

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AMENAGEMENT DU LITTORAL

I S M A L

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Universitaires Appliquées
en Sciences de la Mer

Option : *Microbiologie*

Thème :

CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE DU SITE DE AIN BENIAN

Présenté par : Melle BOUZID Mounia

Soutenu devant la commission d'examen des DEUA (1995/1996)

Rapporteur : H. Merabtine

A mon père Mr BOUZID BELKACEM sans qui ce mémoire n'aurait pas pu se réaliser

Toute ma gratitude pour toute l'aide qu'il a pu m'apporté

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans la précieuse aide d'un grand nombre de personnes que je tiens à remercier aujourd'hui .

Mes sentiments vont tout d'abord à ma grande amie et confidente Mme MERZOUG ASSIA qui à toujours été là pour me soutenir, revoir et corriger ce présent travail pour mettre en forme et en ordre ce qui n'était parfois qu'un brouillon.

Plus particulièrement aussi j'adresse mes remerciements à Mr OULD HOCINE BOUZID qui m'a beaucoup aidé et dirigé.

A Mr MATOUK YUCEF pour toute l'aide précieuse qu'il m'a apporté.

Sans oublié Mme Refès N., Mr Bouali B., Mr Bouslimane D. qui m'ont aidé a réaliser ce travail.

Toute ma gratitude aussi pour tous ceux qui ont apporté leur soutien de prés où de loin tout au long de ce travail aussi bien sur le plan moral que matériel.

Ma famille, mes collègues, mes amis Nada, Boubou, Samira, Meriem, Djamel, Samir, Maya et plus particulièrement Mr OUKID RAMDANE.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. GENERALITES	3
1.1 La pollution bactérienne marine	3
1.2 Origine de la pollution	5
1.3 Dynamique des pollutions microbiennes en mer	5
1.4 Facteurs d'auto-épuration de l'eau de mer	6
1.5 Résistance et survie	7
1.6 Risques encourus par la baignade	7
1.7 Les indicateurs microbiologiques	9
1.8 Les germes indicateurs de pollution fécale	10
1.8.1 Les coliformes totaux	10
1.8.2 Les coliformes fécaux	10
1.8.3 Les streptocoques fécaux	11
1.9 Les germes pathogènes	11
1.9.1 Les salmonelles	11
1.9.2 Les vibrions	12
1.9.3 Les staphylocoques	13
1.10 Les paramètres physico-chimiques	14
1.10.1 La température	14
1.10.2 L'oxygène dissous	14
1.10.3 Le potentiel d'hydrogène	15
1.10.4 La salinité	15
2 MATERIEL ET METHODES	
2.1 Matériel	16
2.1.1 Présentation du site	16
2.1.2 Choix des points de prélèvements	18
2.2 Méthode d'étude	18
2.2.1 Techniques d'étude des paramètres physico-chimiques	20
2.2.2 Mode opératoire d'une analyse bactériologique	20
2.2.2.1 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux et totaux	20

2.2.2.2 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	22
2.2.2.3 Techniques d'étude des germes pathogènes	24
2.2.2.3.1 Les salmonelles	24
2.2.2.3.2 Les vibrions	27
2.2.2.3.3 Les staphylocoques	32
2.2.3 Etude de l'origine de la pollution	34
2.2.4 Evaluation et traitement statistique des résultats	35
 3 RESULTATS ET INTERPRETATION	
3.1 Les niveaux de contamination bactérienne dans le site d'étude	37
3.1.1 Les indicateurs fécaux	37
3.1.2 Les germes pathogènes	41
 4 DISCUSSION ET CONCLUSION	
4.1 Etude du rapport coliformes fécaux / streptocoques fécaux (CF/SF)	42
4.2 Résultats de l'étude statistique : méthode de la distribution lognormale	44
 5 CONCLUSION GENERALE	48
 BIBLIOGRAPHIE	
 ANNEXES	

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les dangers croissants que les pollutions de toutes sortes font courir aux sites marins, aux animaux, et végétaux qui les peuplent, et en définitive à l'homme, font depuis longtemps l'objet des préoccupations des milieux scientifiques.

L'importance de la pollution microbienne des eaux du littoral méditerranéen est un fait maintenant établi. Il est généralement admis que dans les lieux de baignade aménagés le risque de maladie associé à la baignade est essentiellement déterminé par la densité des baigneurs, en particulier si le renouvellement de l'eau, et la désinfection sont insuffisantes. Par contre dans les lieux de baignade naturels, il est probable que les germes pathogènes portés par les baigneurs eux-mêmes ont une influence négligeable sur les risques sanitaires à l'exception de certains agents pathogènes cutanés et oculaires.

L'activité antibactérienne de l'eau de mer a été pendant très longtemps considéré comme responsable de la disparition des micro-organismes entériques. Or, des recherches récentes montrent que certaines bactéries rejetées par les eaux usées des agglomérations, responsables des maladies humaines graves, peuvent s'adapter au milieu marin et non y mourir comme on le pensait dans le passé (GAUTHIER, BREITTMAYER; 1991), d'où la nécessité d'une surveillance continue des plages.

Dans le même ordre d'idée, le présent travail consiste en une analyse bactériologique de l'eau de mer au niveau de Ain Benian. Six stations ont été choisies selon la présence éventuelle d'un égout; les trois premières font l'objet de ce travail.

Cette étude a consisté, selon les normes OMS / PNUE, (1995) à dénombrer les germes témoins de contamination fécale par la méthode des tubes multiples, ainsi que la recherche systématique des germes pathogènes (salmonelles, vibrions, et staphylocoques).

GENERALITES



1. GENERALITES

1.1 LA POLLUTION BACTERIENNE MARINE

Comme tous les écosystèmes, la mer possède sa propre microflore. Cette microflore est constituée de germes adaptés à un milieu spécifique. C'est-à-dire, une température moyenne de 15°C, une salinité d'environ 35-36‰ et un milieu nutritif dilué. Les germes les plus fréquents sont les *Pseudomonas*, les *Achromobacter*, les *Acinetobacter*, les *Flavobacterium*, les *Serratia*, les *Vibrions* et les *Cellvibrio*.

A cette microflore, s'ajoute près de la côte, les bactéries apportées par les eaux usées qui se déversent directement dans la mer où ont été transporté par les fleuves rivières et oueds. La charge bactérienne des eaux usées qui arrive en mer est toujours très importante. Elle est en moyenne de plus de 10^9 à 10^{10} / litre (GAUTHIER, 1989).

La population bactérienne des eaux usées est constituée en majorité des germes du tube digestif de l'homme et des animaux homéothermes qui sont commensales ou opportunistes comme le cas du représentant le plus connu : *Escherichia coli* qui est pathogène pour les enfants et les personnes âgées, il est classé dans le groupe des Coliformes Fécaux.

Un autre groupe de germes est également bien représenté dans les fèces, ce sont des Streptocoques qui sont en grande partie dénués de pathogénicité pour l'homme et sont très abondants dans les eaux usées [2 à $5 \cdot 10^8$ / litre] (GAUTHIER, 1989).

Les eaux usées transportent aussi des germes ou organismes pathogènes tels que :

- les leptospires pathogènes.
- Les champignons pathogènes : *Candida*.
- Les oeufs de métazoaires parasites.

L'eau de mer va recevoir également des micro-organismes qui vivent dans le sol, transportés par les ruissellements des pluies (fig. 1).

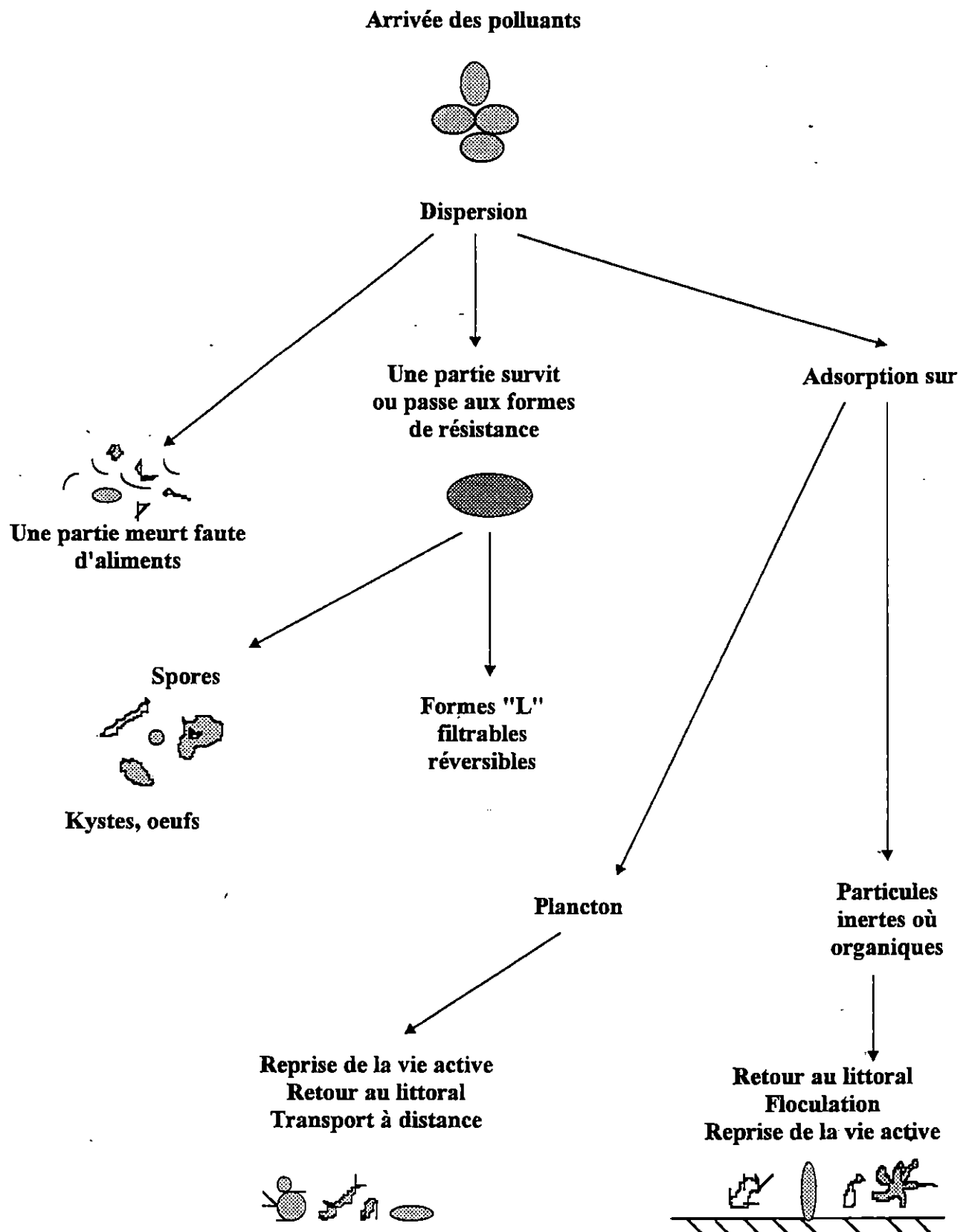


Figure 1 : Devenir des microbes polluants dans la mer d'après Brisou, (1978).

1.2. ORIGINE DE LA POLLUTION

Les eaux fluviales constituent un des éléments majeurs de la pollution marine. Les fleuves sont contaminés par les eaux usées des villes qu'ils traversent, leur charge polluante est souvent massive.

Ces eaux vont contenir des polluants de différentes natures ménagères, comme les eaux de toilettes, les détergents et les matières organiques. Elles vont charrier, les eaux usées des différentes industries établies dans les villes. Et enfin les polluants des exploitations agricoles, qui peuvent être organiques ou chimiques tels que les engrais et les pesticides. Des déversements des déchets divers, provenant des navires sont également évacués dans la mer. Toute cette gamme de polluants finit par arriver à la mer qui se transforme en dépotoir.

1.3 DYNAMIQUE DES POLLUTIONS MICROBIENNES EN MER

Les micro-organismes, ont tendance à se fixer sur les particules minérales ou organiques en suspension dans l'eau. Leur dispersion est alors, fonction de la taille de la particule. Les fractions les plus lourdes sédimentent près des points de rejet, alors que les fractions les plus légères sont entraînées en surface vers le large, 98% de la charge bactérienne (GAUTHIER, 1976). C'est pour cela que l'on observe la plus forte pollution bactérienne en surface.

Le nombre de bactéries se trouvant initialement dans les eaux usées (2-3 millions de micro-organismes / litre) diminue plus vite que ne prévoient les phénomènes de dispersion, ce qui a amené à penser à l'existence d'une auto-épuration de l'eau de mer (GAUTHIER, 1976).

1.4. FACTEURS D'AUTO EPURATION DE L'EAU DE MER

La présence d'un facteur bactéricide dans l'eau de mer n'a jamais été confirmée, pourtant, l'expérience montre que les bactéries pathogènes terrestres sont détruites après des temps de survie plus ou moins longs, allant de 24h à plus d'une semaine (GAUTHIER, 1976). Les principaux facteurs de l'épuration dans le milieu marin seraient les suivants :

- La sédimentation des particules se combinant à l'adsorption des micro-organismes sur les sédiments marins.
- Les radiations ultra violettes qui n'interviennent cependant que sur la couche superficielle de la mer (15 à 20 cm d'épaisseur).
- L'oxygénation qui a une influence épuratrice favorisée par les courants et les vagues. Si la teneur en oxygène dissous augmente, la microflore entérique diminue.
- Les températures inférieures à 15°C provoquent la mortalité des germes. Inversement, l'augmentation de la température favorise l'accroissement du nombre des germes (QUILLIEN, 1980).
- L'existence de substances antibiotiques sécrétées par des bactéries, certains animaux (ormeaux, éponges, coraux), des algues supérieures et surtout par les organismes phytoplanctoniques (Diatomées, Chrysophycées, Cryptophycées, Chlorophycées et Dinoflagellées) (PLUSQUELLEC, 1984).
- L'action de bactériophages agissant sur les bactéries fécales ou des micro prédateurs tel que *Bdellovibrio bacteriovirus* qui parasite les bactéries et provoque leurs lyse complète, mineur sinon négligeable (LECLERC, 1977).

1.5 RESISTANCE ET SURVIE

La survie des germes dans le milieu marin, étudiée in-vitro, a montré qu'il existe trois phases :

- une première phase correspondant a une période d'accoutumance des germes au cours de laquelle, une faible augmentation de la charge bactérienne initiale est enregistrée.
- Une phase de mortalité rapide.
- Une phase terminale où l'on constate la survie d'un petit nombre de germes qui se sont accoutumés au milieu marin (QUILLIEN, 1980).

Des expériences de laboratoires ont révèlent que la résistance et le maintien du pouvoir infectant, se prolonge au delà d'une semaine et fréquemment de 20 à 30 jours (BRISOU, 1978).

D'après PLUSQUELLEC,(1984) certaines Salmonelles survivent 8 à 10 semaines, les Mycobactéries ont une longue survie. Les autres groupes (Pseudomonas, Achromobacter, Chromobacter, Bacillus) semblent pouvoir survivre longtemps.

