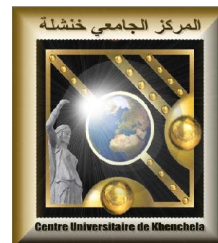


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur
Et
De la Recherche Scientifique



Université Abbès LaghrourKhenchela
Institut des Sciences de la Nature Et de la Vie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère
Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques

Présenté par

MERRADI Manel

Thème

**Contribution à l'étude d'un agent microbien auto-épurateur de
l'eau isolée d'un écosystème aquatique continental de la région
de Khenchela**

Soutenu le: 04 /04 /2012

Devant le jury:

M. HOUHA Belgacem (MCA)	Université de Khenchela	(Président)
M. HOUHAMDI Moussa (Prof)	Université de Guelma	(Encadreur)
M.DARBOUCHE Abdelhak (Prof)	Université de Khenchela	(Examineur)
M. BENOUNIS Messaoud (MCA)	Université de Khenchela	(Examineur)
Melle. METALLAOUI Sophia (MCB)	Université de Skikda	(Membre invité)
M. AYACHI Omar (MCB)	Université de Batna	(Membre invité)

2011-2012

Remerciement:

En premier lieu, je remercie **Mon DIEU TOUT PUISSANT** de l'aide et de l'effort qui m'a octroyé durant la réalisation de ce mémoire.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à Mon promoteur le *Professeur Houhamdi Moussa* d'avoir accepté diriger ce travail, pour l'aide qu'il m'a apporté, pour ses remarques précieuses et sa disponibilité durant les phases de travail, ses encouragements, ses compétences scientifiques, son ouverture d'esprit et sa gentillesse.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de département des sciences vétérinaires de l'université de Batna sous la direction de *Monsieur le Docteur Ayachi Ammar* que je remercie pour l'accueil, la confiance et le soutien qu'il m'a accordé.

Que Messieurs les *Docteurs Darbouche Abdelhak* et *Houha Belkacem, Benounis Messaoud, Ayachi Omar* et *Metallaoui Sophia* reçoivent l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le Directeur de laboratoire d'hygiène de Batna et tous les laborantins de ce laboratoire pour leur aide surtout *Benmakhlouf Amine*.

Mes sincères remerciements vont à toute ma promotion de post-graduation surtout *Karima, Mokthar* et *Keltoum*.

Enfin, à tous ceux qui ont œuvré de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Louange à **Allah**, Celui qui lui glorifie ce qui est dans les cieux et dans les terres, et que la prière et le salut de mon Seigneur soient sur son Serviteur **Mohamed**. (Que le salut soit sur Lui).*

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment et qui trouvent ci après l'expression de ma sincère gratitude :

*Sans aucune doute et avant tous, aux prunelles de mes yeux : **Mes très chers parents**, pour leur tendresse, amour, sacrifice « O mon Seigneur fais-leur ; à tous deux ; miséricorde comme ils m'ont élevé tout petit », pour l'aide massive et assidue tant morale, affective et financière qu'ils m'ont apporté durant ma vie et mes études. "Aucune dédicace ne peut exprimer ma profonde reconnaissance et mon amour infini pour eux".*

A toute la famille Merradi et Ayachi.

A toutes mes chères amies sans exception.

A mes collègues en traduction.

A tous les musulmans qui attestent à Notre DIEU de Monothéisme et son Prophète de révélation. Que DIEU nous rassemble tous en son grand paradis (Amen).

Liste des figures

N° de figure	Titre de figure	N° de page
01	<i>Bdellovibrio bactériovor</i> us.	14
02	Photo du bdelloplaste (Microscope électronique).	18
03	Les différentes étapes du cycle de vie de <i>B.bacteriovorus</i> .	20
04	Cycle des mutants de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> .	20
05	Photo de la souche <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> W durant la formation de bdellocystes (Microscope électronique).	21
06	Photo de la station d'épuration de Khenchela.	24
07	Le dégrilleur.	26
08	Le dessablage et le déshuilage.	27
09	L'aérateur	28
10	Le clarificateur.	28
11	Recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22 et à 37°C dans les eaux.	39
12	Recherche de spores de bactéries anaérobies sulfite-Réductrices et de <i>Clostridium</i> sulfite-réducteurs.	45
13	Mode opératoire de la galerie API 20 E.	49
14	Fiche de résultat du système API 20E.	50
15	Technique de l'Antibiogramme.	54
16	Résultats de l'identification biochimique par API 20E.	68
17	Résultats des suspensions bactériennes avec de l'eau filtrée des différents prélèvements.	72
18	Résultats l'isolement de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> sur milieu solide.	74
19	Plages de lyse de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> .	74

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre du tableau	N° de page
01	Coordonnées de la station d'épuration des eaux usées de la wilaya de Khenchela.	23
02	Informations générales sur la station d'épuration.	23
03	Nature et période de prélèvement.	33
04	Test de la staphylocoagulase.	52
05	Résultats des analyses physicochimiques.	58
06	Qualité des eaux usées en fonction du pH.	59
07	Qualité des eaux usées en fonction de la conductivité électrique.	60
08	Qualité des eaux usées en fonction des matières en suspension.	61
09	Grille de la qualité globale des eaux usées.	61
10	Résultats des germes totaux.	62
11	Résultats des NPP pour les coliformes totaux.	63
12	Résultats des NPP pour les coliformes fécaux.	63
13	Résultats des NPP pour les Streptocoques D.	64
14	Ratio CF/SF et source de contamination.	64
15	Résultats de m'aspect macroscopique et microscopique des colonies.	65
16	Résultats de l'antibiogramme d'<i>E.coli</i>.	69
17	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>.	69
18	Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.	70

19	Résultats des variations de l'absorbance des suspensions bactériennes d'<i>Escherichia coli</i> additionnées de 0.5ml d'eau filtrée de chaque prélèvement.	71
20	Variations du nombre des cellules viables dans les suspensions bactériennes (<i>Escherichia coli</i>) additionnées chacune à 0.5ml des eaux filtrées de chaque prélèvement.	72

Liste des abréviations

BCPL : bouillon lactosé au pourpre de bromocésol.

DBO : la demande biochimique en oxygène.

DCO : la demande chimique en oxygène.

FTAM : la flore mésophile aérobie totale.

GN : gélose nutritive.

MES : les matières en suspension.

NO₃⁻ : les nitrates.

pH : le potentiel d'hydrogène.

STEP : station d'épuration.

T (°C) : la température.

VF : viande foie.

YP : Yeast peptone.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
Chapitre I : pollution biologique de l'eau et épuration	3
I. Pollution de l'eau	3
I.1.Définition	3
I.2.Origine	3
I.2.1.La pollution biologique	3
I.2.1.1. La pollution organique	3
I.2.1.2. La pollution microbienne	4
I.2.1.2.1.Les microorganismes autochtones	4
I.2.1.2.2.Les microorganismes allochtones	4
II. Eaux usées	5
II.1.Définition	5
II.2.Nature et origine	5
II.2.1.Les eaux usées domestique	5
II.2.2.Les eaux usées industrielles	6
II.2.3. Les eaux usées urbaines	6
III.L'autoépuration	6
III.1.Mécanismes de l'autoépuration	7
III.1.1.Mécanismes physicochimique	7
III.1.1.1.La lumière	7
III.1.1.2.La température	8
III.1.1.3.Les métaux lourds	8
III.1.1.4.Le pH	8
III.1.1.5.La pression	9
III.1.1.6.L'oxygène dissous	9
III.1.1.7.La sédimentation	9
III.1.2.Mécanismes biologique	10
III.1.2.1.Compétition	10
III.1.2.2.Amensalisme	10
III.1.2.3.Parasitisme	11
III.1.2.3.1. Bactériophages	11

III.1.2.4.Prédation	11
III.1.2.4.1.Protozoaires	12
III.1.2.4.2.Bactéries prédatrices	12
IV. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	12
IV.1.Découverte et historique	13
IV.2.Morphologie	13
IV.3.Taxonomie	14
IV.4.Ecologie	15
IV.5.Structure du génome	16
IV.6.Cycle de vie de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	16
IV.6.1.La phase d'attaque	16
IV.6.2.La phase d'attachement	17
IV.6.3.La phase de pénétration	17
IV.6.4.La phase de croissance intrapériplasmique	18
IV.6.4.1.Propriétés de la membrane du bdelloplaste et du prédateur	19
IV.6.5.La phase de segmentation et de libération	19
IV.6.6.Les bdellocystes	21
IV.7.Pathologie	21
IV.8.Application à la biotechnologie	22
V. Épuration des eaux usées par les stations d'épuration	22
V.1.Description de la zone d'étude	23
V.1.1.Localisation	23
V.1.2.Informations générales	23
V.2.Objectif du traitement	24
V.3.Etapes d'épuration	25
V.3.1.Prétraitement	25
V.3.1.1.Le dégrillage	25
V.3.1.2.Le dessablage	26
V.3.1.3.Le déshuilage	26
V.3.2. Le traitement biologique par boues activées	27
V.3.3.Le traitement secondaire	28
V.3.4.La désinfection	29
V.3.5. Traitement des boues	29
V.3.5.1.Epaississement	30
V.3.5.2.Déshydratation	30
V.3.5.3.Valorisation de la boue	31

Chapitre II : Matériel et méthodes	32
Objectif du travail	32
I.1. Echantillonnage	32
I.2. Prélèvement	32
I.2.1. Matériel de prélèvement	32
I.3. Transport et conservation au laboratoire	32
I.4. Nature et période de prélèvement	33
II. Analyse physicochimique	33
II.1. Mesure in situ	33
II.1.1. Température	33
II.1.2. pH	34
II.1.3. Conductivité électrique	34
II.1.4. Turbidité	34
II.2. Matières en suspension (MES)	35
II.3. Les nitrates (NO_3^-)	35
II.4. Demande biochimique en oxygène (DBO ₅)	36
III. Analyse bactériologique	37
III.1. Préparation des dilutions	37
III.2. Dénombrement des germes totaux	38
III.3. Dénombrement des coliformes	39
III.4. Recherche et dénombrement des Streptocoques D (fécaux)	42
III.5. Recherche de spores des anaérobies sulfito-réducteurs	44
III.6. Isolement des bactéries Gram positif et négatif	46
III.6.1. Isolement des Entérobactéries	46
III.6.2. Isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
III.6.3. Isolement des staphylocoques à coagulase positive	47
III.7. Tests complémentaires	47
III.7.1. Caractéristiques morphologiques	47
III.7.2. Examen à l'état frais	47
III.7.3. Coloration de Gram	48
III.7.4. Identification biochimique par galerie API 20E	48
III.7.5. Test oxydase	50
III.7.6. Test de catalase	51
III.7.7. Test de staphylocoagulase	51
III.8. Activité antibactérienne in vitro	52
III.9. Isolement de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	54

III.9.1.Milieu liquide	54
III.9.2.Milieu solide	55
III.10. La purification de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	56
Chapitre III : Résultats et discussion	57
I. Analyse physicochimique	57
I.1.Température	57
I.2.pH	58
I.3.Conductivité	58
I.4.Turbidité	59
I.5.Matières en suspension MES	59
I.6.Eléments indicateurs de pollution urbaine	60
I.6.1. Nitrates (NO ₃)	60
I.6.2. Demande biochimique en oxygène (DBO5)	61
II. Analyse bactériologique	61
II.1.Dénombrement	61
II.1.1.Germes totaux	61
II.1.2.Coliformes totaux et fécaux	62
II.1.3.Streptocoques D	63
II.1.4.Les anaérobies sulfito-réducteurs	64
II.2.Isolement et identification des souches bactériennes	64
II.2.1.Résultats des caractères morphologiques et coloration de Gram	64
II.2.2.Résultats des tests de confirmation	64
II.2.3.Résultats d'identification biochimique	66
II.3.Interprétation de l'antibiogramme	67
II.4. Isolement de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	70
Conclusion	71
Résumé	72
Références bibliographiques	75
Annexes	83

L'eau est élément primordial qui maintient la vie sur terre, et la molécule magique qui était toujours liée à l'histoire des hommes et à la naissance des civilisations principalement sur les cours des grands fleuves.

