

MINISTRE 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/21

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV    Filière : Biologie**  
**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par :**

*Narimel GANA & Dalila BOUDJAOU*

*Thème*

**Isolement et caractérisation phénotypique des  
bactéries à Gram positive colonisant  
l'écosystème aquatique à l'Est de l'Algérie.**

**Soutenu le :** 15 / 07 / 2021

**Devant le jury composé de :**

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Dr BOUHANI</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Dr MESSAD</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr DJENADI</i>	<i>MCB.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Pr SOUALILA</i>	<i>Pr</i>	<i>Univ de Souk Ahras</i>	<i>Co-promoteur</i>
<i>Mme RAHMANI</i>	<i>ING</i>	<i>ADE de Bouira</i>	<i>Invité d'honneur</i>

*Année Universitaire : 2020/2021*

# **Remerciements**

*On exprime d'abord nos profonds remerciements à Dieu tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice M<sup>me</sup> DJENADI :*

*Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer notre travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mr SAIKI et M<sup>me</sup> RAHMANI de nous avoir accueilli dans le laboratoire e de l'ADE de Bouira et pour l'aide qu'ils nous ont accordé. Sans oublié toute l'équipe du laboratoire d'ADE de Bouira pour l'accueil cordial et pour l'attention avec laquelle ils ont soutenu notre travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs du département biologie qui nous ont enseigné 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.*

# **Dédicace**

*Je dédie ce travail :*

*À Mon père qui est le plus cher, qui m'a soutenu tout au long de mon parcours d'études scolaire et universitaire, que Dieu le garde et le protège.*

*A la lumière de mes yeux, la flamme de mon cœur, à celle qui m'a éclairée mon chemin et qui m'a encouragé et soutenue tout au long de ma vie. Ma vie et mon bonheur : Maman que j'adore. Je dédie ce travail à toi, pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ta tendresse et ton amour. Toutes les belles et sincères expressions n'expriment pas ma reconnaissance et ma gratitude envers toi.*

*A mon frère et ma sœur les plus précieux dans ma vie, je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous, je vous souhaite une bonne chance dans la vie.*

*A Mon cher binôme et amie Dalila pour tous les moments de joie et surtout de peine qu'on a partagée ensemble.*

*A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.*

*Et enfin je le dédie fortement à notre promotrice M<sup>me</sup> DJENADI pour ses conseils et son soutien et surtout pour son aide. Grand merci !*

*Sans oublier mes braves amies de la promotion de microbiologie  
Master II.*

**NARIMEL**

# **Dédicace**

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et pour m'aider à avancer dans la vie*

*Merci pour les valeurs nobles,*

*L'éducation et le soutient permanent venu de toi.*

*A toute ma famille (mes sœurs ; mes frères) pour son soutien de tous les instants.*

*A Ma chère binôme « Narimel » et à toute sa famille*

*A tous mes collègues et mes amies et en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble,*

*Enfin, mes dédicaces s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué*

*De près ou de loin à la réalisation de ce travail sans oublier notre*

*promotrice M<sup>me</sup> DJENADI pour ses conseils et son soutient, je vous*

*souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

**DALILA**

## Liste des abréviations

**ADE** : Algérienne des eaux

**BEA** : gélose Bile Esculine Azide

**Cat** : Catalase

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CGP** : Cocci Gram positif

**E. coli** : Escherichia .coli

**ESC** : Esculine citrate de fer

**g/l** : Gramme par litre

**Glu** : glucose.

**H** : Heure

**IND** : indole

**Lac** : Lactose

**LB** : Lysogeny Broth ou LuriaBertani ou LuriaBroth.

**L** : Litre

**ml** : millilitre

**MANT**: Mannitol

**MOB** : Mobilité

**MVG** : MEVAG

**MTH** : Maladie Transmissible Hydrique

**NTU** : Néphélométrie Turbidity Unite

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PCA** : Plat Count Agar

**pH** : potentiel d'hydrogène

**PLP** : Protéine Liant la Pénicilline

**SACCH** : Saccharose

**SB** : Slanetz et Bartley

**SF** : Streptocoques Fécaux

**Staph**: Saphylocoques.

**TSI** : tri-sugar iron.

## Liste des abréviations

**TSB** : Bouillon trypticase soya (Trypticase Soya Broth)

**URE** : Uréase

**UFC** : Unité Formant Colonie

**VF** : Gélose viande de foie

**VP** : réactif Voges Proskawer

**VHA** : Le virus de l'hépatite A

**%** : Pourcentage

**+** : Positif.

**-** : Négative.

**C°** : Température en degré Celsius.

**μS** : Micro siemens

**μS/cm** : Micro siemens sur centimètre

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**..... 1

**Partie bibliographique**

**Chapitre I : La diversité bactérienne dans le milieu aquatique**

I. Diversité dans le milieu aquatique.....	3
II. Paramètres physicochimiques.....	3
II.1. Paramètres physiques.....	3
II.1.1. La température .....	3
II.1.2. La turbidité .....	4
II.1.3. La conductivité.....	4
II.1.4.Oxygène dissout .....	4
II.1.5. La salinité .....	5
II.2.Paramètres chimiques .....	5
II.2.1. Le pH .....	5
II.2.2. Les matières organiques .....	5
II.3. Paramètres microbiologiques.....	5
II.3.1.Bactéries .....	6
II.3.1.1Les coliformes totaux.....	6
II.3.1.2. Les coliformes fécaux .....	7
II.3.1.3. Les streptocoques fécaux .....	7
II.3.1.4.Les bactéries Clostridium sulfito réducteurs .....	7
II.3.2. Virus .....	8
II.3.3. Parasite .....	8
<b>III. Risques liés à la pollution des eaux</b> .....	<b>8</b>

**Chapitre II : La flore bactérienne aquatique à Gram positifs**

II. Définition et principales caractéristiques des bactéries à gram positives .....	10
I.1. Diversité des Gram positif .....	10

## Table de matières

I.1.1. Les Cocci à Gram positive .....	10
I.1.2. Les bacilles à Gram positive .....	12
<b>II. Exemple de quelque bactérie à Gram positif.....</b>	<b>12</b>
II .1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
II .1.1 Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
II .1.2 Caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
A-Caractères morphologiques .....	13
B-Caractères cultureux.....	13
C- Caractères biochimiques .....	14
II .1.3 Habitat .....	15
II .2 Les streptocoques fécaux.....	15
II .2.1 Taxonomie .....	15
II .2.2 Caractéristiques bactériologiques.....	16
A-Caractères morphologiques.....	16
B-Caractères cultureux .....	17
II .2.3 Habitat .....	17
II .3 <i>Clostridium</i> .....	17
II .3.1 Taxonomie.....	18
II .3.2 Caractéristiques bactériologiques .....	18
A-Caractères morphologiques.....	18
B-Caractères cultureux .....	19
II .3.3 Habitat .....	19
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>20</b>
I. Présentation de l'unité de l'ADE de BOUIRA .....	20
II. Site de collecte des échantillons .....	20
III. Recueil des échantillons .....	21
IV. Analyse physico-chimique de l'eau .....	22
V. Etude de la diversité bactérienne dans les échantillons d'eau.....	22
V.1. Filtration de l'eau .....	22
V.2. Dénombrement de la flore mésophile totale .....	23
VI. Isolement et caractérisation phénotypique des isolats à Gram+.....	23

## Table de matières

VI.1. Isolement et purification des isolats .....	23
VI.2. Caractérisation phénotypique des isolats à Gram+.....	23
VI.2.1. L'aspect morphologique .....	24
VI.2.1.1.L'aspect macromorphologique .....	24
VI.2.1.2.L'aspect micro-morphologique .....	24
VI.2.2. Teste de catalase .....	25
VI.2.3. Caractérisation biochimiques .....	26
VI.2.3.1.Etude de la fermentation des sucres, production d'H <sub>2</sub> S et de gaz sur TSI .....	26
VI.2.3.2.Etude de la mobilité et de la fermentation du mannitol sur milieu Mannitol mobilité .....	26
.....	
VI.2.3.3.Recherche de l'uréase et production d'indole, sur milieu urée-indole .....	26
VI.2.3.4. Production de VP sur milieu Clarck et Lubs .....	27
VI.2.3.5.Etude de la fermentation de Lactose et glucose, et production de gaz ou de sulfure d'hydrogène H <sub>2</sub> S sur milieu Kliger-Hajna .....	27
VI.2.3.6.Métabolisme oxydatif ou fermentatif sur milieu Hugh et Leifson .....	27
VI.2.3.7. Etude de la fermentation du Glucose et l'oxydation des glucides sur milieu MEVAG .....	28
VI.2.3.8.Etude de l'hydrolyse de l'esculine sur milieu à l'esculine .....	28
<b>Résultat et discussion</b>	
<b>I-Résultat</b>	
I.1. Caractéristiques physicochimiques des échantillons .....	29
I.2. Les résultats de dénombrement de la flore mésophile totale.....	30
I.3. Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats .....	31
I.3.1. Aspects macroscopiques des isolats .....	31
I.3.2. Aspects microscopiques des isolats .....	33
I.3.3. Diversité phénotypique des isolats à Gram+ .....	35
I.3.3.1. Recherche de la catalase .....	35
I.3.3.2. Test biochimique .....	35
1.Test Urée-indol .....	35
2. Test TSI .....	36
3. Test mannitol-mobilité .....	36
4. Milieu MEVAG .....	37
5.Test VP.....	37

## Table de matières

6. Milieu esculine .....	38
7. Milieu Hugh et Leifson .....	38
8. Milieu Kligler-Hajna.....	39
<b>II. Discussion.....</b>	<b>44</b>
<b>Conclusion</b>	
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Les annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Aspect de <i>S. aureus</i> suite à une coloration de Gram.....	13
<b>Figure 02:</b> aspect microscopique des streptocoques après coloration de Gram.....	16
<b>Figure 03:</b> Photographie prise au microscope électronique montrant la forme de coques des cellules de <i>Streptocoque</i> .....	17
<b>Figure 04 :</b> aspect microscopique de <i>Clostridium botulinum</i> difficile.....	18
<b>Figure 05:</b> Sites et points de prélèvement (Nord : Machroha et Sud : Oum el Adhaim) Wilaya de Souk Ahras.....	20
<b>Figure 06 :</b> aspect colonial de quelque isolat sur milieu PCA.....	31
<b>Figure 07 :</b> observation microscopique des souches Gx100 avec huile d'immersion après coloration de Gram sur milieux PCA.....	31
<b>Figure 08 :</b> l'aspect colonial de quelques isolats ayant un Gram positive sur milieu VF, Chapman et BEA.....	33
<b>Figure 09:</b> observation de l'état frais par microscope optique Gx40.....	33
<b>Figure 10 :</b> observation microscopique des isolats sur milieu VF (Gx100).....	34
<b>Figure 11:</b> observation microscopique de quelque isolats sur milieu Chapman et LB	34
<b>Figure 12 :</b> observation microscopique (Gx100) des isolats sur milieu BEA.....	34
<b>Figure 13 :</b> l'effervescence obtenue de la réaction H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> avec la catalase bactérienne...	35
<b>Figure 14 :</b> le résultat négatif d'indole après ajout de réactif kovacs.....	35
<b>Figure 15 :</b> résultat observé sur milieu TSI.....	36
<b>Figure 16 :</b> résultat du teste mannitol –mobilité.....	36
<b>Figure 17 :</b> résultat obtenu sur milieu MEVAG.....	37
<b>Figure 18 :</b> résultat obtenu sur milieu Clack et lubs .....	38
<b>Figure 19 :</b> résultat obtenu sur milieu esculine.....	38
<b>Figure 20 :</b> mis en évidence du résultat positive du test Hugh et leifson.....	39
<b>Figure 21 :</b> aspect du milieu kliger Hajna .....	39

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Les principales maladies d'origine hydrique et leurs agents pathogènes.....	09
<b>Tableau 02 :</b> les caractères des 03 genres de la famille des <i>streptococaceae</i> .....	11
<b>Tableau 03 :</b> Site de collecte des échantillons.....	21
<b>Tableau 04:</b> Origine et qualité de l'eau recueillie.....	22
<b>Tableau 05:</b> La composition chimique et la caractérisation physico-chimique de l'eau des forages de Souk-Ahras.....	29
<b>Tableau 06:</b> le dénombrement de la flore totale sur milieu PCA .....	30
<b>Tableau 07:</b> l'aspect macroscopique et microscopique des échantillons .....	32
<b>Tableau 08:</b> les résultats obtenus sur les différents milieux(1).....	40
<b>Tableau 09:</b> les résultats obtenus sur les différents milieux(2).....	41
<b>Tableau 10:</b> les résultats de l'identification des souches.....	42

# Introduction

Les écosystèmes aquatiques sont des milieux privilégiés pour les transports d'organismes, les échanges entre individus, les évolutions rapides de communautés, combinés à la propagation rapide de signaux physiques et chimiques dans l'environnement. Les réseaux microbiens, composés d'une grande variété de micro-organismes à savoir des bactéries, phytoplanctons et a protozoaires, occupant dans divers états physiologiques. Ces derniers sont la base du fonctionnement de ces écosystèmes.

Ces micro-organismes existent sur la terre depuis des milliards d'années et constituent un ensemble important et diversifié d'organismes microscopiques existant en tant que cellule seule ou en groupe. Ces microorganismes fonctionnent en tant que populations ou assemblages d'organismes similaires (**Prescott et al, 2018**).

Par leur abondance et leur diversité taxonomique et fonctionnelle, les microorganismes jouent un rôle prépondérant au sein des écosystèmes aquatiques. (**Pedrôs-aliô et Guerrero, 1994**).

L'omniprésence et le rôle-clé des microorganismes dans le fonctionnement des systèmes écologiques, notamment aquatiques, font de l'écologie microbienne une discipline essentielle. En particulier, leurs rôles dans les cycles biogéochimiques, qui soutiennent le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, est prépondérant. Par ailleurs, l'émergence de problèmes tels que la pollution de l'air et de l'eau, a permis de réaliser que les microbes ne sont pas que de simples modèles cellulaires. (**Pelmont, 1993**).

Apparus très tôt au cours de l'évolution, les microorganismes ont pu se diversifier alors que l'écologie de la planète a été exclusivement microbienne pendant plusieurs milliards d'années. (**Kherifi et Bekiri, 2017**). L'importance des microbes est intimement liée à leurs caractéristiques spécifiques à savoir leur petite taille leurs facilitant les échanges avec le milieu extérieur et assurant un taux de croissance très élevé, la complexité et la diversité de leur métabolisme De plus, des échanges de gènes rapides et efficaces procurent aux microorganismes une forte capacité potentielle de dispersion et de colonisation et leur permettent de s'adapter rapidement aux variations environnementales. (**Monjou ,1997**).

Lorsque l'eau est accessible, il sujette à une contamination chimique et/ou bactériologique. (**Degbey et al. 2011**). Les infections bactériennes d'origine hydriques posent un réel problème de santé publique, de par leur fréquence et leur gravité et sont liés aux agents microbiologiques (bactéries, virus, protozoaires et parasites) et aux substances chimiques. En effet, dans les pays en voie de développement, les maladies liées aux infections

bactériennes d'origine hydrique ont été responsables pendant plusieurs siècles de vastes épidémies de dysenterie, fièvre typhoïde, choléra...