1.6 LES RISQUES ENCOURUS PAR LA BAIGNADE

La baignade occasionne un contact entre la peau et les muqueuses et peut être accompagnée d'absorption d'eau. C'est ce contact qui va augmenter les risques de contamination par les germes (PLUSQUELLEC, 1984).

Ces risques sont (tableau: 1):

- des rhino pharyngites (STEVENSON, 1950).
- des infections oculaires,
- des otites,
- des sinusites,

Tableau 1 : Les principales maladies causées par la baignade

Catégorie	Maladies	Germes	Site d'attaque	Symptômes
Affections gastro-intestinale	Les gastro-entérites	<i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Shigella</i> , <i>Rotavirus</i>	L'intestin de l'homme et des animaux	1- Par entérotoxine: diarrhée nourisson et des voyageurs 2- Par la cellule elle même : il faut un volume élevé pour provoquer l'infection
	Les salmonelloses	Salmonelle	L' intestin grêle Le gros intestin	Douleur abdominale, diarrhée, nausées, vomissement et fièvre de 38 à 39° C
Affections cutano-muqueuse	Le choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	L' intestin grêle	Vomissement et diarrhée: Déshydratation
	Infection otitique (l' otite externe)	Streptocoque	La peau du conduit	Peau rouge du conduit, démangeaison, vive douleurs accompagnant souvent d'écoulement séreux ou purulent
	La sinusite		Sinus frontale	Douleur au front, inflammation de la cavité
Manifestation fébrile-polymorphe	Conjonctivite	Streptocoque	La conjonctivite (muqueuse recouvrant l' oeil)	Sensation de brûlure de corps étranger mais sans douleur profonde, sécrétions agglutinant les cils le matin au réveil
	Herpès	(Virale)	La bouche	L' apparition d' un prurit, d' une cuisson puis quelque heure plus tard d' une éruption de petites vésicules groupées en bouquet (bouton de fièvre)
Affection génito-urinaire	Urétrites banales	Chlamydiale	L' urètre	Débute par une légère démangeaison du méat, qui rougit, puis une cuisson très pénible apparaît à chaque miction d' où le terme populaire "chaude pisse"

- des troubles gastro-entérites (MOORE, 1970)
- fièvres typhoïdes et autres diarrhées (BRISOU, 1970).

Cependant dans les travaux les plus récents, CABELLI, (1982) *in* PLUSQUELLEC (1984) a montré une relation entre infection et baignade en eau polluée en se basant sur la liaison entre la fréquence des gastro-entérites et la contamination bactérienne des eaux de mer.

Il a aussi montré une meilleure corrélation entre la quantité des *Streptocoques* et les gastro-entérites, que le nombre d'*Escherichia Coli* et des gastro entérites.

Cependant, les risques sanitaires dus à la baignade ne sont pas négligeables, ni facile à évaluer pour plusieurs raisons :

- La population estivale est complexe, très fluctuante et difficile à recenser.
- Certains types de troubles (gastro-entérites) sont considérés comme bénins et ne font pas l'objet d'une consultation médicale.

1.7 LES INDICATEURS MICROBIOLOGIQUES

Un indicateur est un facteur physique, chimique ou microbiologique dont la fréquence est révélatrice du risque de maladie. Le meilleur indicateur est celui dont la densité présente la corrélation la plus importante avec les effets sanitaires associés. Il n'est choisit que sur la base d'une analyse épidémiologique (OMS / PNUE, 1977). Les caractéristiques d'un indicateur microbiologique test ou témoin d'après Bonde (1977) *in* Plusquelec (1984) sont énumérées ci-après :

- être présent quand les pathogènes le sont et qu'ils constituent un danger.
- être plus abondant que les pathogènes.
- être plus résistant aux désinfectants et l'environnement hydrique que les pathogènes.

- être rapidement cultivable sur milieu simple.
- être facilement et rapidement identifiable.
- cultivable sur milieu indépendant de la flore annexe.
- Sa distribution se fait au hasard où de façon uniforme après homogénéisation.

Aucune bactérie ne répond à tous ces critères.

C'est pour cela que plusieurs germes de contamination ont été choisis, Coliformes Totaux (CT), Coliformes Fécaux (C.F.) et Streptocoques Fécaux (SF).

1.8 LES GERMES INDICATEURS DE POLLUTION FECALE

Pour la surveillance sanitaire des plages, les germes choisis sont :

1.8.1 Les Coliformes Totaux (CT)

Ce sont des bactéries, Gram négatif, aérobies, anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets, ne sporulant pas et fermentant le lactose en moins de 48 heures lors de leur croissance à 35°C (OMS / PNUE, 1995).

Ce sont les plus fréquent et les plus nombreux en quantité, mais ils sont d'origine intestinale et proviennent aussi du sol, c'est pour cela que la recherche des Coliformes Fécaux (C.F.) est aussi nécessaire.

1.8.2 Les Coliformes Fécaux (C.F.)

C'est des bactéries, Gram négatif, aérobies anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets ne sporulant pas, fermentent le lactose en produisant du gaz en moins de 24 heures lors de leur croissance à 44.5°C. Ils produisent de l'indole en eau tryptonée contenant du tryptophane à 44.5°C.

les Coliformes Fécaux (CF) ont l'inconvénient d'être peu résistant au milieu marin aussi les Streptocoques Fécaux (SF) sont eux aussi recherchés.

1.8.3 Les Streptocoques Fécaux (SF)

C'est des cocci à Gram positif, oblongs ou ovales en paire ou en courtes chaînes, présentent une croissance dans le bouillon azide à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; dans le bouillon coeur cerveau au bout de 2 jours à 45°C et au bout de 5 jours à 10°C ; ils sont catalase moins (OMS./ PNUE, 1995).

Ils sont originaires des intestins des animaux à sang chaud. Ils indiquent une contamination fécale et un manque d'hygiène (OMS./ PNUE, 1995).

Le terme Streptocoques Fécaux, s'applique aux espèces :

- *Streptococcus faecalis*.
- *Streptococcus faecim*.
- *Streptococcus bovis*.
- *Streptococcus equinus*. (PLUSQUELLEC, 1984)

Caractérisés par leurs aptitudes à se développer dans des conditions hostiles de croissance, puisqu'ils présentent une formidable résistance à des inhibiteurs bactériens (LECLERC, 1977).

Streptococcus fecalis résiste plus longtemps que les salmonelles (GELDREICH, KENNER; 1969). *S. Faecalis* à 10°C : la moitié de la population disparaît en 14 jours.

1.9 Les germes pathogènes

1.9.1 Les Salmonelles

Elles appartiennent au genre *Salmonella* et à la famille des Enterobacteriaceae. C'est le groupe le plus important puisqu'il distingue 1200 sérotypes (BRISOU, 1978). Elles se présentent en forme de bâtonnets à Gram

négatif, oxydase moins, catalase positif, n'hydrolysent pas l'urée et ne désaminent pas la phénylalanine. La plupart des souches sont mobiles, et généralement bétagalactosidase négatives. Elles décarboxylent la lysine et se développent dans la citrate mais pas en présence de cyanures. Les salmonelles produisent de l'acide, rarement du gaz à partir du glucose, attaquent généralement la mannitol et le sorbitol (OMS./ PNUE, 1995).

Il existe quatre espèces du genre *Salmonella* mais une seule, la plus dangereuse est présentée: *Salmonella typhi*, responsable de la fièvre typhoïde humaine. C'est une espèce, citrate négatif, mobile, donnant une acidification par fermentation du glucose et autres sucres.

1.9.2 Les Vibrions

Le genre *Vibrio* appartient à la famille des Vibrionaceae. Bacille à Gram négatif, caractérisé par une mobilité due à un seul flagelle polaire, de forme incurvé où droit de 1,5 sur 0,5 μm . Ils sont aéro-anaérobie facultatif, oxydase positif, catalase positive, citrate positif, indole positif. Croissent sur milieu simple (gélose nutritive, eau peptonée). Ils métabolisent les hydrates de carbone en libérant des acides anaérogènes (SINGLETON, SAINSBURY; 1984). Beaucoup d'espèces sont inoffensives, mais les Vibrions cholorigènes tel que *Vibrio cholérique* et sa variante El Tor, où les *Vibrions parahaemolyticus* et *Vibrio anguillarum* causent des intoxications alimentaires graves voir mortelles. (BRISOU, 1978).

Deux espèces ont été décrite :

Vibrio Cholerae : espèce qui comprend deux souches qui ne sont pas pathogènes, et deux qui provoquent le choléra dont les symptômes sont une forte diarrhée sans fièvre, provoquant une déshydratation. Ces souches produisent une puissante entéro-toxine *Vibrio cholerae* biotype *Cholerae* et *Vibrio cholerae* biotype *El Tor*.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les vibrions cholériques forment des colonies de quelques millimètres sur gélose nutritive. De forme ronde avec faible convexité, un aspect grisâtre translucide et luisant. Ils fermentent le glucose et le saccharose en acidifiant le milieu sans production de gaz. (SINGLETON, SAINSBURY; 1984).

Leur survie peut atteindre 81 jours en eau de mer (BRISOU, 1978). Espèce classée halophile d'après BERGER (1984).

Vibrio Parahaemolyticus: bactérie halophile, elle fait partie de la flore indigène du milieu marin. Il provoque une toxi-infection se caractérisant par une gastro-entérite de type dysenterie avec des diarrhées, crampes abdominales sévères, nausées, fièvres légères et migraines. La croissance de ce Vibrion s'améliore en augmentant la teneur en NaCl du milieu jusqu'à 3%° ce qui lui permet une stabilité et une résistance à des conditions extrêmes tel que la congélation. (SINGLETON, SAINSBURY; 1984).

1.9.3 LES STAPHYLOCOQUES

Du genre *Staphylococcus* qui appartient à la famille des Micrococcaceae, les Staphylocoques figurent parmi les germes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. Ils sont présents sur la peau et les muqueuses chez l'homme et les animaux et vivent aussi dans le sol et dans l'eau. (SINGLETON, SAINSBURY; 1984).

Ce sont des coques associés en agrégats sous forme de grappe de raisins où en amas. Germe à Gram positif, aérobies, anaérobies facultatifs, ne sporulant pas, sont immobiles et chimio-organotrophes. Leur température optimale de croissance est à 37°C, ils sont catalase positive, coagulase positive, oxydase positive, uréase positif, et nitrate réductase positive, (BRISOU, 1978; OMS / PNUE, 1985). L'espèce *S. aureus* est de forme sphérique d'un diamètre de 0,5-1µm.

Les souches de *Staphylococcus aureus* typiques se caractérisent par une production de coagulase, une aptitude à fermenter le mannitol et la présence dans la paroi cellulaire d'acide teichoïque contenant du ribitol. (SINGLETON, SAINSBURY; 1984).

Les *Staphylococcus aureus* sont responsables de grands nombres d'infections fréquentes dans des fosses nasales, les régions périnéales, la peau, les muqueuses, et les sécrétions naso-pharyngées. Ils sont témoins d'une contamination humaine récente. Rares dans l'eau de mer, ils sont plus fréquemment signalés au niveau des sables de plages fréquentées. (BRISOU, 1978).

1.10 Les paramètres physico-chimiques

Dans le milieu marin, l'étude des germes est en relation avec les paramètres physico-chimiques.

1.10.1 La température

Les variations de température de l'eau de mer, résultent des échanges entre les couches superficielles chaudes et celles profondes froides. A la fonte de glace et de l'évaporation, s'ajoute l'effet des échanges air - mer et terre - mer. La plus grande masse de bactéries marines se cultive à des températures d'incubation entre 10 et 15°C avec un optimum de 15 à 18°C (BRISOU, 1986).

1.10.2 L'oxygène dissous (O_2)

L'oxygène dissous est l'un des gaz le plus important pour le milieu marin, la teneur en oxygène dissous dépend de plusieurs facteurs :

- physique : l'agitation interface air-mer et la température.
- biologique : Phénomène d'oxydation, photosynthèse.
- chimique : richesse du milieu en matière organique vivante.

La dissolution de l'oxygène dans l'eau de mer, est en effet régie par des lois physique et dépend de la pression atmosphérique, de la pression de vapeur saturante de la température de l'eau, et de la salinité (CNEXO, 1983).

Sa concentration n'est pas la même le jour et la nuit, les bactéries consomment une grande quantité d'oxygène, une des causes de l'approvisionnement du milieu en gaz.

1.10.3 Le potentiel Hydrogène (pH)

Il est généralement, stable et favorable à la croissance des bactéries, les variations demeurant faibles à des rares exceptions, dont les déversements industriels (OMS / PNUE, 1977).

1.10.4 La Salinité

la Salinité représente la portion de sels minéraux dissous dans l'eau de mer (CNEXO, 1983). Une certaine accoutumance des bactéries de contamination fécale est observée aux concentrations salines, mais si elle augmente brusquement la disparition de certains germes halo-sensible est rapide: (cas des Coliformes), due surtout aux modifications biologiques brutales plus qu'à une influence directe du sel.

Les exigences que manifestent les micro-organismes vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium conduit à la distinction d'un certain nombre de catégories.

- Les Sténohalines : qui ne supportent pas les écarts de concentrations salines.
- Les Halophiles : qui ne se développent qu'à de grandes concentrations salines.
- Les Halophobes : qui ne peuvent pas se développer dans un milieu salé.

Au niveau du bassin algérien, la salinité varie entre 36,5 et 38‰ (BOUDJELLAL et SELLALI, 1994).

MATERIEL
&
METHODIES



2. MATERIEL ET METHODES

2.1 MATERIEL

2.1.1 Présentation du site

Ain Bénian est une ville côtière située à 15 Km de la capitale et à 65Km du chef lieu de la wilaya de Tipaza (fig.2). Elle est délimitée par 36°45' N, 36°45' S et 2°56' E, 2°54' O; sa superficie est de 1782 hectares.

Le climat y est méditerranéen, la température est très modérée en été grâce au Pic de Ras Acrata (ex cap Caxine).

La population est estimée à 48.000 habitants d'après le recensement de 1995. Elle constitue une source de main d'oeuvre, pour la petite et moyenne industrie locale, essentiellement dans le domaine des cosmétiques, du textile, de la confiserie, du bois et du bâtiment.

C'est aussi une région à vocation agricole bien que celle-ci soit en nette régression.

Depuis bien longtemps, le tourisme est un secteur important pour cette commune, par la présence de la station balnéaire d'El Djamila et de son port de plaisance.

Le littoral s'étale sur environ 6Km à l'Est de Rascrata jusqu'à la pointe d'El Djamila, il est rocheux et ne présente pas de plage, favorisant ainsi la pêche à la canne et la chasse sous-marine.

Cette portion du littoral reçoit des rejets liquides sans traitement préalable. Les points d'encrage des rejets à écoulement permanent et à un débit plus ou moins important sont de l'ordre de 5. Il existe d'autres rejets moins importants que les précédents mais beaucoup plus nombreux. Un système de dilution a été installé à l'époque coloniale et qui consiste en des conduites se prolongeant jusqu'au large à 200 ou 300m. La vétusté de ces conduites a entraîné des écoulements juste au bord des côtes. ?

