

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2021

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

Thiziri EL-HADI & Abir GHEZALI

Thème

**Isolement, purification et caractérisation
phénotypique des *Enterobacteriaceae* isolées des
sources d'eau à l'Est de l'Algérie**

Soutenu le : 15 /07/ 2021

Devant le jury composé de

Nom et Prénom

Grade

Dr REMINI .H

MCB

Univ. de Bouira

Président

Dr DJOUAHRA .Dj

MCB

Univ. de Bouira

Examineur

Dr DJENADI .K

MCB

Univ. de Bouira

Promoteur

Pr SOUALILAH ALILA .H

Pr

Univ de Souk-Ahras

Co-promoteur

M SAIKI .L

CDL

ADE de Bouira

Invité d'honneur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Nous aimerions en premier lieu remercier le créateur de l'univers qui nous a dotés d'intelligence et qui nous a donné la volonté ainsi que le courage de réaliser ce travail.

*Nous remercions grandement notre encadrante **Dr DJENADI** de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées.*

*Nos remerciements les plus chaleureux s'adressent également aux membres du Jury Monsieur **REMINI**, Madame **DJOUAHRA** et Madame **SOUALILAH-ALILA**.*

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Vous nous faites l'honneur de siéger dans ce jury pour juger ce modeste travail. Soyez assurés de notre profonde gratitude.

*Nous remercions également le chef de laboratoire Monsieur **SAIKI** de nous avoir accueillis au sein du laboratoire de l'ADE - Unité de **BOUIRA**.*

*Nous adressons nos remerciements en particulier à Monsieur **MOHAND AMER** ainsi qu'à tout le personnel de laboratoire pour leur disponibilité, leur gentillesse, leur encouragement et leur aide durant notre période de stage.*

*Nous remercions profondément Monsieur **MAIZ** pour son aide, son soutien, ses conseils et ses orientations fondamentales qui ont contribué à la rédaction de ce document.*

Nous réservons une pensée spéciale à tous nos enseignants qui ont su nous donner une formation didactique et appréciable durant tout notre cursus.

Vous serez gravés à jamais dans nos mémoires.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon sincère amour.

*A l'homme de ma vie, ma précieuse offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Mokrane**.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Khelidja**.*

Pour celui qui a rendu ma vie meilleure, la personne que j'aime de tout mon cœur.

*A mes frères **El- Mahfoud** et **Mahdi**, que dieu vous protège pour moi mes chers.*

*A mes sœurs **Kenza**, **Thin-hinane**, **Mahdia**, **Zineb**, **Hafida** et **Nounou**, en témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès
Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*A toute **ma famille** sans exception et la mémoire de **mes grands-parents**.*

*Pour **MAIZ Yacine**, la personne que je respecte et que je remercie profondément pour tout ce qu'il a fait pour nous, mille merci.*

*A la personne la plus douce, gentille et modeste au monde, ma promotrice, **Dr DJENADI Katia**, aucun mot ne pourra exprimer votre valeur pour moi. Votre rencontre est un grand honneur.*

*A mes chères amies **Ziri**, **Naro**, **Sarah** et **Amira** que j'adore vraiment
Que dieu vous protège mes belles.*

*A ma binôme **Abir** et sa famille qui nous ont encouragés tout au long de notre travail*

Que Dieu vous protège et vous garde.

*A mes collègues de **la promo BTM** que je porte un grand respect pour eux.*

Thiziri

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail

A ma très chère maman

Quoi que je fasse et quoi que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été la source de ma force pour affronter les différents obstacles de cette vie.

A mon très cher papa

Pour tes encouragements, ton soutien, ton amour et tes sacrifices, afin que rien n'entrave le déroulement de mes études, je te serai toujours redevable.

A ma chère grand-mère,

La personne la plus douce et idéale dans ce monde

Que dieu vous procure bonne santé et longue vie

*A mon grand frère **Nadjib**, sa femme **Ahlam** et leur enfants **Kamyl & Nayla***

*A mes frères **Housseem-Eddine** et **Rayan***

Puisse dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite

*A mes amies **Imane**, **Siham**, **Sonia** et **Amira***

*Merci pour tous les moments inoubliables qu'on a passé ensemble
Sans oublier mon binôme **Thiziri** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

*A tous mes chers amis et collègues de la promo **BTM** que je respecte*

Je vous souhaite plein de bonheur et de réussite dans vos vies

Merci à vous tous d'être toujours là pour moi.

Abir

Table des matières

Table des matières

Remerciements	i
Dédicace.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des figures.....	iii
Liste des abréviations.....	iiii

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie synthèse bibliographique

Chapitre I: Généralités sur l'eau	3
1. Classification des eaux.....	3
1.1. Leur utilisation.....	3
1.1.1. Eaux de pluie.....	3
1.1.2. Eaux superficielles.....	3
1.1.3. Eaux saumâtres.....	3
1.1.4. Eaux souterraines.....	3
1.1.5. Eaux salées.....	4
2.1. Leur origine.....	4
2.1.1. Eaux brutes.....	4
2.1.2. Eaux traitées.....	4
2.1.3. Eaux thermales.....	4
2.1.4. Eaux résiduaires.....	4
2. Les propriétés de l'eau.....	5
2.1. Les paramètres physico-chimiques de l'eau.....	5
2.1.1. Potentiel hydrogène.....	5
2.1.2. Température.....	5
2.1.3. Turbidité	5
2.1.4. Conductivité électrique.....	6
2.1.5. Salinité.....	6
2.2. Substances et critères chimiques indicateurs de pollutions.....	7
2.2.1. Ammonium.....	7

2.2.2	Nitrite et Nitrate.....	7
2.2.3	Chlorure.....	7
2.2.4	Les matières organiques.....	7
2.3.	Les types de contamination de l'eau.....	7
2.3.1.	Pollution thermique.....	7
2.3.2.	Pollution chimique.....	8
2.3.3.	Pollution bactériologique.....	8
3.	Diversité microbienne des eaux.....	8
Chapitre II:	Les entérobactéries.....	11
1.	Bacilles à Gram négatif.....	11
2.	Les entérobactéries.....	11
2.1.	Définition.....	11
2.2.	Classification.....	12
2.3.	Quelques <i>Enterobacteriaceae</i> pathogènes	12
2.3.1.	<i>Escherichia coli</i>	12
2.3.2.	<i>Shigella</i>	12
2.3.3.	<i>Salmonella</i>	13
2.3.4.	<i>Yersinia</i>	13
2.3.5.	<i>Enterobacter, Pantoea</i>	13
2.4.	Caractéristiques.....	13
2.4.1.	Caractères bactériologiques.....	14
Matériel et méthodes.....		16
1.	Site de collecte des échantillons.....	16
2.	Recueil des échantillons.....	17
3.	Analyses physico-chimiques de l'eau.....	18
4.	Evaluation de la diversité bactérienne dans l'eau.....	18
5.	Isolement et purification des isolats de l'eau.....	19

6. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens.....	19
6.1. Essais morphologiques.....	19
6.2. Caractérisation biochimiques (macro-galerie).....	21
A. Milieu Clark & Lubs.....	22
B. Milieu Hugh & Leifson (MEVAG sans sucre).....	22
C. Milieu Hugh & Leifson.....	22
D. Milieu de l'urée indole.....	22
E. Croissance sur le milieu mannitol mobilité.....	22
F. Milieu Triple Sugar Iron.....	22
G. Milieu Kligler hajna.....	23
H. Milieu Auxanogramme.....	23
Résultats et discussion.....	24
1. Résultats.....	24
1.1. Composition minérale et caractéristiques physico-chimiques.....	24
1.2. Diversité bactérienne dans les échantillons d'eau.....	25
1.3. Les isolats dans les échantillons d'eau.....	26
1.4. La diversité des Gram négatif dans les eaux de forage.....	30
2. Discussion.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographies.....	41
Résumé	

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau N°I : Classification des entérobactéries.....	12
Tableau N°II : Site de collecte des échantillons.....	17
Tableau N°III : Origine et qualité de l'eau recueilli.....	18
Tableau N°IV : Résultats de la composition chimique et la caractérisation physico-chimique des échantillons d'eau.....	24
Tableau N°V : Résultats de dénombrement sur milieu PCA.....	25
Tableau N°VI : Résultats des ensemencements par stries sur milieu TGEA.....	26
Tableau N°VII : Résultats de l'observation microscopique des isolats à Gram négatifs.....	29
Tableau N°VIII : Résultats de la caractérisation phénotypique des isolats à Gram négatifs.....	31

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Sites et points de prélèvement (Nord : Machroha et Sud : Oum el Adhaim) Wilaya de Souk-Ahras.....	16
Figure 02 : Les étapes d'une observation à l'Etat frais.....	20
Figure 03 : Les étapes de la coloration de Gram.....	21
Figure 04 : Résultats de la coloration de Gram.....	30
Figure 05 : Résultats de l'état frais.....	30
Figure 06 : Aspect des isolats sur le milieu milieu Clark & Lubs.....	33
Figure 07 : Aspect des isolats sur le milieu Hugh et Leifson (MEVAG sans sucre).....	34
Figure 08 : Aspect des isolats sur le milieu Hugh et Leifson.....	35
Figure 09 : Aspect des isolats sur le milieu mannitol mobilité.....	35
Figure 10 : Aspect des isolats sur le milieu Triple sugar iron.....	36
Figure 11 : Aspect des Isolats sur le milieu Kligler Hajna.....	36
Figure 12 : Aspect des Isolats sur le milieu Auxanogramme.....	37

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
°C : Degrés Celsius
Cl : Chlorure
CO₂ : Dioxyde de carbone
COD : Carbone organique dissous
FNV : Formazin Nephelometric Unit
g : Gramme
H₂ : Dihydrogène
H₂S : Sulfure hydrogène
Kg : Kilogramme
L : Litre
LB : Luria Bertani
M : Molaire
mg : Milligramme
ml : Millilitre
Mm : Millimolaire
MOD : Matière organique dissoute
N₂ : Diazote
NH₄⁺ : Ammonium
NO₂⁻ : Nitrite
NO₃⁻ : Nitrate
O₂ : Dioxygène
OMS : Organisation mondiale de la santé
PCA : Plate count agar
pH : Potentiel hydrogène
TGEA : Tryptone glucose yeast extract
TSI : Triple sugar iron

Introduction

Introduction

L'eau, c'est la vie, a-t-on l'habitude de dire. En effet, c'est « le solvant universel ». Cette eau est composée d'oxygène et d'hydrogène qui, avec le carbone sont indispensables au fonctionnement cellulaire (**Hertig et al., 2006**).

Cependant dans la nature, l'eau n'est pas toujours source de vie. Elle peut véhiculer de nombreux micro-organismes, bactéries, virus et protistes de tout genre, pathogènes et non pathogènes, qui y vivent et s'y développent. La diversité de ces micro-organismes est un constituant important de la biodiversité globale présente sur notre planète.

Sur la Terre, les environnements d'eau douce et marins, diffèrent à bien des égards, mais les deux constituent d'excellents habitats pour les micro-organismes. Les procaryotes sont parmi les contributeurs les plus importants à la transformation de composés organiques et minéraux complexes dans les sédiments d'eau douce (**Jurgens et al., 2000**), et il y a environ 250 000 kilomètres cubes d'eau douce sur Terre, sous forme de lacs, de mers intérieures et de rivières, qui abritent potentiellement des micro-organismes aussi divers que l'assemblage découvert dans les océans ouverts (**Guillou et al., 1999**).

Nous sommes tous conscients du fait que les micro-organismes sont essentiels au fonctionnement, au maintien et à la continuité de la vie sur Terre. Depuis la formation de notre planète, ils ont joué un rôle très critique, notamment en étant les premiers à coloniser et à transformer les effets des perturbations naturelles ou artificielles de l'environnement. La survie des bactéries, leur propagation ainsi que leur capacité à habiter une grande variété d'environnements démontrent leur succès évolutif (**Gaston et al., 1996**). La biodiversité ne se limite pas à décrire les différentes espèces vivant dans un certain habitat, mais elle identifie également la variation génétique et la fonctionnalité de ces espèces au sein de leurs écosystèmes. Par conséquent, de nos jours, les outils de la biodiversité sont utiles dans l'identification de nombreuses espèces microbiennes inconnues vivantes sur Terre. Ainsi, le terme biodiversité microbienne gagne en importance non seulement pour comprendre leur évolution mais aussi pour mieux déterminer leur impact écologique sur certaines niches et l'évolution du climat. Un rapport récent suggère qu'il pourrait y avoir jusqu'à 1 million d'espèces de procaryotes, mais seulement 3 100 sont connues et ont été entièrement décrites dans le manuel de Bergey (**William et al., 1989**). Ainsi, plusieurs nations montrent leur engagement à protéger leur

environnement, et ont inclus la conservation de la diversité écologique dans les politiques de protection de leur pays (**Cohan, 2002**).