Le risque microbiologique provient donc du pouvoir pathogène de ces germes qui est conditionnée non seulement par les propriétés de l'agent infectieux mais aussi par la réceptivité de l'hôte (**Lebleu, 2007**).

L'objectif général de notre projet de fin cycle se base sur l'identification des bactéries à Gram positive et qui peuvent être néfaste pour la santé publique colonisant l'écosystème aquatique (forage) à l'Est de l'Algérie (Souk Ahrasse).

Pour mieux cerner notre étude, le mémoire est subdivisé en deux parties, une synthèse bibliographique qui est consacrée pour la diversité bactérienne à Gram positifs dans le milieu aquatique. Ainsi la deuxième partie expérimentale qui présente les méthodes expérimentales employées et les résultats obtenus suivit de leurs interprétations, enfin nous achevons notre étude par une conclusion générale où sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

# Partie Bibliographique

# **Chapitre I :**

## **Le milieu aquatique et ses caractéristiques**

Pendant que l'eau suit son cycle, elle amasse naturellement beaucoup de choses sur son chemin. La qualité de l'eau diffère naturellement selon le lieu, la saison, et les divers types de roches et sols sur lesquels elle se déplace. Elle peut être polluée naturellement ou par les activités humaines comme un traitement incorrect des eaux usées, de mauvaises pratiques agricoles. (Garnier, 2012)

La surveillance bactériologique et la surveillance physico-chimique des eaux sont considérées comme des outils complémentaires et sont reconnus comme des composantes essentielles des programmes de surveillance de la qualité de l'eau. En effet, la surveillance bactériologique mesure les effets des perturbations sur les communautés biologiques en place tandis que la surveillance physicochimique mesure les agents polluants. (Cawst, 2013)

## I. Diversité des milieux aquatiques :

La notion du milieu aquatique englobe, dans le domaine continental, des types très variés d'écosystème qui comprennent aussi bien des eaux courantes (sources, ruisseaux, torrent, rivières, fleuves et canaux) que des zones humides (marais, tourbières) dites stagnantes (mares, étangs, gravières, ballastières, lacs). (Gosclaud, 1999)

## II. Paramètres physico-chimiques :

Dans son parcours, l'eau se condense dans l'atmosphère et se charge en gaz (azote, oxygène, dioxyde de carbone...), et en impuretés de l'air (poussières, gaz de combustion...). Lorsque l'eau ruisselle à la surface du sol, elle se charge par effet d'érosion (roches, végétaux...) et quant elle s'infiltre, elle traverse plusieurs types de sols, de nature géologique différente, et se charge naturellement en sels minéraux et en oligo-éléments, ainsi le calcium et le carbonate sont présents. Donc ces caractéristiques de l'eau dépendent de la nature géologique des sols qu'elle a traversés, de ce fait elles varient selon la région d'où provient l'eau. (Rodier, 2009).

### II.1 Paramètres physiques :

#### II.1.1 La Température :

La température est un paramètre clé du comportement et de la qualité des eaux. Elle est une caractéristique physique importante. Elle joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, et aussi dans la détermination du pH pour la connaissance de l'origine de l'eau des mélanges éventuels. (Edeline, 1988). La mesure de la température est nécessaire pour accéder à la détermination du champ de densité et des courants. D'une façon générale, la température

des eaux superficielles est influencée par la température de l'air. **(Mokeddem et al, 2005)**  
**(Berne et Jean, 1991)**

### II.1.2 La turbidité :

La turbidité de l'eau est liée à sa transparence La turbidité désigne la teneur d'un fluide en matières qui le troublent. **(WHO, 1994)**. Dans les cours d'eau, la turbidité est généralement causée par des matières en suspension et des particules colloïdales qui absorbent, diffusent ou réfléchissent la lumière. La turbidité est exprimée généralement en Néphélométrie Turbidity Unite (NTU).pour la sécurité de l'eau, il faut maintenir une turbidité inférieure à 5 NTU. **(Jean-Claude, 1983) (Hivony et al, 2015)**.

### II.1.3 La conductivité électrique :

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant électrique. Tous les ions dans l'eau y participent : calcium, magnésium, mais aussi l'aluminium, fer, manganèse, mercure, etc... **(Guentri et Rahmania 2015)**

La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductivimètre avec lequel on obtiendra une valeur en micro-siemens par centimètre ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). **(Vierling ,2003)**, La conductivité d'une eau naturelle est comprise entre 50 et 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ . L'estimation de la quantité totale de matières dissoutes peut être obtenue par la multiplication de la valeur de la conductivité par un facteur empirique dépendent de la nature des sels dissous et de la température de l'eau .La connaissance du contenu en sels dissous est importante, dans la mesure où chaque organisme aquatique a des exigences propres. **(Bougherira, 2008)**. Elle varie également en fonction de la température de l'eau, et proportionnelle à la minéralisation. **(Merabet, 2010)**

### . II.1.4 Oxygène dissous :

L'oxygène dissous mesure la concentration du dioxygène dissous dans l'eau, sa solubilité est liée à plusieurs facteurs particulier : la température, la pression atmosphérique et la salinité et aussi en fonction de l'origine de l'eau. Les eaux superficielles peuvent en contenir des quantités relativement importantes proches de la saturation. Les eaux profondes contiennent le plus souvent que quelques milligrammes par litre. Il est exprimé en mg/l. **(Rodier, 1984)**.

### II.1.5 La Salinité :

La salinité mesure la concentration d'une eau en sels dissous (chlorure de sodium, chlorure de magnésium, sulfate de magnésium, etc.) (**Dégrément, 1952**) Elle correspond à la somme des cations et des anions présents exprimée au travers de la conductivité électrique de cette eau. (Salinité) Cette salinité est exprimée en unité de pourcentage. (**Masmoudi, 2011**).

## II.2 Paramètres chimiques :

### II.2.1 Le pH (potentiel Hydrogène) :

L'eau naturelle pure est neutre c'est-à-dire pH égal à 7. Un pH compris entre 6 et 9 permet un développement à peu près correct de la faune et de la flore. (**Ayad et al, 2016**). Les organismes vivants sont très sensibles aux variations brutales même limitées du pH. Son influence se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les équilibres ioniques des autres éléments en augmentant ou diminuant leur toxicité. Pour la consommation humaine le pH de l'eau est compris entre 6.5 et 8.5. (**Debabza ,2005**),

Le pH des eaux naturelles est lié à la nature des terrains traversés. Dans la plupart des eaux naturelles, le pH dépend de l'équilibre calco-carbonique (**Kahoul et al, 2014**). (**Villers et al, 2005**)

Les eaux très calcaires ont un pH élevé et celles provenant des terrains pauvres en calcaires ou siliceux ont un pH voisin de 7. Le pH est un indicateur de la qualité de l'eau. (**Djermakoye, 2004**)

### II.2.2 Les matières organiques :

Les matières organiques susceptibles d'être rencontrées dans les eaux sont constituées par des produits de décomposition d'origine animale ou végétale, élaborés sous l'influence des microorganismes. (**Rodier, 1976**) L'inconvénient des matières organiques est de favoriser l'apparition de mauvais goût qui pourra être augmenté par la chloration. (**Hamed et al ,2012**)

## II.3 Paramètres microbiologiques :

La diversité microbienne est immense. C'est la résultante de l'évolution sur presque quatre milliards d'années. Cette diversité peut être étudiée sous des angles multiples : variation de la taille des cellules, de la morphologie (forme), des stratégies métaboliques (physiologie), de la mobilité, pathogénèse, adaptation à l'environnement... (**Rodier et al, 1996**).

L'eau doit présenter également une potabilité du point de vue microbiologiques ; généralement, toutes les ressources d'eaux soit des lacs, des rivières, des fleuves, aussi bien des nappes phréatiques un peu profondes, contient trois type des germes typiquement aquatique, tellurique (due par ruissellement) et des germes de contamination humaine ou animale (contamination fécal); que ce soit le type du germe il peut engendrer des maladies infectieuses chez l'homme En définitive, la majorité des microorganismes pathogènes (virus, bactéries ou protozoaires) pouvant causer des maladies susceptibles de se trouver dans l'eau, proviennent de déjections humaines ou animales, l'importance de la pollution microbiologique nous oblige de faire un **(Ouahchia et al ,2015)**

L'eau contient une multitude de microorganismes pathogènes, agents d'infection humaines redoutables. Ce sont des bactéries, des virus, voir des champignons et des algues **(Haslay et Leceler ,1993)**

### **II.3.1 Bactéries :**

En effet, l'origine des contaminations des eaux par les bactéries pathogènes sont essentiellement fécale et ces organismes sont par conséquent des indicateurs de contamination fécale.

Le contrôle bactériologique porte sur la quantification des germes indicateurs de contamination fécale: les coliformes, streptocoques fécaux. D'autres indicateurs non spécifiques ont été utilisés comme complémentaires: les germes totaux et les *Clostridium sulfito réducteurs*. Implique aussi la recherche de certains germes pathogènes: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Pseudomonas aeruginosa* et les *Staphylocoques*. **(Ouahchia et al ,2015) (Coulais ,2002).**

#### **II.3.1.1 Les coliformes totaux :**

Les coliformes regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à lactose-positives pouvant former des colonies en aérobiose à 37C° avec production d'acide si le milieu est gélosé (milieu de culture lactose sélectif et différentiel) ou bien la production d'acide et de gaz si le milieu est liquide (milieu liquide bilié lactosé au vert brillant). **(Ghizellaoui ,2010)** Ce sont des micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs, en forme de bâtonnet, Gram-, non sporulés et dépourvues d'oxydase. **(Edberg et al, 2000).** Les coliformes comprennent les genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia*. **(Hamed, et al, 2012)**

### II.3.1 .2 Les coliformes fécaux (thermotolérants) :

Les coliformes thermotolérants forment un sous-groupe de bactéries qui fermentent le lactose à une température comprise entre 44 et 45C° pendant 24 heures. (OMS, 2012).Elles se définissent également comme étant des bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram négatif, en forme bâtonnée. (Rodier, 2005)

Ce groupe comporte plusieurs souches différentes (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *klebsiella...*), La souche type est *Escherichia coli*, Cette souche est l'espèce la plus fréquemment associée aux coliformes fécaux .Elle représente toutefois 80 à 90% des coliformes thermo-tolérants détectés. La présence d'*E.coli*, apporte la preuve incontestable d'une pollution fécale récente. (Bremond et Vuichard, 1973)

### II.3.1 .3 Les streptocoques fécaux :

Il s'agit d'un ensemble des bactéries de forme sphérique ou cocci, Gram+, disposés en pair ou en chaînette, Ils sont anaérobies aérotolestants, immobiles, non sporules, ne possédant pas de catalase capable de croître à 37 °C en 48 heures . Leur présence dans l'eau indique une pollution d'origine fécale (Seghir ,2008). Elles sont divisées en deux sous groupes : *Enterococcus* et *Streptococcus*. Les Streptocoques possédant une substance antigénique caractéristique du groupe D de Lancefield. (Rodier, 2005)

### II.3.1 .4 Les bactéries Clostridium sulfite réducteurs(ou leurs spores):

Ce sont des germes anaérobies appartenant à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Clostridium*, ils sont présents dans la matière fécale humaine et animale, ainsi que dans les eaux usées et le sol. Les *Clostridium* sont des bacilles à Gram positif, anaérobies stricte, isolés ou en chaînettes, presque toujours mobiles, sporulés non capsulés (à l'exception de *Clostridium perfringens*), catalase négatif. (Rejesk, 2002).

A la différence des *Escherichia coli* et autres organismes coliformes, les spores de *Clostridium* survivent dans l'eau pendant longtemps, car elles sont plus résistantes que la forme végétative à l'action des facteurs chimiques et physiques, alors leur présence dans l'eau désinfectée peut donc montrer que le traitement est déficient. De ce fait elles constituent un bon indicateur de l'efficacité de la désinfection. Elles sont très persistantes et elles peuvent également vivre et se multiplier dans les milieux naturels et sont souvent recherchées pour vérifier l'autoépuration des sols vis-à-vis de l'eau. (Rodier et al, 1996).

### II.3.2 Virus :

Parmi les virus présent dans l'eau, on compte le virus de l'hépatite A; le virus de l'hépatite E plutôt confiné dans les milieux tropicaux, le virus commun des gastroentérites, les Adénovirus, les *Réovirus*. (Cawst, 2013). Le plus souvent les virus sont adsorbés aux matières en suspension et décantent avec elles, aussi bien la désinfection au rayon UV est efficace pour les détruire. (Benkaddour ,2016)

### II.3.3 Parasite :

Les protozoaires constituent un groupe diversifié de microorganismes. Ce sont, pour la plupart des organismes libres, qui peuvent vivre dans l'eau de surface et l'eau usée. Elles ne présentent aucun risque pour la santé humaine. Ce pendant, certains protozoaires entériques, comme *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* ; sont pathogènes et ont été associés à des éclosions de maladies liées à l'eau potable. Ils peuvent se retrouver dans cette eau à la suite d'une contamination par la matière fécale d'humains ou d'animaux. (Kherifi et Bekiri, 2017). Etant résistant aux conditions environnementales sous des formes particulières: kyste, oocyste, une fois ingérés, ils entrent en phase de germination, se reproduisent et entraînent diverses maladies telles que Giardiase, Amibiase, gastroentérites...l'OMS en 1996 a estimé l'incidence mondiale de la Giardiase à 200 millions de cas par année. (Tourab ,2013)

## III. Risques liés à la pollution des eaux :

L'eau joue un rôle important pour la vie, la santé, l'accès à l'hygiène et au confort mais elle peut véhiculer en particulier de nombreux micro-organismes, bactéries, virus et protistes de tout genre, qui y vivent et s'y développent. Aujourd'hui, dans les pays en voie de développements, où l'hygiène individuelle et collective est moins respectée, On y trouve deux groupes de pathologies d'origine hydrique, à ne pas confondre en raison des différentes mesures thérapeutiques et préventives qui s'y attachent :

- Les maladies acquises au contact de l'eau polluée ou transmises par des vecteurs.
- Maladies liées à la consommation d'une eau contaminée par des germes pathogènes.

On appelle maladies hydriques ou MTH (Maladie Transmissible Hydrique) toutes maladies causées par la consommation d'eau contaminée par des selles animales ou humaines, qui contiennent des microorganismes pathogènes. Parmi ces maladies : La brucellose, la

tuberculose, la fièvre typhoïde, le choléra, pour ne citer que ces quelques maladies qui tuent des milliers de personnes chaque année à travers le monde. (Monjou, 1997).