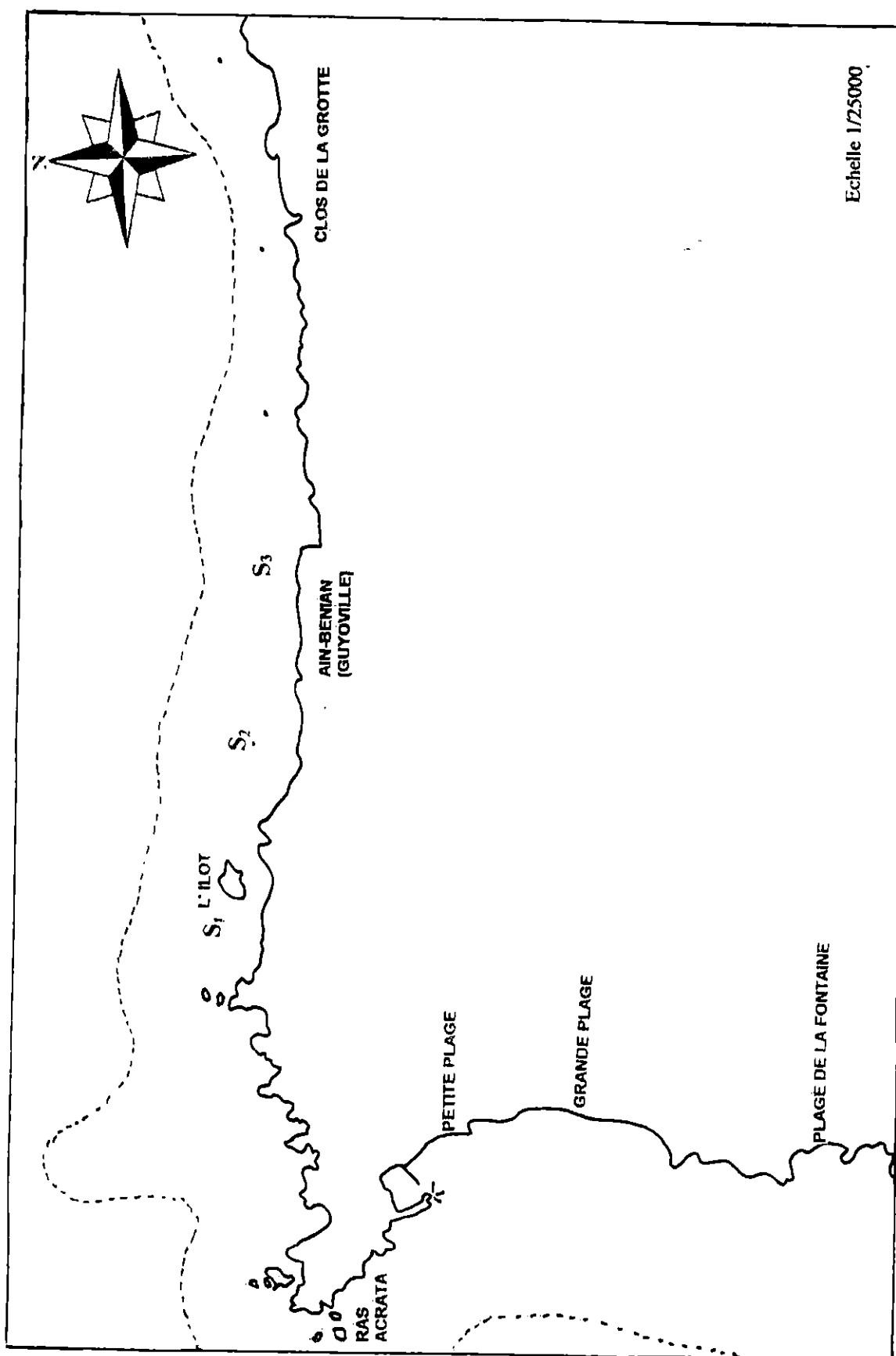


Figure 2 : Localisation des stations de prélèvements

2.1.2 Choix des points de prélèvement

Pour cette étude les trois stations choisies au niveau du site de Ain Benian sont :

Station (1) : La première station rencontrée en sortant du port (fig. 3).

Station (2) : Choisit parce que à son niveau se déverse l'émissaire provenant de l'abattoir de Ain Benian.

Station (3) : A sa proximité existe une plage complètement polluée, transformer en dépotoir pour toutes les ordures, au niveau de cette station s'écoule un égout assez important.

Les cinq prélèvements ont été effectués au cours du mois de Mai jusqu'à la fin de Juin (18 Mai au 30 Juin 1996).

2.2 METHODES D'ETUDE

Pour chacune des trois stations, 2 prélèvements sont effectués. L'un est destiné à la mesure d'un paramètre physico-chimique, le second à l'analyse bactériologique.

Les bouteilles utilisées sont préalablement stérilisées au laboratoire à la chaleur humide (autoclave) pendant 20 minutes à 120°C. Chaque bouteille est étiquetée avec le numéro de la station et la date du prélèvement.

Les bouteilles sont plongées à 20cm de la surface, elles sont ouvertes et fermées dans l'eau pour éviter toute contamination, en prenant soin de laisser une certaine quantité d'air à l'intérieur de la bouteille pour l'homogénéisation (fig. 3).

Les prélèvements ont été effectués entre 9h -11h du matin, selon les recommandations de l'OMS / PNUE(1995).

Le transport des échantillons au laboratoire, se fait dans une glacière dont la température ne dépasse pas 4°C, et le plus rapidement possible pour éviter tous risques de multiplication (OMS / PNUE,1995).

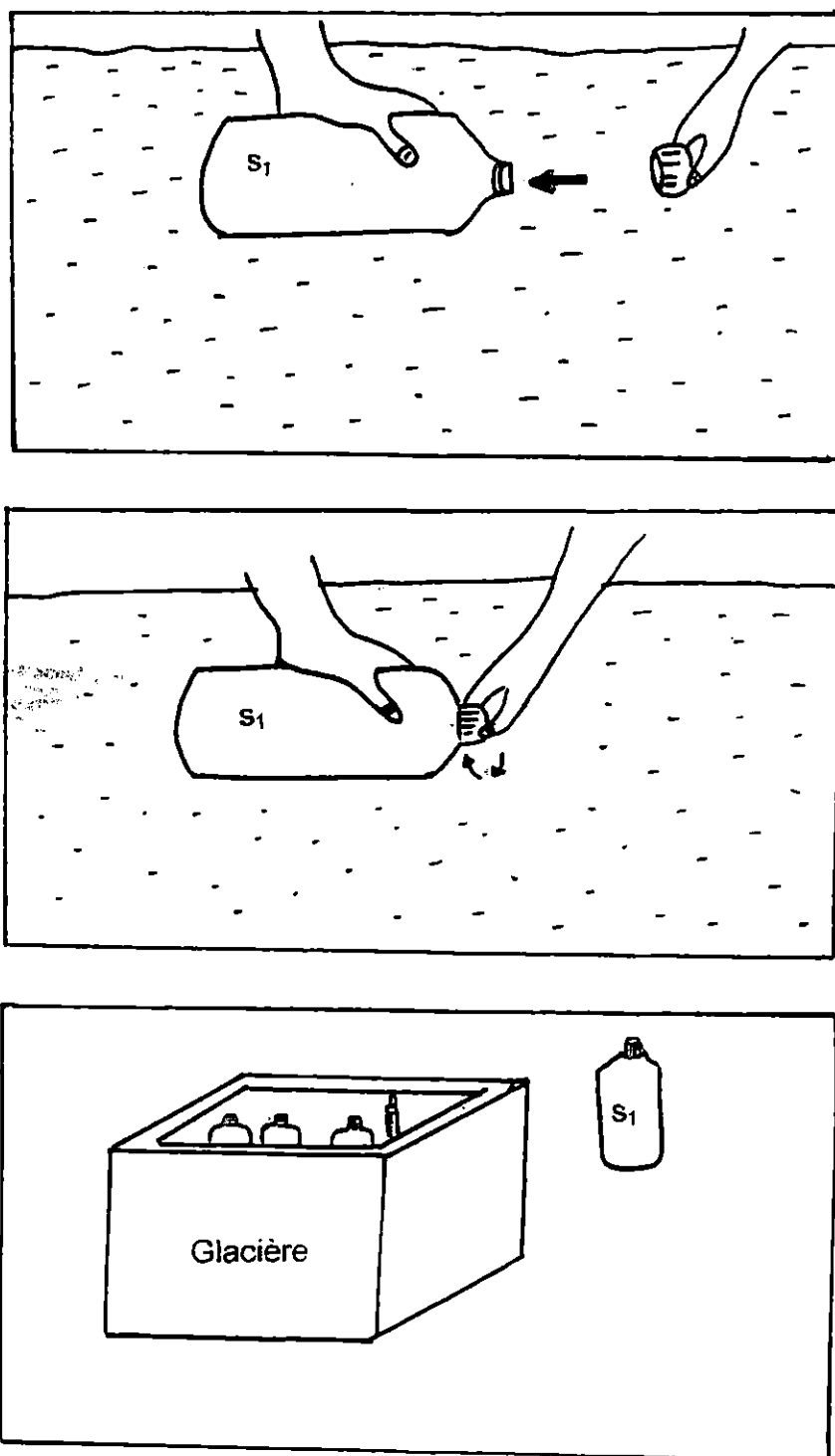


Figure 3: Prélèvements et transport des échantillons dans une glacière à 4°C

2.2.1 TECHNIQUES D'ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

Un seul paramètre physico-chimique a été relevé, c'est la température qui est mesuré à l'aide d'un thermomètre gradué de 0°C à 40°C. Celui ci est plongé dans l'eau quelques minutes.

2.2.2 MODE OPERATOIRE D'UNE ANALYSE BACTERIOLOGIQUE

L'étude des germes test de contamination fécale, les Coliformes Totaux (CT), les Coliformes Fécaux (C.F.) et les Streptocoques Fécaux (SF) ont été dénombrés par la technique des tubes multiples (NPP: Nombre le Plus Probable) en utilisant 3 tubes par dilution de manière à avoir des tubes positifs dans les rangs des dilutions les plus fortes. (OMS / PNUE, 1986)

Cette technique consiste à ensemercer plusieurs séries de tubes contenant des milieux de culture liquide puis de déterminer le NPP à partir des tubes positifs dans chaque série de dilution sur la table de Mc Grady (annexe 1).

2.2.2.1 Recherche et dénombrement des Coliformes Totaux (CT) et Fécaux (CF)

2.2.2.1.1 Test Présomptif (fig. 4)

Le milieu est le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (B.C.P.L) double et simple concentration (annexe 2). Ce milieu sert à l'isolement non sélectif des Entérobactéries. Après ensemencement des milieux avec les quantités d'eau de mer adéquates et homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 48 heures. Un virage de l'indicateur coloré du pourpre au jaune et une production de gaz d'au moins 1/10ème de la cloche traduit la présomption des Coliformes Totaux (CT).

2.2.2.1.2 Test Confirmatif

Chaque tube positif sera repiqué, dans le bouillon au vert brillant lactosé (VBL) qui par l'action de la bile et du vert brillant inhibe fortement la croissance de la flore secondaire (annexe 2).

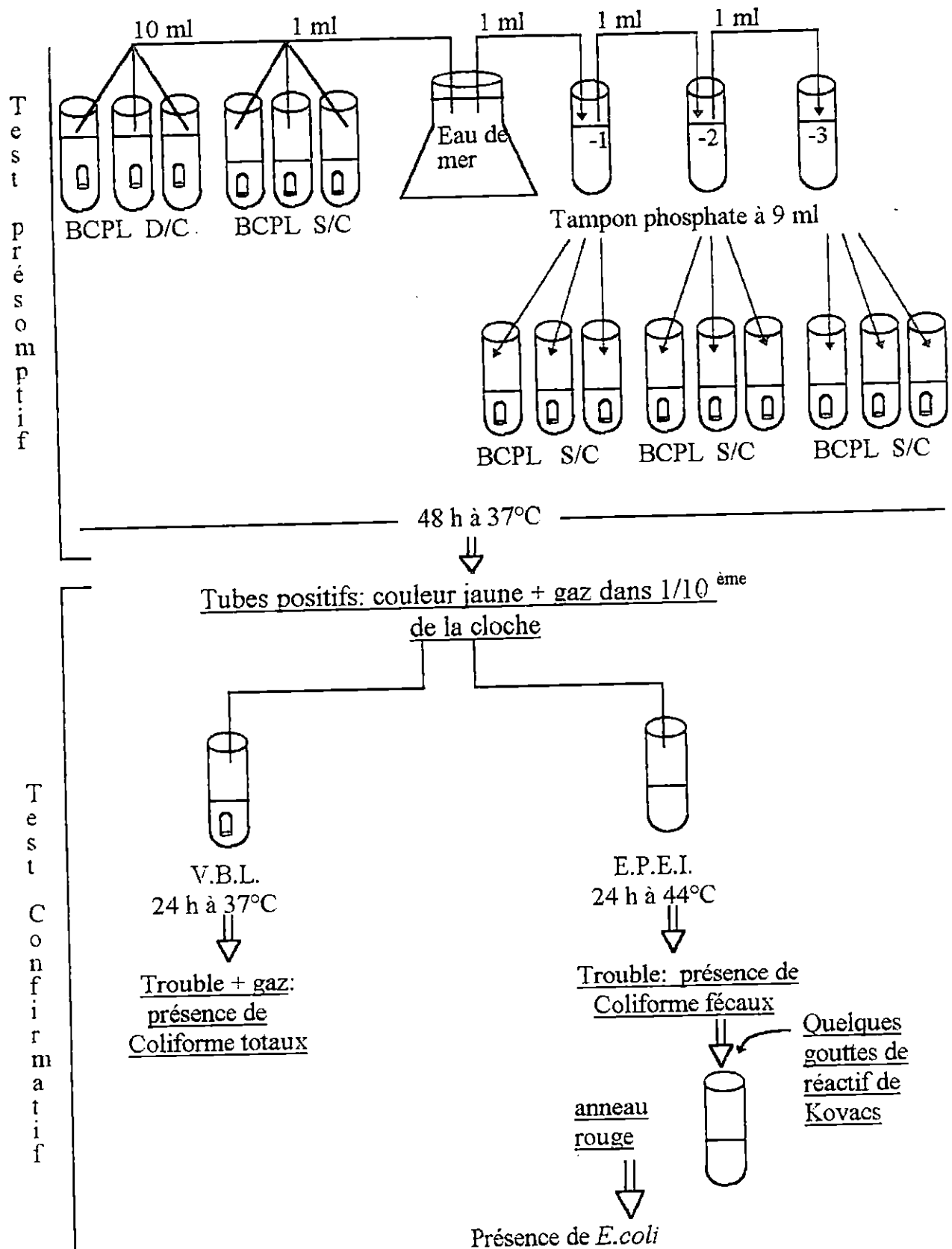


Figure 4: Schéma de la technique de recherche des coliformes totaux et *E.Coli* dans l'eau de mer

Un deuxième tube est ensemencé dans l'eau peptonée exempt d'indole (E.P.E.I) qui permet de vérifier la capacité de produire l'indole à partir du tryptophane des germes (annexe 2).

Ces deux milieux sont utilisés respectivement pour la confirmation de la présence des Coliformes Totaux et Fécaux. Les tubes de (V.B.L) sont incubés à 37°C pendant 24 heures, tandis que les tubes (E.P.E.I) à 44°C pendant 24 heures.