Cette diversité microbienne dans l'écosystème aquatique peut être influencée par des facteurs chimiques. Ce qui pourra engendrer une apparition d'une autre flore pouvant nuire à la santé humaine. La bonne qualité de l'eau constitue un élément très important pour la protection de la santé publique. Dans cet objectif, au cours du temps, les scientifiques ont inventé des règles protectrices qui vont de la source jusqu'au robinet du consommateur.

La majorité de ces règles ont été introduites dans les réglementations sanitaires et s'articulent principalement sur deux étapes qui sont les risques microbiologiques et les risques chimiques (**Oms, 1996**). La menace microbiologique est un risque microbien qui peut nuire à la santé publique (**Haslay, 1993**).

Sous ce large éventail de connaissance et de conscience scientifiques, nombreux sont les laboratoires de recherches qui sont intéressées à la diversité microbienne dans l'écosystème aquatique (**Goñi-Urriza et al., 2000, Kümmerer, 2004, Aubron et al., 2005, Tafoukt et al., 2017, Djenadi et al., 2018, Adjeroud et al., 2020, Singh et al., 2020**).

En raison de la richesse écologique et la grande superficie qui caractérise l'écosystème Algérien, les investigations élaborées sur la diversité microbienne dans des échantillons d'eau sont qualifiée de modérée. Ce qui nous a motivés à se lancer dans la caractérisation phénotypique des isolats de Gram négatif dans la région EST d'Algérie.

En collaboration avec l'équipe scientifique de le l'université de Souk-Ahras nous avons dressé une stratégie de travail expérimental. Après avoir effectué un échantillonnage, nous avons procédé à l'isolement, la purification et la caractérisation phénotypiques des entérobactéries qui se nichent dans les eaux souterraines de la région Souk-Ahras de l'Est de l'Algérie.

Notre manuscrit se compose de trois parties: la première partie est une étude bibliographique sur l'eau et les entérobactéries. Quant à la seconde partie, elle sera consacrée à l'étude expérimentale de la diversité des Entérobactéries dans les échantillons d'eau. Enfin, dans la troisième partie, nous allons exposer les résultats obtenus et les comparer avec l'ensemble des travaux réalisés dans d'autres régions.

Partie Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les eaux

L'eau a toujours été considérée comme l'élément liquide le plus indispensable à la survie des êtres vivants. Divers usages font appel à ce milieu complexe: besoins alimentaires, utilisations domestiques, agricoles et industrielles (**Mouchet et Roustan, 2011**).

L'essentiel des ressources de notre planète est représenté à 97.2 % par des eaux de mers et des océans ; Seulement 2.8 % sont représentées par des eaux douces (**Festy et al., 2003**).

1. Classification des eaux

Les eaux sont classées suivant:

1.1. Leur origine

1.1.1. Eaux de pluie

L'eau météorite est l'eau qui provient des précipitations atmosphériques. Elle contient des gaz dissous ou gaz de l'atmosphère. Ces derniers sont composés de : $N_2 = 16,3$ mg/L, $O_2 = 9,15$ mg/L et $CO_2 = 2,8$ mg/L, des dérivés de l'azote, avec une concentration variant de 1 à 3 mg/L et enfin des polluants divers, provenant des combustions domestiques et industrielles (gaz carbonique, minéraux, organiques et radioactifs) (**Quevauviller, 2010**).

1.1.2. Eaux superficielles

Appelées également eaux de surface, elles sont composées des eaux courantes (fleuves, rivières, torrents, ruisseaux, canaux...), ou stagnantes (lacs naturel ou artificiels, étangs...). Ces eaux se trouvent en contact étroit avec l'atmosphère d'un côté et le sol de l'autre (**Quevauviller, 2010**).

1.1.3. Eaux saumâtres

Les eaux saumâtres sont des eaux d'origine souterraine ou de surface, dont la salinité est intermédiaire entre celle des eaux de mer et celle des eaux douces. Parfois, cette dernière peut être supérieure à celle des eaux de mer (**Mouchet et Roustan, 2011**).

1.1.4. Eaux souterraines

Lorsque l'eau superficielle pénètre dans le sol, une partie est retenue à la surface tandis que l'autre percole dans le sous-sol pour former des aquifères: des réservoirs d'eau suffisamment poreux et perméables. La percolation dépend directement de la perméabilité du terrain concerné (**Quevauviller, 2010**).

1.1.5. Eaux salées

L'eau de mer est un mélange dynamique et complexe de sels, de minéraux dissous et de matières organiques. Ce terme « eau de mer » est utilisé pour représenter une solution où le soluté est appelé sel de mer tandis que le solvant représente l'eau de mer (**Belessiotis et al., 2016**).

1.2. Leur utilisation

1.2.1. Eaux brutes

L'eau brute est une eau qui n'a subi aucun traitement. Elle est généralement qualifiée comme une eau impropre à la consommation humaine du fait de la présence de contaminants (**Mouchet et Roustan, 2011**).

1.2.2. Eaux traitées

Elles se caractérisent par la préservation de la stabilité des variations biologiques, telles que la consommation et la croissance bactérienne, à partir du carbone organique dissous (COD) biodégradable et l'activité de prédation subséquente des protozoaires. Ces micro-organismes doivent être non détectables lors du stockage dans des réservoirs ou lors du transport à travers les réseaux de distribution grâce à l'utilisation de désinfectants. Il s'agit de l'addition d'agents oxydants tels que le chlore, qui permet de limiter la croissance bactérienne dans le réseau (**Sibille, 1998**).

1.2.3. Eaux thermales

Les eaux thermales sont des sources d'eau naturellement minéralisées et qui proviennent des profondeurs de la terre. Elles s'enrichissent de propriétés chimiques et d'oligo-éléments durant leur long voyage à travers les roches, ce qui les rend extrêmement riches et bienfaitantes pour la santé. Contrairement aux eaux de distribution, l'emploi de désinfectant est absolument interdit (**Lebaron, 2020**).

1.2.4. Les eaux résiduaires

Ces eaux sont aussi appelées eaux usées ou effluents liquides. Ce sont des eaux souillées par un usage humain, qui se divisent en eaux résiduaires domestiques et industrielles.

Les eaux résiduaires domestiques sont porteuses de polluants organiques et se répartissent en eaux ménagères chargées de détergents, de graisses ou de solvant, d'une part, et en eaux

vannes issues des rejets de toilettes, d'autre part. Ces dernières sont chargées en germes fécaux ainsi que de diverses matières organiques (**Elskens, 2010**).

Les eaux résiduaires industrielles sont des eaux qui se caractérisent par la variation de leurs caractéristiques, d'une industrie à une autre. En plus des matières organiques, elles peuvent contenir des substances très dangereuses et toxiques comme les métaux lourds, les micropolluants organiques et minéraux, ainsi que des hydrocarbures. Les effluents d'origine industrielle, responsables de la pollution, ne sont pas compatibles avec le système d'épuration public destiné à l'assainissement des effluents urbains (**Elskens, 2010**).

2. Les propriétés de l'eau

2.1. Les paramètres physico-chimiques de l'eau

2.1.1. Potentiel hydrogène

Le potentiel Hydrogène (**pH**) se définit comme le coefficient qui caractérise l'acidité ou la basicité d'une eau. Une eau est dite acide si son pH est inférieur à 7. Elle devient ainsi agressive, c'est-à-dire, qu'elle peut se charger en plomb lors de son passage dans les canalisations.

Une eau est dite basique si son pH est supérieur à 7. Une eau est neutre si son pH égal à 7 (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

Le pH d'une eau naturelle dépend de la nature des terrains traversés ainsi que de son origine. Un pH inférieur à 7 peut engendrer la corrosion des tuyauteries métalliques. Par contre, un pH supérieur à 8, serait responsable d'une diminution de l'efficacité du processus de désinfection au chlore (**Hakmi, 2006**).

2.1.2. Température

La température d'une eau potable (pour des raisons de qualité organoleptique) doit se situer entre 9 et 12 °C, avec un maximum de 15 °C (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

Une température élevée conduit à la diminution du taux d'oxygène dans l'eau, ce qui va conduire, à son tour, à la libération du phosphore contenu dans les sédiments. Une abondance excessive de phosphore, peut entraîner l'apparition d'algues bleu-vert, nocives pour la santé de l'homme (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

2.1.3. Turbidité

La turbidité est la mesure de l'aspect plus au moins trouble de l'eau. Elle est due à la présence dans l'eau de particules en suspension (colloïdes minéraux et organiques, phyto- et zooplankton, bactéries et virus) qui absorbent et réfléchissent la lumière (**Mouchet et Roustan, 2011**).

La turbidité peut avoir des effets considérables sur la qualité microbienne de l'eau. En effet, la croissance microbienne dans l'eau est particulièrement marquée à la surface des particules et à l'intérieur des floes, présents d'une façon naturelle dans l'eau ou formés lors de la coagulation, ce qui peut entraîner une augmentation de la turbidité (**Mouchet et Roustan, 2011**).

Il existe une bonne corrélation entre le décompte microbien et la turbidité : une turbidité élevée entraîne la réduction de sa transparence.

NFU (ou FNU pour Formazin Nephelométric Unit) : est une unité de mesure de la turbidité (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

2.1.4. Conductivité électrique

La conductivité électrique est un paramètre de sommation non spécifique de toutes les espèces ioniques dissoutes (acides, bases, sels et substances organiques) dans une solution.

Elle retrace l'état de minéralisation de l'eau : c'est-à-dire plus la minéralisation de l'eau est élevée, plus la concentration en ions dissous est élevée, et plus la conductivité électrique est grande (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

2.1.5. Salinité

En 1902, une première définition a été attribuée à la salinité : elle représente la masse totale des sels dissous par kilogramme d'eau de mer et est exprimée en g/kg ou ‰. Par exemple : 1 kg d'eau de mer de salinité 35.000 ‰ devrait contenir 35.000 g de sel pour 965.000 g d'eau pure (**Copin-Montegut, 2002**).

La teneur en sel dans les mers, océans ainsi que les grands lacs est varié. Les eaux naturelles telles que les eaux des puits, des rivières et des lacs, contiennent de petites quantités de sels dissous à des concentrations diverses. Tandis que l'eau de mer contient des quantités plus importantes de sels dissous, principalement du chlorure de sodium (**Belessiotis et al., 2016**).

La composition et la quantité des sels dissous des eaux naturelles diffèrent extrêmement selon le type d'eau, le site de l'origine, du taux d'évaporation et dans certains cas du moment ou de la saison (**Belessiotis et al., 2016**).

2.2. Substances et critères chimiques indicateurs de pollutions

2.2.1. Ammonium

L'ammonium, de formule brute (NH_4^+), est un composé chimique présent naturellement dans le sol et l'eau. Après la mort des êtres vivants, ces derniers vont suivre un processus d'ammonification, réalisé par des bactéries, aboutissant à la formation d'ammonium (**Chaussé et al., 2003**).

2.2.2. Nitrite et Nitrate

Les ions nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-) sont le résultat d'une nitrification de l'ammonium NH_4^+ (**Chaussé et al., 2003**). La concentration de nitrates contenus dans une eau destinée à la consommation humaine ne doit pas dépasser la valeur de 50 mg/l selon l'OMS (**Oms, 2013**).

La limite réglementaire acceptable de nitrites est à 0,50 mg/l approximativement. Elle doit être inférieure ou égale à 0,1 mg/L en sortie des installations de traitement (**Apfelbaum et Romon, 2009**).

2.2.3. Chlorure

Les chlorures (Cl^-) sont des oligo-éléments présents en grande quantité dans l'eau de mer. Leur concentration dans l'eau de pluie est d'environ 3mg/l (**Hakmi, 2006**).