**Tableau 01:** Les principales maladies d'origine hydrique et leurs agents pathogènes

Maladies	Agents
<p><b>1-Origine bactérienne</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Fièvre typhoïde et paratyphoïde</li> <li>-Dysenterie bacillaire</li> <li>-Cholera -Gastro-entérites aiguës et diarrhées</li> <li>- Pneumonies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Salmonella typhi</i></li> <li>-<i>Salmonella paratyphi A et B</i></li> <li>-<i>Shigella</i></li> <li>-<i>Vibrion cholera</i></li> <li>-<i>E.coli, entérotoximogène,</i></li> <li>-<i>Campylobacter jejuni,</i></li> <li>-<i>Yerisinia enterocolitica</i></li> <li>-<i>Salmonella sp</i></li> <li>-<i>Legionella pneumophila</i></li> </ul>
<p><b>2-Origine virale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hépatites A et E</li> <li>-Poliomyélite</li> <li>-Gastro entérite aiguës et diarrhées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Virus hépatite A et E</i></li> <li>-<i>Virus poliomyéthyrique</i></li> <li>-<i>Virus de norwalk</i></li> <li>-<i>Rota virus</i></li> <li>-<i>Astrovirus</i></li> <li>-<i>Calicivirus</i></li> <li>-<i>Enterovirus</i></li> <li>-<i>Adenovirus</i></li> </ul>
<p><b>3-Origine parasitaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amibiase</li> <li>- Gastro-entérites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Entamoeba histolytica,</i></li> <li>-<i>Giardia lamblia</i></li> <li>-<i>Cryptosporidium</i></li> </ul>

# **Chapitre II :**

**La flore bactérienne à Gram  
positifs de notre écosystème**

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian GRAM . Il mit au point le protocole de coloration en 1884. Cette dernière est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et en les utilise pour classifier et distinguer entre les espèces bactériennes.

Ainsi, les scientifiques peuvent distinguer les bactéries à Gram négatif, composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire des bactéries à Gram positif .On dit aussi « Gram positives » dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane. (Larry, 2020)

## **I. Définition et principales caractéristiques des bactéries à Gram positives :**

Les bactéries à Gram positives mesurent entre 0,5 et 15  $\mu\text{m}$ . Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de membrane nucléaire, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra chromosomique, appelée plasmide. Elles sont entourées d'une paroi complexe et possèdent souvent des flagelles. (Meddour et al, 2020)

### **I.1. Diversité des Gram positives :**

Selon la morphologie des bactéries à Gram positives on distingue deux groupes majeurs : les Cocci seront plutôt courts et sphériques, les bacilles en forme de bâtonnet, d'autres peuvent être incurvés ou spiralés. (Heart et Shears ,2006).

#### **I.1.1. Les Cocci à Gram positive :**

Les Cocci à Gram positive font partie des flores commensales de la peau et des muqueuses chez l'homme. De ce fait, ils sont fréquemment isolés en bactériologie médicale ; le problème étant de faire la part ; lorsqu' une culture est positive ; entre une situation pathogène et une contamination de l'échantillon par une bactérie commensal.

De nombreuses espèces sont maintenant bien définies, elles peuvent être aérobies, anaérobies strictes, anaérobies-aéro-tolérantes ou bien aérobies-anaérobies facultatives.

Deux familles jouent un rôle majeur en pathologie, ce sont les Micrococcaceae et les streptococcaceae. (Murdoch ,1998).

➤ **Famille des *Micrococcaceae* :**

Bien que cette famille soit en pleine restructuration actuellement ; nous garderons ; pour plus de facilité, la classification retenue dans l'éditions du *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2004). La famille des Micrococcaceae était alors composée de 4 genres : *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*.

Les espèces retrouvées en pathologie humaine appartiennent presque exclusivement aux genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*. (Denis et al, 2016)

➤ **Famille des *Streptococcaceae* :**

La famille des *streptococcaceae* regroupe un ensemble de Cocci à Gram positive ; se présente sous forme de cellules ovoïdes ou sphériques de moins de 2µm de diamètre ; ils sont dépourvus de catalase et de cytochrome oxydase ; ils produisent de l'acide lactique par fermentation du glucose et sont anaérobies –aéro tolérants. Cette famille comportait autre fois 3 genres : *Streptocoques* - *Entérocoques* - *Lactocoques*. (Denis et al, 2016)

**Tableau 02:** les caractères des genres de la famille des *streptococaceae* (Bouvet et al, 2004)

Morphologie	Genre	Espèce
En amas	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative (épidermidis ;saprophyticus).
En chaînette	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptocoques beta hémolytiques</i> : -Groupe A pyogenes -Groupe B agalactiae -autres groupes : C, G, F  <i>Streptocoques alpha hémolytiques</i> :
En diplocoque	<i>Streptococcus</i>	Mutans, salivaris, complexemilleri (anginosis, constellatis, intermidius) Streptococcus Pneumoniae=pneumocoque
En court chaînette	<i>Entrérocooccus</i>	<i>Entrérocooccus faecalis</i> - <i>Entrérocooccus faecium</i>

### I.1.2. Les bacilles à Gram positive :

Les bacilles à Gram positif se développent en aérobiose et qui sont susceptibles d'être pathogènes pour l'homme ou d'être rencontrés dans des prélèvements d'origine humaine sont nombreuses. La morphologie de certains d'entre eux est assez évocatrice pour que, d'emblée, on puisse les rattacher à un genre bactérien précis : c'est habituellement le cas des bactéries appartenant aux genres : *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Actinomyces* (**Barraud et al, 2011**).

#### Exemple des corynébactéries :

Les corynébactéries sont des bacilles à Gram positif non sporulés, immobiles, non filamenteux. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs et présentent classiquement une morphologie particulière irrégulière avec des renflements à une ou aux deux extrémités ; ils sont souvent disposés en amas. Sous cette définition, sont compris le genre *Corynebacterium*. (**Stal, 2007**).

## II. Les bactéries à Gram positif les plus connus:

### II.1 : *Staphylococcus aureus* :

*Staphylococcus aureus* fut découverte dans les années 1870 lors de l'étude microscopique d'échantillons de pus (**Lays, 2012**).

Initialement, les staphylocoques furent classés au sein du genre *Micrococcus*. Dans les années 1900, les premières classifications bactériennes officielles distinguèrent les « genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* tout en les regroupant au sein de la famille des *Micrococcaceae* (**Touaitia, 2016**). Plus récemment, les données de phylogénie moléculaire associées à des analyses chimiques de ces deux genres ont conduit à la création de la famille des *Staphylococcaceae* à laquelle appartient *S. aureus* (**Accarias, 2014**).

#### II .1.1 Taxonomie de *Staphylococcus aureus* :

Selon la 8ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2004), les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC.

**Domaine (règne) :** *Bacteria*

**Division (phylum XIII) :** *Firmicutes*

**Classe :** *Bacilli*

**Ordre :** *Bacillales*

**Famille :** *staphylococcaceae*

**Genre :** *staphylococcus*

**Espèce :** *staphylococcus aureus*

### II.1.2 Caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus*

#### a. Caractères morphologiques :

Les staphylocoques sont des coques Gram positif, non mobiles, de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, observables seuls, en paires et en tétrades, et se divisant de façon caractéristique sous plus d'un plan pour former des amas irréguliers. (Larpent, 2010 ; Prescott *et al*, 2013).



**Figure 01:** Aspect de *staphylococcus aureus* après coloration de Gram. (Hennekinne, 2009).

#### b. Caractères cultureux

Les staphylocoques sont peu exigeants sur le plan nutritif, aéro- anaérobies facultatifs c'est-à-dire qu'ils sont capables de se développer à la surface de la peau, en aérobiose et aussi dans les tissus mal oxygénés. Ils croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. La température

optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées respectivement de 10 à 45 °C et de 5,6 à 8,1. **(Delarras, 2007)**.

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt est observé, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide. Après culture de 24 heures sur gélose au sang, les colonies qu'ils produisent sont de plus grand diamètre que celles produites sur gélose nutritive. Ainsi, une pigmentation peut être observée et la couleur varie selon l'espèce. Certaines souches sont pigmentées en jaune doré (d'où le nom *aureus*). **(Prescott et al, 2013)**.

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% (qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes). Ce milieu sélectif est rendu différentiel par l'addition de mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol. Ce dernier permet à la fois d'isoler les staphylocoques fermentant le mannitol à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers *S. aureus* ou une autre espèce de *Staphylococcus* fermentant le mannitol. **(Ghernaout-benchouk, 2013)**.

### c. Caractères biochimiques :

La recherche des activités biochimiques des staphylocoques est précieuse, elle a pour but d'identifier le genre *Staphylococcus*, distinguer un Staphylocoque pathogène d'un non pathogène et préciser l'origine humaine ou animale d'un Staphylocoque.

Toutes les souches du genre *Staphylococcus* produisent une catalase, permettant ainsi de les distinguer des souches du genre *Streptococcus* qui n'en produisent pas **(Walana et al, 2020)**.

La souche de *S. aureus* possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques. Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés ; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol). Le glucose et le mannitol sont utilisés en anaérobiose et aérobie. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* **(Naili et Mezzani, 2019)**. La recherche de la fermentation du mannitol s'effectue généralement sur le milieu Chapman. Les staphylocoques pathogènes fermentent le mannitol en 24 heures à 48 heures (acidifient le milieu qui vire au

jaune). Cependant certaines souches, pourtant pathogènes demeurent inactives sur le mannitol ,la fermentation du mannitol n'a pas de valeur absolue et doit être complétée par d'autres tests. (Walana *et al*, 2020).

Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylo-coagulase (Varshney *et al*, 1993 ; Chmagh et Abd al-abbas, 2019). Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Chaalal, 2019).

Les souches de *Staphylococcus aureus* d'origine humaine possèdent une hémolysine "alpha" que l'on peut mettre en évidence sur gélose au sang de lapin ou au sang de mouton. Tandis que les *Staphylococcus aureus* pathogènes d'origine animale possèdent une hémolysine "bêta " active uniquement sur les globules rouges de mouton. Cependant certaines souches de *S. aureus* présentent les deux (02) types d'hémolysine. (Nailiet Meziani, 2019).

### II.1.3 Habitat

Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires, ils sont largement disséminés dans l'environnement, et se trouvent fréquemment dans l'air, l'eau et le sol (Chaalal, 2019). Généralement, ces bactéries sont commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux. (Parlet *et al*, 2019).

Environ 50% des sujets sains sont des porteurs asymptomatiques de *S.aureus* au niveau de l'oropharynx, du périnée, des aisselles, et au niveau des fosses nasales, ces dernières constituent son réservoir principal (Balasubramanian *et al*, 2017).

## II .2 Les streptocoques fécaux

### II. .2.1 Taxonomie :

Selon la 8ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1994). La famille des streptococaceae contient 3 genre essentielles : *streptococcus*, *enterococcus* et *lactococcus*.

**Règne** : *Bacteria*.

**Division** : *Firmicutes*.

**Classe** : *Bacilli*.

**Ordre** : *Lactobacillales*.

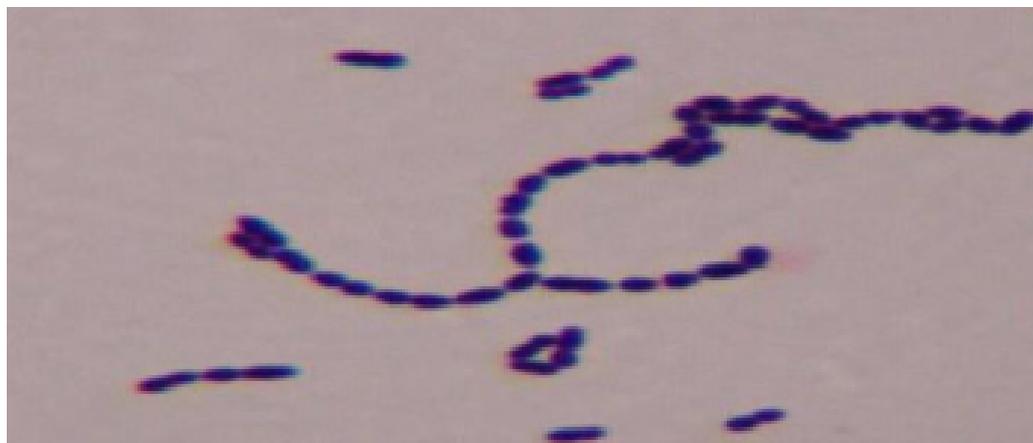
**Famille** : *Streptococcaceae*.

**Genre** : *streptococcus, enterococcus et lactococcus*.

## II .2.2 Caractéristiques bactériologiques

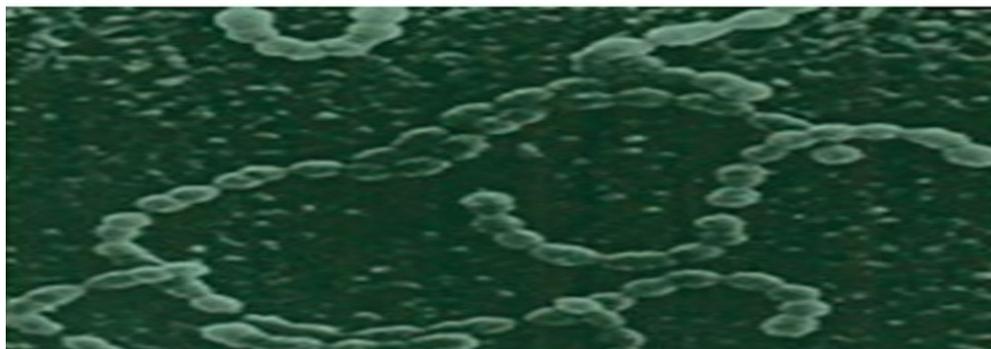
### a. Caractères morphologiques

Ce sont des bactéries sphériques groupées en paires ou en chaînes, Gram positif, non sporulé (Seghir, 2008), Ce groupe est divisé en deux sous-groupes : *Enterococcus* et *Streptococcus*. (Savado et Boubkeir, 2016).



**Figure 02** : aspect microscopique des streptocoques après coloration de Gram (Van der poll et Opal, 2009).

L'apport d'entérocoques par rapport aux coliformes consiste en leur plus grande résistance dans les eaux naturelles. Leur présence serait donc le signe d'une contamination fécale de l'eau plus ancienne (Maiga, 2005).



**Figure 03** : Photographie prise au microscope électronique montrant la forme de coques des cellules de *Streptocoque*. (Van der pollet Opal, 2009).

#### **b. Caractères cultureux :**

En bouillon, les streptocoques poussent en donnant des flocons et un dépôt au fond du tube. (Rodier, 2005), et sur gélose au sang, ils donnent de petites colonies grisâtres, translucides, en grain de semoule, entourées d'une zone d'hémolyse ou non. (Brisou et al, 2004).

#### **II.2.3 Habitat :**

La plupart des streptocoques sont des ubiquitaires, commensaux habituels des cavités naturelles des muqueuse buccale, génitale ou de l'intestin, des voies respiratoires supérieures. Colonise le rhino pharynx de 5 à 10%des adultes et 20 à 50%des enfants avec des variations saisonnières et des téguments et peuvent dans certaines circonstances devenir pathogènes pour l'homme. (Berne ,1972)

Les infections streptococciques si diverses dans leurs manifestations cliniques sont parmi les plus fréquentes et les plus sévères des infections bactériennes. (Berne ,1972)

#### **II .3 Clostridium :**

*Clostridium* est l'un des plus importants genres chez les procaryotes, dont certaines espèces sont extrêmement pathogènes pour l'homme comme *C.botulinum* et *C.perfringens* qui ont provoqués au cours de l'histoire de nombreuses épidémies.

Mais certaines espèces non pathogènes peuvent également avoir des intérêts.(Maiga, 2005)

### II. 3.1 Taxonomie

Selon la 8ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2004), les clostridiiums appartenant à la famille des Bacillacées et au genre *Clostridium*.