Les tubes de (V.B.L) présentant un trouble et une production de gaz d'au moins 1/10^{ème} du volume de la cloche, contiennent des Coliformes Totaux.

Les tubes (E.P.E.I) présentant des troubles contiennent des Coliformes Fécaux. L'apparition d'un anneau rouge en surface après addition de réactif de Kovacs confirme la présence d'*Echerichia Coli* : bactérie indologène.

Le dénombrement des Coliformes Totaux (CT) et Coliformes Fécaux (C.F.) contenues dans 100 ml d'eau de mer s'effectue sur la table de Mc Grady (annexe 1).

2.2.2.2 RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES STREPTOCOQUES FECAUX (SF)

Ils indiquent une contamination fécales et résistent le plus longtemps dans l'eau de mer.

2.2.2.2.1 Test Présomptif : (fig. 5)

Le milieu utilisé est celui de Rothe en double et simple concentration, ce milieu contient de l'azide de sodium qui inhibe la flore secondaire. Après ensemencement à l'aide de pipettes stériles des milieux (Rothe) avec la quantité d'eau nécessaire, l'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures. Les tubes présentant un trouble seront considérés comme positif (annexe 2).

2.2.2.2.2 Test Confirmatif

Quelques gouttes sont prélevées à partir de chaque tube positif, puis sont ensemencées sur le milieu Litsky (annexe 2). L'incubation s'effectue pendant 24 heures à une température de 37°C.

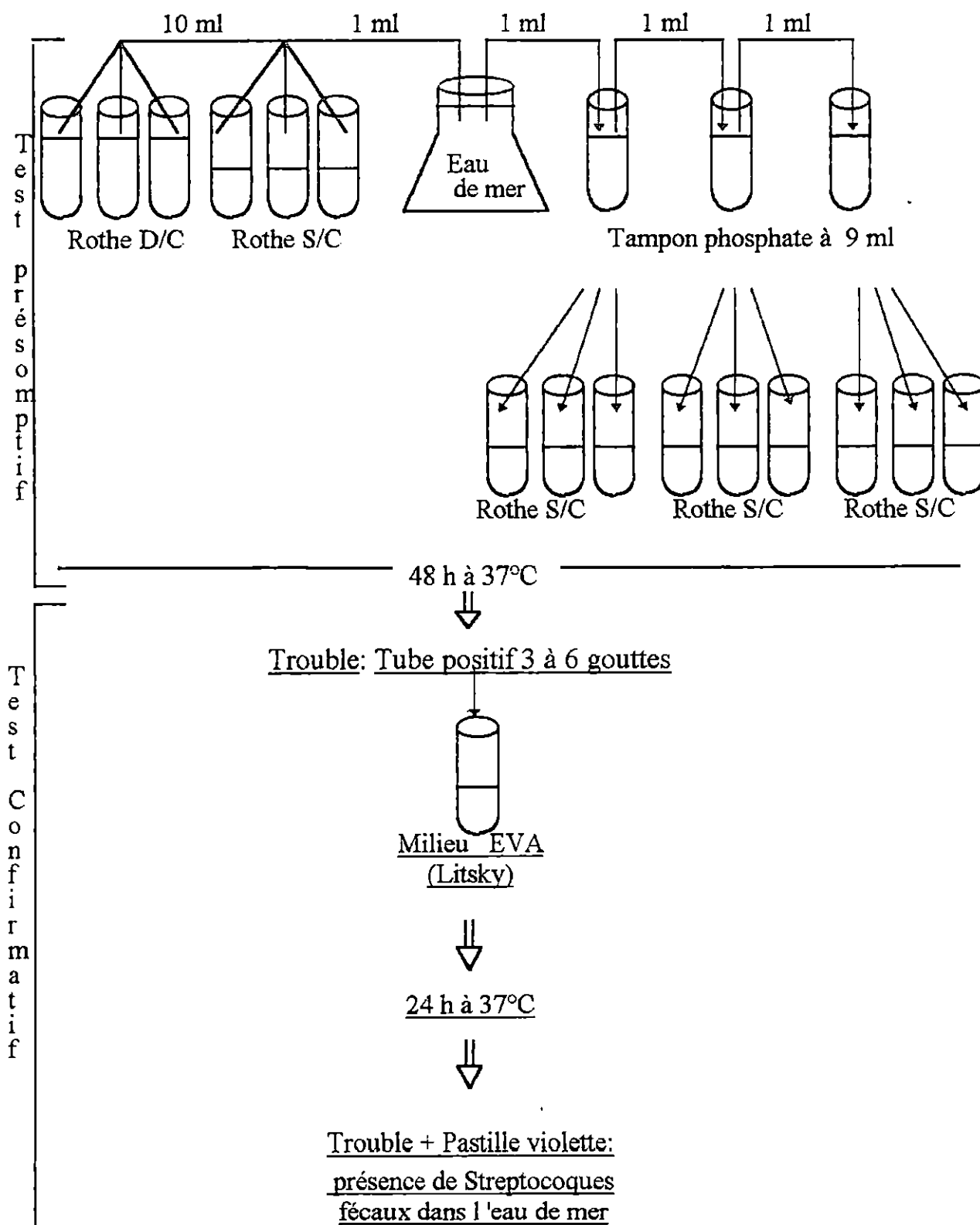


Figure 5: Schéma de la technique de recherche des Streptocoques fécaux dans l'eau de mer

La présence de Streptocoques Fécaux (SF) se confirme si 2 conditions se réalisent :

- apparition d'une culture dans toute la masse liquide.
- présence d'une pastille violette au fond du tube.

Les résultats sont donnés en nombre de Streptocoques Fécaux par 100ml d'eau de mer analysée à l'aide de la table de NPP (Nombre le Plus Probable).

2.2.2.3 TECHNIQUE D'ETUDE DES GERMES PATHOGENES

En plus des Salmonelles et Vibrions qui sont les germes pathogènes habituellement recherchés; les Staphylocoques ont également été dénombrés par la méthode des tubes multiples préconisée par l'OMS / PNUE, (1995). La recherche a été réalisée par la méthode quantitative et qualitative pour les Staphylocoques.

La méthode qualitative est utilisée pour les Salmonelles et les Vibrions. Elle est réalisée en 3 étapes successives : l'enrichissement, l'isolement et l'identification biochimique.

2.2.2.3.1 LES SALMONELLES (fig. 6)

Ce sont des agents bactériens d'origine intestinales, pathogènes pour l'homme, elles sont largement distribuées parmi les animaux.

- **Le premier enrichissement**

Le bouillon au sélénite (S.F.B) simple et double concentration (annexe 2) est le milieu d'enrichissement des Salmonelles. Il favorise leur développement en inhibant par l'action du sélénite de sodium la croissance des Coliformes et des entérocoques.

- **Le premier isolement**

A partir du premier enrichissement, un isolement doit être effectué sur

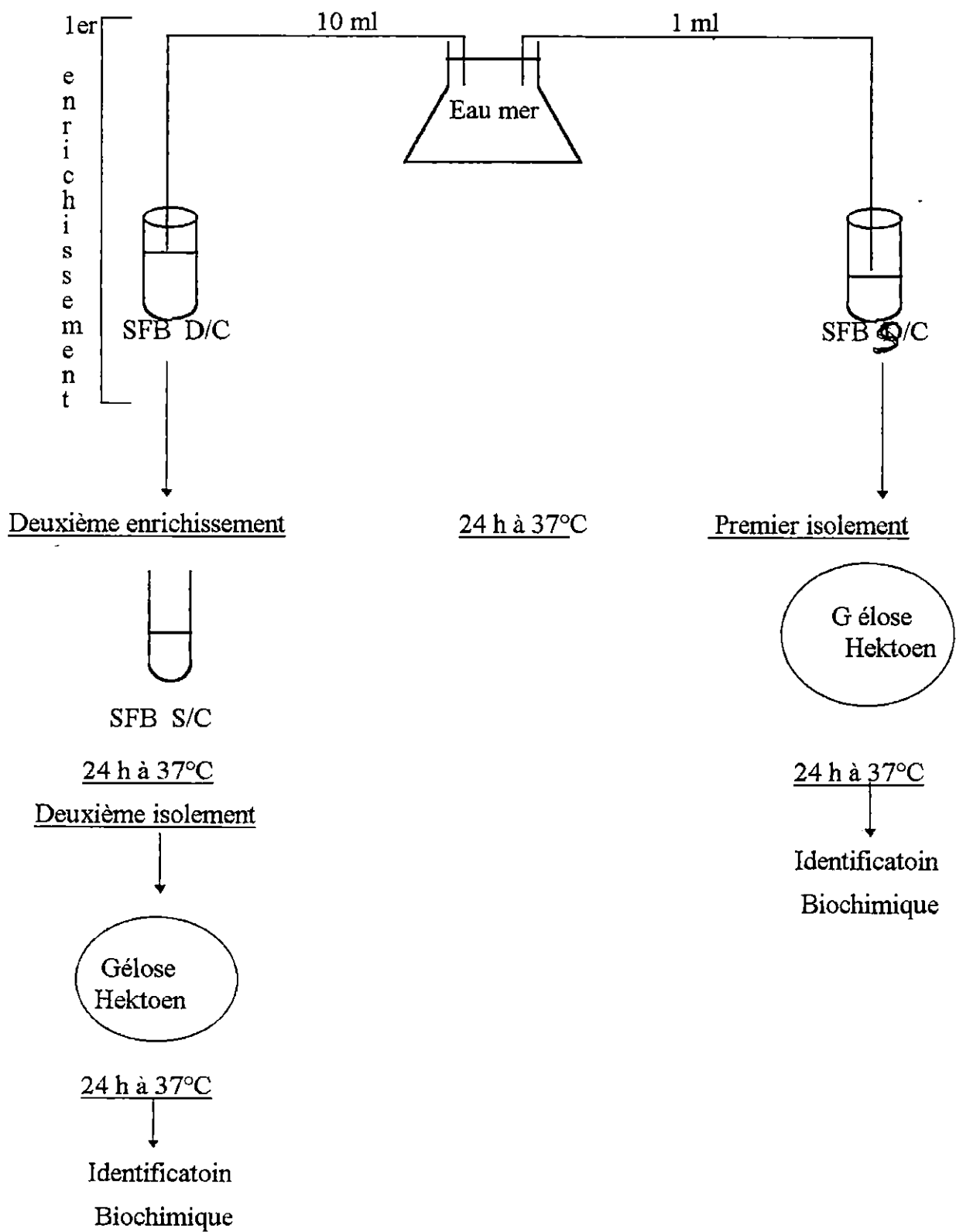


Figure 6: Schéma de la technique de recherche des salmonelles

gélose Hektoen (annexe 2) dont le pouvoir sélectif est assuré par les sels biliaires qui limitent le développement des Coliformes et des Proteus. Les boîtes sont incubées à 37C° pendant 24 heures.

- **Le deuxième enrichissement**

Le deuxième enrichissement se fait en transférant quelques gouttes du tube S.F.B double concentration positif dans le tube S.F.B simple concentration. Les tubes sont incubés à 37C° pendant 24 heures.

- **Le deuxième isolement**

Il s'effectue en étalant une goutte de S.F.B simple concentration sur gélose Hektoen.

Lecture : les colonies suspectes sont verte à centre noir

- **L'identification biochimique**

Les colonies suspectes sont repiquées sur le milieu (Triple Sugar Iron) (annexe 2), par piqûre centrale du culot et des stries sur la pente, l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

Lecture: la dégradation des sucres (glucose, saccharose et lactose) avec formation d'acides est révélée par le virage du rouge orangé au jaune de l'indicateur rouge du phénol, une alcalinisation se traduit par une coloration rouge foncé (MERCK, 1986).

Ce changement de couleurs est associé où non à une production de gaz.

Le thyosulfate est réduit par certains germes en hydrogène sulfuré qui réagit avec les sels ferriques en donnant du sulfure de fer noir qui peut masquer la coloration du milieu (MERCK, 1986).

Pour la confirmation, des galeries Api ont été utilisées (tableau 2).

2.2.2.3.2 LES VIBRIONS (fig. 7)

Ce sont des germes pathogènes pour l'homme et les animaux, leur recherche est qualitative selon les étapes suivantes:

Tableau 2: Galerie apie 20E

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	beta-galactosidase	incolore	jaune (1)
ADH	Arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/orangé (2)
LDC	Lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	jaune/orangé (2)
CIT	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/vert (3)
H ₂ S	thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	incolore/grisâtre	dépôt noir/fin liséré
URE	urée	uréase	jaune	rouge/orangé
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	TDA / immédiat	
			jaune	marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	IND / 2mn maxi	
			jaune	anneau rouge
VP	pyruvate de sodium	production d'acétoïne	VP1 + VP2 / 10mn	
			incolore	rosé-rouge
GEL	gélatine de Kohn	gelatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	glucose	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
MAN	mannitol	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
INO	inositol	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SOR	sorbitol	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
RHA	rhamnose	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
SAC	saccharose	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
MEL	melibiose	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
ARA	arabinose	fermentation / oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	jaune
OX	tube H ₂ S ou ONPG	cytochrome-oxydase	OX / 5-10mn	
			incolore	anneau violet
NO3-NO2	tube GLU	production de NO ₂	NIT1 + NIT2 / 2-3mn	
			jaune	rouge
			Zn	
MOB	(API M) (microscope)	mobilité	rouge	jaune
			rouge	jaune
MAC	milieu de MacConkey	culture sur	absence	présence
OF	glucose (API OF)	fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert	jaune
			vert	jaune
CAT		possession d'une catalase	H2O2 / 1-2mn	
			pas de bulles	bulles

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant après 24H d'incubation doit être considérée négative.