L'importance de l'eau dans l'économie et dans tous les domaines de vie ne cesse de croître et l'approvisionnement en eau douce devient de plus en plus difficile. Son utilisation est le moteur de toute activité sur terre. Cette consommation augmente avec l'accroissement de la population et l'extension des surfaces cultivables. Il en résulte un taux élevé de volumes d'eau polluée et rejetée avec une détérioration de l'environnement. **(El Guamri et al., 2006).**

Le milieu aquatique naturel par son pouvoir auto-épurateur naturel peut éliminer cette pollution. Cette capacité était longtemps attribuée aux virus et aux phages **(Boukroune, 2008)** et en 1980, ce pouvoir hypothétique a été confié à une micro-bactérie prédatrice nommée *Bdellovibrio bacteriovorus* qui se nourrit de bactéries Gram négatif, découverte en 1962 par les deux chercheurs Stolp et Starr. Cependant, la concentration géographique des rejets pose le problème de leur restitution au milieu récepteur. Ainsi, la croissance démographique en milieu urbain et le développement industriel conduisent à une importante augmentation des volumes de ces rejets et des flux des matières organiques polluantes qu'ils engendrent dépassent le pouvoir auto-épurateur du milieu naturel et exigent le développement des procédés de traitement qui élimineraient les polluants de toutes sortes et renforcer les installations d'épuration et des équipements nécessaires à cet effet.

En Algérie, et conformément aux priorités arrêtées par le secteur des ressources en eaux relatives à la protection de l'environnement, un programme ambitieux en matière de réalisation de station d'épuration est actuellement en cours, en plus des stations d'épuration qui sont en cours d'exploitation **(Ladjel, 2010).**

Notre étude porte sur deux axes principaux :

- Une étude des caractérisations physicochimiques et bactériologiques des eaux usées de la station d'épuration de la wilaya de Khenchela.
- Une contribution à l'isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus* de ces eaux et la vérification de son pouvoir lytique vis-à-vis des bactéries Gram négatif isolées des eaux de la même station d'épuration.

Ce mémoire a été structuré en trois chapitres :

- Le premier est une synthèse générale : sur la pollution biologique des eaux, les catégories des eaux usées, les mécanismes d'autoépuration naturelle et les systèmes de traitement adoptés par la station d'épuration.
- Le deuxième est consacré au matériel utilisé et aux méthodes adoptées pour étudier les microorganismes dans l'eau.
- Le troisième rassemble tous les résultats obtenus à partir de notre démarche pratique avec leur discussion.

I. Pollution de l'eau:

I.1.Définition:

La pollution peut se définir comme une dégradation ou une perturbation du milieu naturel, qui résulte en général de l'apport de matières ou de substances exogènes. Ses effets peuvent être modificateurs ou destructeurs vis-à-vis du fonctionnement du milieu, selon la nature ou la quantité de polluant. **(Genin, 2003)**

L'eau comme tout autre écosystème naturel n'est pas à l'abri de cette pollution qui constitue une véritable menace pour ses ressources naturelles. Cette altération rend l'utilisation de l'eau dangereuse et perturbe l'écosystème aquatique. Elle peut concerner les eaux superficielles (rivières, plans d'eau) et les eaux souterraines. **(Denat et al., 2001)**

I.2.Origine :

On distingue trois catégories de pollution pouvant affecter la qualité des eaux: la pollution physique, chimique et biologique. **(Kebich et al., 1999)**

-Nous intéressons dans ce chapitre particulièrement à la pollution biologique.

I.2.1.La pollution biologique :

Est le résultat des activités humaines et animales qui déversent des polluants organiques dans l'écosystème aquatique naturel ce qui dégrade sa qualité et provoque son eutrophisation. La pollution biologique de l'eau est liée intimement et varie en fonction de plusieurs facteurs : de l'usage domestique de l'eau, du type d'assainissement, des diverses activités humaines et s'aggrave aussi avec les phénomènes d'urbanisation et avec l'augmentation des déversements des eaux usées et l'absence des systèmes d'épuration. On peut distinguer deux catégories de polluants d'origine biologique : les matières organiques biodégradables et les microorganismes. **(Bousseboua ,2005 ; Bouziani, 2006)**

I.2.1.1.La pollution organique :

La pollution organique des eaux est le résultat de rejets de certaines industries agroalimentaires hautement polluantes telles que les abattoirs, laiteries, sucreries et conserveries. On peut trouver des matières organiques biodégradables comme les lipides, les glucides, les peptides, les huiles minérales, les débris celluloses et les détergents issues des rejets animaux et de l'industrie agroalimentaire. Lorsque la charge polluante organique est trop importante et dépasse les capacités d'assimilation du milieu sa biodégradation engendre la formation des composés toxiques (ammoniaque, H₂S, phénol). **(Bousseboua, 2005; Kebich et al., 1999)**

I.2.1.2.La pollution microbienne :

L'homme et les animaux hébergent accidentellement ou de façon chronique les microorganismes infectieux et contaminent directement ou indirectement l'eau et le milieu naturel. Par leurs déchets infectieux, ils agissent sur leur propre environnement et constituent dans certaines situations épidémiologiques une menace pour eux-mêmes et pour leur entourage. (**Bouziati,2006**)

De très nombreux microorganismes des trois domaines (Bacteria, Archeae et Eukarya) sont véhiculés par l'eau polluée et y peuvent proliférer grâce aux conditions favorables pour leur croissance et leur multiplication. On peut rencontrer surtout les bactéries, les virus, les champignons, les parasites, les protozoaires et les divers agents pathogènes, responsables de maladies diarrhéiques qui sont tous provenant des matières fécales. (**Sigee, 2005 ; Bousseboua, 2005**)

Donc, on rencontre dans l'eau deux origines des microorganismes selon la classification classique de Winogradsky :

I.2.1.2.1.Les microorganismes autochtones (indigènes) : qui sont toujours présents dans leurs écosystèmes indépendamment de l'apport éventuel de nutriments exogènes, dont le métabolisme est adapté aux conditions physico-chimiques de leurs écosystèmes et qui peuvent s'y reproduire sans difficultés. C'est la microflore des genres bactériens : Pseudomonas, Chromobacter, Achromobacter, Flavobacterium, Cytophaga et Vibrio et des genres algales surtout les diatomés et les dinoflegellés. (**Lagasquie, 1999 ; Bousseboua, 2005**)

I.2.1.2.2.Les microorganismes allochtones (zymogènes): sont fondamentalement étrangers à l'écosystème aquatique, dont le milieu de développement habituel est l'homme ou l'animal et qui sont rejetées dans les rivières via les eaux usées, pluviales ou de ruissellement. Ces microorganismes ne font en général que survivre dans ce milieu hostile en présentant une bonne adaptation et peuvent occasionnellement se développer avec l'apport de substrats exogènes facilement métabolisables. (**Lagasquie, 1999**)

De ce fait, cette microflore est une contamination qui peut être venue :

A. Origine tellurique : sont des Actinomycètes et des bactéries du cycle de l'azote, des bactéries à Gram positif sporulantes des genres Clostridium et Bacillus issues de lessivage des sols. (**Servais et al., 1990**)

B. Origine intestinale (fécale) : représentées par la famille des entérobactéries et les streptocoques fécaux. Leur présence dans l'eau va indiquer une contamination d'origine fécale et donc la possible

présence de germes pathogènes dangereux (exemple : les salmonelles) responsable de risque épidémiologique potentiel. (Servais et al., 1990 ; Bousseboua, 2005)

II. Eaux usées :

II.1. Définition :

Sont définies comme des eaux utilisées à des usages domestiques, industriels ou même agricoles, constituant donc un effluent pollué et qui sont rejetées dans un émissaire d'égout avant d'être orientées vers les cours d'eau. Ces liquides de composition hétérogène sont chargés de matières minérales ou organiques qui peuvent être en suspension ou en solution et dont certaines peuvent avoir un caractère toxique. (Ramade, 2000 ; Koller, 2004)

II.2. Nature et origine:

Malgré la grande diversité des eaux usées, on peut les classer selon leur origine en :

II.2.1. Les eaux usées domestiques :

Les eaux usées d'origine domestique comprennent les eaux ménagères (eaux de toilettes, de lessive, de cuisine) et les eaux vannes (urines et matières fécales), dans le système dit « tout-à-l'égout ». (Baumont et al., 2004)

Ces eaux contiennent des matières minérales (chlorures, phosphates, sulfates, etc.) et des matières organiques tels que les glucides et les graisses (formés de carbone, oxygène, hydrogène, azote et, dans certains cas, d'autres corps tels que le soufre, phosphate, le fer.); comme elles renferment également tous les microorganismes excrétés par la matière fécale. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. (Vaillant, 1974)

II.2.2. Les eaux usées industrielles :

Tous les résultats d'une utilisation de l'eau autre que domestique sont qualifiés de rejets industriels. Cette définition concerne les rejets des usines et ceux d'activités commerciales. La variété des eaux usées industrielles est très grande d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques pour la flore et la faune aquatique et pour l'homme tels que des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures. Certaines d'entre elles nécessitent un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. (Mink, 1977)

II.2.3. Les eaux usées urbaines :

Elles comprennent les eaux usées domestiques et les eaux de ruissellement (eaux pluviales, eaux d'arrosage et de lavage des voies publiques). Les eaux qui ruissellent sur les toitures, les cours, les jardins, les espaces verts, les voies publiques et les marchés entraînent toutes sorte de déchets minéraux et organiques : de la terre, des limons, des boues, des silts des sables, des déchets végétaux (herbes, pailles, feuilles, graines, etc.) et toutes sortes de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, détergents,...). (**Vaillant, 1974**)

III. L'auto-épuration :

L'eau de mer ou de rivière, riche en espèces animales et végétales, transforme et élimine naturellement et spontanément (en totalité ou en partie) les pollutions organiques voire toxiques auxquelles elle sert d'exutoire : c'est ce qu'on appelle l'autoépuration. (**Denat et al., 2001**)

L'autoépuration peut être définie aussi comme l'ensemble des processus biogéochimiques par lesquels un écosystème aquatique pollué retrouve après l'arrêt des bouleversements et des rejets et un laps de temps variable sa pureté initiale. Ce phénomène est facile à observer dans le cas d'une pollution des eaux par des matières organiques fermentescibles où l'action des microorganismes et autres agents biologiques est particulièrement efficace. Lorsque ce pouvoir achèvera son effet, on trouve en principe une biocénose d'eaux pures. (**Ramade, 1998**)

Les mesures de DBO et de DCO sont une bonne approximation des capacités d'autoépuration d'une eau naturelle. (**Denat et al., 2001**)

III.1. Mécanismes d'autoépuration :

D'après plusieurs études faites au laboratoire, il est admis que des facteurs physicochimiques varies (lumière, température, pH, toxicité des métaux lourd....) ont un impact significatif sur la mortalité bactérienne. Les mécanismes biotiques (compétition, prédation..) constituent le foyer des recherches récentes et qui sont largement impliqués dans le pouvoir bactéricide des eaux naturelles. (**Halassi, 2009**)

III.1.1. Mécanismes physicochimiques :

Les changements des conditions physicochimiques influencent la croissance des microorganismes.