**Domaine (règne) :** *Bacteria*

**Division (phylum XIII) :** *Firmicutes*

**Classe :** *Clostridia*

**Ordre :** *Clostridiales*

**Famille :** *Clostridiaceae*

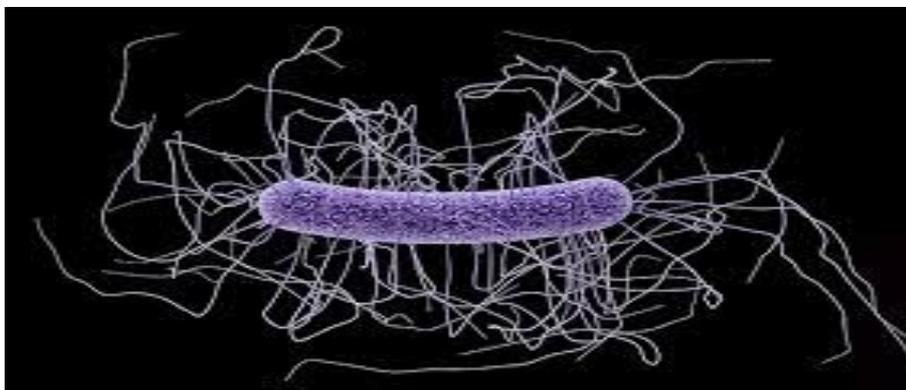
**Genre :** *Clostridium*

**Espèce :** *Clostridium difficile* – *C perfringens* – *C botulinum* – *C.tetani*

### II. 3.2 Caractéristiques bactériologiques :

#### a. Caractères morphologiques :

Les clostridium sont des bactéries à Gram positif mesurant 4 à 6 µm de long et 1 à 2 µm de large.



**Figure 04 :** aspect microscopique de *Clostridium difficile* (Delarras, 2014).

La plupart des espèces sont mobiles et possèdent des flagelles péritriches. Elles sporulent quand les conditions sont défavorables. Il existe de nombreuses espèces différentes de *Clostridium* dont le plus caractéristique est *Clostridium perfringens*. (Savadogo et Boubkeir 2016)

**b. Caractères culturels :**

Les bactéries du genre *Clostridium* poussent, soit sur boîtes de pétri placées dans des enceintes anaérobies (jarres anaérobies), soit dans des bouillons contenant des agents réducteurs. Dans ce dernier cas, la culture ne se fait qu'en profondeur. Sur gélose au sang, placée en anaérobiose, certaines espèces comme *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* et *Clostridium perfringens* donnent de grandes, ou de petites colonies, dont la plupart sont hémolytiques, et pour *Clostridium botulinum*, la culture se fait sur milieu complexe spécifique comme VF. (Delarras, 2014).

**II.3.3 Habitat :**

Elles font partie de la flore tellurique naturelle, aussi bien que dans les matières fécales humaines et animales. (Maiga, 2005). C'est pourquoi, leur utilisation en tant qu'indicateurs de contamination fécale d'une eau n'est pas très spécifique. L'intérêt de la recherche de tels indicateurs réside dans la propriété de sporuler, ce qui les rend particulièrement résistant aux traitements de désinfection. (El ouali lalami, 2014 et Helene, 2000)

# Partie Expérimentale

# Matériel et Méthode

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature de la vie et des sciences de la terre département de biologie de l'Université AKLI Mohand Oulhadj – Bouira, et au sein de laboratoire des analyses des eaux algériennes (ADE) sous la direction de Mr SAIKI et sous encadrement de Mme Rahmani.H pendant la période allant du 24/05/2021 à 24/06/2021.

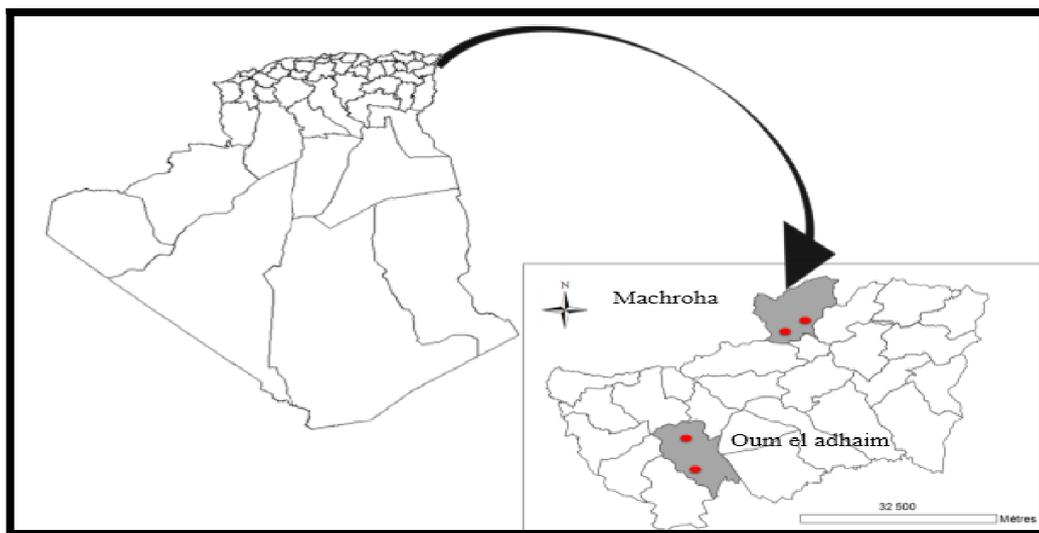
### I. Présentation de l'unité de l'ADE de Bouira :

« L'Algérienne des eaux », par abréviation « ADE » est un établissement public national à caractère industriel et commercial doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière.

L'unité de Bouira a été créée en 2003, Elle est équipée d'un laboratoire d'analyse qui contrôle la qualité de l'eau distribuée aux abonnés ainsi que les eaux des forages et les eaux stockées les réservoirs et surtout les robinets. La collecte des échantillons se fait tous les matins pour l'ensemble des centres de l'ADE de Bouira, La périodicité de cette collecte est de une à deux fois par semaine et par centre, une fois par semaine est réservée pour le contrôle de la désinfection au niveau des stations de pompage et des réservoirs

### II. Site de collecte des échantillons :

Dans le but d'élaborer une étude de la diversité des Gram positives 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 08 carte géographique).



**Figure 05:** Sites et points de prélèvement (Nord : Machroha et Sud : Oum el Adhaim) Wilaya de Souk-Ahras.

Nous tenons à signaler 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 03).

**Tableau 03 : 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

### III. Recueil des échantillons :

Les échantillons d'eau sont obtenus des puits et des forages dont la profondeur varie de 15m à 100m. 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 04).

**Tableau 04:** Origine et qualité de l'eau recueillie.

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

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.

#### IV. Analyse physico-chimique de l'eau :

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

#### V. Etude de la diversité bactérienne dans les échantillons d'eau :

##### V.1 Filtration de l'eau :

La technique de filtration sur membrane est une méthode standard internationalement reconnue pour l'analyse de qualité de l'eau (ISO 7899-2 1984). Elle nécessite un dispositif de

filtration constitué d'un support de filtre sur lequel la membrane filtrante (MF) sera posée, un entonnoir cylindrique recevant le liquide et d'une fiole réceptrice reliée à une pompe à faire le vide.

Les membranes filtrantes (MF) utilisées pour la filtration sont généralement en ester de cellulose et d'une porosité de 0,45µm ou de 0,22 µm. La MF est habituellement quadrillée afin de compter les colonies bactériennes plus facilement. On tient à préciser que la filtration est élaborée en 02 fois. (Greenlee et al, 2009).

### VI. 2 Dénombrement de la flore mésophile totale :

Les bactéries présentes dans l'échantillon à analyser sont retenues sur la MF dont les pores sont inférieurs à la taille des bactéries (pore de 0,22 µm de diamètre). La MF qui a retenu les bactéries contenues dans l'eau, est ensuite déposée sur un milieu de culture Gélose PCA qui sont favorable au développement de la flore mésophile. Après incubation, on procède au dénombrement.

Une membrane fera l'objet d'un dénombrement de la flore mésophile. Et une autre membrane sera utilisée pour finir l'isolement.

- ❖ Pour les boîtes négatives ; on récupère les membranes et les remet dans leurs flacons initiaux d'après remplis de 10 ml de TSB et 5ml de glycérol l'aide de micropipette.
- ❖ Pour les boîtes positive ou il y a des cultures on réalise le frottis et la coloration de Gram.

## VI. Isolement et caractérisation phénotypique des isolats à Gram + :

### VI.1. Isolement et purification des isolats à Gram + :

Les membranes filtrantes vont subir un lavage. Avant l'isolement, on fait l'enrichissement : A l'aide des épendorfes stériles, nous avons ajouté 500ul de liquide filtrant de chaque échantillon et 1ml de l'eau peptonées.

A partir des bouillons d'enrichissement on fait l'ensemencement nous sur les boîtes de Pétri contenant les quatre (04) milieux spécifiques :

- **M1** : viande de foie : pour la recherche de *Clostridium*.
- **M2** : Slantez : pour la recherche des streptocoques.
- **M3** : BEA : pour la recherche des Entérocoques.
- **M4** : Chapman : pour la recherche staphylocoque

On dépose sur chaque milieu (M1.M2.M3.M4) la même quantité 100 ml de chaque échantillon et on procède à l'ensemencement par la méthode de râteau. Par la suite incubé à 37°C pendant 24 heures.

L'étape suivante est faire une série de repiquage pour la purification des souches puis identifier les espèces en se basant sur l'observation macroscopique (forme –taille –pigment) et sur l'observation microscopique (état frais et coloration de gram) et confirmer par la galerie biochimique.

Après le premier ensemencement sur boîte de Pétri, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée sur les milieux de culture qui sont préparé dans des boîtes de pétrie contenant le milieu (VF ; BEA ; Chapman,) ces boîtes sont incubées à une température 37°C pendant 24h.

Les boîtes qui sont pures feront l'objet d'une conservation des souches suivit d'une identification.

### **VI.2 Caractérisation phénotypique des isolats à Gram + :**

#### **VI.2.1 L'aspect morphologique :**

##### **VI.2.1.1 L'aspect macromorphologique :**

L'observation des colonies peut être d'un grand intérêt taxonomique lorsque la culture est faite sur des milieux spécifiques faisant apparaître certains caractères propres aux espèces ex : la production de pigment. Or, ici, c'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier.

##### **VII.2. 1.2 L'aspect micro-morphologique :**

Nous faisons une observation microscopique des bactéries à l'état frais, pour voir leur mobilité. La taille, la forme et le type de regroupement des cellules bactériennes.

On dépose aseptiquement sur une lame porte-objet (propre) une goutte d'eau physiologique, puis à l'aide d'une anse de platine stérile , on prélève une colonie à partir du milieu gélosé, l'émulsionner dans la goutte, puis recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Et on fait la lecture microscopique à l'objectif (x40).

Pour vérifier la pureté des isolats et s'orienter dans le diagnostic, nous utilisons la coloration de Gram.

**Les étapes de coloration de Gram est comme suit :**

La coloration de Gram a pour but de déterminer l'aspect microscopique et la nature de sa paroi et de classer les bactéries selon leur Gram (G-, G+), leur morphologie (Cocci, Bacille, coccobacille), et leur mode d'association (en chaînette, libre).

Elle est consistée à la coloration d'un frottis à l'aide de réactifs spécifiques, en commençant par l'application du violet de Gentiane, laissé agir pendant 1 min, rincer à l'eau. On ajoute le lugol et laisser agir pendant 1min. On Rince à l'eau courante. Laver à l'eau puis à l'alcool à 95° ; rincer à l'eau. Recolorer avec la fuchsine ; laissé agir pendant 30 secondes. Rincer à l'eau courante égouttée puis sécher au-dessus de la flamme de bec bunsen. Observer au microscope à immersion après avoir déposé une goutte de l'huile de cèdre entre de la lame(x100) **(Guillaume, 2004)**

**VI.2. 2 Le test de catalase :**

L'aspect microscopique et macroscopique des colonies ne suffit pas pour identifier de façon précise les bactéries. Il faut rechercher d'autres caractères, principalement les caractères biochimiques ou métaboliques **(Guiraud, 1998)**.

La catalase est un enzyme qui décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux.



La recherche de la catalase est un teste fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif. **(Dryden, 1994)**.

Sur une lame microscopique propre, on dépose une goutte d'eau oxygénée, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette pasteurie boullée ; une colonie (ou plusieurs de la souche à tester. **(Joffin et Leryol, 2001)**.

**Observations :** Si on observe un dégagement gazeux ; on dit catalase positif.

Si on n'observe aucun dégagement gazeux ; on dit catalase négatif.

La recherche d'une catalase est un test important pour différencier les staphylocoques des streptocoques. Les staphylocoques donnent des réactions positives alors que les autres donnent des réactions négatives. **(Delarras, 2003)**.

### VI.2.3 Caractérisation biochimiques :

Après la purification, l'identification préliminaire des souches a été orientée par les résultats de la coloration de Gram, catalase, et par les caractères culturels des souches observés sur les milieux utilisés. On ensemence une macro-galerie d'identification à partir de la souche pure présentée sur une gélose Lauria Bertani.

Pour cela on prépare au préalable 5ml de suspension l'eau physiologie ayant une culture raclée sur la gélose.

Une galerie biochimique a été réalisée pour l'identification de l'espèce.

#### VI.2.3.1 Etude de la fermentation des sucres, production d'H<sub>2</sub>S et de gaz sur TSI :

On ensemence la pente par des stries puis on réalise une piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

##### Interprétation :

- Fermentation positive de Lactose : virage au jaune de la pente
- Fermentation positive de saccharose : virage au jaune de la région médiane.
- Fermentation positive de glucose : virage au jaune fond du tube
- Production de gaz : présence de bulle d'air
- Production d'H<sub>2</sub>S : noircissement du tube. (Jesene, 1998)

#### VI.2.3.2 Etude de la mobilité et de la fermentation du mannitol sur milieu Mannitol mobilité :

L'ensemencement se fait à l'aide d'une anse de platine par une piqûre centrale. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

##### Interprétation :

- Fermentation de Mannitol : virage au jaune du tube
- Présence d'une Mobilité : diffusion de part et d'autre de la piqûre centrale. (Singleton, 1999)

#### VI.2.3.3 Recherche de l'uréase et production d'indole, sur milieu urée-indole :

Ensemencer le milieu et incuber à 37°C pendant 24 heures, pour mettre en évidence la production d'indole on additionne quelques gouttes du réactif de Kovacs.

**Interprétation :**

- Production d'une uréase : coloration rose violette.
- Production d'indole :\_apparition d'un anneau rouge\_à la surface. **(Prescott, 1992).**

**VI.2.3.4 Production de VP sur milieu Clarck et Lubs :**

Ensemencer le milieu, puis incuber à 37°C pendant 24 heures on ajoute les réactifs de Voges Proskauer (VPI et VPII).