(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

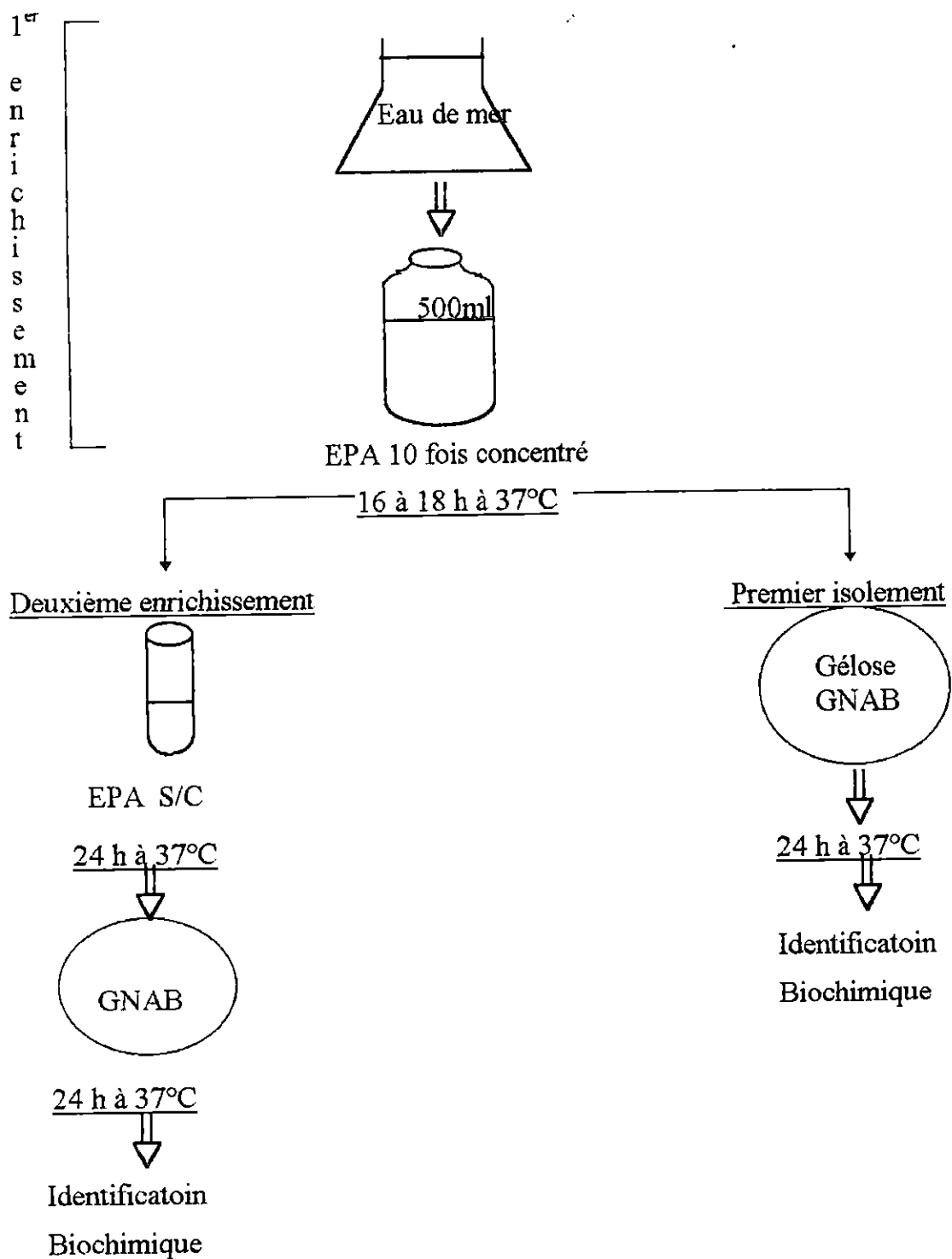


Figure 7: Schéma de la technique de recherche des Vibrions

- **Le premier enrichissement:**

le milieu d'enrichissement des Vibrions est l'eau peptonée alcaline (E.P.A) 10 fois concentrée (annexe 2). Il faut ajouter au flacon d'E.P.A 450ml d'eau de mer. L'incubation se fait à 37°C pendant 16 à 18 heures.

- **Le premier isolement**

A partir du premier enrichissement, on réalise un 1^{er} isolement en étalant une goutte prélevée du flacon d'E.P.A sur gélose nutritive alcaline biliée (G.N.A.B) (annexe 2).

- **Le deuxième enrichissement**

Transférer quelques gouttes du flacon d'E.P.A 10 fois concentré dans un tube d'E.P.A. simple concentration puis incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Le deuxième isolement**

Il se fait de la même manière que le premier isolement.

Les colonies suspectes sur GNAB sont translucides, lisses et bombées et subiront une identification biochimique.

- **L'identification biochimique**

Les colonies suspectes sont repiquées sur la gélose de HAJNA-KLIGER (KIA) par piqûre centrale du culot, et des stries sur la pente. (annexe2)

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

La lecture se fait de la manière suivante:

1. un culot jaune indique la fermentation du glucose
2. une pente rouge indique la non oxydation du lactose
3. la production de gaz se manifeste par des bulles ou une poche d'air
4. un noircissement indique la réduction des thiosulfates en H₂S

Pour la confirmation, on utilise la galerie classique (tableau 3).

2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10 ou 11 ou 12 ou 13 ou 14 ou 15 ou 16 ou 17 ou 18 ou 19 ou 20 ou 21 ou 22 ou 23 ou 24 ou 25 ou 26 ou 27 ou 28 ou 29 ou 30 ou 31 ou 32 ou 33 ou 34 ou 35 ou 36 ou 37 ou 38 ou 39 ou 40 ou 41 ou 42 ou 43 ou 44 ou 45 ou 46 ou 47 ou 48 ou 49 ou 50 ou 51 ou 52 ou 53 ou 54 ou 55 ou 56 ou 57 ou 58 ou 59 ou 60 ou 61 ou 62 ou 63 ou 64 ou 65 ou 66 ou 67 ou 68 ou 69 ou 70 ou 71 ou 72 ou 73 ou 74 ou 75 ou 76 ou 77 ou 78 ou 79 ou 80 ou 81 ou 82 ou 83 ou 84 ou 85 ou 86 ou 87 ou 88 ou 89 ou 90 ou 91 ou 92 ou 93 ou 94 ou 95 ou 96 ou 97 ou 98 ou 99 ou 100

Tableau 3: Résumé des tests biochimiques permettant l'identification des Entérobactéries

Test	Substrat	Milieu	Mode d'ensemencement	Réactions/Enzymes	Remarques	Résultats	
						Positif	Négatif
LDC	Lysine	Moeller	Quelques gouttes (3 à 6)	Lysine décarboxylase	En anaérobiose	Violet (alcalin)	Jaune (acide)
ODC	Ornithine	Moeller	Quelques gouttes (3 à 6)	Ornithine décarboxylase	En anaérobiose	Violet (alcalin)	Jaune (acide)
ADH	Arginine	Moeller	Quelques gouttes (3 à 6)	Arginine déshydroxylase	En anaérobiose	Violet (alcalin)	Jaune (acide)
Témoïn	Néant	Moeller	Quelques gouttes (3 à 6)	Néant	En anaérobiose	Violet (alcalin)	Jaune (acide)
URE	Urée	Urée-indole	Quelques gouttes (3 à 6)	Uréase	-	Rose	Orange
TDA	Tryptophane	Urée-indole	Quelques gouttes (3 à 6)	Tryptophane désaminase	Lecture immédiate	Maron foncé	Pas de changement de couleur
INDOLE	Tryptophane	Urée-indole	Quelques gouttes (3 à 6)	production d'indole	-	Rose	Orange
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside		Suspension dense de 0,25ml.	Beta-galactosidase	Plus disque ONPG	Jaune	Incolore
VP	Pyruvate de sodium	Clark et Lubs	Quelques gouttes dans 2,5ml	production d'acétone	Plus VP1 et VP2 lecture après 10 mn	Rouge cerise	Blanc
RM	Rouge de méthyl	Clark et Lubs	Quelques gouttes dans 2,5ml	-	Plus rouge de méthyl lecture immédiate	Rose	Jaune
MANNITOL	Mannitol	Mannitol-mobilité	piqûre centrale	Fermentation / Oxydation	-	Jaune	Rouge
MOBILITE		Mannitol-mobilité	piqûre centrale	Mobilité	-	Diffusion des bactéries dans le milieu	Néant
CITRATE		C-simmons	Stries longitudinales	Utilisation du citrate	Une seule source de carbone : citrate	Bleu (culture avec alcalinisation)	Vert
TSI/KIA		Gélose glucose-saccharose-lactose-H ₂ S	Culot : piqure centrale. Pente : stries	Fermentation/oxydation Thiosulfate en anaérobiose : H ₂ S production de gaz.	Différenciation entre Salmonella et P. <i>Vulgaris</i> ou P. <i>mirabilis</i>	Jaune	Rouge groseille
						Noir	Néant
						Bulles dans la masse	Néant
						Poche gazeuse décollante	Néant

2.2.2.3.3 LES STAPHYLOCOQUES

Les souches *S. Aureus* coagulase positifs sont des agents pathogènes potentiels et ils sont responsables d'un grand nombre d'infections.

2.2.2.3.3.1 Inoculation et incubation : (fig. 8)

- **Test présomptif :**

Le milieu utilisé est le m-Staphylococcus double et simple concentration (annexe2). Après ensemencement avec les quantités nécessaires d'eau de mer et homogénéisation, les tubes sont incubés pendant 24h à 37°C. Les tubes troubles sont considérés comme positifs.

- **Test confirmatif :**

Chaque tube positif sera ensemencer sur une boîte de Pétri contenant de la gélose Kranep (annexe 2). Le thiocyanate de potassium, inhibe la totalité de la flore secondaire alors que le pyruvate de sodium, et le mannitol favorise la croissance des Staphylocoques en compensant l'action des autres inhibiteurs (actidione, chlorure de lithium). La lecture se fait après incubation pendant 48h à 37°C. Les colonies typique de *S. Aureus* sont généralement jaune d' or.

2.2.2.3.3.2 L'identification:

Les colonies ayant dégradé le jaune d'oeuf subiront les tests d'identification qui sont.:

- **La recherche de la coagulase:**

Pour vérifier la production de la coagulase, chaque colonie est repiqué sur un tube de gélose au sang qui favorise les bactéries hémolytiques (annexe 2).

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, chaque tube de gélose au sang (BN) est inoculé dans un bouillon contenant une infusion de coeur et de cervelle (CC). C'est le milieu préférentiel pour le test de la coagulase libre (annexe 2); ces tubes sont incubés à 37°C de 8 à 20h.

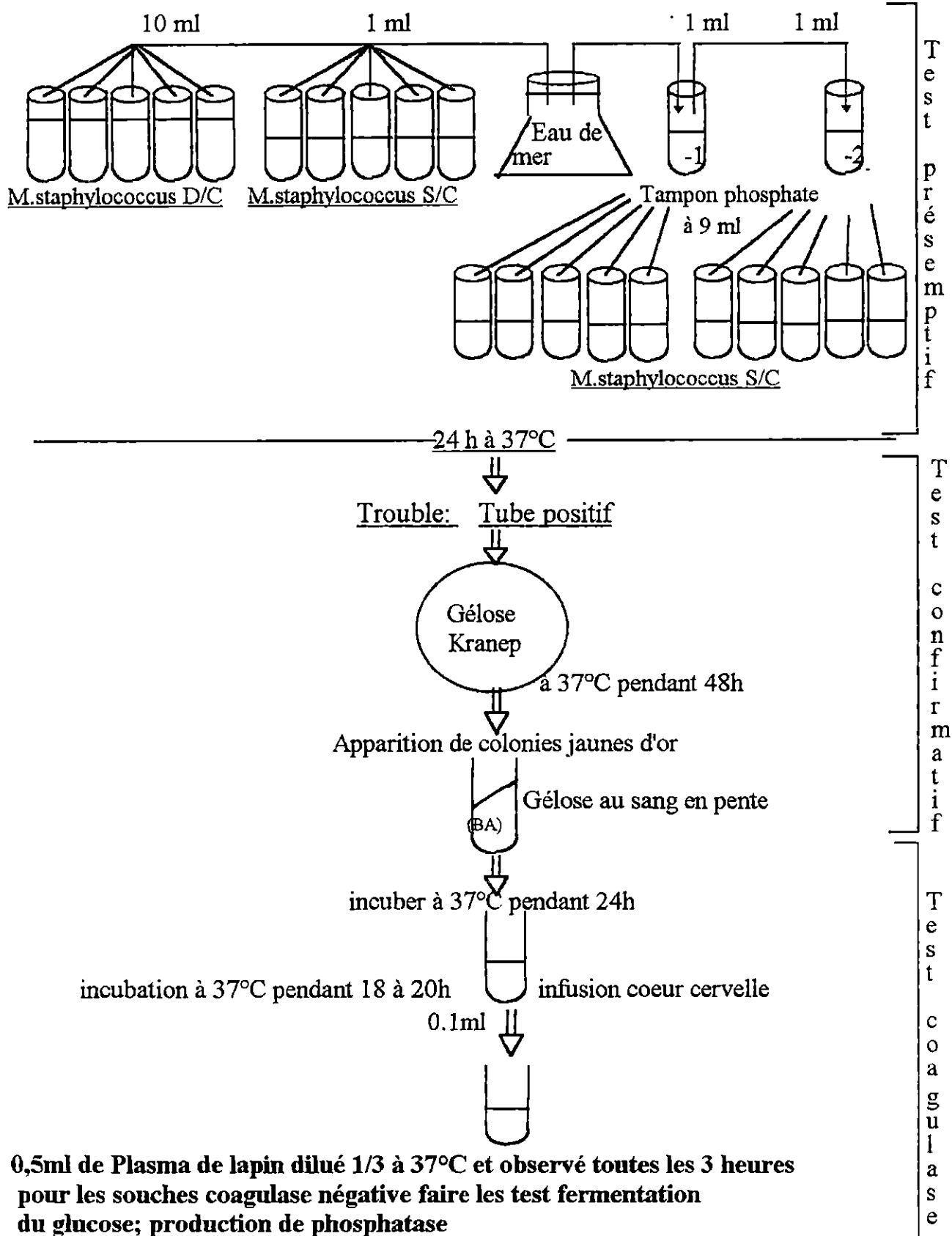


Figure 8: Schéma de la technique de recherche des Staphylocoques

Après incubation verser 0,1 ml (2 gouttes) de chaque milieu (CC) dans un tube contenant 0,5 ml de plasma de lapin dilué (1:3). Incuber à 37°C et observer toutes les 3 heures. L'apparition d'une coagulation pendant la période d'incubation constitue une réaction positive indiquant la présence de *S. Aureus*.

Une réaction de coagulation non satisfaisante, nécessite des tests complémentaires qui sont :

- un test de fermentation du glucose
- un test de production de la phosphatase
- Test de fermentation du glucose

Le milieu utilisé est le milieu d'oxydation / fermentation. Il doit être passé à la vapeur 10-15 m avant son utilisation afin d'enlever l'oxygène dissout.

Inoculer les tubes, et réaliser le test en condition ^{aérobie} en couvrant la surface des tubes avec une couche d'huile. Incuber à 37°C pendant 5 jours.

Les tubes sont considérés comme positifs s'ils présentent une production d'acide et un virage postérieur au jaune, celle-ci se manifeste par une fermentation du glucose et indique la présence de *S. Aureus*.

- Test de production de la phosphatase

Inoculer les plaques de production de phosphatase à partir de la gélose au sang: une goutte d'ammoniaque est versée dans le couvercle, les colonies qui viront au rouge foncé en présence de vapeur d'ammoniaque, sont identifiées comme *S. aureus*.

2.2.3 Etude de l'origine de la pollution

L'origine de la pollution fécale, a été étudiée par GELDREICH et KENNER (1969). Ces auteurs ont proposés pour l'étude de l'origine de la contamination, l'évaluation du rapport CF/SF. L'interprétation du rapport CF/SF est la suivante:

$CF/SF < 0.7$: la pollution est d'origine animale

$0.7 < CF/SF < 1$: la pollution est à prédominance animal

$1 < CF/SF < 2$: la pollution est d'origine inconnue (incertitude dans l'interprétation)

$2 < CF/SF < 4$: la pollution est à prédominance humaine

$CF/SF > 4$: La pollution est exclusivement urbaine (d'origine humaine).

2.2.4 Evaluation et traitement statistique des résultats

La qualité microbiologique des eaux côtières peut être interprétée en utilisant des méthodes de condensation des résultats basés sur la probabilité et la statistique.