La concentration maximale admissible en chlorure dans une eau de boisson est de 200 mg/l. D'ailleurs c'est au-delà de cette concentration que l'on commence à ressentir le goût de chlore (**Hakmi, 2006**).

2.2.4. Les matières organiques

La matière organique est composée d'une fraction dissoute et d'une fraction particulaire. La matière organique dissoute (**MOD**) est constituée de molécules organiques qui proviennent de la dégradation des végétaux, d'organismes mort et également des micro-organismes (**Sibille, 1998**).

2.3. Les types de contamination de l'eau

On distingue trois principaux types :

2.3.1. Pollution thermique

La pollution thermique est le résultat de versement de quantités importantes d'eau utilisées pour le refroidissement dans les milieux aquatiques (eaux littorales, fleuves). Par exemple : la production d'énergie électrique par des centrales nucléaires.

L'augmentation excessive de la température de l'eau entraîne une modification de l'équilibre biologique des eaux et facilite le développement d'amibes libre pathogènes. (**Festy et al., 2003**).

2.3.2. Pollution chimique

L'origine du risque chimique se situe dans l'utilisation excessive d'engrais (pesticides) dans le domaine agricole, de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires (**Rico, 2000**).

2.3.3. Pollution bactériologique

La provenance de la pollution microbienne et parasitaire est manifestement d'origine fécale, causée par des déjections humaines et animales au travers des eaux usées, moins maîtrisées sur le plan sanitaire (**Festy et al., 2003**). Les facteurs microbiens de pollution des eaux usées sont des virus (exemple : virus de l'hépatite A, entérovirus de type poliovirus...) responsables d'hépatites, gastro-entérites ou syndromes neuro-méningés ; ces virus sont en général plus persistants que les bactéries et résistent aux traitements de désinfection (**Festy et al., 2003**).

3. Diversité microbienne dans les eaux

La diversité microbienne dans l'écosystème aquatique est immense. Elle résulte de l'évolution sur presque quatre milliards d'années. La diversité dans les eaux peut être étudiée sous des angles différents : variation de la taille des cellules, de la morphologie, des stratégies métaboliques, de la mobilité, pathogénèse ainsi que l'adaptation à l'environnement.

Les microorganismes sont d'une grande diversité métabolique, en particulier les bactéries qui peuvent utiliser pratiquement n'importe quel substrat comme source d'énergie et de carbone (exemple : des acides humiques aux plastiques) (**Sharma et al., 2019**).

Les virus constituent une classe majeure des microorganismes. Il existe entre 10^6 et 10^9 particules virales par millilitre d'eau à la surface de l'océan. La majeure partie des virus est représentée par des bactériophages qui peuvent infecter des bactéries hétérotrophes et des cyanobactéries. Les virus, en plus des procaryotes marins, infectent aussi d'autres grands groupes d'algues et de phytoplancton marin. Les bactériophages seraient responsables du remplacement d'au moins un tiers des bactéries aquatiques, ceci est d'une importance majeure en écologie, car la multiplication des bactéries marines dépasse la capacité nutritive des protozoaires marins. Les bactériophages jouent un rôle important dans l'accélération du transfert de gènes entre les

bactéries marines. La lyse bactérienne viro-induite engendre la plus grande partie de l'ADN libre présent dans l'eau de mer. Ces échanges peuvent être positif et conduisent à la dégradation des polluants toxiques par les bactéries marines transformées (**Woolverton et al., 2008**).

Les bactéries hétérotrophes dans l'eau présentent une diversité importante ($10^4 - 10^6$ cellules /mL). Cette abondance est liée à l'apport de matière organique. Nous retrouvons aussi des bactéries photosynthétiques anoxygéniques comme les bactéries pourpres et vertes : bactéries photosynthétiques, qui utilisent le sulfure d'hydrogène (H_2S) (parfois H_2) comme source d'électrons ; ou précipitent le soufre à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule.

Un troisième groupe sont les bactéries photosynthétiques oxygéniques représentées par les cyanobactéries : les petites picocyanobactéries des océans et des lacs (jusqu'à 10^5 cellules/mL), alors que les espèces plus grandes des lacs et estuaires, forment des structures coloniales macroscopiques, certaines espèces sont même capables de fixer l'azote atmosphérique. Les prochlorophytes, petit picoplancton, découverts en 1990, sont très abondants et répandus en mer (**Woolverton et al., 2008**).

Dans le milieu marin, la communauté microbienne est dominée par de nombreuses ultra micro-bactéries ou nano-bactéries, en particulier *Sphingomonas*, qui passe facilement au travers des filtres de $0.2 \mu m$. La plus grande bactérie du monde est *Thiomargarita namibiensis* avec une taille qui varie de (100 à $300 \mu m$) utilisant le sulfure et le nitrate comme réducteur et oxydant, qu'elle stocke dans une énorme vacuole ($800 mM$ de nitrate ; granules de soufre en périphérie). Ces bactéries sont très avantageuses pour le recyclage du soufre et de l'azote dans ces milieux (**Woolverton et al., 2008**).

La diversité microbienne de l'eau douce comprend deux principaux groupes : les cyanobactéries et les microalgues. Les microalgues comprennent les principaux phylums : *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Xanthophyta*, *Dinophyta*, *Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Bacillariophyta*, *Rhodophyta* et *Phaeophyta*. Les membres de *Chlorophyta* sont associés à une plus grande importance commerciale car la plupart des espèces appartenant à ce groupe ont le potentiel d'être utilisées comme biocarburant, par exemple, *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis* et *Nannochloris*. Parmi tous ces membres *Chlorella* a été signalé comme un microbe potentiel pour la production de biodiesel. Cependant, les souches suivantes de cyanobactéries ont été signalées pour la production d'hydrogène gazeux comme biocarburant, *Anabaena*, *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Cyanothèque*, et *Microcoleus* (**Sharma et al., 2019**).

L'hydrogène cyanobactérien est une source d'énergie alternative très prometteuse en raison de ses caractéristiques écologiques et de ses besoins minimaux en nutriments pour sa croissance. En plus de servir de source de microalgues de biocarburant, les cyanobactéries sont également utilisés dans l'aquaculture, le traitement des eaux usées, l'alimentation, les engrais et la production de métabolites secondaires, notamment les exopolysaccharides, les vitamines, toxines, enzymes et produits pharmaceutiques (**Sharma et al., 2019**).

Chapitre II

Les entérobactéries

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse. Cette importance s'explique bien par la variété des espèces bactériennes (**Harbarth et al., 2000**).

1. Bacilles à Gram négatif

Les bacilles à Gram négatif comptent actuellement plus de 100 espèces bactériennes, isolées dans les laboratoires. Une vingtaine d'entre elles peuvent présenter un intérêt médical, car elles sont dotées d'un pouvoir potentiellement pathogène. (Exemples : *Escherichia*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) (**Achkour, 2012**). Les bacilles à Gram négatif se subdivisent en deux groupes importants : les bacilles à Gram négatif fermentaires ou (les entérobactéries) et les bacilles à Gram négatif non fermentaires (**Achkour, 2012**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales. Elles sont dites pathogènes opportunistes. Nous citons comme exemples : *Kingella*, *Alcaligenes* et *Achromobacter* (**Berthelot et al., 2005**).

2. Les entérobactéries

2.1. Définition

Les entérobactéries forment un grand groupe de bactéries ayant une similitude forte. La création de ce groupe a été proposée par Ranh en 1937, qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* (**Joly et Reynaud, 2007**).

Le mot "entérobactérie" signifie le positionnement d'une famille des organismes microscopiques dans le tube digestif (le colon) de l'homme et des animaux (**Bengherbia et al., 2014**). Cette famille est composée de parasites, de commensales et de saprophytes (**Joly et Reynaud, 2007**).

La famille des *Enterobacteriaceae* comprend de nombreux genres bactériens qui sont immobiles et/ou mobiles. Ce sont des germes aérobies, anaérobies facultatifs qui se développent sur des milieux ordinaires. Les entérobactéries qui fermentent le glucose et le lactose, ne possèdent pas de l'oxydase mais possèdent une catalase, à l'exception de *Shigella dysenteriae*. Enfin, ce sont des souches non sporulées qui réduisent les nitrates en nitrites (**Konare, 2016**).

2.2. Classification

Les entérobactéries sont actuellement classées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S en 44 genres qui sont classés selon leurs propriétés fermentatives en cinq groupe : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae* (Larpen, 2000). Les genres les plus fréquent isolés en bactériologie sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* (Morice, 2003).

Tableau N°I : Classification des entérobactéries (Ababsa, 2020).

Rangs taxonomiques	Classification
<i>Domaine</i>	<i>Eubacterie</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Phylum</i>	<i>Proteobacterie</i>
<i>Ordre</i>	<i>Enterobacteriales</i>
<i>Classe</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<i>Famille</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>

2.3. Quelques *Enterobacteriaceae* pathogènes

2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'espèce la plus fréquemment isolée dans le laboratoire de bactériologie. C'est aussi le premier germe responsable d'infections communautaires. Les infections causées par *E. coli* sont de deux types : infections intestinales à type de diarrhées et infections extra-intestinales. *E. coli* est de loin le premier germe responsable d'infection urinaire. Les souches dites « uropathogènes » parviennent à coloniser l'arbre urinaire grâce à des adhésines (piliou fimbriae).

Elle est également responsable d'infections materno-foetales, de prostatites et des infections des voies biliaires (Kansaye, 2020).

2.3.2. *Shigella*

Ce genre comprend 4 espèces ou sous-groupes A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes exemple : (groupe A, *S. dysenteriae* avec une quinzaine de sérotypes). De nouveaux sérotypes sont en cours de confirmation pour les trois premières espèces.

S. dysenteriae type 1 ou bacille de Shiga est l'agent de la dysenterie bacillaire stricto sensu.

Les autres *Shigella* provoquent des syndromes dysentériques. Il existe en fait de grandes variations dans la gravité des infections, la forme la plus grave étant due au bacille de Shiga. **(Kansaye, 2020).**

2.3.3. Salmonella

Du point de vue médical, on distingue deux grands groupes du genre *Salmonella* : les salmonelles majeures, agents de fièvres typhoïde et paratyphoïdes *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* et *S. Paratyphi C* **(Kansaye, 2020).**

2.3.4. Citrobacter

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont des saprophytes. Elles colonisent l'intestin de l'homme. Cette bactérie peut provoquer des infections du tractus urinaire. Toutes les espèces à l'exception de *C. rodentium*, sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale **(Kansaye, 2020).**

2.3.5. Yersinia

Yersinia pestis est responsable de la peste. L'homme se contamine par contact direct avec des animaux domestiques.

Y. pseudotuberculosis et *Y. Eterocolitica* sont responsables des yersiniose qui sont des infections qui se présentent sous formes digestives (gastro-entérites fébriles).

Y. pseudotuberculosis est responsable d'adénite mésentérique et *Y. enterocolitica* est en capable de se multiplier à 4°C **(Kansaye, 2020).**

2.3.6. Enterobacter, Pantoea

Les *Enterobacter*, présents dans l'environnement naturel, sont également des germes commensaux du tube digestif des animaux mais aussi des opportunistes responsables des infections urinaires, de bactériémie et des méningites **(Kansaye, 2020).**

2.4. Caractéristiques

Les entérobactéries sont des bâtonnets droits, flagellés immobiles et /ou mobiles par des ciliatures péritriches, non sporulés, aérobies facultatifs, produisant de l'acide à partir du glucose, n'exigent pas de sodium ni de stimulateur, catalase positif, oxydase négatif, réduisent les nitrates en nitrite **(Madian et Martinko, 2007).**

Les critères de différenciations entre les espèces (**Carip, 2008**)

- ✓ la fermentation des différents sucres,
- ✓ la production ou non de sulfure,
- ✓ la production d'indole,
- ✓ la production d'uréase,
- ✓ la présence ou l'absence des enzymes métaboliques (β -galactosidase, désaminases, décarboxylases).