**Interprétation :**

- VP+: coloration rouge cerise du milieu. **(Le Minor et Richard, 1993)**

**VI.2.3.5 Etude de la fermentation de Lactose et glucose, et production de gaz ou de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S sur milieu Kligler-Hajna :**

On ensemence le culot par piqure et la surface inclinée par stries serrées et parallèles pour avoir une culture en nappe centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

**Interprétation :**

- Le lactose est fermenté : la surface inclinée vire au jaune.
- Le glucose est fermenté : le culot vire au jaune
- S'il y a production de gaz ; il est possible d'observer ; soit seulement quelques bulles ; soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu du fond du tube.
- Production d'H<sub>2</sub>S : Se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente. **(Singleton, 1999)**

**VI.2.3.6 Métabolisme oxydatif ou fermentatif sur milieu Hugh et Leifson :**

On ajoute 500ul de glucose à concentration 20%). Onensemencer par piqure descendant jusqu'au fond 2 tubes : 1 avec huile de paraffine et 1sans huile de paraffine avec une culture pure. .Incuber au moins 48 heures à la température optimale.

**Interprétation :**

- Oxydative : Si le tube sans paraffine est vert/ Orangé et le tube avec paraffine est vert, donc elle utilise O<sub>2</sub> et un peu acide.
- Fermentative : Si les 2 tubes sont jaunes, pas utilisation O<sub>2</sub> et très d'acide.
- Inactive : Si les 2 tubes sont verts, donc sont inactive pour le glucose et pas d'acide produit.

- Si les 2 tubes sont vert-bleu, elle est alcalinisant et on a un produit alcalin (basique).  
(Prescott, 1992).

### **VI.2.3.7 Etude de la fermentation du Glucose et l'oxydation des glucides sur milieu MEVAG :**

On a ajouté dans chaque éprouvette de contenant MEVAG et 250ul de solution aqueuse stérile de glucose à concentrations 20%. On réalise une piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

#### **Interprétation :**

Coloration jaune dans le tube. Fermentation anaérobie du glucide, cela signifie que la souche est anaérobie stricte. (Jesene, 1998)

### **VI.2.3.8 Etude de l'hydrolyse de l'esculine sur milieu à l'esculine :**

On ensemence le milieu par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur bouclé chargé de la culture bactérienne.

#### **Interprétation :**

- . Réaction positive : Noircissement
- . Réaction négative : Absence de noircissement. . (Jesene, 1998)

# Résultats et Discussion

## II Résultats et Discussion

Dans ce chapitre, nous allons nous présenter les résultats obtenus de l'étude de la flore mésophile totale ainsi que l'identification phénotypique des bactéries à Gram positive colonisant l'écosystème aquatique à l'Est de l'Algérie (Souk Ahras).

### I. Les résultats :

#### I.1. Caractéristiques physicochimiques des échantillons :

Au terme des analyses physico-chimiques des 32 échantillons de l'eau nous ont eu les informations sur le pH et la salinité de ces eaux. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (Tableau 05) ci-dessous.

**Tableau 05:** La composition chimique et la caractérisation physico-chimique de l'eau des forages de Souk-Ahras.

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

Selon les résultats obtenus par l'ADE de Souk-Ahras, nous avons remarqué que les échantillons recueillis ont un pH optimum pour la croissance des bactéries neutrophiles. Notamment, les résultats de la salinité montrent que notre niche écologique ne peut pas être un environnement favorable pour les halophiles, sachant que les halophiles nichent un écosystème caractérisé par une salinité allant de 3 à 4 M (Jiang et al, 2006). L'ensemble de ces informations nous laisse supposer que nous pouvons avoir une faible diversité des bactéries Gram positive.

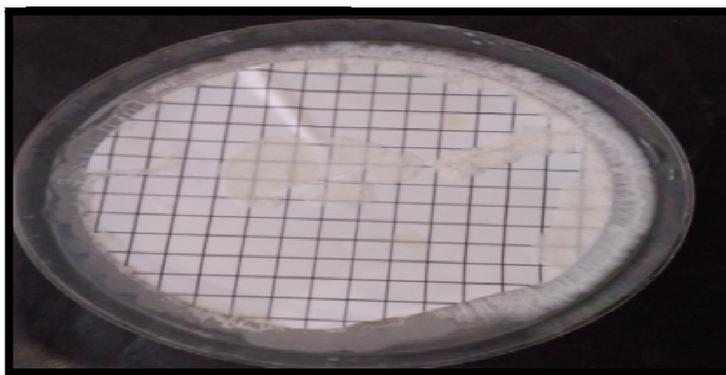
## II Résultats et Discussion

### I.2. La flore bactérienne totale de nos échantillons d'eau :

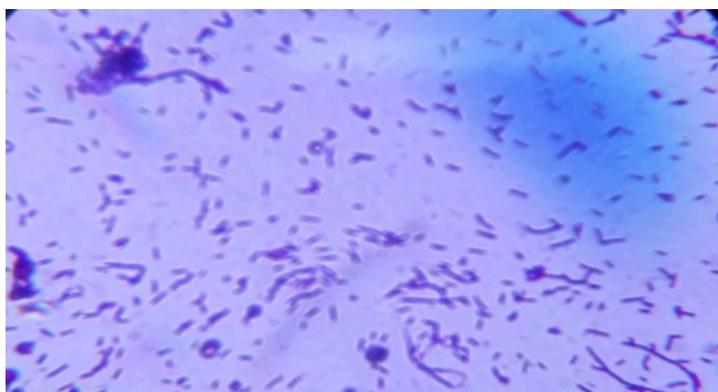
Les résultats de dénombrement de la flore mésophile totale sur milieu PCA sont représentés dans le tableau 06.

**Tableau 06:** le dénombrement de la flore totale sur milieu PCA

Isolats	Nombre	Forme	Couleur	Aspect filament
A	0. Colonies	/	/	Oui
B	11. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
C	14. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
D	2. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
E	0. Colonies	/	/	Oui
F	11. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
G	0. Colonies	/	/	Oui
H	1. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
I	4. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
J	3. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
K	4. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
L	1. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
M	4. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
N	4. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
O	6. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
P	6. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
Q	6. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
R	1. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
S	0. Colonies	/	/	Oui
T	8. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
U	0. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
V	3. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
W	1. Colonies	rondes	Jaunâtres	Oui
X	3. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
Y	2. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non
Z	1. Colonies	rondes	Jaunâtres	Non



**Figure 06 :** l'aspect colonial de quelques isolats sur milieu PCA



**Figure 07 :** l'aspect microscopique des souches ( $G \times 100$ ) avec huile d'immersion après Coloration de Gram sur milieu PCA.

Dans notre étude nous avons effectué l'isolement sur quatre (4) milieux considérer comme sélectif pour ces genres qui sont : Chapman ; BEA ; viande foie (VF) ; Slanetz et Bratley. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures ; les boite des pétries ont été examinée.

### **I.3. Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats :**

#### **I.3.1. Aspects macroscopiques des isolats :**

L'observation de l'aspects macroscopiques des isolats décrit deux types majeurs de colonies: des colonies de forme bombé, ayant un contour régulier et d'aspect très visqueux (E1 ;F1 ;M1 ;N1 ;P1 ;R1 ;S1 ;T1 ;H1 ) sur milieu Chapman et sur milieu Viande-foie et BEA, on a obtenus des colonies de forme plate ayant des contours régulier et des colonies circulaires ayant un contour régulier et un aspect lisse (I1 ;G1 ;O1) et de couleur :jaune ;blanc ;transparent et beiges),cependant sur le milieu Slantez et Bratley aucune colonie ne s'est formée.

## II Résultats et Discussion

**Tableau 07** : l'aspect macroscopique et microscopique des échantillons

Codes	Aspect macroscopique					Aspect microscopique	
	Taille des UFC	Couleur	Forme	Milieu	Gram	Forme et Regroupement	Etat frais
<b>E1</b>	Moyenne	Jaune	bombé	Chapman	+	coccobacille en amas	-
	Grand	Blanc	bombé	Vf	+	coccobacille en chaînette	-
<b>F1</b>	Moyenne	Jaune	bombé	Chapman	+	coccobacille en amas	-
<b>I1</b>	Moyenne	Blanc	plats	LB	+	coccobacille en amas	-
	Petite	Blanc	bombé	BEA	+	coccobacille en chaînette	-
	Moyenne	Beige	bombé	Vf	+	coccobacille en amas	-
<b>G1</b>	Grande	transparent	plats	LB	+	Coccobacille en chaînette	-
	Grande	transparent	plats	BEA	+	coccobacille en chaînette	-
<b>M1</b>	Moyenne	Blanc	bombé	Chapman	+	coccobacille en amas	-
<b>N1</b>	petite	Blanc	bombé	LB	+	coccobacille en amas	-
	moyenne	Beige	bombé	Vf	+	coccobacille en amas	-
<b>O1</b>	petite	transparent	plats	LB	+	coccobacille en amas	-
	petite	Blanc	bombé	BEA	+	coccobacille en chaînette	-
<b>P1</b>	grande	Beige	bombé	Chapman	+	simple bacille	+
<b>R1</b>	petite	Blanc	bombé	LB	+	coccobacille en amas	-
	petite	Blanc	bombé	VF	+	coccobacille en amas	-
<b>S1</b>	grande	Jaune	bombé	Chapman	+	coccobacille en amas	-
<b>T1</b>	petite	Jaune	bombé	Chapman	+	coccobacille en amas	-
	moyenne	Blanc	bombé	VF	+	coccobacille en amas	-
<b>H1</b>	petite	Jaune	bombé	LB	+	coccobacille en amas	-
<b>C1</b>	Moyenne	Blanc	bombé	BEA	+	Coccobacille en chaînette	-
	grande	Blanc	bombé	VF	+	coccobacille isolé	-
<b>Q1</b>	grande	Blanc	bombé	BEA	+	coccobacille en chaînette	-
<b>AB1</b>	petite	Blanc	bombé	BEA	+	coccobacille isolé	+
<b>DL2</b>	Moyenne	Blanc	bombé	BEA	+	coccobacille en chaînette	
<b>D1</b>	grande	transparent	bombé	VF	+	simple bacille	+
<b>K1</b>	Moyenne	Blanc	bombé	VF	+	simple bacille	+
<b>L1</b>	petite	Jaune	bombé	VF	+	coccobacille isolé	+
<b>R1</b>	petite	Blanc	bombé	VF	+	coccobacille en amas	-
<b>W1</b>	Grande	Jaune	bombé	VF	+	simple bacille	+
<b>Z1</b>	Grande	Beige	bombé	VF	+	simple .bacille	+
<b>Syme2</b>	Grande	Jaune	bombé	VF	+	simple bacille	+



**Figure 08 :** l'aspect colonial de quelques isolats ayant un Gram positive sur milieu VF, Chapman et BEA

### I.3.2. Aspects microscopiques des isolats :

#### ➤ Observation à l'état frais :

L'observation des bactéries à l'état frais (figure 19) montre que certains isolats sont mobiles ; tandis que d'autres sont peu mobile et présentent un mouvement Brawnien.



**Figure 09 :** l'observation de l'état frais par microscope optique à (x40 G).

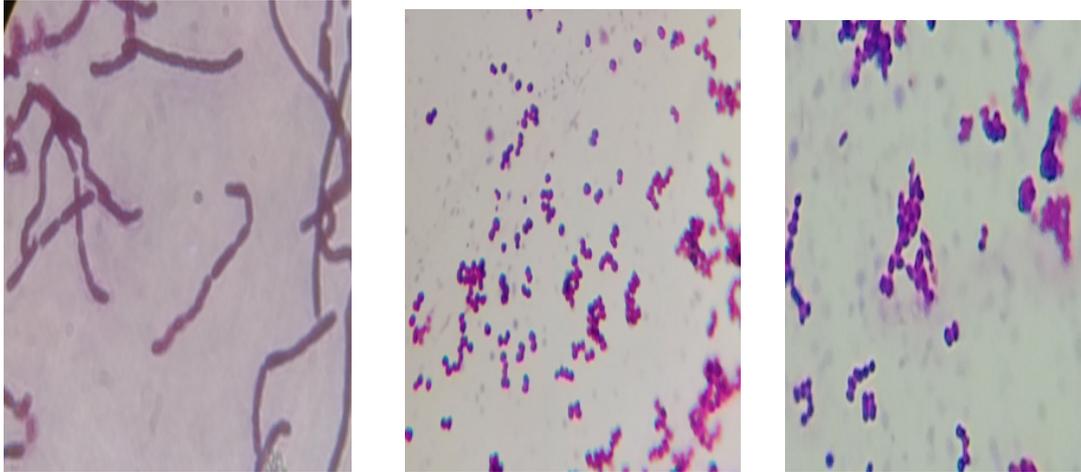
#### ➤ Observation à l'immersion :

Les résultats obtenus par l'observation des frottis colorés sous microscope optique nous a permet de distinguer une diversité formes cellulaires bactériennes de nos isolats à Gram positif. Concernant la taille et le type de regroupement de notre isolat, ces derniers sont surtout des :

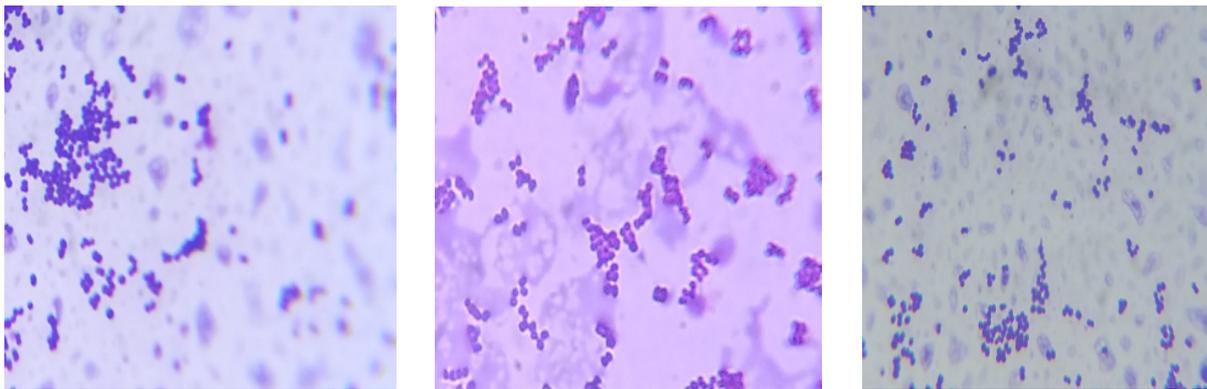
- ✓ Coccidé coloré en violet, en chaînette ou et la plupart en amas (grappe de raisin) sur le milieu. Principalement les isolats obtenus sur milieu Chapman et BEA ce qui peut nous orienter vers une présence des isolats de *Staphylococcus* ou *Streptococcus*
- ✓ Et d'autre part on a de simple bacille et coccobacille sur le milieu BEA et VF. Ces derniers peuvent être du genre *Bacillus*.