Cette méthode d'évaluation de la concentration des indicateurs microbiens est fondée sur un modèle statistique (OMS / PNUE, 1995).

Les teneurs en indicateurs microbiens présents dans les échantillons d'eaux à analyser, suivent une distribution de probabilité lognormale. Cette méthode permet d'évaluer les concentrations microbiennes par rapport au pourcentage établis et aide à comprendre les variations dans le temps de la qualité microbiologique de l'eau côtière. Les résultats d'expérience sont triés en concentration croissantes et converties en logarithme naturel. A chacune des concentrations microbiennes est associées une fréquence cumulative $F(X_i)$ tel que :

$$F(X_i) = i/n+1 * 100$$

X_i = Concentration microbienne à la i ème position

$F(X_i)$ = Fréquence cumulative associée à la i ème concentration.

i = numéro d'ordre de chaque concentration microbienne.

n = nombre total de concentration microbienne.

La distribution des probabilités lognormale correspondant aux résultats des expériences est obtenue par la méthode numérique suivant une régression par la méthode des moindres carrés. La dispersion des résultats par rapport à leur valeur moyenne est obtenues par le calcul de l'écart type de la distribution définie par l'expression :

$$S = \text{Ln } xx84 - \text{Ln } xx50$$

ou

$$S = \text{Ln } xx50 - \text{Ln } xx16$$

xx84, xx50, xx16 étant les concentrations microbiennes non dépassées dans 84%, 50% et 16% des échantillons respectivement.

xx représente les deux initiales de l'indicateur microbien considéré. L'estimation de la déviation standard peut être interprétée de la manière suivante :

$S \leq 1$: Station de prélèvement avec une qualité microbienne très stable.

$1 < S < 3$: Station de prélèvement avec une variation temporaire de sa qualité microbiologique à l'intérieur des limites les plus couramment observées.

$S \geq 3$: Station de prélèvement avec une qualité microbiologique assez variable dû soit à une source discontinue de pollution, soit à un modèle variable de circulation côtière (variation de la direction des vents).

L'intervalle de confiance de la concentration microbienne médiane, xx50 à une station d'échantillonnage est déterminé par l'expression suivante

$$\begin{aligned} & \left[\exp \left(\ln (xx50) - S / \sqrt{n} * t_{1-\alpha/2, n-1} \right); \right. \\ & \left. \exp \left(\ln (xx50) + S / \sqrt{n} * t_{1-\alpha/2, n-1} \right) \right] \end{aligned}$$

xx50 : concentration microbienne non dépassée dans 50% des échantillons estimés à partir de la distribution lognormale.

S : écart-type de la distribution lognormale

$t_{1-\alpha/2, n-1}$: la variable de student possédant n-1 degrés de liberté correspondant à 95% de confiance.

n : nombre de concentrations microbiennes incluses dans la série de données.

α : niveau de signification.

RESULTS
&
INTERPRETATION



3. RESULTATS ET INTERPRETATION

3.1. Les niveaux de contamination bactérienne dans le site d'étude

Les résultats de la surveillance sanitaire des trois stations de prélèvements, sont représentés sur les tableaux 4, 5, 6 et la figure 9.

3.1.1. Les indicateurs fécaux

Station 1

L'évolution des concentrations en Coliformes Totaux (CT) et Streptocoques Fécaux (SF) montrent une variation similaire, pendant toute la période d'échantillonnage. Les concentrations les plus importantes ont été observées le 18 et le 25 mai 1996. Puis, elles diminuent progressivement jusqu'à atteindre leurs concentrations minimales le 16 juin. Une légère augmentation est observée le 30 juin (fig 9).

Les teneurs en Coliformes Fécaux évoluent différemment, leurs concentrations diminuent jusqu'au 1^{er} juin puis elles augmentent.

Station 2

La variation temporelle des Coliformes Totaux (CT) et Coliformes Fécaux (CF) est identique à celle de la station 1 avec seulement des teneurs plus faibles en Coliformes Fécaux. Les maximums et minimums observés se situent aux mêmes dates que la station (1).

Par contre les streptocoques Fécaux (SF) ont un maximum le 25 mai et un minimum le 16 juin.

Au dernier prélèvement, une augmentation des concentrations est relevée pour tous les témoins de contaminations.

Station 3

Il faut noter que cette station est la plus polluée par rapport aux stations une et deux. Pour les 3 premiers prélèvements la variation des Streptocoques Fécaux (SF) est très faible; puis, elle diminue progressivement.

Tableau 4 : Paramètres climatologiques, physico-chimiques et bactériologiques de l'eau de mer de la station 1 (Ain Benian)

Dates des prélèvements	Météorologie	T°C	CT / 100ml	CF / 100ml	SF / 100ml	CF/SF	Germes pathogènes
18 Mai	EM: houle légère DV : ouest TPS : ensoleillé	19.3	>110000	110000	110000	1	absents
25 MAI	EM: houle légère DV : nord ouest TPS : légèrement couvert	19.1	>110000	210	110000	0.001	absents
1 Juin	EM: assez calme DV : Est TPS : nuageux	19	46000	150	2100	0.07	absents
15 JUIN	EM: belle DV : Est TPS : ensoleillé	21	430	460	23	20	absents
29 JUIN	EM: agitée DV : ouest TPS : ensoleillé	18.5	2300	>1100	43	25.5	absents

EM = état de la mer, DV = direction du vent, TPS = temps

Tableau 5 : Paramètres climatologiques, physico-chimiques et bactériologiques de l'eau de mer de la station 2 (Ain Benian)

Dates des prélèvements	Météorologie	T°C	CT / 100ml	CF / 100ml	SF / 100ml	CF/SF	Germes pathogènes	Autres bactéries isolées
18 Mai	EM: houle légère DV : ouest TPS : ensoleillé	19.2	110000	24000	1500	16	absents	<i>Proteus morgani</i>
25 MAI	EM: houle légère DV : nord ouest TPS : légèrement couvert	19.1	110000	9300	110000	0.084	absents	-----
1 Juin	EM: assez calme DV : Est TPS : nuageux	19.1	9300	700	240	2.91	absents	-----
15 JUIN	EM: belle DV : Est TPS : ensoleillé	22	1500	150	43	3.48	absents	-----
29 JUIN	EM: agitée DV : ouest TPS : ensoleillé	18.5	9300	1100	75	14.66	absents	<i>Proteus morgani</i>

Tableau 6 : Paramètres climatologiques, physico-chimiques et bactériologiques de l'eau de mer de la station 3 (Ain Benian)

Dates des prélèvements	Météorologie	T°C	CT / 100ml	CF / 100ml	SF / 100ml	CF/SF	Germes pathogènes	Autres bactéries isolées
18 Mai	EM: houle légère DV : ouest TPS : ensoleillé	18.9	150000	2800	15000	0.18	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 / 100ml	----
25 MAI	EM: houle légère DV : Nord ouest TPS : légèrement couvert	19.2	2800	2800	1500	1.86	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 / 100ml	<i>Proteus vulgaris</i>
1 Juin	EM: assez calme DV : est TPS : nuageux	19	>110000	1100	9300	0.11	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 / 100ml	----
15 JUIN	EM: belle DV : est TPS : ensoleillé	21	75000	75000	20000	3.75	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 / 100ml	----
29 JUIN	EM: agitée DV : ouest TPS : ensoleillé	18.5	75000	75000	750	100	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 / 100ml	

EM = état de la mer, DV = direction du vent, TPS = temps

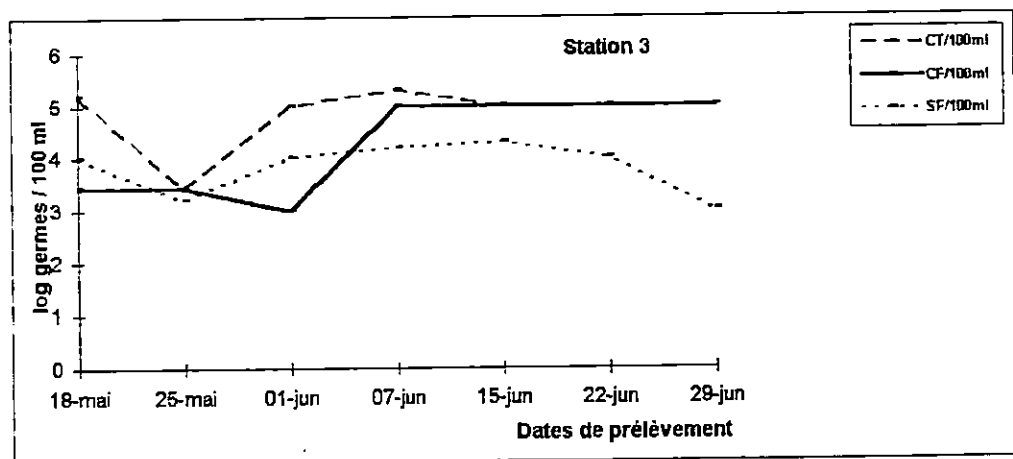
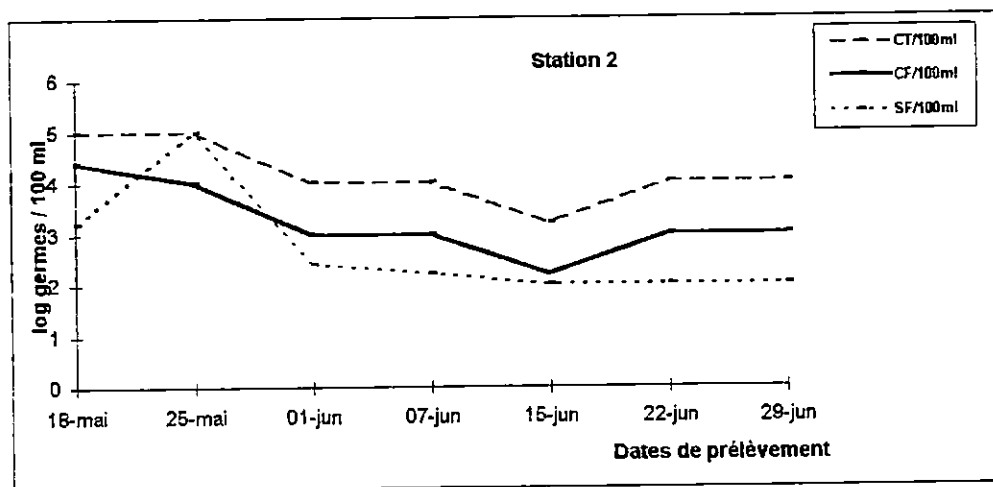
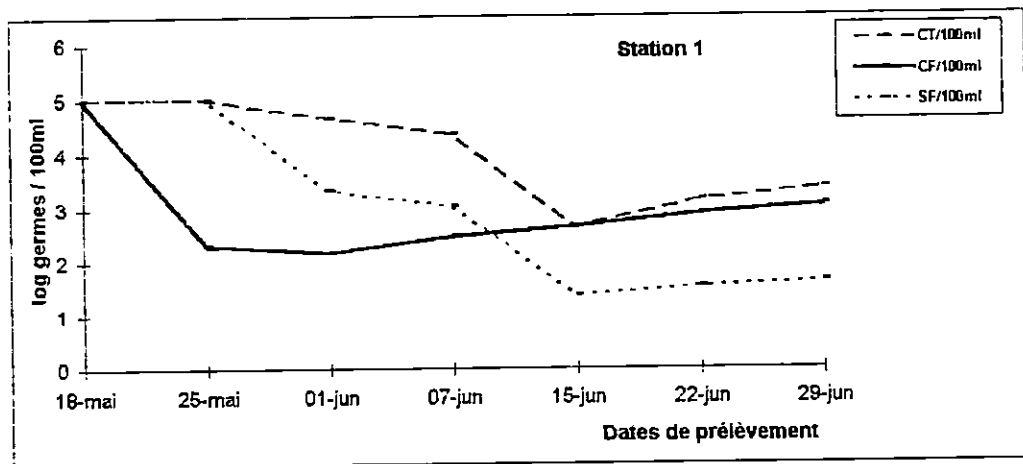


Figure 9: Evolution des germes fécaux: coliformes totaux (CT), coliformes fécaux(CF), et streptocoques fécaux (SF) en fonction des dates de prélèvement

Le point remarquable pour les Coliformes Totaux (CT) et Coliformes Fécaux (CF) se situe le 1^{er} juin, où les Coliformes Totaux (CT) sont au maximum et les Coliformes Fécaux (CF) sont au minimum; des teneurs observées pendant la période d'échantillonnage.

3.1.2 Les germes pathogènes

Pendant toute la période d'échantillonnage ni Salmonelles ni Vibrions n'ont été isolés, cependant *Proteus morgani* et *Proteus vulgaris* ont été identifiés à la station 2 et 3.

Les Staphylocoques n'ont été quantifiés qu'à la station 3, l'espèce *S. aureus* est présente à chacune des dates de prélèvement à des teneurs constantes de 23 germes/100ml. Ces souches ont toutes été confirmées comme étant coagulase positives, et sont donc des souches de *Staphylocoques aureus* pathogènes.

DISCUSSION & CONCLUSION



4. Discussion et Conclusion

Au cours de la période d'échantillonnage de l'eau de mer dans la région d'Ain Bénian trois augmentations en témoins de contamination fécale ont été observées le 18 mai, le 28 mai et le 30 juin. Cette augmentation peut être relié au fait que la mer à ces dates était soit légèrement agitée (18-25 mai) ou agitée le 30 juin. Cette augmentation des teneurs pourrait en partie s'expliquer par le fait qu'il y a eu une remise en suspension des micro-organismes piégés dans le sédiment (GAUTHIER, 1989), ou une diffusion des germes provenant de la station 2.

La station 3 s'est révélé être la station la plus polluée quel que soit le germe pris en considération, au niveau de cette station un égout important se déverse.

4.1. Rapport Coliformes Fécaux/Streptocoques Fécaux (CF/SF)

Ce rapport (CF/SF) permet de déterminer l'origine de la pollution fécale.

Station 1

- Les prélèvements 2 et 3 indiquent un rapport inférieur à 0,7, ce qui signifie que la pollution est d'origine animale (tableau 4).
- Les prélèvements 4 et 5 indiquent un rapport supérieur à 4, la pollution est d'origine humaine.
- Le rapport du 1^{er} prélèvement est de 1, la pollution est donc d'origine mixte.

Station 2

- Le rapport du 1^{er} et dernier prélèvement est supérieur à 4 ce qui signifie que l'origine de la pollution est exclusivement humaine (tableau 5).
- Pour le deuxième prélèvement, le rapport indique une concentration inférieur à 0,7 ce qui prouve que la pollution est exclusivement animale.
- Les prélèvements 3 et 4 présentent un rapport situé entre 2 et 4 donc la pollution est d'origine mixte avec une prédominance humaine.

Station 3

- Les prélèvements 1 et 3 indiquent un rapport inférieur à 0,7 donc la pollution est animale (tableau 6).
- Le rapport du dernier prélèvement est de 100 ceci indique une pollution humaine exclusive.
- Le 2^{ème} prélèvement présente un rapport de 1,86 ce qui indique une pollution mixte avec une origine incertaine.