III.1.1.1. La lumière :

Les radiations solaires sont un facteur très important responsable de l'inactivation microbienne, cette dernière est proportionnelle avec l'intensité des radiations, le temps d'exposition à celles-ci, dont l'effet létale augmente avec l'intensité. *E. coli* dans les eaux douces devient sensible à des concentrations de peroxyde qui sont normalement inoffensives sous l'effet négatif de la lumière sur son système enzymatique du catalase. (Cameson et al., 1975). Les radiations solaires de courtes longueurs d'onde ont un effet bactéricide reconnu, quoique plus important en milieu marin, lorsqu'il est couplé à la salinité de l'eau qu'en rivières. (Fujioka et al., 1981).

Les UV causent des cassures de l'ADN par activation de la dégradation du tryptophane. Avec une longueur d'onde de 260nm, les UV provoquent la dimérisation de la thymine : deux nucléotides thymines adjacents dans un brin d'ADN se retrouvent alors associés par deux liaisons covalentes. La transcription et la réplication de l'ADN sont alors inhibées sur cette portion transformée. L'UV-A interfère avec le métabolisme et détruit la structure de la cellule de la bactérie. L'UV-A (longueur d'onde de 320-400nm) détruit les pathogènes en réagissant avec l'oxygène dissous dans l'eau et produit des radicaux libres d'oxygène et des peroxydes d'hydrogène. (Halassi, 2009)

La radiation infrarouge chauffe l'eau. Quand la température de l'eau dépasse les 50°C, le processus de désinfection est trois fois plus rapide. (Guillaume, 2007)

III.1.1.2. La température :

Le métabolisme et la croissance des microorganismes sont fonctions de la température où chaque souche microbienne a une température optimale et caractéristique en dehors de laquelle sa croissance est difficile. (Martin, 1985)

Une basse température provoque la formation de cristaux de glace dans le milieu intracellulaire ce qui pousse les bactéries à produire des molécules antigel comme des carbohydrates. Le stress oxydatif est également décuplé, du fait que l'oxygène se dissout très bien dans l'eau froide. Les membranes phospholipidiques ne sont pas à l'abri du stress, elles se rigidifient et nécessitent des compositions en lipides permettant d'assurer leur fluidité à basse température. La composition en acides aminés des protéines synthétisées par les bactéries vivant à basse température peut également varier. Lorsque les températures dépassent l'optimum de croissance, les protéines sont dénaturées, tandis que les membranes phospholipidiques « fondent » sous l'effet de la chaleur. Les bactéries thermophiles doivent donc augmenter la rigidité de leurs membranes pour lutter contre la désagrégation. Des protéines capables de résister à de plus fortes températures sont également synthétisées (Heat Shock Proteins). (Guillaume, 2007).

III.1.1.3. Les métaux lourds :

La survie des bactéries hétérotrophes diminue avec des concentrations élevées en métaux lourds (Sn, Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Mn, Zn), en raison de leur toxicité spécifique sur de nombreux organismes. Les métaux lourds contribuent au processus de l'épuration des eaux par leur capacité d'inactiver les systèmes enzymatiques des organismes cibles. (Niewolak, 1996).

III.1.1.4. Le pH :

Le pH est un alternatif de la température qui affecte la multiplication et la reproduction des microorganismes. Pour les bactéries aquatiques, l'optimum de pH se situe entre 6,5 et 8,5, ce qui correspond aux pH de leur environnement aquatique. Le pH manifeste une action directe sur les enzymes microbiennes, en dissociant des groupes fonctionnels sur les protéines ce qui rend l'enzyme inactive ou sur la traduction des protéines spécifiques, souvent via l'activation d'un facteur de transcription σ spécifique. (Halassi, 2009).

Escherichia coli et *Salmonella typhimurium* sont ainsi capables de produire des protéines en cas de stress acide mais aussi il peut exercer une action indirecte à différents niveaux : sur la solubilité des gaz, notamment du CO_2 , avec des répercussions importantes sur la productivité primaire, sur la disponibilité de certains nutriments (NH_4 , PO_4), facteurs limitant de l'écosystème aquatique et sur la mobilité des métaux lourds (Martin, 1985).

III.1.1.5. La pression :

La plupart des bactéries des eaux douces ne se développent pas à des pressions de 200 atmosphères. Les hautes pressions hydrostatiques semblent affecter différentes fonctions microbiennes telles que les synthèses des ARN, ADN et des protéines enzymatiques par la déformation de la configuration tertiaire et donc baisse de l'activité enzymatique. Les hautes pressions affectent aussi et les fonctions de transport membranaires (Martin, 1985).

III.1.1.6. L'oxygène dissous :

On ne peut certes établir une relation constante entre la teneur en oxygène dissous et la pollution en aérobie, mais il est certain que les concentrations élevées d'oxygène dissous constituent, par leur action microbicide, un des éléments essentiels de l'épuration constatée. Les concentrations élevées en oxygène inhibent la survie des microorganismes micro-aérophiles présents dans les eaux pauvres en oxygène. Mais pour les microorganismes aérobies, l'oxygène présente un avantage énergétique net dont il est l'accepteur final des électrons dans les chaînes

respiratoires. Cet élément est également dangereux par le fait de générer des formes toxiques pour les cellules. Les aérobies sont donc, dotés d'enzymes spécialisées dans la détoxification des composés oxygénés actifs parallèlement à la mise en place de chaînes respiratoires. (Guillaume, 2007)

III.1.1.7. Sédimentation :

La sédimentation joue un rôle singulier dans la décroissance des microorganismes car elle cause une disparition apparente des bactéries. Celles-ci changent de compartiment physique : elles quittent la partie supérieure de la masse d'eau, où sont effectuées les mesures de qualité bactériologique, pour se déposer sur le fond. Cette disparition peut être provisoire, car sous l'effet d'une augmentation de débits, il peut y avoir remise en suspension des sédiments et des bactéries (Wilkinson *et al*, 1995)

III.1.2. Mécanismes biologiques :

III.1.2.1. Compétition :

Elle s'installe lorsque différents micro-organismes d'une population ou d'une communauté cherchent à s'approprier une même ressource, qu'il s'agisse d'occuper un endroit physique, ou de consommer un aliment limitant particulier. (Lansing *et al.*, 2003).

La présence de microorganismes autochtones, plus aptes à se multiplier dans les conditions environnementales des cours d'eau, selon leur concentration et leur nature, implique la décroissance des bactéries allochtones. (Flint, 1987)

III.1.2.2. Amensalisme :

L'amensalisme (du latin « pas à la même table ») décrit l'effet négatif qu'un organisme exerce sur un autre. Il s'agit d'un processus unidirectionnel, basé sur la production par un organisme, d'un composé spécifique qui agit négativement sur un autre organisme. Exemple classique de l'amensalisme : la production des antibiotiques qui peuvent inhiber ou tuer un organisme qui y est sensible. (Lansing *et al.*, 2003 Certains antibiotiques synthétisés par la biomasse phytoplanctonique servent pour maintenir l'activité bactériostatique ou bactéricide dans l'eau. Les staphylocoques ne peuvent pas se développer à proximité de *Penicillium notatum* qui inhibe leur croissance par la production de la pénicilline.(Branger *et al .*, 2007).D'autres relations d'amensalisme importantes impliquent une production microbienne des composés organiques spécifiques qui causent des ruptures dans la paroi cellulaire ou la membrane plasmique. C'est

notamment le cas des bactériocines. La production de l'éthanol par les levures inhibe la croissance des flores bactériennes. (Davet, 1996)

L'amensalisme est une interaction qui maintient l'équilibre écologique mais ne présente qu'un faible effet en comparaison d'autres interactions. (Hellmann, 2001)

III.1.2.3. Parasitisme :

Une interaction connue sous le nom de parasitisme est une interaction où une espèce vit au détriment de l'autre. Les parasites sont habituellement plus petits que leurs hôtes et souvent se nourrissent d'eux sans les tuer, ils vivent en dépendance de l'espèce hôte. (Hellmann, 2001)

Le parasitisme est l'une des interactions microbiennes les plus complexes, la frontière entre parasitisme et prédation s'avérant difficile à établir. Dans le parasitisme, le parasite et l'hôte coexistent en association jusqu'à un certain degré. Selon l'équilibre établi entre les deux organismes. Cette coexistence peut varier et passer d'une relation parasite stable à une relation pathogène qui peut être considérée comme prédation. A noter que tous les parasites ne sont pas des agents pathogènes et tous les agents pathogènes ne sont pas des parasites ; *Clostridium botulinum* est un exemple de bactérie pathogène non parasite. (Singleton, 1999)

III.1.2.3.1. Bactériophages :

Les bactériophages sont considérés comme des facteurs biotiques affectant l'élimination des bactéries dans l'environnement naturel. Les virus bactériens peuvent établir une relation lytique avec leurs hôtes et causent leur mort et participent dans le contrôle des populations bactériennes. Il est difficile de spécifier le degré de contribution des bactériophages dans le processus de purification de l'eau. (Halassi, 2009)

III.1.2.4. Prédation :

La prédation est la consommation d'une espèce par une autre. Cette consommation influence négativement une population des deux espèces connue comme proie et positivement l'autre espèce dite prédateur. Dans ce phénomène le prédateur engloutit ou attaque une proie. La proie peut être plus grande ou plus petite que le prédateur, et le résultat normal est la mort de la proie. (Hellmann, 2001 ; Lansing et al., 2003)

Les prédateurs consomment la proie pour un simple but: produire de nouveaux prédateurs où le nombre des descendants est fonction de l'efficacité de cette consommation. Au lieu de l'investissement dans des voies métaboliques coûteuses, le prédateur choisit une facile manière :

profiter et tuer la proie. A leur tour les proies ont évolué des défenses contre la prédation, y compris la capacité de se sauver, éviter la détection, ou soient difficiles à manger ce qui a obligé les prédateurs à développer des outils pour traiter les différents types de stratégies de la défense de la proie, ils peuvent devenir moins remarquables, plus rapides, ou plus habiles. La prédation est le facteur initial du transfert de l'énergie dans les biocénoses. C'est un processus écologique essentiel qui contrôle aussi les populations constituant les communautés et leur évolution. (Ramade, 1993)