2.4.1. Caractères bactériologiques

a) Caractères morphologiques

Toutes les entérobactéries sont des polymorphes de 2-3 μm de longueur sur 0,6 μm de largeur. De nombreuses espèces sont soit mobiles par ciliatures péritriches ou immobiles, non sporulées et peuvent être capsulées (*Klebsiella*). La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (*E. coli*, staphylocoques et streptocoques). Quelques espèces sont caractérisées par la présence d'une capsule visible au microscope (**Bakhoun et al., 2004**).

b) Caractéristiques cultureaux

Les entérobactéries sont facilement cultivables sur les milieux universels en 24 heures à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Sur milieux gélosés, leurs colonies sont lisses, brillantes, de structure homogène (type S). Cet aspect donne après cultures des colonies à surface sèche rugueuse (type R). Les colonies muqueuses, larges et luisantes (type M) sont des *Klebsielles*. Les souches sauvages ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme (**Achkour, 2012**).

Leurs exigences nutritionnelles sont souvent réduites et la plupart de ces bactéries peuvent croître en milieu synthétique avec une source de carbone comme le glucose. Ce sont des germes mésophiles et neutrophile et ils sont très tolérants aux variations de la pression osmotique.

Ainsi on distingue 5 types de colonies :

- Colonies S : arrondies, lisses, humides, blanches ou translucides.
- Colonies R : sèches à contours irréguliers et mates.
- Colonies M : grosses colonies.
- Colonies envahissantes ou nappâtes : formation d'un tapis uniforme (*Proteus*)

- Colonies naines : Elles s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques.

c) Caractéristiques biochimiques

Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le mécanisme protéique (la présence d'uréase, la production d'indole, la dégradation du tryptophane) et la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose). Ce sont des germes qui réduisent en général les nitrates en diazote, ont la capacité d'utiliser le citrate ou de former des gaz, et assurent la production d'hydrogène sulfuré (**Avril et al., 2000**).

Les BGN sont des aéro-anaérobies, habituellement catalase (+), dépourvues d'oxydase (**Kassama et al., 2013**).

d) Caractéristiques antigéniques

Pour bien identifier les espèces nous faisons l'étude des caractères antigéniques. Toutes les entérobactéries et sans exception possèdent des antigènes de paroi (antigènes O), d'autres contiennent des antigènes de surface tel que les antigènes K et les entérobactéries mobiles contiennent en plus des antigènes flagellaires ou (antigènes H) (**Sougakoff et Trystram, 2003**).

Partie pratique

Matériel & Méthodes

Matériel et méthodes

1. Site de collecte des échantillons

Dans le but d'élaborer une étude de la diversité des Gram négatives dans les eaux souterraines de la région de l'Est de l'Algérie, 32 échantillons ont été recueillis sur la période de janvier à février 2021 dans la wilaya de Souk-Ahras (Figure 01 carte géographique).

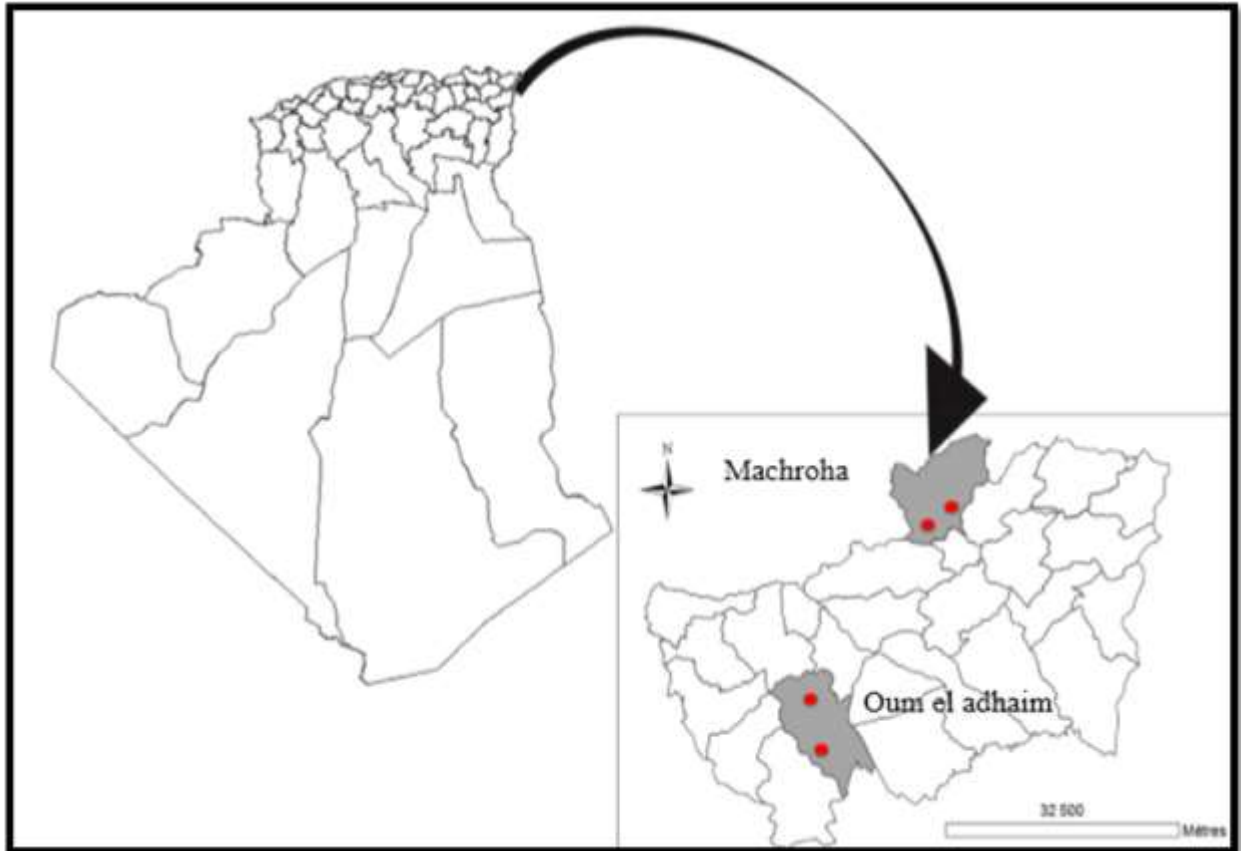


Figure 01 : Sites et points de prélèvement (Nord : Machroha et Sud : Oum el Adhaim)
Wilaya de Souk-Ahras.

Nous tenons à solliciter sur le fait que tous les échantillons d'eau ne sont pas exposés à des contaminations aux eaux usées ; spécialement aux eaux usées d'origine hospitalière. Ces régions sont des régions connus pour les différentes activités agricoles à savoir : élevage de bétails (Vaches, veaux, moutons et chèvres) (Tableau N°II).

Tableau N°II: Site de collecte des échantillons

Numéro	Code des échantillons	Zones d'échantillonnage	Activités	Nombres d'échantillons
01	S1	Zone Sud	activités agricoles et élevage de bétails	5
02	S2	Zone Sud	activités agricoles et élevage de bétails	3
03	S3	Zone Sud	activités agricoles et élevage de bétails	3
04	S4	Zone Sud	activités agricoles et élevage de bétails	3
05	M1	Zone Nord	activités agricoles et élevage de bétails	4
06	M2	Zone Nord	activités agricoles et élevage de bétails	3
07	M3	Zone Nord	Zone Forestière	6
08	M4	Zone Nord	Zone Forestière	3
09	M5	Zone Nord	Zone Forestière	2
Nombre total des échantillons				32

2. Recueil des échantillons

Les échantillons d'eau sont obtenus des puits et des forages dont la profondeur varie de 15 m à 100 m. Ces échantillons d'eau sont largement utilisés par la population autochtone soit dans pour leur propres utilisations quotidiennes ou bien par leurs animaux domestiques et d'élevage. Ces eaux sont également utilisées dans l'irrigation traditionnelle des terrains agricoles (Tableau N°III).

Tableau N°III: Origine et qualité de l'eau recueillie.

Numéro	Code des échantillons	Origine (Puit, forage)	Profondeur
01	S1	Forage	7 m
02	S2	Forage	5 m
03	S3	Forage	8 m
04	S4	Forage	7 m
05	M1	Forage	7 m
06	M2	Puit	10 m
07	M3	Puit	13 m
08	M4	Puit	5 m
09	M5	Puit	10 m

Une fois sur terrains les étudiants de Master et les doctorants accompagnés par notre co-encadreur Pr Soualah Allila de l'université de Souk-Ahras ont procédé à l'échantillonnage. Sous des conditions d'aseptise : 250 ml d'échantillons d'eau ont été recueillies dans cinq flacons stériles. Dans le cas des sources d'eau de forage, l'eau est récupérée directement des robinets. Cependant, dans le cas des puits les bouteilles ont été complètement immergées (**Djenadi, 2019**).

Pour maintenir la diversité bactérienne de l'eau et faire les analyses physico-chimiques et microbiologiques, les échantillons sont acheminés au laboratoire dans une glacière à une température de 4 et 6 °C.

3. Analyses physico-chimiques de l'eau

Les analyses physico-chimiques de l'eau doivent s'effectuer avant 24 heures après le prélèvement.

4. Evaluation de la diversité bactérienne dans l'eau

4.1. Filtration de l'eau

Au niveau de l'Institut des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, de l'Université de Souk-Ahras, des étudiants en Master et des doctorants accompagnés par notre co-encadreur Pr Soualah-Alila, ont procédé à la filtration des échantillons d'eau à l'aide d'une membrane filtrante (0.22 µm). Au terme de la filtration les membranes, en trois séries sont acheminées au laboratoire

de l'ADE de Souk-Ahras pour élaborer des analyses physico-chimiques et le laboratoire de l'ADE de Bouira ainsi que le laboratoire pédagogique de la faculté FSNV de Bouira pour effectuer les études microbiologiques.

4.2. Dénombrement de la flore bactérienne sur PCA

Une fois au laboratoire de l'ADE de Bouira, une série de membranes filtrantes sont déposées sur des boîtes de Pétrie (90 mm) contenant de la gélose de Plate Count Agar (PCA). Au terme d'une nuit de l'incubation à 37 °C, nous avons effectué un dénombrement des UFC présentes sur la membrane et une notification de l'aspect des colonies (**Guiraud, 2012**).

5. Isolement et purification des isolats de l'eau

Dans le but de performer l'identification des isolats à Gram négatives spécialement les *Enterobacteriaceae* des échantillons d'eau, les cellules piégées sur la membrane de la seconde série sont remis en suspension dans 10 ml du bouillon cœur cerveau. Un millilitre de la suspension bactérienne est inoculé dans un millilitre du bouillon Lauria Bertani (LB) puis incubé à 37 °C pendant 24 heures. Le lendemain, 500 µl de la suspension bactérienne est inoculé sur différents milieu de culture ENDO, Tryptone Glucose Yeast Extract (TGEA).

Après 24 heures d'incubation à 37 °C les isolats obtenus sont purifiés tout en se basant sur la coloration de Gram et l'aspect des colonies sur les milieux. Au terme de la conservation, les isolats purifiés sont conservés dans du glycérol à -20 °C pour d'éventuel identification.

6. Caractérisation phénotypique des isolats bactériens

Les isolats bactériens sont identifiés suivant les critères morphologiques de la colonie, la morphologie cellulaire et le test biochimique standard. La méthode de coloration de Gram nous confirme leur affiliation au gram négatifs suivant leur sensibilité au solvant et l'absorption des colorants. Et la macro galerie biochimique va nous permettre de voir le comportement de ces isolats vis-à-vis d'une source de carbone ou d'azote et aussi définir le type respiratoire ainsi que le métabolisme emprunté par nos isolats. Pour élaborer l'ensemble de ces tests, des cultures jeunes sont préparées soit sur des boîtes ou dans des tubes.

6.1. Essais morphologiques

6.1.1. Essais macro-morphologiques

Lors de cette partie, nous avons visualisé les colonies sur les milieux ENDO et TGEA. Sous une loupe binoculaire nous avons mentionné l'aspect, couleur, forme, élévation et le contour des colonies.

6.1.2. Essais micro-morphologiques

A. Etat frais

Cet examen se pratique sur des cultures en milieu liquide. À l'aide d'une anse de platine on prélève une goutte de notre suspension bactérienne que l'on dépose sur une lame propre et sèche. Par la suite on dépose délicatement une lamelle en partant d'une position inclinée à 45°.

La mise au point se fait en faible luminosité, à l'objectif x40. Il faut attendre 1 minute pour ne pas confondre une mobilité positive et un simple mouvement du liquide ; ceci était le but de notre observation (Aygan *et al.*, 2007).