## II Résultats et Discussion

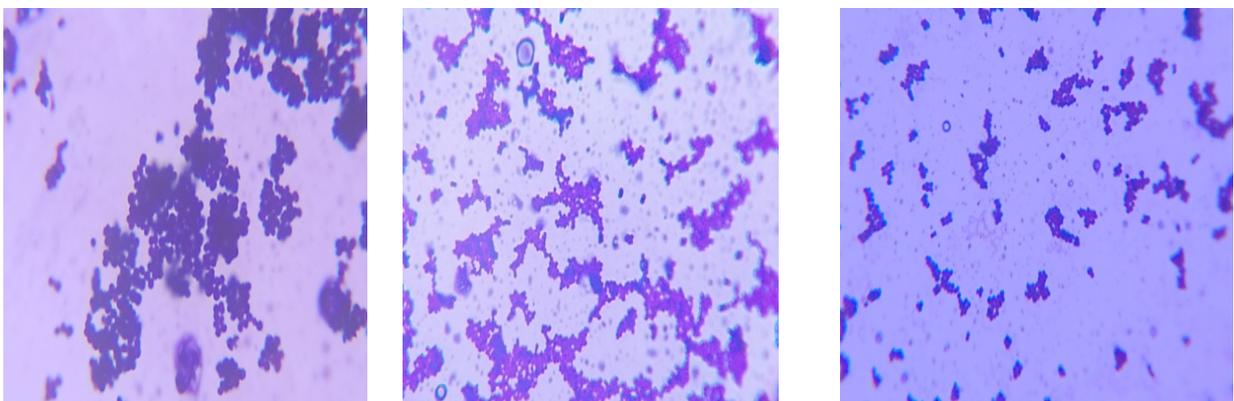
Après avoir préparé le frottis et effectué la coloration de Gram, nous avons pu observer les lames à grossissement 100.



**Figure 10** : l'observation microscopique des isolats sur milieu VF (Gx100).



**Figure 11** : l'observation microscopique de quelques isolats sur milieu Chapman (Gx100).



**Figure 12-**: l'observation microscopique (Gx100) des isolats sur milieu BEA.

### I.3.3. Diversité phénotypique des isolats à Gram+

A l'issus de la détermination des caractères biochimiques, nous avons constaté une diversité de nos isolats à Gram positifs (tableau 7).

#### I.3.3.1 Recherche de la catalase :

Au terme des testes de catalase, nous avons constaté que la majorité les isolats (22 souches) sont catalase+, et le reste (09 souches) sont des catalase -.



**Figure 13 :** L'effervescence obtenue de la réaction d' $H_2O_2$  avec la catalase bactérienne.

#### I.3.3.2 Test biochimique :

##### 1. Test Urée-indol :

Après l'ensemencement et l'incubation a 37°C pendant 24 H , on a observé l'absence une uréase négative (-)se manifestent par un virage de la couleur jaune , pour tout les souches .

Après l'ajout du réactifs Kovacs,l'ensembles des isolats testé ne dégradent pas le tryptophane ; pour cela ne produisent pas de l'indole( indole négative)



**Figure 14 :** Le résultat négatif d'indole après ajout du réactif de kovacs.

## II Résultats et Discussion

### 2. Test TSI :

Concernant les isolats issus de la purification ; le tableau (09) regroupe tous les résultats du test Triple Sugar Iron (TSI). Tous les isolats fermentent le glucose, le lactose, saccharose avec quelque isolat qui ne fermentent pas le lactose et le saccharose avec l'absence de production de gaz et éventuellement l'absence de H<sub>2</sub>S.

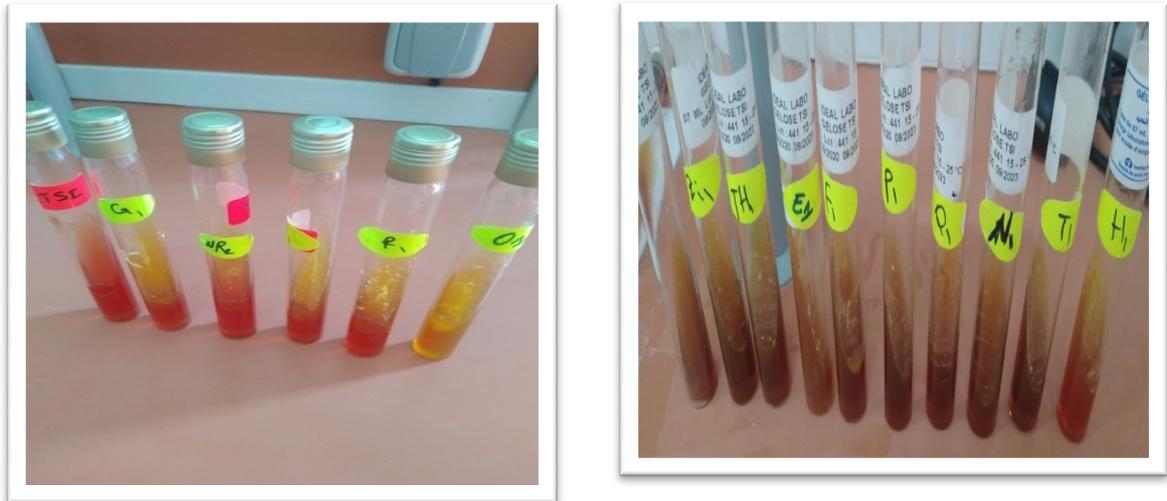


Figure 15 : Résultat observé sur le milieu du TSI

### 3. Test mannitol-mobilité :

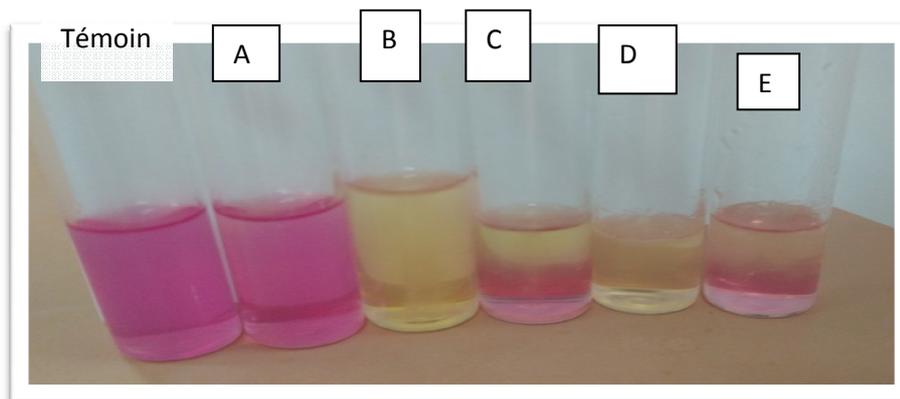


Figure 16 : Résultats de test mannitol-mobilité.

A partir de la figure : le tube (D) est mannitol positif ce qui indique que les bactéries ont acidifié le milieu qui vire alors au jaune (grâce au rouge de phénol).

## II Résultats et Discussion

En ce qui concerne la mobilité, les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement (tube B), en créant un trouble du milieu.

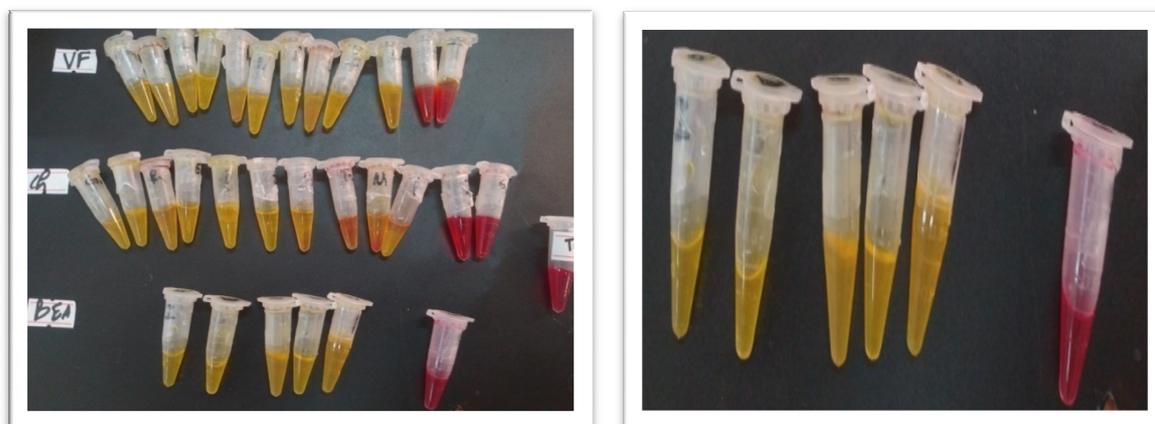
En revanche le tube (A) indiqué un résultat négatif, les bactéries immobiles persistent le long de la piqûre centrale et le milieu garde sa couleur initiale (pas de dégradation pas le mannitol).

Concernant le tube (C, E) a un mannitol positif en présence d'O<sub>2</sub>, ce qui indique que les bactéries ont acidifié le milieu dans des conditions aérobiose.

On note à partir de ce test 21 souche sont mannitol positif et 9 souches sont mannitol négatif, cependant on trouve que 20souches sont des souches mobiles et 10 sont des souches immobiles.

### 4. Milieu MEVAG :

Après l'incubation à 37°C pendant 48h, on observe une transformation de la couleur du milieu de rougeâtre à un couleur jaunâtre, se traduire par la fermentation du glucose par toutes les souches, donc le test est positive.



**Figure 17:** résultat obtenu sur le milieu de MEVAG.

### 5. Test VP :

Après 48h d'incubation ; Pour le test VP apparitions d'une coloration rouge après l'ajoute les deux réactifs du Vosges Proskaur (VP1, VP2), signifie la présence d'acétoïne et présence de fermentation du

## II Résultats et Discussion

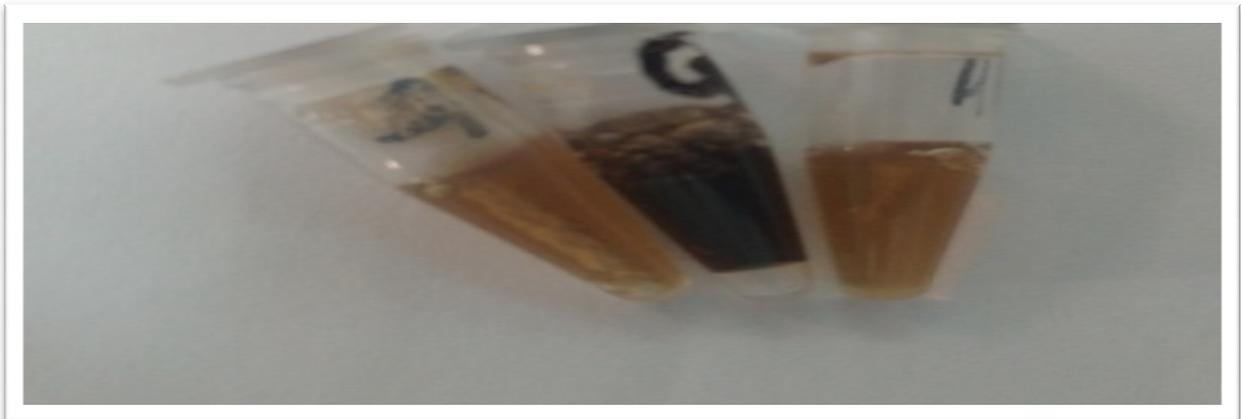
glucose par la voie butylène glycolique (de production d'acétoine), toute la souche testée est dite VP positive.



**Figure 18:** les résultats obtenu sur milieu Clark et Lubs après l'additions des réactifs VP1 et VP2.

### 6. Milieu esculine :

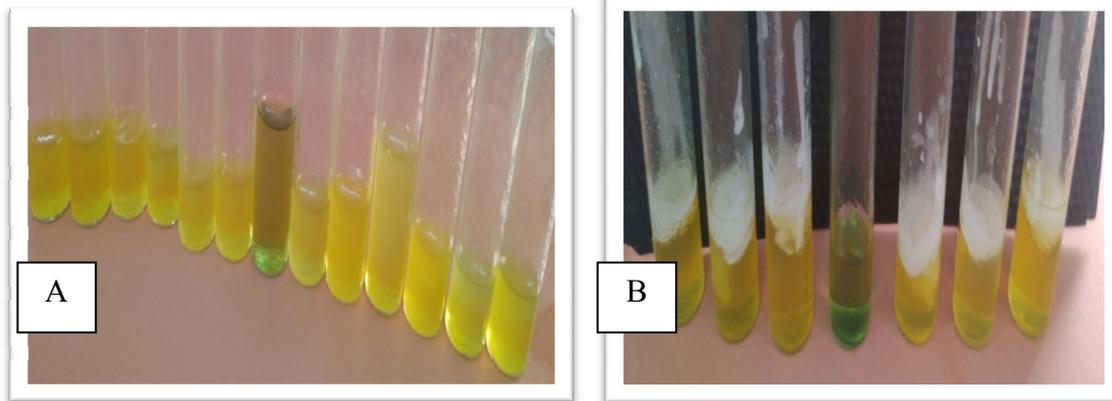
Après 24h d'incubations on observe aucun changement de couleur (reste gris) sauf la seule souche de milieu Chapman et BEA (G1) on observe noircissement qui indiqué que cette bactérie possède l'enzyme Esculinase.



**Figure 19:** Les résultats obtenus sur milieu esculine

### 7. Milieu Hugh et Leifson :

Les résultats obtenus montrent que pour les 30 souches il y a eu une acidification dans les deux tubes (le tube fermé et le tube ouvert) d'où le virage de couleur du vert au jaune et pas d'utilisation O<sub>2</sub> qui signifie que les résultats sont positifs.



A : tube aérobie sans paraffine

B : tube anaérobie avec paraffine

**Figure 20:** Mise en évidence du résultat positive du test hugh et leifson.

### 8. Milieu Kligler-Hajna :

Après l'incubation, on a remarqué Sur le milieu Kligler-Hajna, il y a eu une acidification dans la pente et le culot pour les isolats, d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec l'absence des bulles d'air et absence de noircissement donc ces souches sont : lactose (+), glucose (+), gaz (-), H<sub>2</sub>S (-). Alors que Les autres isolats sont incapables d'utiliser les deux sucres.

Pour les isolats il y a eu une acidification que dans le culot, avec l'absence des bulles d'air et absence de noircissement donc la bactérie est : lactose (+), glucose +, gaz (-), H<sub>2</sub>S (-).