III.1.2.4.1. Protozoaires :

Des avancées scientifiques récentes ont démontré que, en rivière, l'ingestion des bactéries allochtones par les protozoaires constituait leur principale cause de mortalité (Menon, 1993). Les ciliés sont d'excellents exemples de prédateurs qui engloutissent leur proie. Un seul cilié peut ingérer de 60 à 70 bactéries par heures. La prédation des bactéries par les ciliés est importante dans les milieux aquatiques. (Lansing et al., 2003)

III.1.2.4.2. Les bactéries prédatrices :

Un ensemble intéressant de bactéries sont actives dans la nature comme *Bdellovibrio*, *Vampirococcus* et *Daptobacter*. Chacun de ceux-ci a une façon qui lui est propre d'attaquer une bactérie sensible. (Lansing et al., 2003). Les bactéries de l'ordre Myxobactérales se nourrissent d'autres microorganismes. Elles libèrent des enzymes qui lysent d'autres bactéries et champignons et vivent grâce aux produits ainsi solubilisés. (Singleton., 1999)

IV. *Bdellovibrio bacteriovorus* :

Il est rare que des bactéries tuent ou soient tuées par leurs concurrents. Le plus souvent elles produisent pour tuer des composés toxiques contre lesquels elles sont elles-mêmes immunisées. Par ailleurs, quelques espèces de bactéries ont adopté un système de prédation, en attaquant directement les autres bactéries. *Bdellovibrio bacteriovorus* fait partie de ces organismes. (Neidhardt, 1994)

Bdellovibrio bacteriovorus (du latin *bdella* : la sangsue, *vibrio* : incurvé, *bacterio* : bactérie, *vorus* : mangeur). C'est une petite bactérie à Gram négatif, aérobie strict, mésophile, oxydase positive, catalase variable et GC% :45-51, qui se comporte en prédateur exclusivement des bactéries à Gram négatif. Aussi connue comme «le plus petit chasseur» , elle possède l'étrange faculté de percer des trous à travers la membrane externe des autres bactéries à Gram négatif plus grandes qu'elle (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Aquaspirillum*) et de se développer à l'intérieur de leurs espaces périplasmiques où elle inhibe la synthèse des protéines et la répllication de l'ADN de la proie, rompt sa membrane plasmique et incorpore ses acides aminés, acides gras et acides

nucléiques comme source de carbone et d'énergie. En outre, *Bdellovibrio bacteriovorus* est une bactérie viable non cultivable ce qui impose la difficulté de son isolement in vitro. (Singleton, 2005 ; Lambert et al ., 2004)

La recherche des *Bdellovibrio* a commencé par une découverte fortuite par Stolp et Petzold (1962). La physiologie, l'écologie, la taxonomie, les interactions avec la proie et le cycle cellulaire de *Bdellovibrio* étaient illustrés dans les années 60 et 70 principalement par les groupes de recherche de Shilo et Varon, Stolp et Starr, Rittenberg, Hespell, Diedrich, Ruby, Tudor, Thomashow, et récemment Willimas. (Jurkevitch, 2006)

IV.1. Découverte et historique :

La première découverte de ce genre de bactérie a été en 1962 par Stolp et Petzold au niveau de l'institut de bactériologie de Berlin, dans une tentative d'isoler les bactériophages du phytopathogène *Pseudomonas syringae* à partir des échantillons de sol. Stolp et Petzold observèrent des plages de lyse se développaient dans le tapis de *Pseudomonas syringae* longtemps après que sa croissance eût cessé, ce qui était inhabituel car les plages dues aux bactériophages ne s'agrandissent plus après l'arrêt de la croissance bactérienne. Stolp plaça ce matériel entre lame et lamelle et, grâce à son sens aigu de l'observation, nota que les *Pseudomonas* étaient cognés par quelque chose. Il ne pouvait voir *Bdellovibrio* du fait de sa très petite taille et parce qu'il se déplace trop vite. Il examina ce matériel au microscope électronique, et découvrit alors *Bdellovibrio bacteriovorus*. (Neidhardt, 1994 ; Lambert et al ., 2004)

IV.2. Morphologie :

Ce sont des petits batonnets incurvés, Gram négatif dont la taille est de : 0.25 à 0.40 μm de largeur et 1 à 2 μm de longueur, ainsi qu'il existe de petites cellules de 2 μm de largeur et 0.8 μm de longueur. (Ruby, 1991; Pan et al ., 1997)

Les cellules présentent une morphologie typique des bactéries Gram négatif avec une membrane externe qui entoure une couche fine de peptidoglycane. Elles sont très mobiles par un flagelle polaire gainé et très long (plus de 30 μm , il a une forme ondulée tendue complexe et constitué de deux portions : l'une est centrale et l'autre est un fourreau externe composé à son tour de deux majeures bandes de protéines (flagellines), dont l'une est d'approximativement 29.5 K dalton et l'autre 28 K dalton. L'épaisseur du fourreau est 7.5 μm . La gaine du flagelle est une extension de la membrane externe mais de composition biochimique différente. Grâce à ce flagelle *Bdellovibrio bacteriovorus* est considérée parmi les plus rapides microorganismes connus en

science, la souche *B. bacteriovorus* HD100 nage d'une vitesse de 160µm/s. Aussi que le flagelle joue un rôle primordial dans le rencontre de la proie. (Lambert et al., 2009)



Fig.1. *Bdellovibrio bacteriovorus*. (Jurkevitch, 2006)

IV.3.Taxonomie :

La taxonomie de *Bdellovibrio bacteriovorus* reste encore fragmentaire. Historiquement les microorganismes appartenant au genre *Bdellovibrio* ont des caractéristiques connus comme : une grande mobilité par un flagelle polaire, l'attachement et la pénétration à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, la lyse de la proie et finalement la libération des progénitures (Varon et Shilo, 1978). Le genre était placé parmi les protéobactéries, dont il est plus proche aux myxobactéries et les bactéries sulfito-réductrices. (Jurkevitch, 2006)

Récemment les *Bdellovibrio* sont reclassés sous l'ordre de *Bdellovibrionales*, l'ordre qui ne compte que la famille de *Bdellovibrionaceae* et trois genres (*Bdellovibrio*, *Micavibrio*, *Vampirovibrio*). (Lansing et al., 2003)

Règne : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Delta Proteobacteria*

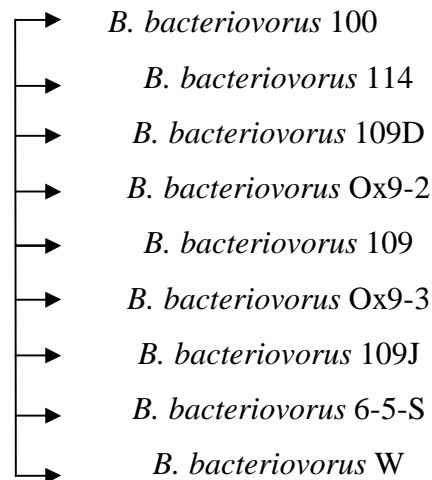
Ordre : *Bdellovibrionales*

Famille : *Bdellovibrionaceae*

Genre : *Bdellovibrio*

Espèce : *bacteriovorus*

Les résultats de l'analyse des ARNr 16S des échantillons terrestres montrent les différentes souche de l'espèce *B. bacteriovorus* : (Donze et al., 1991)



IV.4. Ecologie :

B. bacteriovorus semble être omniprésente dans la nature. Cette bactérie a été isolée à partir des échantillons de sol, de la rhizosphère des racines des plantes, des rivières, des océans, des eaux usées, des intestins et des excréments des oiseaux et des mammifères, et même des coquilles des huîtres et des branchies de crabes. La concentration de cette bactérie augmente de 10 à 3500 UFC près de la section urbanisée des rivières. (Kelley et al., 1992; Schwudke et al., 2001). Ses exigences sont en général : l'oxygène et les bactéries à Gram négatif nécessaires pour sa croissance (*B. bacteriovorus* a une chance de survivre de 50% en présence d'une concentration de 3×10^6 de cellules proies). Sa température optimale se situe entre 28-30°C, ce qui rend *B. bacteriovorus* une bactérie mésophile. Considérée comme bactérie aérobie mais au cours de sa phase d'attaque ou comme bdelloplaste, *B. bacteriovorus* peut tolérer des périodes de sécheresse et de courtes périodes d'anaérobiose. Même en présence d'une grande population proie, *B. bacteriovorus* paraît sensible aux polluants environnementaux tels : les métaux lourds, les détergents et les pesticides. (Jurkevitch, 2003; Lambert et al., 2004).

IV.5. Structure de génome :

La taille du génome de *Bdellovibrio bacteriovorus* est de 2.07×10^6 Pb. Le séquençage du génome de *B. bacteriovorus* HD100 a pris fin le 31/01/2004. Le génome complet se compose d'un seul chromosome circulaire qui est de 3.782.950 nucléotides de long. La totalité du génome a une teneur de GC de 50% et contient 3629 gènes qui codent pour 3587 protéines et 42 ARN de structure. (Lambert et al., 2004; NCBI Genome Database)

Le génome code pour un grand nombre de protéines, beaucoup d'entre elles sont des enzymes lytiques, des enzymes de dégradation et des protéines de transport. Ces enzymes sont

nécessaires à la dégradation de la proie ou la cellule hôte, dont certaines de ces enzymes sont sécrétées à l'extérieure de *B.bacteriovorus*, tandis que les produits de dégradation sont transportés du cytoplasme de la cellule proie à l'intérieure du prédateur. *B. bacteriovorus* a cinq types de systèmes de sécrétion membranaires externes et quatre types de systèmes de sécrétion membranaires internes (Barabote et al., 2007).

Le chromosome contient également plusieurs groupes de gènes essentiels pour la motilité et la formation des flagelles et des pili. (Lambert et al., 2004)

IV.6.Cycle de vie de *Bdellovibrio bacteriovorus* :

Le cycle cellulaire de ce prédateur est fascinant, il est biphasique où deux phases s'altrent : une phase d'attaque mobile dans des environnements différents et une phase de croissance périplasmique à l'intérieure de la proie. (Jurkivetch,2006)

IV.6.1. La phase d'attaque :

Durant cette phase les cellules nagent d'une façon extrêmement rapide, couvrant 100 fois la longueur de son corps par seconde. (Neidhardt, 1994). La rapidité de mobilité de *B.bacteriovorus* générée par son flagelle permet sa collision avec la proie ; cependant la collision semble être aléatoire et sans aucune attraction chimiotactique envers la proie. Le chimiotactisme proprement dit est celui détecté envers l'oxygène et les composés organiques tels : les acides aminés, les glucides et les acides gras, ces derniers indiquent les niches riches en bactéries et conduisent le prédateur à sa proie. La phase d'attaque tire profit d'un large répertoire de protéines responsables du phénomène de chimiotactisme, ces protéines servent à sentir les différents signaux chimiques pour pouvoir localiser la proie. (Jurkevitch, 2006). Les recherches récentes ont montré que la souche *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J possède au moins 13mcp (Chemotaxis Protein récepteur of Methyl). (Boukroune,2008)

IV.6.2.La phase d'attachement :

Le pH , la composition et la température du milieu sont des facteurs qui influencent l'attachement à la proie. (Varon et al., 1978)

Cette phase se déroule en deux étapes. Dans les premières minutes de la rencontre, un attachement initial est réversible et non spécifique. Après 20 à 30 minute, un attachement irréversible,même avec l'agitation, et spécifique se place. L'attachement irréversible implique l'interaction du pôle non flagellé de *Bdellovibrio* avec le polysaccharide core de lipopolysaccharide

(LPS) de la membrane externe de la proie. Les bactéries à Gram positif ne peuvent pas servir comme proie à l'absence des recepteurs dans leurs membranes externes. (Jurkevitch, 2006)

La capsule proteique d'*Aquaspirillum serpens*, *A.sinuosum*, et *Aeromonas salmonicida*, contrairement celle d'*E.coli* rend ces bactéries résistantes à l'attachement des *Bdellovibrio*. (Koval et al., 1997).