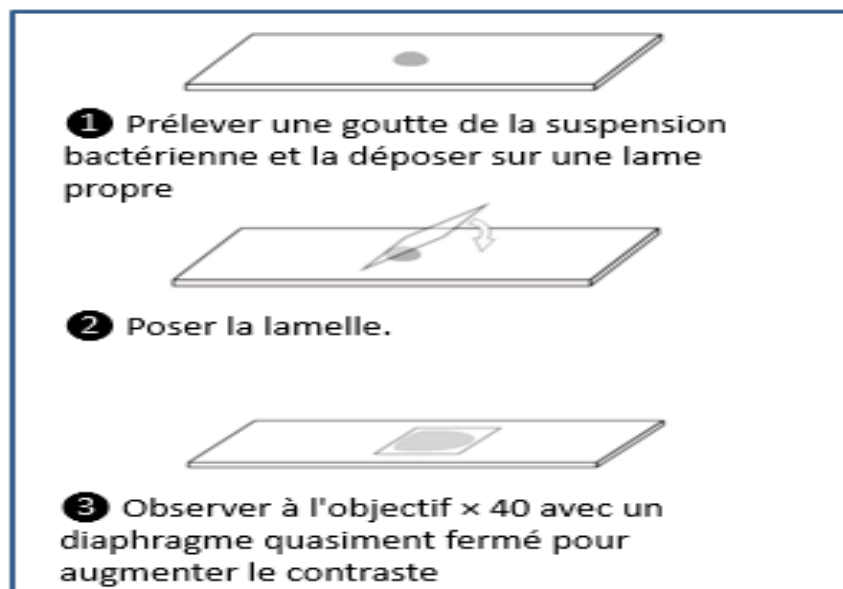


Figure 2: Les étapes d'une observation à l'Etat frais (Aygan *et al.*, 2007).

B. Coloration de gram

- **Réalisation du frottis**

Après avoir nettoyé les lames et à l'aide d'une anse de platine, on remet en suspension une colonie d'isolat dans une goutte d'eau physiologique. Par la suite on fait sécher au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, on parlera ainsi d'une fixation des échantillons à la chaleur (Brucker, 1986).

- **Coloration**

Sur la lame d'un frottis fixé, déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane, laisser agir 1 minute, rincer convenablement en faisant couler de l'eau sur la lame au-dessus du

frottis. Puis déposer quelques gouttes de Lugol et laisser agir 45 seconds avant de procéder au rinçage à l'eau. Décolorer avec de l'alcool à 90% en faisant couler cette solution sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (10 à 15 secondes) puis rincer à l'eau comme précédemment décrit. Contre-colorer en déposant de la fuchsine pendant 1 minute puis rincer et laisser sécher à l'air. Observer au microscope grossissement x100 en déposant une goutte d'huile à immersion sur la lame (**Brucker, 1986**).

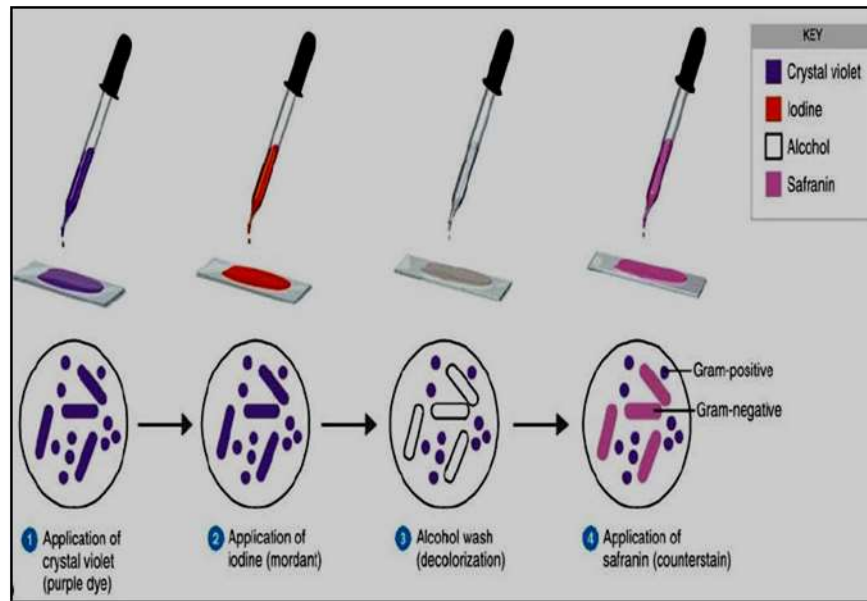


Figure 3: Les étapes de la coloration de Gram (**Denis et al., 2007**).

Essai de catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) et dissocier 1 à 2 colonies bactériennes à l'aide de l'anse. Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles, dans le cas contraire on ne va pas voir d'effervescence (**Reiner, 2010**).



6.2. Caractérisation biochimiques (macro-galerie)

Dans ces essais les milieux sont utilisés pour pouvoir définir le métabolisme et le comportement de nos isolats.

A. Milieu Clark & Lubs

Ce milieu permet d'étudier une voie de fermentation du glucose (la voie du butane diol) L'étude de cette voie permet de différencier les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*

(bacilles Gram -, oxydase -). Pour Pour cela nous avons mis 2-3 gouttes de suspension bactérienne sur notre milieu liquide, puis incubation 24 heures à 37 °C, bouchon dévissé.



B. Milieu Hugh & Leifson (MEVAG sans sucre)

Ce milieu permet la mise en évidence de la voie d'attaque des glucides. Dans notre milieu on fait additionner stérilement le glucose pour une concentration finale de 1 % avec l'ajout d'une goutte de suspension bactérienne puis ensemencement par une piqûre centrale à l'aide du fil droit et incubation 24 h à 37 °C (**Hamill, 2008**).

C. Milieu de Hugh & Leifson

Ce milieu permet de déterminer la voie d'attaque du glucose utilisé comme source d'énergie par la plupart des bactéries soit par :

Voie oxydative : Dans notre milieu on fait additionner stérilement une concentration de 10 % de glucose avec l'ajout de 2 gouttes de suspension bactériennes puis ensemencement par une piqûre centrale à l'aide du fil droit et incubation 24 h à 37 °C, bouchon dévissé. C'est uniquement en présence de dioxygène que la bactérie utilise le glucose.

Voie fermentative : ce sont les même étapes que la voie oxydative mais dans ce cas on ajoute jusqu'à 1 cm de paraffine dans le but de créer l'anaérobiose. Le glucose est utilisé en absence de dioxygène.

D. Milieu de l'urée indole

Ce milieu permet de mettre en évidence la présence d'une uréase et la présence d'une tryptophanase, il est essentiellement utilisé pour l'identification des entérobactéries (bacilles gram-, oxydase -). Pour cela on met quelques gouttes de suspension bactérienne avec une pipette Pasteur sur un milieu liquide puis incubation 24 heures à 37 °C (**Nayak, 2020**).



E. Croissance sur le milieu mannitol mobilité

Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche. Le milieu est ensemencé par une piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur fermée puis incubé 24 heures à 37 °C (**Abe et al., 2018**).

F. Milieu Triple Sugar Iron

Le milieu Triple Sugar Iron Agar ou (TSI) contient trois glucides : le glucose (0,1%), le saccharose (1%) et le lactose (1%) + (l'extrait de bœuf, levure, et des peptones...) + le rouge de phénol comme indicateur de pH. Pendant la préparation, on met 63,5 g de la poudre TSI dans 1 litre d'eau distillé, chauffer et agiter puis autoclaver. Le mélange est versé dans des tubes à essais inclinés. Cette inclinaison permet d'avoir un métabolisme aérobie dans la pente et anaérobie dans le culot. Puis incubation 24 h à 37 °C (**Denis et al., 2007**).

(**Hamill, 2008**).

G. Milieu kligler hajna

Ce milieu d'identification permet de mettre en évidence la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz, la dégradation du lactose et la production de H₂S.

Préparation de milieu : mettre dans un erlenmeyer 53,5 g de la poudre kligler et 1 litre d'eau distillée, chauffage et agitation du milieu puis autoclavage 20 minutes à 120 °C. Verser le contenu dans des tubes à essais inclinés dans le but d'avoir une pente et un culot.

A partir d'une suspension bactérienne,ensemencer à l'aide d'une pipette Pasteur fermée la pente par des stries serrées et le culot par une piqûre centrale puis incubé 24 heures à 37 °C, bouchon bien fermé (**Silue, 2005**).

H. Milieu Auxanogramme

Ce milieu sert à déterminer la capacité de la bactérie à dégrader un sucre donné mis dans un milieu de base, la capacité de produire l'acide mais aussi destiné à étudier des glucides avec une concentration finale de 1 % (glucose, lactose, saccharose, xylose, arabinose, maltose, galactose, fructose).

Préparation du milieu : on met 15 g de Peptone et 5 g de Na Cl, avec l'ajout de 5ml de rouge de phénol comme un indicateur de pH, chauffer et agiter puis autoclaver 20 minutes à 120 °C.

Dans des tubes à essais on met 2 ml du milieu auxanogramme et de 250 µl de maltose dans chaque tube avec l'addition de quelques gouttes de notre suspension bactérienne, puis incubation 24 h à 37 °C. Les mêmes étapes sont suivies pour le galactose et le xylose (**Denis et al., 2007**).

Résultats & Discussion

Résultats et discussion

1. Les résultats

1.1. Composition minérale et caractéristiques physico-chimiques

L'analyse physico-chimique des 32 échantillons de l'eau nous ont permis de nous renseigner sur le pH et la salinité de ces eaux. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (Tableau N°IV) ci-dessous.

Tableau N°IV: Résultats de la composition chimique et la caractérisation physico-chimique des échantillons d'eau.

Numéro	Code des échantillons	Zones d'échantillonnage	pH	Salinité (mg/ml)
01	S1	activités agricoles et élevage de bétails	6,97	80
02	S2	activités agricoles et élevage de bétails	6,96	83
03	S3	activités agricoles et élevage de bétails	7,35	67,2
04	S4	activités agricoles et élevage de bétails	7,72	68,3
05	M1	activités agricoles et élevage de bétails	7,05	65,2
06	M2	activités agricoles et élevage de bétails	6,99	71
07	M3	Zone Forestière	7,47	85
08	M4	Zone Forestière	7,22	82
09	M5	Zone Forestière	7,44	75,6

D'après les résultats obtenus par l'ADE de Souk-Ahras, nous avons constaté que les échantillons recueillis ont un pH optimum pour la croissance des bactéries neutrophiles. De plus, les résultats de la salinité montrent que notre niche écologique ne peut pas être un écosystème favorable pour les halophiles. Un écosystème favorable pour les halophiles est caractérisé par une salinité allant de 3 à 4 M (**Jiang et al., 2006**). L'ensemble de ces informations nous oriente vers une possibilité d'avoir une diversité bactérienne modérée des bactéries gram négatif.

1.2. Diversité bactérienne dans les échantillons d'eau

Sur les 32 échantillons d'eau filtrés, uniquement 23 échantillons ont présentés une croissance bactérienne sur les membranes. L'aspect des colonies varie de transparentes, blanches et jaunes. Leur regroupement diffère, certaines sont bien distinctes tandis que d'autres sont en amas (Tableau N°V).

Tableau N°V: Résultats de dénombrement sur milieu PCA

Echantillons	Nombre de colonies	Aspect
A ₂	Absence	Aucun
B ₂	12 colonies	Blanches
C ₂	2 colonies	Jaunes
D ₂	2 colonies	Blanches
E ₂	Absence	Aucun
F ₂	12 colonies	Blanches
G ₂	1 colonie	Transparente
H ₂	8 colonies	Jaunes
I ₂	6 colonies	Jaunes
J ₂	2 colonies	Transparentes
K ₂	3 colonies /5 colonies	Jaunes / transparentes
L ₂	6 colonies	Jaunes
M ₂	6 colonies	Transparentes
N ₂	5 colonies	Jaunes
O ₂	4 colonies	Transparentes
P ₂	7 colonies	Jaunes
Q ₂	4 colonies	Transparentes
R ₂	2 colonies	Jaunes
S ₂	Absence	Aucun
T ₂	8 colonies	Jaunes
U ₂	2 colonies	Transparentes
V ₂	2 colonies	Transparentes
W ₂	Amas	Transparent
X ₂	6 colonies	Transparentes
Y ₂	2 colonies	Jaunes
Z ₂	1 colonie	Transparentes

D'après les résultats obtenus sur les boîtes de PCA, on a constaté que le nombre des colonies est moins de 20 UFC par 1 litres d'échantillon. Ces résultats nous révèlent que la diversité est très modérée dans les eaux de forages.

