide)	0.2 g/l
Acide nalidixique	15 mg/l
Sulfate de potassium.....	10 g/l

Chlorure de magnésium..... 1.4 g/l
Agar 10 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M17]- Gélose GNAB : pH = 8.6

Peptone 10 g/l
Extrait de viande 3 g/l
Chlorure de sodium 5 g/l
Bile de bœuf 2 g/l
Agar 8.6 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M18]- Gélose Sabouraud : pH = 6

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

[M19]- Sabouraud au Chloramphénicol : pH = 6

Peptone 10 g/l
Glucose massé 20 g/l
Chloramphénicol 0.5 g/l
Agar 15 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M20]- King A: pH = 7.2

Peptone dite "A" 200 g/l
Glycérol 10 g/l
Sulfate de potassium 10 g/l
Chlorure de magnésium..... 1.4 g/l
Agar 12 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M21]- King B: pH = 7.2

Peptone dite "B" 20 g/l
Glycérol 10 g/l
Hydrogénophosphate de potassium 1.5 g/l
Sulfate de magnésium heptahydraté 1.5 g/l
Agar 12 g/l
Eau distillée 1000 ml

[M22]- Citrate de Simmons : pH = 7.1

Citrate de sodium 1 g/l
Bleu de bromothymol 0.08 g/l
Chlorure de sodium 5 g/l
Sulfate de magnésium 0.2 g/l
Hydrogénophosphate de potassium 1 g/l

Dihydrogénophosphate d'ammonium.....	1 g/l
Agar.....	15 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M23]- TSI (gélose glucose – lactose – saccharose - H₂S): pH = 7

Peptone	15 g/l
Extrait de viande	3 g/l
Extrait de levure	3 g/l
Peptone pepsique de viande	5 g/l
Glucose	1 g/l
Lactose	10 g/l
Saccharose	10 g/l
Rouge de phénol	0.024 g/l
Chlorure de sodium	5 g/l
Sulfate de fer II (Pasteur)	0.2 g/l
Thiosulfate de sodium	0.3 g/l
Agar	11 g/l
Eau distillée	1000 ml

[M24]- Milieu mannitol-mobilité : pH = 7.4

Peptone tryptique de viande	20 g/l
Mannitol	2 g/l
KNO ₃	1 g/l
Rouge de phénol 1%	4 ml
Agar	4 g/l
Eau distillée	1000 ml

Réactifs utilisés

[R1]- Réactif rouge de méthyle (RM) : Pour mettre en évidence la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

Rouge de méthyle	0.5 g
Alcool à 60°	100 ml

[R2]- Réactif de Vosges Proskauer (VP): Pour la recherche de l'acétoïne.

VP1:

Hydroxyde de potassium	40 g
Eau distillée	100 ml

VP2:

Alpha naphthol	6 g
Ethanol	100 ml

[R3]- Réactif de Kovacks : La mise en évidence de la production d'indole.

Paradiméthylaminobenzaldéhyde 5 g
Alcoolamylique 75 ml
HCl pur 25 ml

[R4]- Réactif de TDA : Pour la recherche du tryptophane désaminase.

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

Les colorants utilisés

[C1]- Violet de gentiane

Violet de gentiane 1 g/l
Ethanol à 90% 10 ml/l
Phénol 2 g/l
Eau distillée 1000 ml

[C2]- Lugol

Iode 1 g/l
Iodure de potassium 2 g/l
Eau distillée 1000 ml

[C3]- Fushine

Fushine basique 1 g/l
Alcool éthylique 100 ml/l
Phénol 5 g/l
Eau distillée 1000 ml