IV.6.3.La phase de pénétration :

Dure 20 minute après l'attachement. Lorsque *Bdellovibrio bacteriovorus* s'attache à sa proie, elle tourne rapidement sur elle-même (à plus de 600 tours/ min) grâce à la rotation de son flagelle. Cette activité de forage au travers l'enveloppe, est facilitée par les enzymes lytiques produites par le prédateur. (Tudor et al., 1990)

Les enzymes impliquées dans ce processus sont principalement : (Rittenberg, 1978)

- ✓ Glycanase
- ✓ Peptidase
- ✓ N-deacetylase
- ✓ Acyclase
- ✓ Lipopolysaccharidase (LPSase)
- ✓ Une enzyme qui dégrade le lipoprotéine de Baun.

Le résultat final de ces enzymes est la formation d'un trou au niveau de la membrane externe de la proie. A ce stade *B.bacteriovorus* perd son flagelle, entre dans le périplasma de sa proie et commence à se développer. La pénétration est donc la combinaison des voies mécaniques et enzymatiques. (Neidhardt,1994)

Une fois le prédateur est installé à l'intérieure du périplasma, il s'attache à la membrane cytoplasmique de la proie qui sous l'action de la glycanase, la N deacetylase et l'acyclase, qui dégradent le peptidoglycane, prend une forme sphérique stable osmotiquement dite : le **bdelloplast** qui sert comme chambre qui maintient la croissance du prédateur. (Lambert et al., 2006)

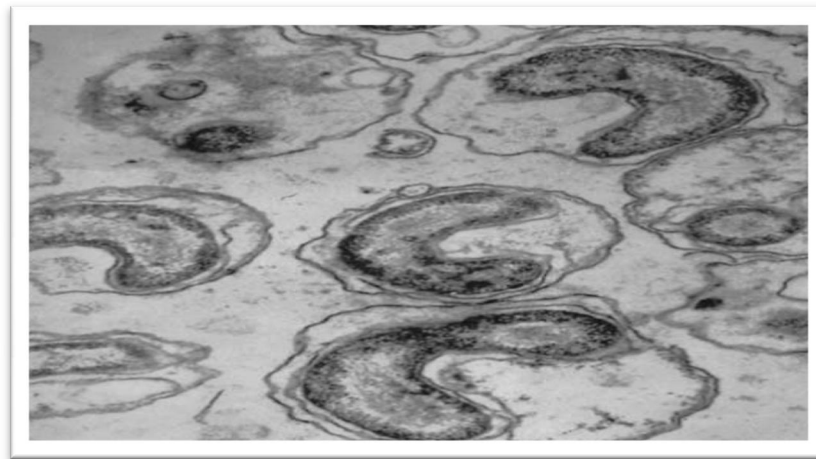


Fig2. Photo du bdelloplaste (Microscope électronique). (Jurkevitch, 2006)

IV.6.4.La phase de croissance intrapériplasmique :

La croissance cellulaire et la synthèse des macromolécules commencent après 45 à 60 minutes de l'attaque. Après la pénétration, le bdelloplaste est immunisé contre une invasion supplémentaire des *Bdellovibrio* à cause des altérations dans la membrane externe de la proie. De ce fait, le bdelloplaste offre un environnement protégé pour le prédateur en lui permettant d'entrer dans un nouveau stade de développement : la croissance intrapériplasmique. Cette phase est caractérisée par l'élongation en filament spiralé, la réplication d'ADN et finalement la fragmentation du filament en cellules filles flagellées. (Jurkevitch, 2006)

B.bacteriovorus utilise les molécules de sa proie pour sa propre biosynthèse et sa reproduction et transporte les nutriments du cytoplasme de la proie par ses porines de sa membrane externe (Omp). (Tudor et al., 1994). Ces porines font l'objet de nombreuses études dont elles ont été considérées comme des dérivées de la membrane externe de la proie et qui sont transloquées au prédateur durant la pénétration avec le lipide A du LPS. Mais des recherches récentes montrent que le lipide A de *Bdellovibrio bacteriovorus* a une structure unique et qui ne ressemble pas à celui de la proie (*E.coli*). Ainsi qu'une nouvelle expérience par une spectrophotométrie de masse révèle que la majorité des Omp des souches de *Bdellovibrio bacteriovorus* croissant à l'intérieur de différentes proies n'ont pas des séquences homologues à celles des *OmpF* et *OmpC* de ces proies. Les résultats d'une électrophorèse sur gel confirment que les Omp de la proie (*E.coli*) trouvées dans ses cellules lysées sont absentes dans les cellules du prédateur. (Schwuke, 2003 ; 2005)

Au sein du bdelloplaste, le prédateur gère cet usine d'une façon hautement organisée où il dégrade les building blocks de la proie en petites unités qui seront utilisées ultérieurement pour la synthèse des macromolécules. L'ADN de la proie n'est pas à l'abri du pouvoir de *B.bacteriovorus*,

il est dégradé en nucléotides par des endo et des exonucleases. La dégradation de l'ADN est synchronisée avec l'incorporation des nucléotides jusqu'à la terminaison de la réplication et l'élongation d'un filament spiralé et l'initiation de la septation. (Lambert et al., 2006)

Hespell et al, 1975 montrent que *B.bacteriovorus* utilise les ribonucléotides de la proie pour la synthèse de ses ribosomes. Que 10 à 15% du peptidoglycane est initialement dégradé pour faciliter l'entrée du prédateur et il ne se dégrade plus jusqu'à la fin de prédation.

IV.6.4.1. Propriétés de la membrane du bdelloplaste et du prédateur :

Le changement dans la structure de la paroi cellulaire de la proie pendant l'invasion de *B.bacteriovorus* n'est pas limité à son peptidoglycane. La surface cellulaire devient plus hydrophobe grâce à la modification du peptidoglycane par des acides gras ou au clivage des résidues glucosamine de LPS. (Sockett et al., 2004)

La membrane cytoplasmique devient perméable pour le lactose et les petites molécules hydrophiles. Cependant, la perméabilité de la membrane externe n'est pas altérée et la plupart des protéines périplasmiques sont retenues. (Cover et al., 1984)

IV.6.5. La phase de segmentaton et de libération :

Quand le bdelloplast est épuisé de nutriments, le filament reçoit un signal pour être fragmenté en cellule individualisées chacune avec un flagelle polaire, les mésosomes jouent un rôle important dans le processus de division. La longueur du filament est limitée par la taille de la proie et le nombre des cellules filles varie de 4 à 5 (avec un génome d'une taille de 3.85Mb) par une cellule d'*E.coli* et de 20 à 30 par une cellule d'*Aquaspirillum serpens*. Le signal peut être un peptide qui s'accumule et provoque la division. Finalement, le peptidoglycane est complètement dégradé, le bdelloplaste est lysé en permettant la libération de nouveaux Bdellovibrios jeunes qui sont prêts à attaquer d'autres bactéries. (Lambert et al., 2006. L'âge de *B.bacteriovorus* détermine la durée de son cycle de vie qui peut prendre 2 à 4 h. (McCan et al., 1998)

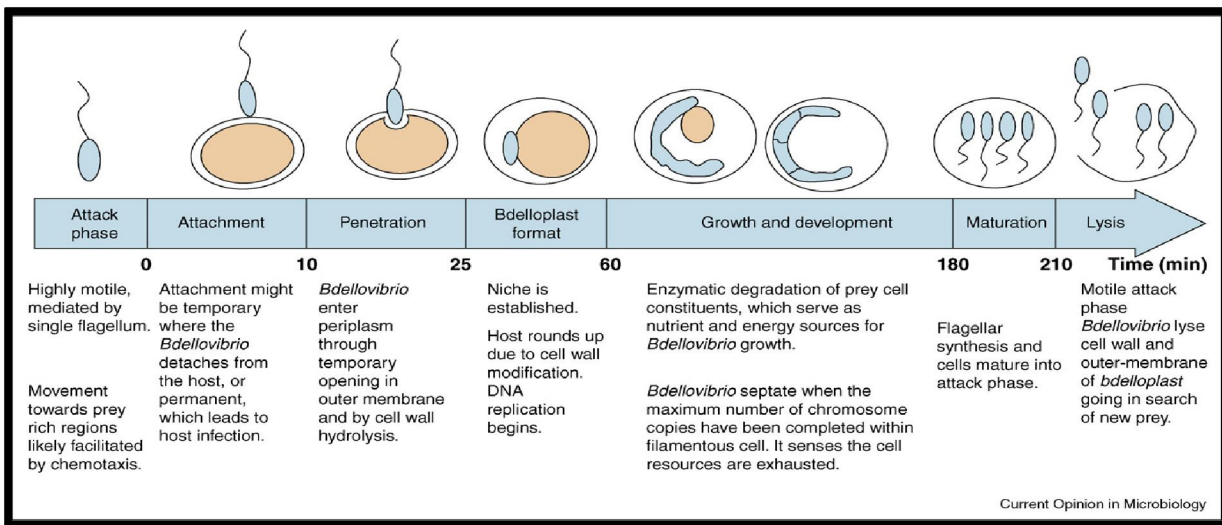


Fig.3. Les différentes étapes du cycle de vie de *B. bacteriovorus*. (Lambert et al., 2006)

B. bacteriovorus peut exister et vivre sous trois catégories :

- Des souches dépendantes de l'hôte (la proie) (HD).
- Des souches indépendantes de l'hôte capables de croître sur milieu complexe in vitro (H-I).
- Des souches parasites facultatives capables de se développer dans une bactérie ou un milieu de culture. (Halassi, 2009)

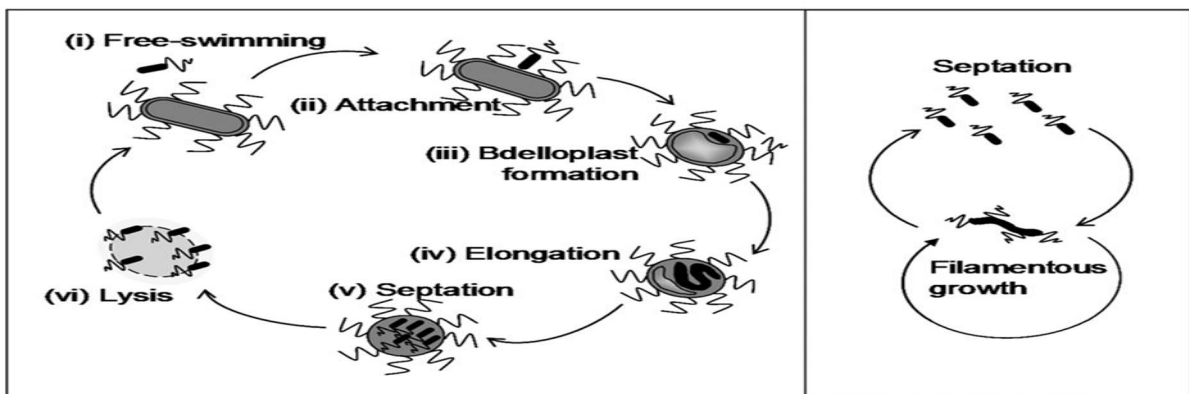


Fig.4. Cycle des mutants de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Lambert et al., 2009)

HI à droite et HD à gauche.