1.3. Les isolats bactériens dans les échantillons d'eau

Au terme de notre isolement des bactéries gram négatifs, nous avons obtenus 45 isolats sur les 32 échantillons d'eau recueillis. La croissance des cellules est visualisée uniquement sur le milieu TGEA. L'aspect des colonies exprime une grande diversité, à savoir des colonies: blanches, jaunes, crèmes et transparentes. Dont certaines sont convexes d'autres sont bombées ou plates. Soit à forme régulière ou non régulière (Tableau N°VI). Tandis que sur le milieu ENDO nous visualisons une absence totale de croissance sur tous nos isolats.

Tableau N°VI: Résultats des ensemencements par stries sur milieu TGEA

Codes	Nombre de colonies	Couleur	Forme de la colonie	Elévation des colonies	Forme du contour
A₁	Indénombrable 1 colonie	Blanches Crème	Circulaire Circulaire	Convexe Convexe	Régulier
B₁	Indénombrable	Beige	Circulaire	Convexe	Régulier
C₁	1 20 colonies 2 Indénombrable	Blanches Crèmes	Circulaire Circulaire	Convexe convexe	Régulier
D₁	Indénombrable	Blanches	Punctiforme	Plate	Régulier
E₁	1 3 colonies 2 1 colonie 3 20 colonies	Crèmes	Fusifforme Circulaire Circulaire	Plate Convexe Convexe	Régulier
F₁	1 colonie 12 colonies	Jaune Blanches	Circulaire Circulaire	Bombée Convexe	Régulier
G₁	1 2	Blanches Crèmes Transparent e Blanches	Circulaire Circulaire Plane Circulaire	Convexe	Régulier

H₁	1	1 colonie	Beige	Circulaire	Plate (fond vide)	Régulier
	2	4 colonies	Blanches	Circulaire		
I₁	1	1 colonie	Jaune	Circulaire	Convexe	Régulier
	2	Indénombrable	Transparentes			
J₁	1	8 colonies	Blanches	Circulaire	Plate	Régulier
	2	4 colonies		Rhizoïde	Bossue	Filamenteuse
K₁		2 colonies	Blanches	Circulaire	Bombée	Régulier
L₁		11 colonies	Transparentes	Circulaire	Convexe	Régulier
M₁		Indénombrable	Beige	Circulaire	Convexe	Régulier
N₁		38 colonies	Blanches	Circulaire	Plate	Régulier
O₁	1	Indénombrable	Blanches	Circulaire	Convexe	Régulier
	2	Indénombrable	Blanches	Circulaire irrégulière	Convexe	Régulier Dentelé
P₁		1 colonie	Blanche	Irrégulière		Ondulé
Q₁	1	93 colonies	Blanches	Punctiforme	Convexe	Régulier
	2	15 colonies		Circulaires		
		1 colonie grosse		Circulaire		
R₁		1 colonie	Blanche	Punctiforme		Régulier
S₁	1	7 colonies	Crèmes	Circulaire	Convexe	Régulier
	2	14 colonies	Crèmes	Irrégulière	Convexe	Dentelé
			Oranges	Circulaire		
T₁	1	34 colonies	Blanches	Rhizoïde	Bossue	Filamenteuse
	2	19 colonies		Circulaire	Convexe	Régulier
		3 colonies		Rhizoïde	Bossue	Filamenteuse
U₁		30 colonies	Blanches	Punctiforme	Convexe	Régulier
V₁		1 colonie	Crème	Punctiforme	Convexe	Régulier

W₁	7 colonies	Blanches	Rhizoïde	Bossue	Filamenteuse
X₁	4 colonies	Blanches	Circulaire	Convexe	Régulier
Y₁	3 colonies	Blanches	Circulaire	Convexe	Régulier
Z₁	1 5 colonies	Blanches	Circulaire	Elevée	Régulier
	2 Indénombrable	Jaunes	Circulaire Irrégulière	Elevée Plane	Régulier Contour orange
AB₁	6 colonies	Blanches	Circulaire	Convexe	Régulier
	1 colonie	jaune	Circulaire	Convexe	Régulier
TH₁	1 8 colonies	Blanches	Circulaire	Convexe	Régulier
	2 1 colonie	Jaune	Circulaire	Convexe	Régulier
Zi₁	1 colonie	Blanche	Circulaire	Convexe	Régulier
DL₂	1 colonie	Blanche	Circulaire	Convexe	Régulier
NR₂	6 colonies	Blanches	Rhizoïde	Bossue	Filamenteuse
	35 colonies		Punctiforme	Convexe	Régulier
SYM₂	Indénombrable	Blanches	Circulaire Irrégulière	Convexe	Régulier Dentelé

Cette diversité peut être expliquée par le fait que le milieu TGEA est un milieu sélectif pour la flore mésophile. Ce qui nous a incités à faire une sélection des bactéries gram négatifs à travers une coloration de Gram.

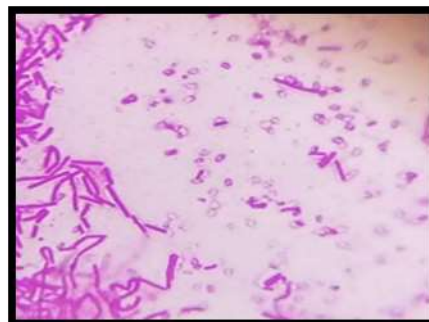
Après avoir élaboré la coloration de Gram sur les 45 isolats, uniquement 15 isolats sont définis comme des bactéries à Gram négatives. Sous microscope optique ces 15 isolats ont exprimé une diversité importante. Certains ont une forme de bacilles et d'autres une forme de cocci, regroupés soit en amas ou bien isolés. Ces derniers peuvent aussi être mobiles ou immobiles tels que les résultats sont présentés dans le tableau N°VII et les figures n°04 et 05.

Tableau N°VII: Résultats de l'observation microscopique des isolats à Gram négatifs

CODES	Coloration de gram		Etat frais
	Forme des cellules	Regroupement	Mobilité
A₁	Bacille	Isolé	+
E₁	Cocci	Amas	+
F₁₋₁	Cocci	Amas	-
F₁₋₂	Cocci	Isolé	-
N₁₋₁	Cocci	Chainette	-
N₁₋₂	Bacille	Isolé	+
P₁	Bacille	Chainette	+
Q₁₋₁	Cocci	Amas	-
T₁₋₁	Bacille	Paire	-
T₁₋₂	Cocci	Amas	-
X₁	Cocci	Amas	-
Z₁	Cocci	Chainette	-
Z₁₋₁	Cocci	Amas	-
Z₁₋₂	Cocci	Amas	-
TH₁	Cocci	Amas	-



a) Cocci à Gram négatif



b) Bacille à Gram négatif

Figure 04: Résultats de la coloration de Gram



a) Cocci à Gram négatif



b) Bacille à Gram négatif

Figure 05: Résultats de l'état frais

1.4. La diversité des Gram négatifs dans les eaux de forage

Les 15 isolats à Gram négatives ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique. Après avoir effectué des ensemencements sur différentes source de nutriments à savoir carbone et azote, nous avons constaté qu'il y a une diversité bactérienne dans nos échantillons d'eau douce. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessus (Tableau N°VIII).

Tableau N°VIII: Résultats de la caractérisation phénotypiques des isolats à Gram négatifs

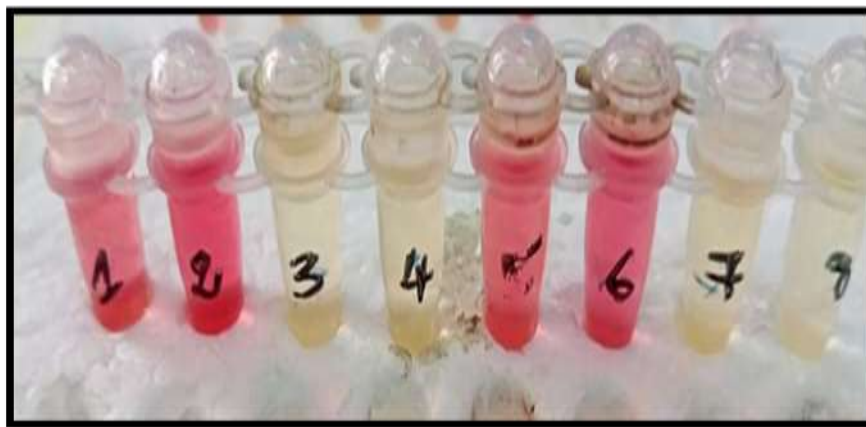
Codes	Cat	Clark & Lubs	Mevag sans sucre	Urée Indole		Mannitol mobilité	Kligler hajna				TSI		Hugh & Leifson		Auxanogramme		
		VP		UR	IN		Mannitol	GLU	LAC	Gaz	H ₂ S	Gaz	H ₂ S	paraffine paraffine	Sans paraffine	Avec paraffine	MAL (1%)
A ₁	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
E ₁	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
F ₁₋₁	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
F ₁₋₂	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
N ₁₋₁	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
N ₁₋₂	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
P ₁	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
Q ₁₋₁	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
T ₁₋₁	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
T ₁₋₂	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
X ₁	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	++	+

Z₁	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
Z₁₋₁	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
Z₁₋₂	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+
TH₁	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	++	++	+

+: positif, -: négatif, Cat: catalase, UR: urease, IN: indole, GLU: glucose, LAC: lactose, MAL: maltose, GAL: galactose, XYL: xylose.

Le test de catalase est principalement utile pour différencier entre les genres appartenant à la même famille ainsi que des espèces appartenant au même genre (Denis et al., 2007). Nous avons constaté que neuf (09) isolats parmi quinze (15) sont revenus positifs (Tableau N° VIII). Cela veut dire que neuf (09) isolats ont la capacité de produire une enzyme qui neutralise les effets bactéricides du H₂O₂. La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène conduisant ainsi à la formation de bulles (Denis et al., 2007). Tandis que pour les six (06) autres isolats représentent des résultats négatifs, ce qui veut dire qu'il n'existe aucune enzyme catalase pour hydrolyser le peroxyde d'hydrogène ce qui se traduit par l'absence la formation de bulles.

Au terme de l'incubation des tubes de Clark et Lubs, nous avons ajouté le VP1 et VP2. Après quelques secondes nous visualisons des résultats positifs et des résultats négatifs (Figure n°06 et tableau N°VIII). Parmi nos quinze (15) isolats à Gram négatifs, seulement six (06) isolats sont considérés positifs. Ce résultat positif est visualisé par un virage de la couleur du jaune vers le rouge. Tandis que les neufs (09) autres isolats sont restés inchangés ce qui veut dire qu'ils sont considérés comme ayant des résultats négatifs.



a) aspect du test positif (rouge)

b) Aspect du test négatif (jaune)

Figure 06: Aspect des isolats sur le milieu milieu Clark & Lubs.

La réaction de Voges-Proskauer (VP) permet de mettre en évidence la production d'acétone ou (acétyl méthyl cabriole). L'acétone se transforme en butadiène qui réagit avec l' α -naphtol et donne une coloration rouge (Denis et al., 2007).