Sur 15 prélèvements, 8 d'entre eux indiquent un rapport qui montre que l'origine de la pollution est d'origine humaine exclusive où prédominante. Ceci est probablement dû au rejet d'eaux domestiques des habitations riveraines sur le site étudié.

4.2 Résultats de l'étude statistique : méthode de la distribution lognormale

4.2.1 Les Coliformes Fécaux

L'écart type (S) est un paramètre caractéristique des variations de la qualité bactériologique de l'eau de mer, pendant la période d'observation (tableau 7).

La valeur estimée de la déviation standard est obtenue après normalisation des données (fig. 10) au moyen de la formule suivante:

$$\begin{aligned}
 S &= \text{Ln CF}_{84} - \text{Ln CF}_{50} \\
 S &= .13355,028 - 4385,493 \\
 S &= 1,11
 \end{aligned}$$

1 < S < 3 : Les stations de prélèvement ont une variation temporaire de leur qualité microbiologique à l'intérieur des limites les plus couramment observées (OMS/PNUE, 1995).

L'intervalle de confiance de la moyenne des concentrations microbiennes peut être obtenue à partir de chacune des séries possible, de n résultats microbiologiques (tableau 9) des stations de prélèvement (OMS / PNUE, 1995) avec :

Tableau 7: Evaluation de la qualité microbiologique de l'eau de mer de Ain-Benian, par un modèle lognormal : classement des teneurs en Coliformes fécaux

i	F(X _i)	X _i	ln F (X _i)	ln X _i
1	6.25	150	1.833	5.011
1	6.25	150	1.833	5.011
3	18.75	210	2.931	5.347
4	25	460	3.219	6.131
5	31.25	700	3.442	6.551
6	37.5	1100	3.624	7.003
6	37.5	1100	3.624	7.003
6	37.5	1100	3.624	7.003
9	56.25	2800	4.030	7.937
9	56.25	2800	4.030	7.937
11	68.75	9300	4.230	9.138
12	75	11000	4.317	9.306
13	81.25	24000	4.398	10.086
14	87.5	75000	4.472	11.225
14	87.5	75000	4.472	11.225

i = numéro d'ordre, F(X_i) = fréquence cumulative,
X_i = concentration microbienne.

Tableau 8: Evaluation de la qualité microbiologique de l'eau de mer de Ain-Benian, par un modèle lognormal : classement des teneurs en Streptocoques fécaux

i	F(X _i)	X _i	ln F (X _i)	ln X _i
1	6.25	23	1.833	3.135
2	12.5	43	2.526	3.761
2	12.5	43	2.526	3.761
4	25	75	3.219	4.317
5	31.25	240	3.442	5.481
6	37.5	750	3.624	6.620
7	43.75	1500	3.778	7.313
7	43.75	1500	3.778	7.313
9	56.25	2000	4.030	7.601
10	62.5	2100	4.135	7.650
11	68.75	9300	4.230	9.138
12	75	11000	4.317	9.306
12	75	11000	4.317	9.306
12	75	11000	4.317	9.306
15	93.75	15000	4.541	9.616

i = numéro d'ordre, F(X_i) = fréquence cumulative,
X_i = concentration microbienne.

$\alpha = 5\%$ (niveau de signification)

$n-1 = 14$ (degré de liberté)

$t = 2,145$ (valeur de la distribution de Student).

La valeur moyenne en coliformes fécaux évaluée au niveau des trois stations confondues appartient à l'intervalle de confiance suivant:

$$I C = [2368,4;8022,4]$$

Les valeurs moyennes logarithmiques des coliformes fécaux (CF50) dans l'eau de mer prélevée dans la zone d'étude est de 4386 CF / 100ml d'eau analysée. De même la valeur impérative (CF90) est de 15487 CF / 100ml d'eau de mer (fig 11). Les concentrations en coliformes fécaux obtenues dépassent les critères de salubrité concernant les eaux de baignade(annexe 4), dans 50% et 90% des échantillons analysés.

4.2.2 Les Streptocoques Fécaux

Après normalisation des teneurs en streptocoques fécaux (fig.10) par une transformation logarithmique. L'obtention d'un coefficient de corrélation hautement significatif ($R = 0.9574$); a permis l'estimation de la déviation standard:

$$S = \ln SF_{84} - \ln SF_{50}$$

$$S = 9790,644 - 2320,409$$

$$S = 1,44$$

$1 < S < 3$: Les stations de prélèvement ont une variation temporaire de leurs qualité microbiologique (tableau 8) à l'intérieur des limites les plus couramment observées (OMS / PNUE, 1995).

L'intervalle de confiance de la moyenne des concentrations microbiennes, est obtenue à partir de chacune de la série de $n = 15$ résultats microbiologiques échantillonnées (tableau 9).

Tableau 9 : Evaluation de la qualité bactériologique de l'eau de mer échantillonnée à Ain-Benian selon le modèle lognormal.

Concentrations des Germes /100ml	S	IC	Observation
CF 50 = 4386 CF 84 = 13355 CF 90 = 15487	1,11	[2368; 8022]	insatisfaisant
SF 50 = 2320 SF 84 = 9791 SF 90 = 11857	1,44	[1963; 9681]	insatisfaisant

S = écart-type, IC = intervalle de confiance.

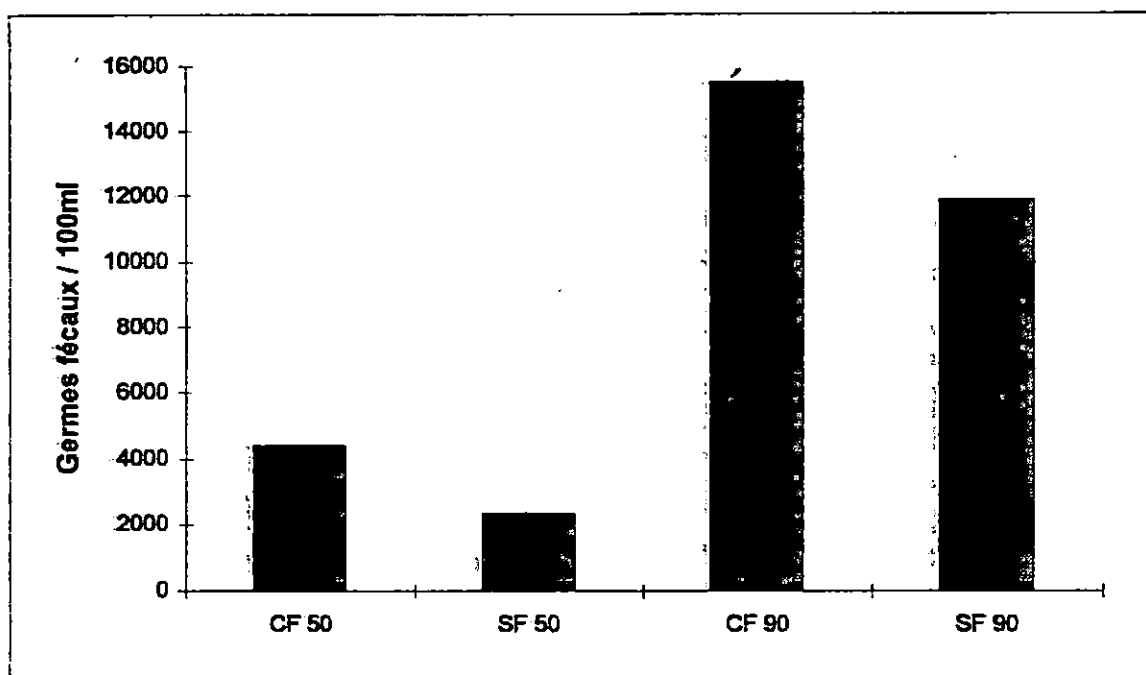


Figure 10 : Histogrammes des valeurs guides et impératives des Coliformes fécaux (CF), et Streptocoques fécaux (SF) observés dans l'eau de mer de Ain-Benian

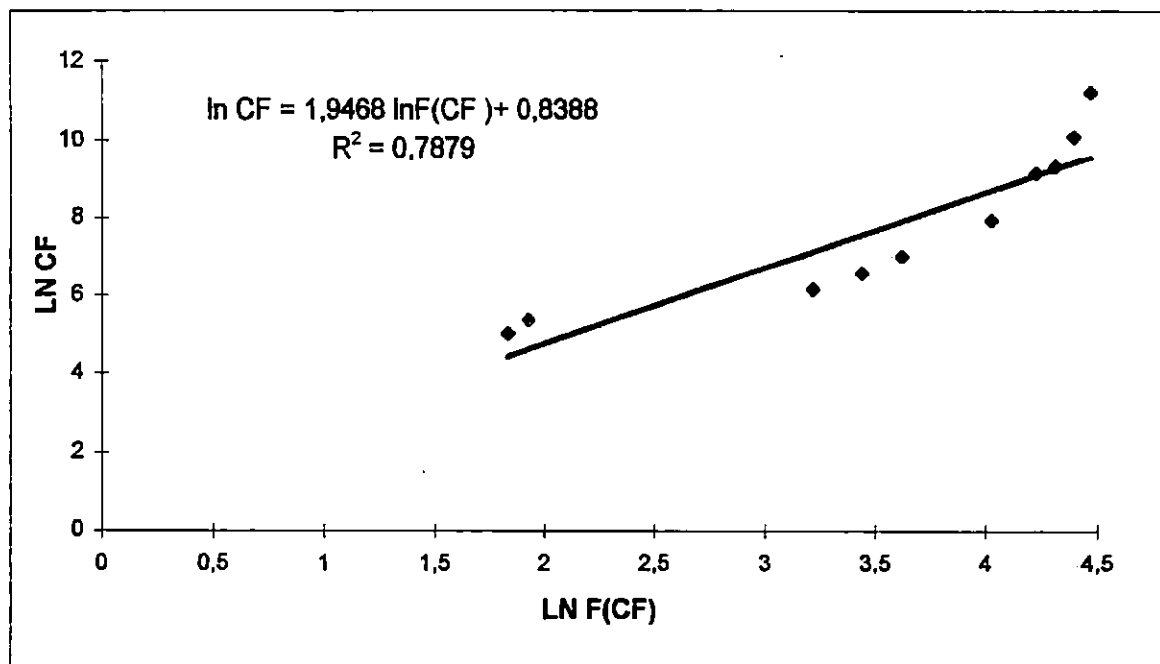


Figure 11 : Normalisations des taux en Coliformes fécaux (CF) observés par la distribution Gausso-logarithmique.

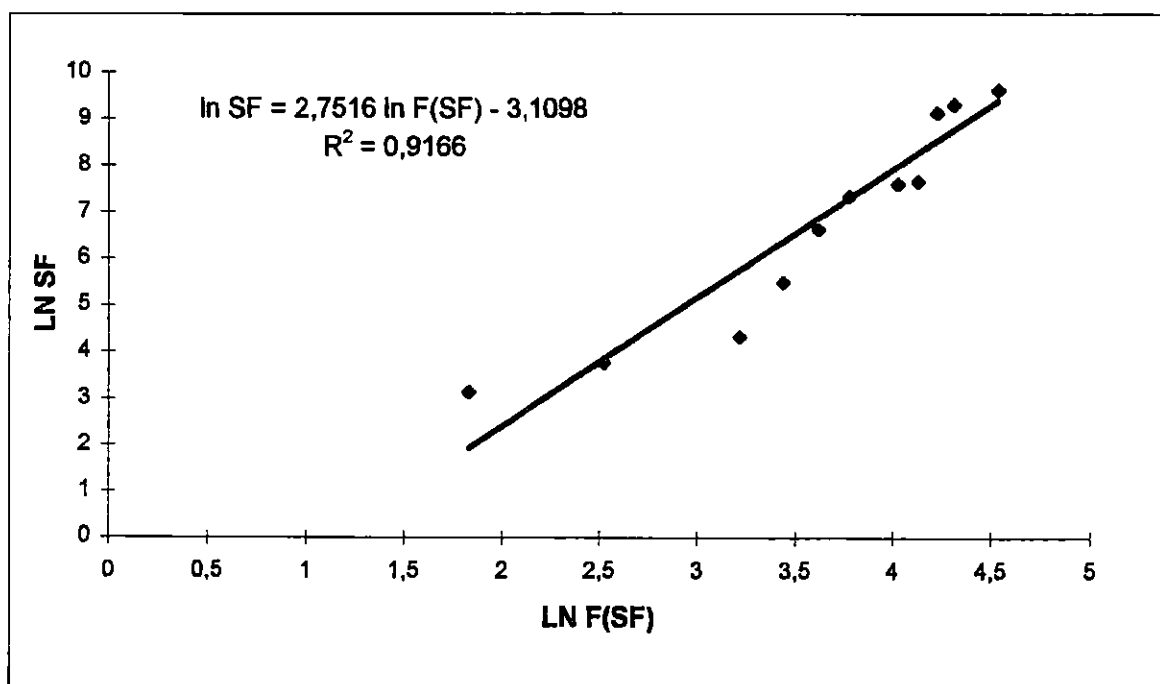


Figure 12 : Normalisations des taux en Streptocoques fécaux (SF) observés par la distribution Gausso-logarithmique.

D'après l'OMS / PNUE, (1995):

$\alpha = 5\%$ (niveau de signification)

$n-1=14$ (degré de liberté).

$t = 2,145$ (valeur de la distribution de Student)

$$IC = [\exp(\ln SF_{50} - S/\sqrt{n} * t_{1-\alpha/2, n-1}); \ln SF_{50} + S/\sqrt{n} * t_{1-\alpha/2, n-1})]$$

$$IC = \exp(8,38-0,798); \exp(8,38+0,798)$$

$$IC = 1962,7 \text{ SF/100ml} ; 9681,7 \text{ SF/100ml}$$

l'intervalle de confiance de l'eau de mer analysé au niveau des 3 stations étudiées signifient que 95% des valeurs se situeraient dans l'intervalle compris entre [1962,7 ; 9681,7] CF / 100ml.

La valeur moyenne logarithmique des streptocoques fécaux (SF50) obtenue (fig. 12) dans l'eau de mer prélevée à Ain Benian est de 2320 SF / 100 ml d'eau de mer. Cette valeur dépasse largement celle préconisée par l'OMS / PNUE, 1995 .

La valeur impérative (SF90) est de 11857 SF / 100ml. Cette charge dépasse aussi la valeur norme. Les valeurs obtenues dépassent largement les normes préconisées par l'OMS / PNUE, 1995 pour les eaux à usages récréatifs.

Les valeurs guides et impératives en coliformes fécaux, obtenues indiquent une pollution récente de la zone étudiée. Ceci est expliqué par les déversements continues des habitations riveraines.

CONCLUSION GENERALE



5. CONCLUSION GENERALE

L'étude de la pollution bactérienne du site d'Ain Bénian, par la méthode préconisée par l'OMS / PNUE (NPP) a permis de donner un aperçu global de l'état de salubrité de cette côte.

La zone étudiée est considérée comme insalubre au regard des critères établis par les normes algériennes (annexe 4).

Néanmoins, l'absence de germes pathogènes tels que les Salmonelles et Vibrions sauf pour les Staphylocoques rassure sur l'impact réel de la pollution au niveau de cette zone qui est influencé par :

- l'état de la mer.
- Le débit des égouts.
- La direction et la vitesse du vent.
- Le déversement anarchique de déchets domestiques.