**Figure 21:** Aspect du milieu Kligler-Hajna.

## II Résultats et Discussion

**Tableau 08:** les résultats obtenus sur les différents milieux(1)

Milieu	Echantillon	MEVAG	hydrolyse de l'esculine	Clack et lubs	Hugh-Liefson		Urée-indole	
					Avec huile de parafine	Sans huile de paraffine	Uréase	indole
Milieu Chapman	E1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	F1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	I1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	G1	+	+	+	Jaune	Jaune	-	-
	M1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	N1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	O1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	P1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	R1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	S1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	T1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	H1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
Milieu BEA	C1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	I1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	O1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	Q1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	AB1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	DL2	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
Milieu VF	C1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	D1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	E1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	I1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	K1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	L1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	N1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	R1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	T1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	W1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	Z1	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-
	Sym2	+	-	+	Jaune	Jaune	-	-

## II Résultats et Discussion

**Tableau 09:** les résultats obtenus sur les différents milieux(2)

Milieu	Echantillon	Catalase	SACH	Glu	Lac	H2S	Production de gaz	Mannitol	Mobilité
Milieu Chapman	E1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	F1	+++	+	+	+	-	-	+	-
	II	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	G1	-	+	+	+	-	-	+	-
	G1	-	+	+	+	-	-	+	-
	M1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	N1	+++	+	+	+	-	-	+	-
	O1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	P1	+++	+	+	-	-	-	+	+
	R1	+++	+	+	+	-	-	+	-
	S1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	T1	+++	+	+	+	-	-	+	-
H1	+++	+	+	+	-	-	+	-	
Milieu BEA	C1	-	+	+	+	-	-	+	-
	II	-	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	O1	-	-	+	-	-	-	+/aérobie	-
	Q1	-	-	+	-	-	-	+	-
	AB1	++	-	+	-	-	-	+	+
	DL2	-	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
Milieu VF	C1	-	+	+	+	-	-	+	-
	D1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+
	E1	-	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	II	+++	+	+	+	-	-	+	-
	K1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+
	L1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+
	N1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	R1	+++	+	+	+	-	-	+	-
	T1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	-
	W1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+
	Z1	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+
Sym2	+++	+	+	+	-	-	+/aérobie	+	

## II Résultats et Discussion

**Tableau 10:** les résultats d'identification des souches

Codes	Aspect macroscopique		Aspect microscopique		Identification biochimique														GENRE
	Milieu	Couleur	Gram	Regroupement	CAT	Mob	MNTL	GLU	LAC	SACCH	MVG	VP1.VP2	ESC	HUGHL	URE-INDO	H2S	P.GAZ		
E1	Chapman	Jaune	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	Vf	Blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Streptococcus	
F1	Chapman	Jaune	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
H1	LB	Blanc	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	BEA	Blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Streptococcus	
	Vf	Beige	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
G1	lb	transparent	Gram+	cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	+	jaune	-	-	-	Streptococcus	
	BEA	transparent	Gram+	cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	+	jaune	-	-	-	Streptococcus	
M1	Chapman	Blanc	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
N1	LB	blanc	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	VF	beige	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
O1	LB	transparent	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	BEA	blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	-	+	+	-	jaune	-	-	-	Streptococcus	
P1	Chapman	beige	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus	
R1	LB	blanc	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	VF	blanc	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
S1	Chapman	Jaune	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
T1	Chapman	Jaune	Gram+	Cocci en mas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	
	VF	blanc	Gram+	cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus	

## II Résultats et Discussion

<b>H1</b>	LB	Jaune	Gram+	Cocci en amas	+++	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Staphylococcus
<b>C1</b>	BEA	blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Strptococcus
	VF	blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Strptococcus
<b>Q1</b>	BEA	blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	-	+	+	-	jaune	-	-	-	Streotococcus
<b>AB1</b>	BEA	blanc	Gram+	coccobacille isolé	++	+	+	+	+	-	+	+	-	jaune	-	-	-	/
<b>/DL2</b>	BEA	blanc	Gram+	Cocci en chaînette	-	-	+	+	+	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus
<b>D1</b>	VF	transparent	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus
<b>K1</b>	VF	blanc	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus
<b>L1</b>	VF	Jaune	Gram+	coccobacille isolé	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	/
<b>W1</b>	VF	Jaune	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus
<b>Z1</b>	VF	beige	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus
<b>Syme2</b>	VF	Jaune	Gram+	simple bacille	+++	+	+	+	-	+	+	+	-	jaune	-	-	-	Bacillus

### II. Discussion

L'étude de la diversité des Gram positives qui colonisent les eaux souterraines de la région de Souk Ahras nous a permis de visualiser une grande diversité. Selon Sirisena et ses collaborateurs cette diversité peut être liée à plusieurs facteurs à savoir la chimie des eaux souterraines ; en particulier au potentiel redox et à l'impact humain (**Sirisena et al, 2013**).

D'après les résultats de dénombrement de la flore mésophile totale l'aspect colonial et l'observation microscopique après Coloration de Gram sur milieu PCA (figure 11 et 12), on a supposé que les bactéries obtenues soient des actinomycètes par rapport à leurs formes filamenteuses sous microscope et ce reste à confirmer par la méthode moléculaire. La présence des actinomycètes dans les eaux souterraines peut être possible du moment que ces espèces sont très communes dans le sol et peuvent contaminer les eaux par lessivage.

Les nombres de bactéries revivifiables à 37°C varient entre 1 et 11 colonies de couleur jaune et de forme ronde. A l'exception de 05 échantillons puisqu'ils contiennent aucune colonie. (Annexe1).

Le nombre élevé des germes revivifiables à 37°C revient à la température idéale du milieu aquatique qui favorise leur amplification, et sont provenus de la matière fécale des animaux à sang chaud. Ils représentent une quantité altérable et cela provoqué par une contamination d'origine fécale.

On se basant sur les résultats de l'identification des échantillons d'eau et les tests biochimiques on a trouvé une variation des souches (tableau 06) :

- 14 souches appartiennent au genre *Staphylococcus*
- 08 souches appartiennent au genre *Streptococcus*
- 07 souches appartiennent au genre *Bacillus*
- Et 02 souches non défini

Le dénombrement des *Staphylococcus* montre que les échantillons sont très chargés et représente un nombre égal à 14 souches (E1, F1, M1, O1, P1, S1, T1 et H1) et (R1 N1 I1). Harakeh et ses collaborateurs ont réussi à isoler des souches de *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* (**Harakeh et al, 2006**).

## II Résultats et Discussion

Les échantillons (E1, I1, C1, Q1, O1 et G1 sur les 02 milieux VF et LB) sont un peu chargé en streptocoques.

En sud d'Afrique, Moloantoa and Ateba, ont pu isoler des souches de *Streptococcus* du groupe B (Moloantoa and Ateba, 2013).

La présence de ces *Streptococcus* est directement liée à la quantité de matière fécale animale.

Les nombres des souches de *Bacillus* identifier est 07 souches (P1, DL2, D1, K1, W1, Z1 et SYM2). Günther, et ses collaborateurs ont pu identifier une souche de *Bacillus pumilus* dans les eaux souterraines contaminées (Günther et al. 1995). La présence de *Bacillus* dans les eaux peut avoir une relation directe avec la composition des eaux mais aussi aux caractères physico-chimiques de cette eaux. Sans oublié la présence des contaminants qui peuvent être d'origine animal. Dans notre présentation du site nous avons souligné que nos régions d'échantillonnages sont connues pour les activités agricoles. Ce qui corrobore avec nos résultats obtenus.

## Conclusion

Au cours de notre étude effectuée au niveau du laboratoire de l'ADE de la wilaya de Bouira durant la période allant de 20 avril jusqu'au 20 juin 2021, et la suite de stage est faite au niveau de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre, 31 échantillons ont été inclut dans cette étude dont l'objectif est d'arriver à identifier les genres bactériologiques existant dans les échantillons de l'eau.

Ce travail, nous a permis dans un premier temps de connaitre les techniques d'analyses microbiologiques adoptées par le laboratoire central de l'ADE. Il nous a permis également dans le cadre de cette mission de bien maîtriser les techniques d'analyse grâce aux nombreuses manipulations que nous avons pu faire. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux techniques d'isolement et d'identification des paramètres bactériologiques de l'eau.

Afin de déterminer la biodiversité des échantillons de l'écosystème aquatique de l'est de l'Algérie, un protocole de l'isolement et d'identification jusqu' au niveau de genre a été adopté.

En se basant sur l'aspect macroscopique, aspect microscopique et les tests biochimiques et d'après les résultats exprimés, il s'apparait une biodiversité microbienne dans plusieurs échantillons d'eau car un flacon peut contenir de 1 à 03 genres identifiés.

Grâce à cette biodiversité morphologique, nous sommes arrivés à suspecter : 14 souches qui appartiennent au genre *staphylococcus* ,08 souches de genre *streptococcus* et 7 genres de *Bacillus* et 2 souches restent non-définies grâce au manque de plusieurs tests.

### **Perspectives :**

- ✓ Confirmer l'identification des genres par des techniques plus précises et pousser l'identification des souches étudiées jusqu' au niveau espèce.

# **Références Bibliographiques**

## A

- **Accarias, S. (2014).** *Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).p212.
- **Avril,j-l,Dabernat ,et al(2000).** Bactériologie clinique.Ellips Edition Marketing SA.
- **Ayad w, (2016).**Thèse doctorat Evaluation de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux souterraines : cas des puits de la région d'el-Harrouch (wilaya de Skikda) université Badji Mokhtar – Annaba p : 19-20.

## B

- **Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsis, B., & Torres, V. J. (2017).** Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. *Pathogens and disease*, 75(1), ftx005.
- **Barraud O., Denis F., Ploy M-c (2011)** Bactériologie Médicale (2e édition largement revue et actualiséé) chapitre 36- bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies), pp : 443-474.
- **Benkaddour .N (2016),** Contribution à l'étude de l'efficacité de la graine de Moringa oleifera dans la dépollution des eaux d'Oued Safsaf, Université de Sciences de la vie et da la nature et sciences de la terre et de l'univers Abou Beker Belkaid, Tlemcen.
- **Bergey's (2004).**Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche des bactéries et de levures moisissures, Edition : Lavoisier. Paris.
- **Berne F, (1972).**Les traitements des eaux dans l'industrie pétrolière.Edition TECHNIP ,207P.
- **Berne.F, Jean.C (1991).**Traitement des eaux, Edition TECHNIP.207p.
- **Bougherira, N. (2008).** Impact des rejets industriels du complexe sidérurgique sur les eaux superficielles et souterraines dans la plaine de Meboudja. ANNABA: UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA.
- **Bouvet, Anne, Aubry-damon, Hélène, et Péan, Yves. (2004).** Émergence de la résistance aux macrolides des Streptococcus pyogenes ou streptocoques bêta-

hémolytiques du groupe A. Numéro thématique *RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES* « Résistance à la résistance », p. 154.

- **Bremond.R, Vuichard. R(1973)**, Paramètres de la qualité des eaux, Paris.
- **Brisou, P., Chamouilli, J. M., Gaillard, T., & Muzellec, Y. (2004)**. Infections à pneumocoque. *EMC-Pédiatrie*, 1(4), 410-431.

## ©

- **Chaalal W. (2019)**. Caractérisation moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de denrées alimentaires .Thèse de doctorat en Microbiologie. Oran : Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 84p.
- **Chmagh AA .et Abd Al-Abbas MJ. (2019)**. Comparison between the coagulase (coa and vwb) genes in *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *Gene Reports*, 16, 100410.
- **Cawst (2013)**. Introduction à l'Analyse de Qualité de l'Eau. Calgary, Alberta, Canada: Centre for Affordable Water and Sanitation Technology - Centre pour les Technologies d'Eau.
- **Coulais.J, (2002)**. Qualité des eaux et normes de potabilité en deux serves, Edition : des ateliers.

## ᵀ

- **Debabza M (2005)**, Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée: Analyse microbiologique des eaux des plages de la ville d'Annaba ; Evaluation de la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes, Université des sciences de Badji-Mokhtar, Annaba.
- **Degbey, C., Makoutode, M., Agueh, V., Dramaix, M., & De Brouwer, C. (2011)**. Facteurs associés à la qualité de l'eau de puits et prévalence des maladies hydriques dans la commune d'Abomey-Calavi (Bénin). *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 21(1), 47-55.
- **Dégrément. (1952)**. Mémento technique de l'eau, Première édition.
- **Delarras C. (2007)**. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Paris : Edition Lavoisier ,476p.

- **Djermakoye Moussa Moumouni (2004).** Caractéristique physicochimiques et bactériologiques et impact sur les eaux de surface et eaux souterraine. Thèse de doctorat, Université de Bamako. Mali.27-30p.
- **Delarras C. et Trebaol B. (2003).** Surveillance Sanitaire Et Microbiologique Des Eaux:Réglementation - Prélèvements - Analyses. *TEC & DOC*. 269p.
- **Delarras C. (2014).** Pratiques en microbiologie de laboratoire- recherche de bactéries et de levures-moisissures .Lavoisier
- **Denis F., Bouchiat C., Loubinoux J (2016) -** Bactériologie Médicale (3<sup>e</sup>édition)- technique usuelles-chapitre28-cocci à Gram positif-page 261-290.
- **Dryden, M. S., Keyworth, N., Gabb, R., & Stein, K. (1994).**Asymptomatic food handlers as the source of nosocomial salmonellosis. *Journal of hospital infection*, 28(3), 195-208.

## E

- **El Ouali Lalami A. (2014)** et Al. Contrôle de la qualité microbiologique des eaux usées domestiques et industrielles de la ville de Fès au Maroc ; *J. Mater. Environ. Sci.* 5 2325-2332 ; ISSN : 2028-2508 ; (S1) (2014).
- **Edberg, SC., Rice EW, Karlin. RJ et Allen, MJ. (2000).** *Escherichia coli*: the best biologicaldrinking water indicator for public health protection. *Journal of AppliedMicrobiology*, 88: 106S-116S.4
- **Edeline F, (1988),** L'épuration biologique des eaux résiduaires : Théorie et Technologie. 3ème édition, 170-201p, Technique et Documentation, Paris, France, 1988.

## G

- **Garnier, F. (2012).** Contribution à l'évaluation biogéochimique des impacts liés à l'exploitation géothermique des aquifères superficiels. Expérimentations et simulations à l'échelle d'un pilote et d'installations réelles. Orléans: école doctorale Sciences et Technologies, Université d 'Orléans.

- **Ghernaout B. (2013).** Prévalence du portage nasal de staphylococcus aureus : son rôle dans l'infection du site opératoire. Thèse de Doctorat. Université AboubekrBelkaïd Tlemcen .197pp
- **Ghizellaoui S. (2010)** Thèse de magister en chimie analytique et traitement des eaux, Evaluation de la qualité des ressources en eau alimentant la ville de Constantine, prévision de la demande en eau à l'horizon, p 13-24.
- **Greenlee et al. (2009)**Dow Water & Process Solutions, FILMTECTM Reverse OsmosisMembr. Tech. Man.
- **Grosclaude.G(1999).**Un point sur l'eau.Tom 2 usages et polluantes.ED .INRA.Paris.P210.
- **Guentri.S, Rahmania .F, (2015).** « Contribution à la connaissance de la remontée et la pollution des eaux », Edition : universitaires européennes.
- **Guillaume P.Y. (2004).** Les milieux de culture en microbiologie. Adresse URL : <http://py.guillaume1.free.fr/microbiologie.htm>,consulté le 03 octobre 2005
- **Guiraud J-P. (1998).** Microbiologie alimentaire. *Dunod.* 651p.
- **Günther, K., Schlosser, D., & Fritsche, W. (1995).** Phenol and cresol metabolism in *Bacillus pumilus* isolated from contaminated groundwater. *Journal of basic microbiology*, 35(2), 83-92.

## H

- **Hannachi, A., Gharzouli, R., & Tabet, Y. D. (2014).** Gestion et valorisation des eaux usées en Algérie. *LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782*, (19).
- **Hamed, et al, (2012).** Thèse d'Ingénieur d'état en Biologie .Etude des propriétés physicochimiques et bactériologiques de l'eau du barrage DJORF-TORBA, Université des sciences et technologies département des sciences (Bechar).
- **Harakeh, S., Yassine, H., Hajjar, S., & El-Fadel, M. (2006).** Isolates of Staphylococcus aureus and saprophyticus resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment. *Marine pollution bulletin*, 52(8), 912-919.
- **Hélène (2000).** Thèse d'Ingénieurs du génie sanitaire Qualité microbiologique des eaux brutes distribuées par BRL, l'Ecole Nationale de la Santé Publique de Langue doc Roussillon(France), p: 81.
- **Haslay. C, Leceler H, (1993)** « Microbiologie des eaux d'alimentation », 101-107 p.