D'autre part, nous avons utilisé le milieu de MEVAG additionnée avec 1% de glucose. Ce milieu nous a permis de révéler la voie d'attaque du glucose et aussi la détermination du

métabolisme oxydatif ou fermentatif de la bactérie, autrement dit : la bactérie dégrade-t-elle le glucose via le cycle de Krebs ou utilise-t-elle une autre voie. D'après nos résultats uniquement treize isolats à Gram négatifs qui suivent le cycle de Krebs comme voie de dégradation de glucose sans production de gaz (Figure n°07 et tableau N°VIII). Ce qui nous révèle que parmi nos isolats de bactéries Gram négatifs, nous n'avons pas eu de coliformes.



a) Aspect du test positif



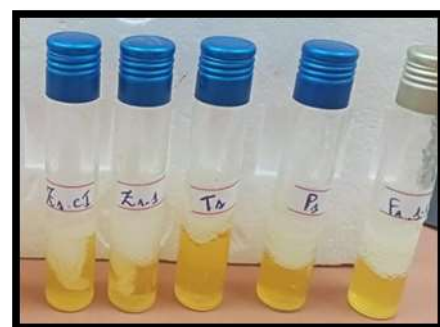
b) Aspect du test négatif

Figure 07: Aspect des isolats sur le milieu Hugh et Leifson (MEVAG sans sucre)

Nous avons également ensemencé nos isolats dans le milieu Hugh et Leifson auquel on ajoute du glucose (10%). Les isolats contenant de la paraffine et les isolats sans paraffine ont subi un virage de couleur vers le jaune (acidification des tubes) ce qui indique que nos isolats sont des métabolismes fermentatifs et oxydatifs (Figure n°08). Les tubes entièrement en jaunes indiquent qu'il y a eu virage de l'indicateur coloré à cause de la production d'acide dans tout le tube : les bactéries ont utilisé le glucose en présence et en absence d'oxygène.



a) tubes sans la paraffine



b) tubes avec la paraffine

Figure 08: Aspect des isolats sur le milieu Hugh et Leifson.

Nous avons poursuivi la caractérisation du métabolisme fermentaire de nos isolats mais cette fois-ci, nous avons utilisé le milieu mannitol mobilité. Ce milieu nous permet d'évaluer aussi bien la fermentation de mannitol que la mobilité bactérienne.

Le virage de couleur au jaune indique la fermentation du mannitol et cela par acidification du milieu, ceci a été retrouvé chez sept (07) isolats (N₁-1, N₁-2, P₁, X₁, Z₁-2, TH₁, E₁) cela veut dire que nos isolats fermentent le mannitol. Cependant, la couleur reste inchangée chez deux (02) isolats (F₁-2, T₁-2) cela veut dire qu'ils ne fermentent pas le mannitol (Figure n°09).

Mais avec six (06) isolats (A₁, F₁, Q₁-1, T₁-1, Z₁, Z₁-1) on a visualisé dans le tube deux couches, un fond rose et une surface jaune, cela nous laisser supposer qu'il y a une dégradation partielle du mannitol dans le milieu et ces six isolats sont des aérobies strictes (Figure n°09).

En ce qui concerne la mobilité de nos isolats, nous n'avons remarqué aucune diffusion des bactéries, donc la totalité de nos isolats sont immobiles.



a) Mannitol positif



b) Mannitol négatif

Figure 09: Aspect des isolats sur le milieu mannitol mobilité.

La gélose triple sugar iron (TSI) est utilisée pour une identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation des sucres, Après une incubation de 24heures nous avons distingué un virage de la couleur vers le jaune chez tous nos isolats (15 isolats). Ce changement de couleur indique que nos isolats fermentent le glucose, saccharose et /ou lactose (Figure n°10).



Figure 10: Aspect des isolats sur le milieu Triple sugar iron

Les résultats révèlent que nos isolats ne réduisent pas le soufre (H_2S négatif) et ils ne produisent pas de gaz, ce qui indique que nos isolats ne libèrent pas du dioxyde de carbone (CO_2) lors de la fermentation du glucose, donc parmi nos isolats nous n'avons pas de coliformes. Un résultat qui est logique, du moment que nos échantillons sont issus des zones qui ne sont pas contaminées avec des eaux usées ou autre contamination d'origine fécale.

D'autre part, le milieu Kligler Hajna nous a permis d'avoir des informations qui vont consolider nos informations sur le métabolisme du glucose, lactose ainsi que la production des gaz et la réduction de H_2S de nos isolats à Gram négatifs (Figure n°11).



a) Glucose (+), lactose (+)



b) Glucose (-), lactose (+)

Figure 11: Aspect des Isolats sur le milieu Kligler Hajna

On a également pu élargir notre étude sur le métabolisme des sucres à travers l'auxanogramme. En comparant avec le témoin négatif, les résultats obtenus nous ont permis de révéler que tous nos isolats expriment une croissance en présence de xylose, maltose et galactose (1%) comme seule source de carbone. A l'exception de X1 qui ne se développe pas en présence de maltose (Tableau N°VIII).

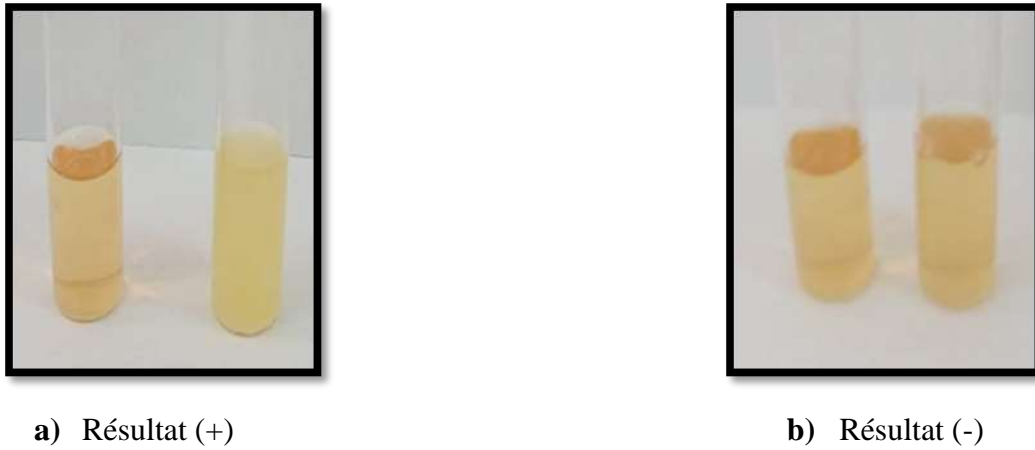


Figure 12: Aspect des Isolats sur le milieu auxanogramme

Sur un autre volet le milieu urée indole nous a permis de voir si nos isolats bactériens consomment de l'urée et s'ils produisent de l'indole. Après une incubation de 24 heures nous n'avons remarqué aucun changement ni virage de couleur dans les quinze isolats à Gram négatives. La couleur inchangée s'explique par l'absence des bases responsables du changement de la couleur de l'indicateur de pH. Ce qui veut dire que nos isolats ne consomment pas l'urée et sont donc considérés comme des uréases négatives.

Après l'ajout de quelques gouttes du réactif de KOVACS nous observons immédiatement la formation d'un anneau de couleur rouge à la surface de nos quinze tubes. La formation de l'anneau s'explique par une réaction d'hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase et la formation de l'indole.

D'après l'ensemble des résultats préliminaires de la caractérisation phénotypique de l'ensemble de nos isolats nous avons pu les affilier à des genres bactériens de la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Les isolats A₁, E₁, N₁₋₁, N₁₋₂, T₁₋₂, Z₁₋₂ et Z₁₋₁ peuvent être affiliés soit aux *Hafnia* ou bien à *Serratia*, car ces bactéries sont VP + et urée -. Mais suivant le métabolisme du glucose, du lactose et de l'indole + nous avons déduit que les isolats peuvent être affiliés au genre *Hafnia*.

Les isolats X₁ et Z₁ expriment les résultats suivant : glucose + ; lactose- ; gaz - ; H₂S - ; indole + ; urée -, donc ils peuvent être affilié au genre *Shigella*.

Enfin, les isolats F₁₋₁, F₁₋₂, P₁, Q₁₋₁, T₁₋₁ et Z₁₋₁ expriment des résultats négatifs pour le VP et l'urée, donc on peut les attribuer soit au genre *Citrobacter* ou bien au genre *Salmonella*. Mais suivant le métabolisme des sucres à savoir le glucose et le lactose qui sont fermentés nous dirons que ces isolats sont des *Citrobacter*.

2. Discussion

L'étude de la diversité bactérienne dans l'environnement aquatique est investie par un grand nombre de scientifiques à travers le monde (Goñi-Urriza et al., 2000, Kümmerer, 2004, Aubron et al., 2005) et aussi en Algérie (Tafoukt et al., 2017, Djenadi et al., 2018, Adjeroud et al., 2020).

C'est ce qui nous a incité à travailler sur des échantillons d'eau de forage de région Est de l'Algérie, plus précisément de la wilaya de Souk-Ahras côté Nord et Sud. A partir de 32 échantillons, nous avons eu 45 isolats, dont uniquement 15 caractérisés comme des Gram négatives. Après avoir réalisé une cascade de tests biochimiques, nous avons pu avoir un ensemble de caractères phénotypiques qui nous ont permis d'affilier nos isolats au genre d'*Enterobacter*, *Citrobacter* et *Shigella*. Nos résultats corroborent avec les investigations élaborées par l'ensemble des scientifiques à travers le monde, soit sur des échantillons des eaux de surfaces ou de profondeurs.

Une identification du gène de l'ARNr 16S extrait des isolats d'eau de source en Inde, ont montré de différentes prévalence de d'*Escherichia coli* (37.50%), *Escherichia fergusonii* (29.41%), *Klebsiella oxytoca* (36.93%), *Citrobacter freundii* (37.92%), *Citrobacter amalonaticus* (43.82%), *Enterobacter sp.* (43.82%), *Morganella morganii* (43.82%), *Hafnia alvei* (32.42%), *Hafnia paralvei* (38.74%), et *Shigella flexneri* (30.47%) (Singh et al., 2020).

Une étude similaires sur des échantillons d'eau de source naturel, ont révélé une diversité importante des bacétries à Gram négatives à savoir: *Klebsiella spp.* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* et d'autres *Klebsiella spp.*) avec une proportion plus importante de bactéries pathogènes pour l'homme telles que: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, et *Yersinia* (Mukherjee et al., 2016).

A partir de différents échantillons d'eau recueillis des régions côtières contaminées avec des eaux d'irrigation, Kümmerer et ces collaborateurs, ont identifié des *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et des *Enterobacter* (Kümmerer et al., 2004). Des espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* and du genre *Aeromonas* sont isolées des eaux de rivière (Goñi-Urriza et al., 2000, Aubron et al., 2005).

En Algérie, Tafoukt et ces collaborateurs, ont isolés des *Enterobacteriaceae* dans des eaux d'oued El Soummam (Tafoukt et al., 2017). A partir de différents point d'eau, Djenadi et ces collaborateurs ont réussi à identifier des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* et *Aeromonadaceae*. Des eaux de sources et de forage, ils ont identifié des espèces qui peuvent être un danger de santé publique tel que : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* (Djenadi et al., 2018). Les résultats obtenus par

ces scientifiques révèlent une diversité importante des bactéries dans ces environnements inorganiques, à faible quantité en matières organiques. Cette diversité varie de manière proportionnelle avec les conditions physico-chimiques de l'eau. Ces eaux peuvent regorger d'espèces pathogènes ou bien d'espèces exprimant des résistances à une large gamme d'antibiotiques qui peuvent être des agents de transmission de la résistance vers l'humain ou bien dans notre écosystème (**Tafoukt et al., 2017, Djenadi et al., 2018**). C'est pour cela on doit leur accorder une importance et une étude approfondie sur leur diversité.

Conclusion

Conclusion

La recherche sur la biodiversité est actuellement une thématique porteuse et dynamique. La description de la diversité s'est particulièrement intensifiée en écologie microbienne grâce aux développements méthodologiques récents. Cependant l'étude de la biodiversité microbienne reste très descriptive, sans cadre théorique développé.

Notre activité de recherche en écologie microbienne s'est déroulée dans ce contexte en partant d'études descriptives pour tendre vers des études plus expérimentales s'appuyant sur les théories écologiques.

En effet, les théories et connaissances actuelles en écologie peuvent déjà servir de base pour tenter de développer des outils pour la gestion et la protection des écosystèmes. Les résultats de notre étude ont montré la présence de quelques souches pathogènes qui appartiennent au genre *Shigella*, *Hafnia* et *Citrobacter* dans les échantillons d'eau analysés. Ces eaux peuvent regorger des espèces exprimant des résistances aux antibiotiques qui peuvent être des agents de transmission de la résistance vers l'homme ou bien de nos écosystèmes. C'est pour cela que nous devons leur accorder une importance et une étude approfondie sur leurs diversité.