La durée de l'étude s'est étalée sur deux mois (mai et juin, 1996), elle ne constitue donc qu'un aperçu ^{potentiel} de l'état de pollution dans la zone d'étude. La méthode préconisée par l'OMS / PNUE (1995), nécessite une évaluation continue de l'état de pollution et l'établissement de ses tendances saisonnières.

Afin de diminuer la charge microbienne et pallier aux problèmes qu'elle peut engendrer, il serait souhaitable de traiter les eaux domestiques ou tout au moins d'installer des émissaires qui permettent la dispersion de la charge polluante hors de portée du site. Ce qui permettra à la fois d'économiser pour l'homme une ressource naturelle qui devient insuffisante, et de sauvegarder la Méditerranée, aujourd'hui particulièrement menacée.

BIBLIOGRAPHIE

- AMINOT A., CHAUSSEPIED M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEOX : 75-76.
- BLANCHI M., MARTY D., BERTRAND J. C., CAUMETTE P., GAUTHIER M., 1976. Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Masson, Edit. Paris: 323p.
- BONDE G. J., 1986. Studies on the dispersion and disappearance phenomena of enteric bacteria in the marine environment. *Rev. Int. Oceanog. Méd.*, tome 9: 17 - 44.
- BORREGO J. J., ARRABAL F., ROMERO P., 1982. Study of the microbiological pollution of Malaga littoral areas: relation ship between faecal Coliformes and faecal Streptococci. VI^{ème} journée. Etud. Pollution. C.I.E.S.M, Cannes: 561 -564.
- BOUDJELLAL B. Y., SELLALI B., 1994. Présentation de la côte algérienne: configuration et particularité. *Work shop sur la pollution marine accidentelle*, Bejaia: 4p.
- BRISOU J. F., DENIS F. A., 1978. Hygiène de l'environnement maritime. Masson, Edit. Paris: 218p.
- BRISOU J. F., DENIS F. A., 1980. Technique de surveillance de l'environnement maritime. Masson, Edit. Paris: 206p.
- FONTAINE M., PERES J. M., 1976. La pollution des eaux maritimes. Gauthier Villars, Edit. Paris : 117-126.
- GAUTHIER M. J., 1976. Pollution et génétique: échanges de gènes entre bactéries hétérotrophes autochtones et allochtones en milieu marin. Gauthier -Villard, Edit. Paris: 328 - 329.
- GELDREICH E. E. E; KENNER B.A; 1969. Concept of faecal streptococci in stream pollution. *J. Water. Pollution. Control Fed.*, 41, R336.
- LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J., WATTRE R., 1977. Microbiologie appliquée. Doin, Edit. Paris: 158p.
- MARCHAL N., BOURBON J. L., RICHARD D., 1987. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Edit. Paris: 505p.
- MERCK C., 1986. Manuel de microbiologie. Merck, Edit. Darmstadt: 191p.
- O.M.S./ P.N.U.E., 1977. Directives applicables à la surveillance sanitaire de la qualité des eaux littorales. Bureau régional pour l'Europe, Copenhague: 25p.
- O.M.S./ P.N.U.E., 1983. Détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de référence pour les études de pollution marine, 4 (1): 24p.

- O.M.S. / PNUE., 1995. Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles: quelques agents bactériens pathogènes. III (3): 1- 14.
- O.M.S./ PNUE., 1995. Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles: recommandations générales. I (041): 45 - 47.
- PICHOT G., BARBELLES J., 1978. Estimation des taux moyens de disparition des bactéries fécales dans les eaux côtières Belge de la mer du Nord. *Rev. Int. Océanog Méd.*, tomes LI-LII:115 - 126.
- PLUSQUELLEC A., 1984. Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales: cas particulier de la baie de Concarneau la forêt. Thèse Doct. Sci., Univ. Brest: 202p.
- QUILLIEN J., 1980. Inspection sanitaires des coquillages. Thèse Doct. Sci., Univ. Toulouse : 242p.
- RODIER J., 1984. L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer. 7^{ème} Edit. Dunod : 1364p.
- SINGLETON P., SAINSBURY D., 1984. Bactériologie. Masson, Edit. Paris: 158p.
- VANELLE A. M., 1991. Le contrôle bactériologique des coquillages vivants. *Rev. Inter. Oceanog. Méd.*, tomes 101-102-103-104: 63 -71.

ANNEXES



Annexe 1: Nombre le plus probable et intervalle de confiance dans le cas du système d'ensemencement dans trois tubes. Table de MAC.GRADY (RODIER, 1984)

NOMBRE DE TUBES DONNANT UNE REACTION POSITIVE SUR:			N.P.P DANS	LIMITE DE CONFIANCE A 95%	
3 TUBES DE 10ml	3 TUBES DE 1ml	3 TUBES DE 0.1ml		LIMITE INFERIEURE	LIMITE SUPERIEURE
0	0	1	3	< 0.5	9
0	1	0	3	< 0.5	13
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	440
3	2	1	150	35	470
3	2	2	210	36	1300
3	3	0	240	71	2400
3	3	1	460	150	4800
3	3	2	1100		

Annexe2: MILIEUX DE CULTURES ET REACTIFS.

Recherche des Coliformes totaux et fécaux.

• Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (B.C.P.L)

Composition en g/l:

Peptone de viande	5
Extrait de viande	3
Lactose	10
Pourpre de bromocrésol	0.025

pH final: 7, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes

Utilisation: milieu d'isolement non sélectif des *Entérobacteriaceae*

Mode d'action: la fermentation du lactose se manifeste par une production d'acide qui entraîne le virage du pourpre de bromocrésol au jaune.

• Bouillon lactosé bilié au vert brillant (V.B.L.)

Composition en g/l:

Peptone de viande	10
Lactose	10
Bile de boeuf desséchée	20
Vertbrillant	0.0133

pH final: 7.2, autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation: milieu nutritif pour l'enrichissement et la détermination du titre en *E.coli* des eaux usées, eaux résiduaires, produits laitiers et autres.

milieu d'isolement non sélectif des *Entérobacteriaceae*

Mode d'action: la bile et le vert brillant inhibent fortement la croissance de la flore secondaire.

La fermentation du lactose avec dégagement gazeux, témoin de la présence d'*E.coli*, est mise en évidence au moyen de la cloche de DURHAM; d'autres coliformes peuvent aussi se développer sans production de gaz.

• Eau peptonée exempte d'indole (E.P.I.)

Composition en g/l:

Peptone tryptique de caséine	10
NaCl	5

Autoclaver à 115°C pendant 20 minutes.

Utilisation: mise en évidence de la formation de l'indole.

Mode d'action: la capacité ou l'incapacité de former l'indole à partir du tryptophane est un caractère taxonomique. La caséine obtenue par dégradation tryptique contient un taux élevé en tryptophane. L'indole formée est mise en évidence par le réactif de KOVACS.

• Réactif de KOVACS

Composition en g/l:

Paradiméthylamino-benzaldehyde	5
Alcool amylique	75
Acide chlorydrique pure	35

Recherche des streptocoques fécaux

- **Milieu de ROTHE**

Composition en g/l:

Peptone de caséine	20
Glucose	5
NaCl	5
Phosphate bipotassique	2.7
Phosphate monopotassique	2.7
Azide de sodium	0.7

pH final: 6.8 ± 0.2 , autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation: pour l'enrichissement des **streptocoques fécaux** dans les eaux d'alimentation, eaux usées, eaux de mer, coquillages, etc.

Mode d'action: l'azide de sodium inhibe la flore secondaire.

- **Milieu de LITSKY (EVA)**

Composition en g/l:

Peptone de caséine	20
Glucose	5
NaCl	5
Phosphate bipotassique	2.7
Phosphate monopotassique	2.7
Azide de sodium	0.3
Ethyle violet	0.0005

pH final: 6.8 ± 0.2 , autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation: milieu destiné à la mise en évidence des **streptocoques fécaux**.

Mode d'action: la présence de l'ethyle violet en fait un milieu plus sélectif.

Recherche des salmonelles.

- **Bouillon au sélénite de sodium (S.F.B.)**

Composition en g/l:

Peptone de viande	5
Lactose	4
Sélénite de sodium	4
Phosphate dipotassique	10

pH final: 6.8 à 7, autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation: milieu d'enrichissement.

Mode d'action: destiné exclusivement à la recherche des **salmonelles**.

- **Gélose Hektoen**

Composition en g/l:

Protéose peptone	12
Extrait de levure	3
NaCl	5
Thiosulfate de sodium	5

Saccharose	12
Lactose	12
Salicine	2
Citrate ferrique ammoniacal	1.5
Sels biliaires	9
Bleu de bromothymol	0.064
Fushine acide	0.04
Agar	13.5

pH final: 8.6, ne pas autoclaver.

Utilisation: le pouvoir sélectif est assuré par les sels biliaires qui limitent le développement des Coliformes et des Proteus.

Mode d'action: l'identification des bactéries isolées est basée sur l'attaque des trois sucres: salicine, lactose, et saccharose. Les Salmonelles n'attaquent aucun de ces sucres.

• Triple sugar iron (T.S.I.)

Composition en g/l:

Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptone de caséine	5
Peptone de viande	5
Lactose	10
Saccharose	10
D-glucose	1
Citrate ferrique d'ammonium	0.5
NaCl	5
Thyosulfate de sodium	0.3
Rouge de phénol	0.024
Agar	12

pH final: 7.8, autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation: utiliser pour l'identification des Entérobactéries.

Mode d'action: permet de mettre en évidence l'attaque de trois sucres, et la production de l'hydrogène sulfuré. L'utilisation du glucose apparait au niveau du culot, le lactose et/ou le saccharose au niveau de la pente. Le thiosulfate est réduit en hydrogène sulfuré, il réagit avec les sels ferriques en donnant du sulfure de fer (H_2S).

Recherche des vibrions

• Eau peptonée alcaline 10 fois concentré (E.P.A)

Composition en g/l:

Peptone	80
NaCl	5

pH final: 9.2, autoclaver à 115°C pendant 20 minutes.

- **Gélose KRANEP**

Composition en g/l:

Peptone de viande	10
Chlorure de sodium	3
Phosphate dissodique	2
Thiocyanate de potassium	25.5
Azide de sodium	0.05
Actidione	0.041
Chlorure de lithium	5.1
D(-) manitol	5.1
Pyruvate de sodium	8.2
Agar	13.5
Emulsion de jaune d'oeuf	100ml

pH final: 6.9±0.1

Utilisation: gélose selective pour l'isolement de tous les *Staphylocoques* et *Microcoques*

Mode d'action: le chlorure de lithium et l'azide sont des bactériostatiques à larges spectre d'inhibition.

Le thiocyanate de potassium inhibe la totalité de la flore secondaire. Le pyruvate de sodium favorise la croissance des Staphylocoques.

- **Base de gélose au sang (BA)**

Composition en g/l:

Muscle de coeur de boeuf, infusion de	375
Tryptone	10
Chlorure de sodium	5
Agar	15

pH final: 7.4 ± 0.2

Utilisation: permet la vérification de la coagulase de chaque colonie typique de *S.aureus*.

- **Coeur cerveau**

Composition en g/l:

Infusat de cerveau	12.5
Infusat de coeur	5
Protéose- peptone	10
D(+)- glucose	2
Chlorure de sodium	5
Dihydrogénophosphate de sodium	2.5

pH final: 7.4

Utilisation: bouillon d'hémoculture, permet de confirmer la coagulase de chaque colonie typique de *S. aureus*.

- **Plasma de lapin**

Composition en g/l:

1 à 2 mg d'EDTA (éthylène- diamine- tetraacétate), pour 1 ml de sang de lapin.

Utilisation: confirmation du test de la coagulase.

- **Gélose KRANEP**

Composition en g/l:

Peptone de viande	10
Chlorure de sodium	3
Phosphate dissodique	2
Thiocyanate de potassium	25.5
Azide de sodium	0.05
Actidione	0.041
Chlorure de lithium	5.1
D(-) manitol	5.1
Pyruvate de sodium	8.2
Agar	13.5
Emulsion de jaune d'oeuf	100ml

pH final: 6.9±0.1

Utilisation: gélose sélective pour l'isolement de tous les **Staphylocoques** et **Microcoques**

Mode d'action: le chlorure de lithium et l'azide sont des bactériostatiques à large spectre d'inhibition.

Le thiocyanate de potassium inhibe la totalité de la flore secondaire. Le pyruvate de sodium favorise la croissance des **Staphylocoques**.

- **Base de gélose au sang (BA)**

Composition en g/l:

Muscle de coeur de boeuf, infusion de	375
Tryptone	10
Chlorure de sodium	5
Agar	15

pH final: 7.4 ± 0.2

Utilisation: permet la vérification de la coagulase de chaque colonie typique de *S.aureus*.

- **Coeur cerveau**

Composition en g/l:

Infusat de cerveau	12.5
Infusat de coeur	5
Protéose- peptone	10
D(+)- glucose	2
Chlorure de sodium	5
Dihydrogénophosphate de sodium	2.5

pH final: 7.4

Utilisation: bouillon d'hémoculture, permet de confirmer la coagulase de chaque colonie typique de *S. aureus*.

- **Plasma de lapin**

Composition en g/l:

1 à 2 mg d'EDTA (éthylène- diamine- tetraacétate), pour 1 ml de sang de lapin.

Utilisation: confirmation du test de la coagulase.

Annexe3: Coloration de GRAM

MODE OPERATOIRE

- Préparer un frottis sur une lame.
- Recouvrir le frottis fixé avec le colorant primaire (violet de gentiane).
- Laisser agir une minute puis jeter le colorant.
- Recouvrir la lame de lugol, laisser agir 20 secondes.
- Jeter le mordant (lugol), et recommencer une deuxième fois.
- Rincer la lame à l'eau distillée.
- Incliner la lame, laisser tomber goutte à goutte l'agent de décoloration (alcool).
- Laver abondamment à l'eau distillée.
- Recolorer à l'aide d'un colorant de contraste (fuchsine), laisser agir 2 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher la lame au dessus d'une flamme ou d'une plaque chauffante.
- Observer au microscope et décrire.

Annexe 4: Normes pour la qualité microbiologique des eaux de baignade

Tableau 10: Normes Algériennes requises pour la qualité des eaux de baignade

Décret exécutif N° 93 - 164. (Journal officiel n° 46 du 14/07/1993)

Paramètres	Unités	Valeurs guides	Valeurs impératives
CT	/100ml	500	10000
CF	/100ml	100	2000
SF	/100ml	100	--
Salmonelles	1 litre	--	0
Vibrios	/450ml	--	0

Les concentrations inférieures ou égales aux valeurs guides indiquent une eau de bonne qualité.

- Les eaux dont les concentrations sont comprises entre les valeurs guides et limites sont de qualité acceptable et doivent faire l'objet d'une surveillance continue.

Tableau : Qualité microbiologique d'une eau côtière méditerranéenne à usage récréatif selon les critères provisoires OMS / PNUE. (86)

Paramètre qualité de l'eau	Concentrations microbiennes, CF / 100ml	
	Critères	Observations
CF50	100	8
CF90	1000	140