- **Heart T. Shears P. (2006).** Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion.
- **Hennekinne JA. (2009).** *Nouvelles approches pour la caractérisation des toxoinfections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive.* Thèse de Doctorat en Agronomie. Paris : Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'environnement, 183p.
- **Hivony. S., Razanamparany. B et Rakotomalal. J. (2015).** Caractères physicochimiques et bactériologiques de l'eau de consommation (puits) de la commune rurale d'antanifosty, région vakinankaratra, madagascar. Larhyss Journa, n°24 : 7-17.
- **Hospitalier-Rivillon J, Poirier R(2008)** - L'eau destinée à la consommation humaine : Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement ; 69 : 496-505p.

## J

- **Jean- claude.B (1983).** Contrôle des eaux douces et de consommation humaine, Edition Ed. Techniques ingénieur, pp2-8.
- **Jiang, L., Chen, X., & Chen, Y. Z, Li, Z. R., Lin, H. H., Han, L. Y. (2006).** PROFEAT: a web server for computing structural and physicochemical features of proteins and peptides from amino acid sequence. *Nucleic acids research*, 34(suppl\_2), W32-W37.
- **Joffin J.N. et Leyral G. (2001).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3ième éditions. *Biologie technique*, 58. ; CRDP d'Aquitaine ; page : 230. des aliments. Paris : T 1, Tec et doc Lavoisier.

## K

- **Kahoul. M et Touhami. M (2014).** Evaluation de la qualité physico-chimique des eaux de consommation de la ville d'Annaba (Algérie), Larhyss Journal, n°19 : 129-138.
- **Kherifi et Bekiri, (2017)** .Les maladies à transmission hydrique en Algérie. Journal Algérien des régions aride : 10 Bouira.

## L

- **Lebleu Nathalie (2007).** Désinfection des eaux par procédés membranaires : Etude des mécanismes de transfert des bactéries. Thèse de l'Université de Toulouse III– Paul Sabatier.
- **Le Minor, L., & Richard, C. (1993).** *Yersinia. Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries.* Institut Pasteur, Paris, France, 129-135.
- **Larpent JP (2010).** *Staphylococcus aureus.* France : Editions documentation et technique, Lavoisier, 279p.
- **Larry M.Bush(2020)** , Présentation des bactéries, LE MANUEL MSD VERSION POUR LE GRANDE PUBLIC ,  
[https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/infections\\_bact%C3%A9riennes-pr%C3%A9sentation/pr%C3%A9sentation-des-bact%C3%A9ries](https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/infections_bact%C3%A9riennes-pr%C3%A9sentation/pr%C3%A9sentation-des-bact%C3%A9ries)
- **Lays C (2012).** *ARN régulateurs de Staphylococcus aureus : Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques.* Thèse de doctorat en Microbiologie Modélisation. Lyon : Université Claude Bernard, 214p.

## M

- **Maiga (2005)** Qualité organoleptique de l'eau de consommation produite et distribuée par l'EDM.SA dans la ville de Bamako : évaluation saisonnière, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali p77
- **Masmoudi-A, (2011).** Effet de la salinité des eaux et la fréquence d'irrigation sur le sol et le végétal. Université Mohamed Khider – Biskra. P 61.
- **Meddour R., Misseraoui A., Laaref A., Benjedah., A (2020).** La classification bactérienne. 10.13140/RG.2.2.10384.43526
- **Merabet S. (2010).** Evaluation de la qualité physico-chimique des eaux brutes et distribuées au barrage réservoir de Béni Haroun Mémoire de magister, Université Mentouri ,Constantine.4-7p.
- **Moloantoa, M., & Ateba, C. N. (2013).** Isolation of group B streptococcus in groundwater in the North West Province, South Africa. *Life Sci. J*, 10(3), 444-449.
- **Monjou (1997).** Les pathologies d'origine hydrique et la potabilité de l'eau, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Les Cahiers du MURS n°33 - 2ème trimestre. Paris.

- **Mokeddem K , Ouddane S,(2005).**Qualité physico-chimique ET bactériologique de l' eau de source Sidi Yaakoub( Mostaganem),Mémoire d'ingénieur institut de biologie Mascara ,pp18-22.
- **Murdoch, D.A. (1998).**Gram+,anaerobicocci. *Clinicalmicrobiologyreviews*, 11(1), 81-120.

## N

- **Naili DS. Et MezianiN(2019).***Etude du portage de Staphylococcus aureus chez les animaux de rentes et leur implication dans les mammites.* Thèse de doctorat en Médecine vétérinaire. Blida : Institut des sciences vétérinaires ,45p.

## O

- **Ouahchia C et al. (2015) ;** Qualité bactériologique de l'eau potable des différents réservoirs et] chez les consommateurs de la commune de Tipaza alimentes par la station de Sidi Amar a partir de l'eau de surface du lac-arrage de Boukourdane. Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n°23, September 2015, p. 139-154.

## P

- **Parlet CP., Brown MM. et Horswill AR. (2019).** Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. *Trends in microbiology*, 27(6), 497-507.
- **Pedrôs-auô C, Guerrero R., (1994).** Prokaryotology for the limnologist. In: MARGALEF R. [éd.], *Limnology now: a paradigm of planetary problems*, p. 37-57.
- **Pelmont J., (1993).** Bactéries et environnement- Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble, 899 p.
- **Prescott H.K. (1992).**Microbiologie, (De boeck université).
- **Prescott Willey. Sherwood Woolverton.(2013).** Les bactéries : les Gram-positives à faible teneur en G+C dans l'ADN.*In : Microbiologie.* Bruxelles: Edition De Boeck supérieur ,551-1070p.

- **Prescott Willey, Sherwood, Woolverton.(2018).** Les bactéries : les Gram-positives à faible teneur en G+C dans l'ADN.*In : Microbiologie.* Bruxelles: Edition De Boeck supérieur ,40-50p.

## B

- **Rejsek F, (2002) :** Analyse des eaux- Aspects réglementaires et techniques, biologie technique CRDP d'aquitaine p : 358
- **Rodier, J. (1976).** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer.8 édition. Paris., France.: DUNOD.
- **Rodier, J., B., L., N., M., R, B., C., M. J., P., L., et al. (1996).** L'analyse de l'eau. 9ème Ed. France.: Dunod.
- **Rodier (1984).** L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eaux de mer, 7 ème édition Dunod. Paris.
- **Rodier J., 2005.** L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eau de mer. 8eme édition: Dunod, Paris.
- **Rodier (2009).** L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux résiduaires, Eau de mer, 9 ème édition Dunod. Paris.

## S

- **Savado M., et Boubkeir Y (2016) ;** Mémoire de Master, Isolement et Etude de quelques Entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug à Constantine.
- **Seghir K (2008),** Thèse de Doctorat En Géologie Appliquée Vulnérabilité à la pollution protection des ressources en eaux et gestion active du sous-système aquifère de Tébessa Hammamet (Est Algérien), Faculté des Sciences de la Terre de Badji Mokhtar, Annaba, 2008.
- **Singleton, P. (1999).** Bactériologie (cours 2 ème cycle). *Dunod, 4 eme édition, Paris,* 330-351.
- **Sirisena, K. A., Daughney, C. J., Moreau-Fournier, M., Ryan, K. G., & Chambers, G. K. (2013).** National survey of molecular bacterial diversity of New Zealand groundwater: relationships between biodiversity, groundwater chemistry and aquifer characteristics. *FEMS microbiology ecology*, 86(3), 490-504.

## T

- **Touaitia R. (2016).** *Staphylococcus aureus résistant à la méticilline : Emergence et mécanismes de résistance.* Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar, 106-125p.
- **Tourab H. (2013).** Contribution à l'étude de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux souterraines dans la plaine du Haouz, Université des Sciences et Techniques Cadi Ayyad, FST Marrakech (Maroc).

## V

- **Varshney JP., Kapur MP. et Sharma A.(1993).** Studies on somebiochemicalcharacteristics of *Staphylococcus aureus* of buffalo mammaryorigin. *Comparative Immunology, Microbiology and InfectiousDiseases*, 16(4), 317-321.
- **Van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009).** Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*, 374(9700), 1543-1556.
- **Vierling (2003),** Aliment et boisson-Filière et produit, 2 ème édition DOIN éditeurs. Centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine, p: 11-270.
- **Villers, J., Squilbin, M., & yourassowsky, C. (2005).** **Qualité** physicochimique et chimique des eaux de surface. . Institut Bruxellois pour la gestion de l'environnement.

## W

- **Walana W., Bernard PB., Eugene DK., Samuel A., Vicar KE., Iddrisu BY., Alhassan AM. et Juventus BZ. (2020).** *Staphylococcus aureus* nasal carriage among health care workers, inpatients and care takers in the Tamale Teaching Hospital, Ghana. *Scientific African*, 8, e00325.
- **WHO (Word Health Organization) (1994).** Guidelines for drinking-water quality. fourth edition.Geneva. 564p.

# **Les annexes**

## Annexe

### Composition des milieux de culture (pour 1L d'eau distillé)

#### Gélose PCA

Tryptone 5,00 g

Extrait autolytique de levure 2,50 g

Glucose 1,00 g

Agar agar bactériologique 12,0 g

PH  $7,0 \pm 0,2$

#### Milieu BEA (Bile Esculine Azide)

Tryptone 17g

Peptone 3g

Extrait de levure 5g

Bile de bœuf déshydratée 10g

Nacl 5g

Esculine 1g

Citrate d'ammonium ferrique 0.5g

Azoture de sodium 0.15g

Agar 15g

PH 7.1 à 25°

#### Milieu Chapman

Formule (en gramme par litre d'eau distillée)

Extrait de viande de bœuf 1g

Peptone 10g

Mannitol 10g

Chlorure de sodium 75g

Rouge de phénol 0,025g

Agar 15g

#### Milieu de slantez et bratley

Tryptose 20g

Glucose 2g

Extrait de levure 5g

Hydrogène o phosphate di potassique 4g

Azoture de sodium 0.4g

Agar agar 8à18g

### **Milieu viande-foie (VF)**

Meatliverbase 20g/l

D (+) Glucose 0,75g/l

Starch 0,75g/l

Sodium sulfite 1,2g/l

Ammonium ferricitrate 0,5g/l

Agar 11g/l

### **Gélose LB**

Peptone 20g

Extrait de viande 2g

Chlorure de sodium 2,5g

### **Milieu urée –indole**

L. Tryptophane 3g

Phosphate mono potassique 1g

Phosphate dipotassique 1g

Chlorure de sodium 5g

Urée 20g Alcool à 95° 10ml

Rouge de phénol en solution 2,5ml

### **Milieu mannitol –mobilité**

Peptone pancréatique de viande 20g

Agar-agar : 4g Mannitol 2g

Nitrate de potassium 1g

Rouge de phénol 4ml

### **Gélose TSI**

Extrait de viande de bœuf 3g

Extrait de levure 3g  
Peptone tryptique 20g  
Chlorure de sodium 5g  
Citrate ferrique 0,3g  
Thiosulfate de sodium 0,3g  
Lactose 10g  
Glucose 1g  
Saccharose 10g  
Rouge de phénol 0,05g  
Agar 12g  
Ph 7,4

**Milieu Clark et Lubs**

Peptone tryptique de viande 5g  
Phosphate bipotassique 5g  
Glucose 6g  
Ph 7

**Milieu Kligler-Hajna (pH=7,4-7,5).**

Extrait de viande de bœuf 3g  
Extrait de levure 3g  
Peptone (riche en lysine) 20g  
NaCl 5g  
Citrate ferrique 0,3g  
Thiosulfate de sodium 0,3g  
Lactose 10g  
Glucose 1g  
Rouge de phénol (solution à 1%) comme indicateur du Ph5mAgar 12g

## Résumé

Nous avons effectué une recherche dans le thème : isolement et caractérisation phénotypique des bactéries à Gram positive colonisant l'écosystème aquatique à l'Est de l'Algérie au sein de laboratoire de l'ADE de la wilaya de Bouira et la suite de stage est faite au niveau de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre, 32 échantillons ont été inclut dans cette étude.

Pour arriver à identifier de façon précise les genres bactériens existant dans les échantillons de l'eau, il faut en premier lieu avoir le nombre exact de la flore la flore d'origine sur gélose PCA. Puis on a passé à l'isolement et la purification des souches bactériennes à Gram sur quatre (04) milieux spécifiques : VF – BEA – Slantez- Chapman.

Et puisque l'aspect microscopique et macroscopique des colonies ne suffit pas pour identifier de façon précise les bactéries, on a réalisé les tests biochimiques ou métaboliques.

D'après les résultats, on a trouvé une variation des souches : 14 souches du genre *Staphylococcus*, 08 souches du genre *Streptococcus* et 07 souches appartiennent au genre *Bacillus*. Cette variation indique qu'il y a une charge bactérienne importante,

**Mots clés :** analyses bactériologiques, écosystème aquatique, Gram positive, isolement, identification.

### ملخص

أجرينا بحثاً في الموضوع: العزل والتوصيف الظاهري للبكتيريا موجبة الجرام التي تستعمر النظام البيئي المائي في شرق الجزائر في مختبر ADE بولاية البويرة ويتم إجراء بقية التدريب على مستوى المختبر بكلية علوم الطبيعة الحياة وعلوم الأرض، تم تضمين 32 عينة في هذه الدراسة. لتحديد الأجناس البكتيرية الموجودة في عينات المياه بدقة، من الضروري أولاً الحصول على العدد الدقيق للنباتات والنباتات الأصلية على أجار PCA. ثم انتقلنا إلى عزل وتنقية سلالات الجرام البكتيرية على أربع (04) وسائط محددة: VF - BEA - SLANTEZ - CHAPMAN.

ونظراً لأن المظهر المجهرى والعيانى للمستعمرات لا يكفي لتحديد البكتيريا بدقة، فقد تم إجراء اختبارات كيميائية حيوية أو أيضية. وفقاً للنتائج، تم العثور على تباين في السلالات: 14 سلالة من جنس *Staphylococcus*، و 08 سلالات من جنس *Streptococcus* و 07 سلالات من جنس *Bacillus*. يشير هذا الاختلاف إلى وجود حمولة بكتيرية كبيرة.

**الكلمات المفتاحية:** التحليلات البكتريولوجية، النظام البيئي المائي، موجبة الجرام، العزلة، التحديد.

### Abstract

The aim of our investigation is to isolate and carry out the phenotypic characterization of Gram positive bacteria from aquatic ecosystem in eastern Algeria. Our investigation were carried in the laboratory of the ADE of the wilaya of Bouira and at the Faculty of Natural and Life Sciences and Earth Sciences, Thirty-two samples were included in this study.

To be able to accurately identify the bacterial genera existing in the water samples, it is first necessary to have the exact number of the original flora and flora on PCA agar. We then proceeded to the isolation and purification of the Gram bacterial strains on four (04) specific media: VF - BEA - Slantez- Chapman.

Since the microscopic and macroscopic appearance of the colonies is not sufficient to identify the isolate strains,, biochemical or metabolic tests were carried out.

According to the results, a variation of the strains was found: 14 strains of the genus *Staphylococcus*, 08 strains of the genus *Streptococcus* and 07 strains of the genus *Bacillus*. This variation indicates that there is a significant bacterial load.

**Key words:** bacteriological analyzes aquatic ecosystem, Gram positive, isolation, and identification.