IV.6.6. Les bdellocystes :

Dans certaines conditions de croissance, *B. bacteriovorus* entre dans une étape de dormance c'est le cas de la souche W. Les bdellocystes sont caractérisés par une épaisse couche de peptidoglycane formée à l'extérieur de la paroi du prédateur et associée à la paroi du bdelloplaste, comme elle est synthétisée par le prédateur sans l'utilisation des précurseurs de la proie. Cette

forme est plus résistante à la dessiccation, la température, la sonication et contient plus d'ADN, d'ARN, de protéines et de glucides que la forme végétative. Le bdellocyste prend 4 h pour la formation et sa germination est favorisée par le L-glutamate, NH_4^+ et K^+ . Donc, cette souche fait partie d'un groupe unique des microorganismes présentant trois phases différentes de développement : une phase d'attaque mobile, une phase de croissance intrapériplasmique et une phase de dormance. (Jurkivetch, 2006)

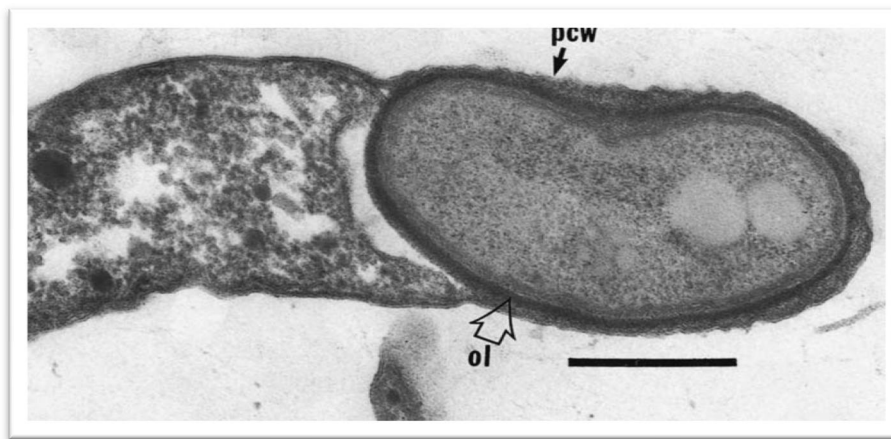


Fig.5. Photo de la souche *Bdellovibrio bacteriovorus* W durant la formation de bdellocystes (Microscope électronique). (Jurkevitch, 2006)

Ol : la couche externe de la souche qui s'épaissit et s'attache à la paroi cellulaire de la proie (**PCW**).

IV.7.Pathologie :

B. bacteriovorus n'est pas un agent pathogène connu pour les humains. Il est un agent pathogène connu pour les bactéries à Gram négatif, ce qui en fait un agent de lutte biologique possible à de nombreux agents pathogènes humains. (Lambert et al., 2004)

IV.8. Application à la biotechnologie :

Les principales applications de *B. bacteriovorus* à la biotechnologie semblent être son potentiel comme agent de lutte biologique. *B. bacteriovorus* a été utilisée dans certaines usines de traitement d'eau pour réduire le nombre de bactéries à Gram négatif dans l'eau. En agriculture cette bactérie a été utilisée pour limiter ou empêcher le départ et la propagation des agents pathogènes des plantes avec certaines cultures. Son utilisation dans l'agriculture nécessite une connaissance approfondie de son écologie et de la culture.

V. Épuration des eaux usées par les stations d'épuration:

Le développement industriel et l'immense pollution des eaux excèdent et gênent le pouvoir auto-épuration naturelle de l'eau. Depuis quelques décennies et dans le cadre de la politique publique de préservation de la qualité des eaux naturelles, les communes ont mis en place des stations d'épurations pour le traitement des eaux usées.

Il ya quelques dizaines d'années, les eaux usées domestiques ou industrielles étaient le plus souvent rejetées dans les rivières sans aucun traitement préalable. Malgré le pouvoir d'autoépuration de l'eau, le rejet en rivières a des limites : dans une grosse agglomération, la quantité d'eaux usées déversées peut très vite dépasser les capacités naturelles de la rivière, et les microorganismes de l'eau ne peuvent donc « consommer » toute la pollution. De plus, l'autoépuration ne concerne pas les métaux lourds et d'autres produits toxiques : ceux-ci ne sont jamais éliminés et s'accumulent dans les sédiments. (Koller, 2004)

L'épuration des eaux usées est un élément critique dans la promotion de la santé publique et la promotion de la protection des ressources en eau. C'est un ensemble de techniques qui consistent à purifier l'eau soit pour recycler les eaux usées dans les milieux naturels, soit pour transformer les eaux naturelles en eau potable, d'où la nécessité d'une séparation des égouts, permettant d'adapter chaque traitement à chaque type de pollution et le rendre ainsi plus performant. (Guirkinger, 2006).

La STEP est le moyen qu'offre la technique pour rétablir l'équilibre biologique de l'eau. De plusieurs types selon le type d'effluent à épurer (urbain, donc en principe essentiellement pollué par des matières organiques fermentescibles, ou industriel, contaminé par exemple par un type de composé chimique xénobiotique de toxicité redoutable), ces stations peuvent aussi varier par le degré de dépollution. (Koller, 2004)

V.1.Description de la zone d'étude :

« La station d'épuration des eaux usées de la Wilaya de Khenchela »

V.1.1. Localisation :

La station d'épuration des eaux usées de la wilaya de Khenchela est située dans la frontière de la route de Baghai, Wilaya de Khenchela. Elle est fonctionnelle depuis l'année 2008 sous la direction de l'ONA, le tableau suivant indique ses coordonnées exactes :

Tab.1. Coordonnées de la station d'épuration des eaux usées de la wilaya de Khenchela (ANB Constantine, 2007)

Code	Wilaya	Commune	Code Commune	Nom	X (m)	Y(m)	Z(m)
SE0706	40	khenchela	4001	Station d'épuration	903,9	249.45	1020÷1045

V.1.2. Informations générales :

Les informations concernant la nature des effluents, leurs débits et le niveau, le procédé et la qualité d'épuration plus le devenir des eaux traitées sont tous résumées dans ce tableau :

Tab.2. Informations générales sur la station d'épuration (ANB Constantine, 2007)

Capacité d'épuration (Eq-hab)	Débit moyen reçu (m3/j)	Débit moyen épuré (m3/j)	Rendement épuration (%)	Niveau d'épuration	Procédé d'épuration	Type de rejets	Devenir des boues
2015:192000 2030:322000	2015:230 622030:46363	2015 :2306 22030:46363	100%	Tertiaire	Boues activées	Domestique	Fins agricoles

Après le traitement, l'eau épurée peut être utilisée : pour l'irrigation avec un volume de :
2015: 8,4 à 2030 : 16,9 hm3/an et réutilisée pour l'industrie.

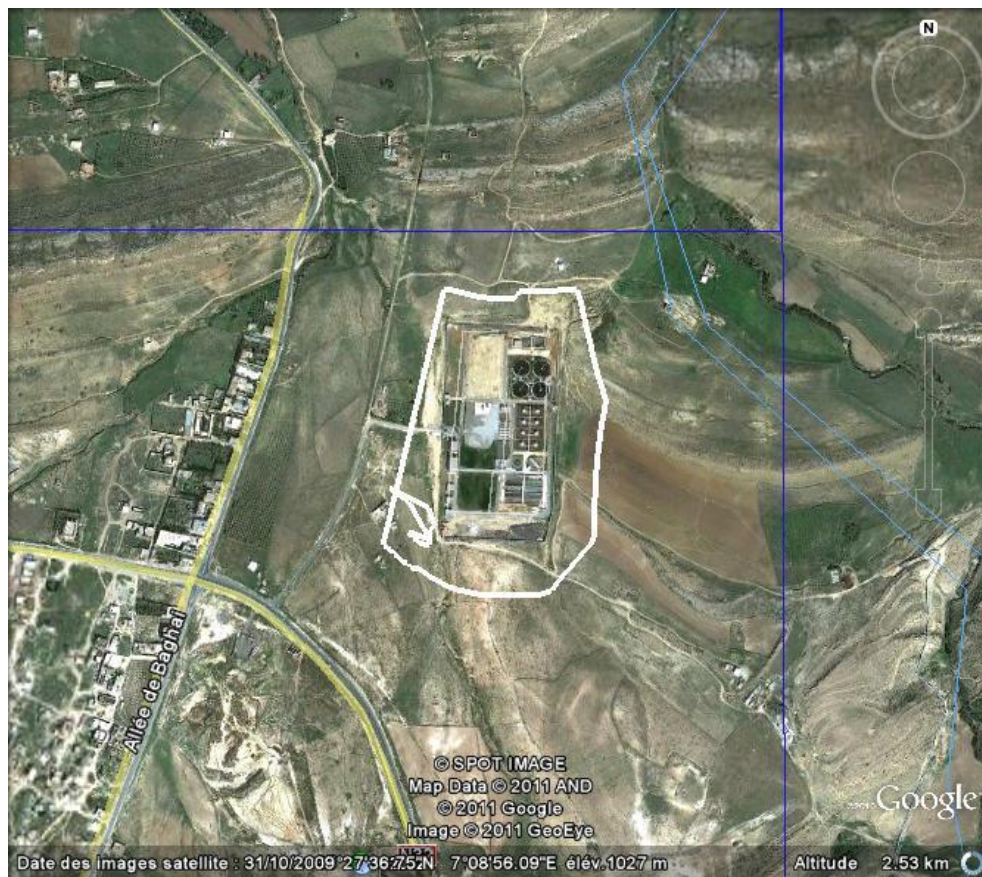


Fig.6. Photo de la station d'épuration de Khenchela (Satellite). (Google earth, 2011)

V.2. Objectif du traitement :

L'objectif d'une station d'épuration est de concentrer la pollution contenue dans les eaux usées sous forme d'un petit volume de résidus, les boues, et d'obtenir un effluent traité dont la phase liquide répond à des normes bien précises (degré de traitement recherché) mais avec des matières en suspension relativement stabilisées et e faible quantité. (Koller, 2004)