Références Bibliographiques

A

- Ababsa, A., Belloula, B., & Khennouchi, N. C. E. H. (2020).** Evaluation de l'antibiorésistance des entérobactéries en milieu hospitalier.
- Abe, A. M. K., Assanvo, J. B., Sanogo, M., & Koffi, K. M. (2018).** Caractérisation phénotypique de 52 souches des Bacillus isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(5), 2284-2293.
- Achkour, Z. (2012).** *Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif* (Doctoral dissertation).
- Adjeroud, M., Escuder-Rodríguez, J. J., González-Siso, M. I., & Kecha, M. (2020).** Metagenomic Investigation of Bacterial and Archaeal Diversity of Hammam Essalihine Hot Spring from Khenchela, Algeria. *Geomicrobiology Journal*, 37(9), 804-817.
- Aubron, C., Poirel, L., Ash, R. J., & Nordmann, P. (2005).** Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, US rivers. *Emerging infectious diseases*, 11(2), 260.
- Apfelbaum, M., & Romon, M. (2009).** *Diététique et nutrition*. Elsevier Health Sciences.
- Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (2000). *Bactériologie clinique*. Ellipses Edition Marketing SA.
- Aygan, A., & Arikani, B. (2007).** An overview on bacterial motility detection. *Int J Agr Biol*, 9, 193-196.

B

- Belessiotis, V., Kalogirou, S., & Delyannis, E. (2016).** *Thermal solar desalination: Methods and systems*. Elsevier.
- Bengherbia, A., Hamaidi, F., Zahraoui, R., Hamaidi, M. S., & Megateli, S. (2014).** Impact des rejets des eaux usées sur la qualité physico-chimique et bactériologique de l'Oued Beni Aza (Blida, Algérie). *Lebanese science journal*, 15(2), 39-51.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F. O., Ros, A., Lucht, F., & Pozzetto, B. (2005).** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*, 53(6), 341-348.
- Brucker, M. C. (1986).** Gram staining: A useful laboratory technique. *Journal of Nurse-Midwifery*, 31(3), 156-158.

C

- Chaussé, K., Phaneuf, D., Levallois, P. (2003).** Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine.
- Carip, C. (2008).** *Microbiologie, hygiène: bases microbiologiques de la diététique*. Tec & Doc.

Cohan, F. M. (2002). What are bacterial species?. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 457-487.

Copin-Montegut, G. (2002). *Propriétés physiques de l'eau de mer*. Ed. Techniques Ingénieur.

D

Djenadi, K., Zhang, L., Murray, A. K., & Gaze, W. H. (2018). Carbapenem resistance in bacteria isolated from soil and water environments in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 15, 262-267.

Djenadi, K. (2019). *Isolement, identification et caractérisation des symbiotes de *Genista numidica** (Doctoral dissertation, Université de Béjaïa-Abderrahmane Mira).

E

Elskens, M. (2010). Analyse des eaux résiduaires-Mesure de la pollution.

F

Festy, B., Hartemann, P., Ledrans, M., Levallois, P., Payment, P., & Tricard, D. (2003). Qualité de l'eau. *Environnement et santé publique-Fondements et pratiques*, 333-368.

G

Gaston, K. J., & Biodiversity, A. (1996). A biology of numbers and difference. *London, UK, 1*, 1-5.

Goñi-Urriza, M., Capdepuuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., & Quentin, C. (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Applied and environmental Microbiology*, 66(1), 125-132.

Guiraud, J.P. (2012). *Microbiologie alimentaire*. Dunod.

Guillou, L., Moon-Van Der Staay, S. Y., Claustre, H., Partensky, F., & Vaulot, D. (1999). Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4528-4536.

H

Hakmi, A. (2006). Traitement de l'eau de source Bousfer ORAN. *Mémoire de Licence. Université des sciences et de la technologie Oran*.

Haslay, C., Leclerc, H., & Festy, B. (1993). *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Paris: Technique & Documentation - Lavoisier.

Hamill, S., Neill, S. D., & Madden, R. H. (2008). Use of Hugh and Leifson's medium as a simple screening test to aid in the differentiation of *Arcobacter* spp. from background flora during their isolation from foodstuffs. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 187-191.

Harbarth, S., Liassine, N., Dharan, S., Herrault, P., Auckenthaler, R., & Pittet, D. (2000). Risk factors for persistent carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases*, 31(6), 1380-1385.

Hertig, J. A. (2006). *Etudes d'impact sur l'environnement* (Vol. 23). PPUR presses polytechniques.

J

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3832-3845.

Joly, B., & Reynaud, A. (2003). Enterobacteria. Systematics and diagnostic methods. *Enterobacteria. Systematics and diagnostic methods*.

Jurgens, G., Glöckner, F. O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M., & Münster, U. (2000). Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(1), 45-56.

K

Kansaye, H. (2020). *Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches d'entérobactéries isolées de pus, d'hémoculture et de selles au CHU du point G (USTTB)*.

Khayar, Y. (2011). *Comportement des enterobacteries isolees des urines vis-a-vis de l'amoxicilline-acide clavulanique l'imipeneme et l'ertapeneme* (Doctoral dissertation).

Konare, M. S. (2016). Sensibilité aux antibiotiques des souches d'Entérobactéries isolées en 2016 au Laboratoire de Biologie Médicale et Hygiène Hospitalière du CHU du Point G.

Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(2), 311-320.

L

Larpent, J. P. (2000). *Listeria* (No. Ed. 2). Editions Tec & Doc. Chapitre(5) page 85.

Lebaron, P. (2020). Les eaux thermales: quand minéralité et signature biologique se combinent pour expliquer leurs propriétés. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* (Vol. 147, No. 1, pp. 1S20-1S24). Elsevier Masson.

M

Millet, L., Melcion, D., & Devoyod, J. J. (1974). La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. I.-Techniques d'études et résultats préliminaires. *Le lait*, 54(537), 397-407.

Mouchet, P., & Roustan, M. (2011). Caractéristiques et propriétés des eaux-Eau pure, eaux naturelles.

Mukherjee, N., Bartelli, D., Patra, C., Chauhan, B. V., Dowd, S. E., & Banerjee, P. (2016). Microbial diversity of source and point-of-use water in rural Haiti—a pyrosequencing-based metagenomic survey. *PLoS One*, *11*(12), e0167353.

N

Nayak, R. (2020). INDOLE TEST. [http.24 by Publishing.com](http://24byPublishing.com), 68.

O

Oms. (1996). Rapport sur la santé dans le monde : 1996, combattre la maladie, promouvoir le développement. Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse.

Oms. (2013). Directives de qualité pour l'eau de boisson. Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse.

Q

Quevauviller, P. (2010). *Eau, environnement et santé publique*. Editions Tec & Doc-Lavoisier.

Quinteira, S. M. B. (1999). Resistências aos antibióticos B-lactâmicos em Enterobacteriaceae isoladas de águas de consumo.

R

Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. *American society for microbiology*, 1-6.

Rico, A. (2000). *Pollutions et pratiques agricoles. Deux concepts : dose journalière admissible et chimiodéfense. Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie*, *323*(5), 435–440. doi:10.1016/s0764-4469(00)00152-9.

S

Sharma, P., Slathia, P. S., Raina, N., & Bhagat, D. (2019). Microbial diversity in freshwater ecosystems and its industrial potential. In *Freshwater Microbiology* (pp. 341-392). Academic Press.

Sibille, I. (1998). Stabilité biologique des réseaux de distribution d'eau potable. *L'Année Biologique*, *37*(3), 117-161.

Silue, N. (2005). Thermorésistance de trois serotypes de Salmonella dans l'oeuf et les gésiers de poulets. *Université Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire, Afrique*.

Singh, A. K., Das, S., Kumar, S., Gajamer, V. R., Najjar, I. N., Lepcha, Y. D., ... & Singh, S. (2020). Distribution of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae Pathogens in Potable Spring Water of Eastern Indian Himalayas: Emphasis on Virulence Gene and Antibiotic Resistance Genes in Escherichia coli. *Frontiers in microbiology*, *11*.

Sougakoff, W., & Trystram, D. (2003). Résistances aux β -lactamines. *Service de Bacteriologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière*, 9-12.

T

Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., & Rolain, J. M. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria. *Water research*, 120, 185-189.

Tanentzap, A. J., Fitch, A., Orland, C., Emilson, E. J., Yakimovich, K. M., Osterholz, H., & Dittmar, T. (2019). Chemical and microbial diversity covary in fresh water to influence ecosystem functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(49), 24689-24695.

W

William, S. T., Sharpe, M. E., Holt, J. G., Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Krieg, N. R., ... & Staley, J. T. (1989). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology (Vol 4). *Williams and Wilkins, Baltimore*.

Woolverton, C. J., Sherwood, L. M., Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. McGraw-Hill.

Résumé

L'écosystème aquatique regorge d'espèces microbiennes. Dans cet écosystème les bactéries, représentent la proportion la plus élevée. Cette diversité diffère d'une niche à une autre, cette différence est liée à la composition chimique et organique de l'écosystème. Cette variabilité de la diversité nous a incités à effectuer une caractérisation phénotypique des isolats des eaux souterraines dans la région de Souk-Ahras. A partir de 32 échantillons nous avons eu 45 isolats entre les Gram positifs et Gram négatifs. Un criblage des Gram négatifs nous a permis d'obtenir uniquement 15 isolats de Gram négatifs. Ces isolats à Gram négatifs ont exprimé une importante diversité métabolique. Une fois les données métaboliques rassemblées, nous avons pu affilier les 15 isolats au genre de *Shigella* (13.33%), *Hafnia* (46.66%) et *Citrobacter* (40%). Les résultats obtenus révèlent une diversité modérée dans les eaux de forage de la région de Souk-Ahras. Cette diversité varie proportionnellement avec les caractéristiques physico-chimiques et composition en matière organique. Nos résultats révèlent que les eaux de forages peuvent contenir des agents pathogènes nocifs pour la santé. Pour cela, il faut donner plus d'importance à la qualité microbiologique de nos eaux souterraines.

Mots clés : Eau de forage, Diversité bactérienne, *Enterobacteriaceae*, Gram négatif.

Abstract

Aquatic ecosystem is colonised by several microbial species. In this ecosystem bacterial strains express high diversity proportion. This diversity is variable, due to the chemical and organic composition of the ecosystem. These findings motivate us to elaborate investigations on the bacterial diversity in the Souk Ahras region following phenotypic characterisation of bacterial isolated from ground water. From 32 samples, we isolate 45 isolates between Gram positive and Gram negative. Then bacterial screening of Gram negative allowed us to obtain 15 isolates. These isolates express an important metabolic diversity. According the obtained results we may affiliated these isolates to *Shigella* (13.33%), *Hafnia* (46.66%) and *Citrobacter* (40%) genera. This finding reveal that ground water have a moderate diversity. This diversity is thinly related to the physico-chemical and organic composition. Moreover, our results inform us that, ground water may be colonised by pathogenic germ, which may thread public human health. For that, we should give more importance to the bacterial diversity in water ecosystem.

Key words: Ground water, bacterial diversity, *Enterobacteriaceae*, Gram negatives.

ملخص

النظام البيئي يعج بأنواع الكائنات الدقيقة. في هذا النظام البيئي، تمثل البكتيريا أعلى نسبة. يختلف هذا التنوع من مكان إلى آخر، وهذا الاختلاف مرتبط بالتركيب الكيميائي والعضوي للنظام البيئي. دفعنا هذا التباين في التنوع إلى إجراء وصف ظاهري لعينات المياه الجوفية في منطقة سوق أهراس. من بين 32 عينة كان لدينا 45 عينة بين موجبة الغرام وسالبة الغرام. سمح لنا فحص البكتيريا بالحصول على 15 عينة سالبة الغرام فقط. عبرت هذه العينات سالبة الغرام عن تنوع أبيض كبير. بمجرد جمع البيانات الأيضية، تمكنا من ضم 15 عينة إلى جنس *Shigella* (13.33%)، *Hafnia* (46.66%) و *Citrobacter* (40%). النتائج التي تم الحصول عليها تكشف عن تنوع معتدل في مياه الآبار الارتوازية في منطقة سوق أهراس. يختلف هذا التنوع بشكل متناسب مع الخصائص الفيزيائية والكيميائية وتكوين المادة العضوية. تظهر نتائجنا أن مياه الآبار قد تحتوي على مسببات الأمراض الضارة بالصحة.

الكلمات المفتاحية: المياه الجوفية، التنوع البكتيري، البكتيريا المعوية، سلبيات الغرام.