Le rôle principal de cette station d'épuration des eaux usées est de traiter, de réduire la charge polluante des eaux usées domestiques et de produire des rejets traités compatibles avec la qualité souhaitée et dans les normes idéales et des boues utilisées comme fertilisant en agriculture. (Anonyme, 2008)

V.3. Etapes d'épuration :

V.3.1. Prétraitement:

Les eaux usées arrivant à la station d'épuration sont très polluées et doivent subir des prétraitements. (Gamrassni, 1984)

Le prétraitement consiste à éliminer les matières susceptibles de gêner l'exploitation du réseau d'égouts de la station (**Koller, 2004**). Les phases de prétraitement sont le dégrillage, le dessablage et le déshuilage qui ont une triple fonction :

- Protéger l'équipement en aval contre le colmatage et le blocage de certaines pompes;
- Eviter les conditions médiocres d'aération;
- Protéger le milieu récepteur contre les risques esthétiques, ou la formation de filtre d'huile gênant la réaction naturelle. (**Valiron, 1991**)

V.3.1.1. Le dégrillage :

Les eaux usées brutes contiennent des éléments de grandes dimensions qui pourraient perturber le fonctionnement hydraulique de la station. Le dégrillage consiste à éliminer ces éléments (déchets) de grandes dimensions qui se trouvent dans l'égout brut (déchets insolubles, les plastiques...). En effet, ces déchets ne pouvant pas être éliminés par un traitement biologique ou physico-chimique, ils sont éliminés mécaniquement. (**Brame, 1986**)

Pour ce faire, on passe d'abord les eaux à travers des grilles à barreaux plus ou moins espacés dont l'écartement est de l'ordre du centimètre ou de tamis rotatifs qui retiennent les éléments les plus volumineux. (**Thomazeau, 1981**)



Fig.7. Le dégrilleur

V.3.1.2. Le dessablage :

Après le dégrillage il reste encore dans l'eau des fragments solides qui peuvent décanter facilement, mais dont la dureté et la taille relativement importante, supérieure à 0,2 mm de diamètre, pourrait conduire à l'abrasion de certains éléments de la station ; on élimine ces matériaux

dans de petits bassins rectangulaire ou circulaire et le sable se dépose au fond des bassins puis évacué via une pompe à sable vers le séchage du sable. Les dessableurs sont curés périodiquement et les matières solides sont généralement mélangées aux boues. (Gamrassni, 1984).

V.3.1.3. Le déshuilage :

Le déshuilage permet d'éliminer par écrémage ou par un système de gouttelettes les matières flottantes (huiles, hydrocarbures, éléments solides flottants..) qui passent à travers les grilles et qui forment une couche mince en surface et gêne le processus d'aération (Gamrassni, 1984). Les résidus de déshuilage ne doivent être mélangés aux boues que s'il est prévu une incinération. (Duchene, 1990)



Fig.8. Le dessablage et le déshuilage.

V.3.2. Le traitement biologique par boues activées:

Utilise les microorganismes épurateurs existants dans les eaux usées en facilitant l'assimilation de la matière organique par un apport d'oxygène. Ce genre de traitement vise à éliminer les matières biodégradables des eaux usées en les transformant en corps et résidus microbiens plus facilement décantables. Les boues issues de ces traitements sont appelées « boues biologiques » essentiellement formées par les résidus de bactéries cultivées dans les ouvrages d'épuration Le procédé à boues activées consiste en un réacteur biologique aérobie, où les microorganismes (bactéries) se développent dans un bassin alimenté d'une part en eaux et d'autre part en oxygène par des apports d'air nécessaires pour l'assimilation de la pollution et pour leurs propres besoins, l'oxygénation permet aussi un brassage de la boue activée qui est indispensable au contact entre les microorganismes, les polluants et l'O₂. (Edeline, 1997; Adem, 2001)

Dans une station de boues activées, la séparation de l'eau traitée et de la masse des bactéries se fait dans le décanteur secondaire, et recyclé dans le bassin aérateur pour maintenir la population des microorganismes intervenant dans l'épuration. **(Guivarch, 2001)**



Fig .9. L'aérateur.

V.3.3. Le traitement secondaire ou clarification :

Le clarificateur est un ouvrage équipé généralement d'un pont racleur et d'un motoréducteur ; ce poste permet la séparation de l'eau épurée et la boue activée qui se dépose au fond du clarificateur. Les boues issues de ce type de décantation sont mélangées et forment ainsi ce que l'on nomme « boues fraîches ». **(Guy, 2003)**. La station d'épuration de Khenchela se dispose de quatre clarificateurs ou encore décanteurs. **(Anonyme, 2008)**



Fig.10. Le clarificateur.

V.3.4. La désinfection :

Une eau même très bien épurée contient encore une grande quantité de microorganismes (bactéries, virus, champignons, protozoaires, etc.), dont certains sont pathogènes pour l'homme et les animaux. Seul un traitement de désinfection qui est la dernière étape de traitement des eaux usées permet une réduction de 10^5 du nombre de ces germes. (Koller, 2004)

Il est possible de classer les procédés de désinfection selon plusieurs critères : (Mayet, 1994)

- Suivant la nature des souches que l'on cherche à détruire, on parle de traitement fongicide (contre les moisissures et les champignons), de traitement algicide (contre les algues), bactéricide (contre les bactéries) ou encore virulicide (contre les virus) ;
- Suivant le mode d'action du processus qui peut être de différents types : toxicité directe, coagulation des protéines, actions enzymatiques par blocage des métabolismes ou inhibition de la reproduction ;
- En fonction des moyens utilisés, on distingue les procédés physiques (température, rayons ultraviolets et ionisants) et les procédés chimiques (chloration et ozonation). (Mayet, 1994).

La désinfection de l'eau épurée au niveau de la station d'épuration de Khenchela se fait par l'hypochlorite de sodium pour éliminer les germes pathogènes. (Anonyme, 2008)

V.3.5. Traitement des boues :

Il n'existe pas de traitement d'épuration d'eau qui n'aboutisse à la production de résidus concentrés contenant les matières de pollution et les produits de transformation insolubles. Ces résidus appelés boues, ont diverses origines. Selon leur origine, les boues ont une composition différente qu'elles proviennent d'un traitement d'eau potable, d'un procédé physicochimique ou biologique ou d'une eau usée urbaine ou industrielle. (Gaid, 1984)

Le traitement des boues est défini comme l'ensemble des opérations visant à modifier les caractéristiques des boues en excès à fin de rendre leur destination finale fiable, sans nuisance et d'une manière rationnelle et économique. (Roula, 2005)

Le traitement et l'élimination des boues constituent une part importante de l'investissement d'une station et la part la plus lourde de l'exploitation (40 à 60 % de l'ensemble du traitement des eaux usées). (Koller, 2004)

V.3.5.1. Epaissement :

C'est le premier stade de réduction de volume des boues issues des traitements biologiques ou physicochimiques des eaux usées sans dépense d'énergie notable. (Koller, 2004)

L'épaississement consiste à séparer par gravité (décantation ou sédimentation) ou par flottation, l'eau interstitielle des particules de boues. **(Gaid, 1984)**

Les intérêts de l'épaississement sont multiples et l'on cite particulièrement : **(Koller, 2004)**

- l'amélioration du taux de réduction des matières organiques.
- l'amélioration des rendements des dispositifs de déshydratation et de séchage.
- La création, dans le cas d'un épaississement par décantation, d'un volume tampon entre la chaîne de traitement de l'eau et celle des boues, qui permet d'améliorer la sécurité du traitement.
- Soulage les décanteurs primaires et évite tout risque de fermentation des boues.

V.3.5.2. Déshydratation (les lits de séchage) :

La déshydratation constitue la seconde étape de réduction du volume des boues au cours de laquelle on réalise sur les boues épaissies une élimination plus ou moins poussée de leur humidité résiduelle de façon à les amener à l'état solide. Le séchage des boues s'effectue à l'air libre sur des lits de sable drainés. Cette technique reste, en raison essentiellement des frais d'investissement réduits, la seule technique de dessiccation utilisée pour les stations d'importance modeste. Les lits de séchage comportent un massif drainant de 0,25 à 0,30 m d'épaisseur constituée par des scories ou pierrailles réparties en couche de granulométrie décroissante du bas vers le haut. Ce massif est surmonté d'une couche de sable, de cendres ou de poussière de coke de 0,1 m d'épaisseur. **(Koller, 2004)**

V.3.5.3. Valorisation de la boue :

La valorisation des boues est souvent aléatoire et leur évacuation constitue presque toujours une charge d'exploitation importante. Sur le plan économique le but à atteindre est en réalité de limiter les frais de leur traitement et de leur transport. L'utilisation agricole est aujourd'hui la solution la plus satisfaisante sur le plan de l'environnement et la plus économique. Les boues sont épandues dans les champs, directement sous forme liquide ou pâteuse (après déshydratation), puis enfouies. Vu la situation géographique de la station d'épuration de Khenchela et sa présence dans un périmètre d'activité agricole, la meilleure solution est d'utiliser la boue pour la fertilisation des terres agricoles. **((Koller, 2004 ; Anonyme, 2008).**

En dehors de la présence excessive dans certains cas de graisses ou fibres, le risque potentiel de l'utilisation des boues en culture est celui lié à la présence de métaux lourds. **(Koller, 2004)**

Objectif du travail :

- Notre objectif de cette étude est : d'étudier la qualité physicochimique et bactériologique de l'eau de la station d'épuration de Khenchela et de contribuer à isoler une micro-bactérie prédatrice *Bdellovibrio bacteriovorus* de cette eau et étudier son pouvoir lytique vis-à-vis les bactéries à Gram négatif.

I.1. Échantillonnage :

Un échantillon représente un très petit volume de l'eau destinée à être examinée. La dispersion de microorganismes dans la fraction échantillonnée doit refléter le volume entier de l'eau ayant servi au prélèvement, l'échantillonnage n'est pas simplement une procédure de prélèvement sur l'eau d'une petite portion, il vise à fournir une information sur les caractéristiques de l'eau. (Lightfoot, 2002)

I.2. Prélèvement :

Le prélèvement d'un échantillon d'eau est une opération délicate à laquelle le plus grand soin doit être apporté ; il conditionne les résultats analytiques et l'interprétation qui en sera donnée. L'échantillon doit être homogène, représentatif et obtenu sans modifier les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (gaz dissous, matières en suspension, etc.). (Lightfoot, 2002)

- Nous avons pris des échantillons de l'entrée et de la sortie des eaux usées de la station d'épuration.

I.2.1 Matériel de prélèvement :

Le matériel était des flacons neufs en verre stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 1 heure. Le flacon ne doit pas être rempli entièrement, il convient de laisser un petit vide d'air permettant de bien mélanger en secouant le flacon. (Lightfoot, 2002; Rodier, 2009)

I.3. Transport et conservation au laboratoire :

Après l'étiquetage des prélèvements, ils sont transportés au laboratoire dans une glacière à une température comprise entre 4°C et 6°C dans les 24 heures afin d'assurer une conservation satisfaisante, NF EN ISO 5667-3 (juin 2004). (Rodier, 2009)

I.4. Nature et période de prélèvement :

Tab.3.Nature et période de prélèvement

Nature du prélèvement	Période des prélèvements	Types d'analyses effectuées
Eau usée de la STEP de Khenchela.	Juin-juillet 2011	Physicochimiques et bactériologiques

- Les analyses physicochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de la station d'épuration de Khenchela et le laboratoire de chimie, département de Biologie, Centre Universitaire de Khenchela.
- Les analyses bactériologique ont été effectuées dans le laboratoire d'hygiène CHU Batna et le laboratoire de bactériologie du département des Sciences Vétérinaires, Université de Batna.

II. Analyse physico-chimique :

II.1.Mesure *in situ*:

Certains paramètres physicochimiques peuvent être modifiés lors de transport de l'échantillon ce qui est nécessaire de mesurer ces paramètres *in situ*. (Rodier, 2009)

II.1.2.Température :

Il est très important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision. En effet, celle-ci joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité et dans la détermination de pH pour la connaissance de l'origine de l'eau et des mélanges. Les variations de température affectent certaines propriétés de l'eau, comme la solubilité de l'oxygène ou la vitesse des réactions chimiques (exemple de réactions chimiques : la fermentation ou l'autoépuration des cours d'eau). (Leclerc, 1996 ; Rodier, 2009)

- La température de l'eau est mesurée par un thermomètre digital de la marque CITEC.

II.1.2. Le pH :

Le pH est un facteur physique qui participe au même titre que la conductivité, l'alcalinité et la température à des organismes dans les écosystèmes aquatiques. Le pH des eaux traitées rejetées de la station d'épuration dans le milieu naturel doit être compris entre 6 et 8.5. (Rejsek, 2002)

- Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre digital de la marque **HACH** préalablement étalonné à pH 4,7 et 10.

II.1.2.1.Mode opératoire :

-Rincer l'électrode d'abord avec de l'eau distillée.

-Immerger l'électrode dans l'échantillon.

-Faire la lecture après la stabilisation du pH au pH mètre.

II.1.3.La conductivité électrique :

La conductivité est la capacité de l'eau de conduire le courant électrique et cela est dû à la présence des ions. La conductivité est liée à la présence d'ions en solution. Elle augmente avec la température et la concentration en sels dissous. (Rodier, 2009)

- La mesure est effectuée par un conductimètre digital de la marque **HACH**.

II.1.3.1.Mode opératoire : est identique à celui du pH.

II.1.4.Turbidité :

La turbidité d'une eau est due à la présence des matières en suspension finement divisées : argile, limon, grain de silice, matière organique. La mesure de l'abondance de ces matières mesure son degré de turbidité. Celui-ci sera d'autant plus faible que le traitement de l'eau aura été plus efficace. (Rodier, 2009)

- La mesure de la turbidité se fait à l'aide d'un turbidimètre digital de la marque **HACH**.

II.1.4.1.Mode opératoire : est identique à celui du pH.

II.2.Matières en suspension (MES) :

Ce sont des particules solides dont la taille est supérieure à 10 μm , dispersées dans l'eau sans être chimiquement liées avec elle. Elles déterminent la turbidité de l'eau, limitent la pénétration de la lumière dans l'eau, la teneur en oxygène dissous et nuisent le développement dans la vie

aquatique. Leur mesure donne une première indication sur la teneur en matières colloïdales d'origine minérale ou organique. **(Rejsek, 2002)**

La détermination des matières en suspension dans l'eau s'effectue par filtration. L'eau est filtrée et le poids de matières retenues par le filtre est déterminé par pesée différentielle. **(Rodier, 2009)**

II.2.1. Matériel spécial

- Dispositif de filtration sous vide ou sous pression (100 000 à 200 000 Pa).
- Disques filtrants en fibres de verre (plusieurs types de disques commerciaux sont disponibles, la porosité la plus communément utilisée est 1,2 μm). **(Rodier, 2009)**

I.2.2. Mode opératoire

- Laver le disque de filtration à l'eau distillée, le sécher (à 105 °C) jusqu'à masse constante, puis le peser à 0,1 mg près après passage au dessiccateur.
- Le mettre en place sur l'équipement de filtration. Mettre en service le dispositif d'aspiration ou de pression. Verser l'échantillon sur le filtre.
- Rincer la fiole ayant contenu l'eau à analyser avec 10 ml d'eau permutée.
- Faire passer sur le filtre cette eau de lavage.
- Laisser essorer le filtre, sécher à 105 °C. Laisser refroidir au dessiccateur et peser à 0,1 mg près, jusqu'à masse constante. **(Rodier, 2009)**

II.3. Les nitrates (NO_3^-) :

Les nitrates (ou azote nitrique) représentent la forme azotée souvent la plus présente dans les eaux naturelles. Les nitrates constituent la composante principale de l'azote inorganique ou minéral. Toutes les formes d'azote (azote organique, nitrites...etc.) sont susceptibles d'être à l'origine des nitrates par un processus d'oxydation biologique. **(Rodier, 1996)**

II.3.1. Principe:

Les nitrates sont réduits, à travers une colonne de cadmium, en nitrites qui sont dosés par spectrophotométrie. **(Rodier, 2009)**

II.3.2. Mode opératoire:

Faire passer 100 ml d'un mélange composé de 25 ml d'échantillon et de 75 ml de solution de chlorure d'ammonium EDTA à travers la colonne. Ecarter les 30 premiers millilitres et réaliser la détermination des nitrites sur 50 ml de la fraction restante par la méthode de dosage des nitrites. **(Rodier, 1996)**

II.4. Demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

La demande biochimique en oxygène exprime la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction ou la dégradation des matières organiques d'une eau par les microorganismes du milieu. Il s'agit d'un paramètre mesurant une oxydation biologique des matières organiques qui fait intervenir des réactions enzymatiques complexes intra ou extracellulaires. (Rodier, 2005)

II.4.1.Principe :

La DBO est mesurée au bout de 5 jours à 20°C (la température favorable à l'activité des microorganismes consommateurs d'oxygène) et à l'obscurité (afin d'éviter toute photosynthèse parasite).

-Deux échantillons sont nécessaires : le premier sert à la mesure de la concentration initiale en O₂, et le deuxième à la mesure de la concentration résiduaire en O₂ au bout de 5 jours.

-La DBO₅ est la différence entre les deux concentrations.

Les mesures sont effectuées sur un même volume et le second échantillon sera conservé 5 jours à l'obscurité à 20°C. (Hakmi, 2002)

II.4.2.Matériel :

-Oxymètre.

-Agitateur magnétique.

-Aérateur.

-Flacon.

-Eau ultra pure pour la dilution.

II.4.3.Mode opératoire :

II.4.3.1. Préparation de l'eau de dilution :

-Mettre la vielle de prélèvement, dans un récipient de 10L de l'eau du robinet dans la quelle on plonge pendant 24h un aérateur pour la saturation en O₂ et laisser reposer 12h. Le facteur de dilution pour une eau usée est de 50 à 100 (DBO moyen =300mg/l pour un effluent domestique).

(Rejsek, 2002)

II.4.3.2. Préparation des flacons de mesure :

-Verser dans le flacon un peu d'eau de dilution puis la quantité prévue d'échantillon et remplir le reste du flacon de l'eau de dilution.

-Fermer le flacon sans y laisser d'air pénétrer.

-Faire ainsi deux flacons identiques. (Rejsek, 2002)

II.4.3.3.Mesure de temps :

➤ Doser l'O₂ dans le flacon d'échantillon dilué (T₀ mg/l). (Rejsek, 2002)

II.4.3.4.Incubation :

- Placer les deux flacons restant à l'étuve 20°C et à l'obscurité pendant 5 jours. **(Rejsek, 2002)**

II.4.3.5. Mesure au temps 5 jours :

- Doser l'O₂ dans le flacon d'échantillon dilué pestant (T₅ mg/l). **(Rejsek, 2002)**

II.3.4.6. Résultat :

- La lecture se fait comme suit : $DBO = F(T_0 - T_5)$

III. Analyse bactériologique :

III.1. Préparation des dilutions :

Le nombre de dilution dépend de la nature de l'eau à analyser et sa charge microbienne, dans notre cas la dilution est poussée jusqu'à la dilution 10⁻⁵ comme étant une eau très chargée. **(Lebres et al., 2008)**

La dilution 10⁻¹ : Dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée ou physiologique stérile, on ajoute 1ml de la solution mère à l'aide d'une pipette pasteur stérile. **(Lebres et al., 2008)**

La dilution 10⁻² : Dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée ou physiologique stérile, on ajoute 1ml de la dilution 10⁻¹ à l'aide d'une nouvelle pipette pasteur stérile. **(Lebres et al., 2008)**

Les autres dilutions sont préparées par la même façon en utilisant pour chacune une nouvelle pipette stérile.

III.2. Dénombrement des germes totaux:

III.2.1. Définition :

La flore mésophile aérobie totale (FTAM) ou encore germes revivifiables est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banals de contamination (il s'agit de groupe microbien qu'il n'est pas toujours nécessaire de définir au plan taxonomique). Le dénombrement des germes aérobies mésophiles est utilisé comme indicateur de pollution et d'efficacité de traitement, en particulier des traitements physiques tels que la filtration, qui devrait entraîner soit une très forte diminution de la concentration bactérienne par rapport à l'entrée, soit même une absence de bactéries. **(Rodier, 2009 ; Guiraud, 2004)**

III.2.2. But :

Cet examen vise à dénombrer non spécifiquement le plus grand nombre de micro-organismes mais en particulier de bactéries se développant dans les conditions aérobies habituelles de culture afin d'apprécier la pollution microbienne de l'eau. (Rodier, 2009 ; Joffin, 1999)

III.2.3. Technique:

Selon la norme AFNOR NF EN ISO 6222 (juillet 1999) la méthode utilisée est celle de dénombrement par inoculation dans la masse. Dans cette technique, à partir de la solution mère et des dilutions décimales 10^{-1} . 10^{-2} 10^{-5} porter aseptiquement 1 ml en double dans deux boîtes de Pétri vides, numérotées et préparées.

-Ensuite, 15 à 19 ml de gélose TGEA ou GNAB ou GN en surfusion sont coulés dans les boîtes et mélangés uniformément avec l'inoculum par un lent mouvement circulaire horizontal (en forme de « 8 »)

-Laisser solidifier sur pailleuse puis incuber les boîtes en deux séries :

- La première série sera incubée à 22 °C pendant 72 heures
- La deuxième série sera incubée à 37 °C pendant 48 heures. (Lebres *et al.*, 2008 Guiraud, 2004)

III.2.4.Lecture :

- Chaque colonie étant par convention considérée comme ayant été engendrée par un seul microorganisme. Les colonies de cette flore ont des formes caractéristiques lenticulaires et bien distinctes. Seules les boîtes contenant entre plus de 15 et moins de 300 colonies sont retenues et les résultats sont exprimés en nombre de microorganismes révivifiables par millilitre. (Lebres *et al.*, 2008).

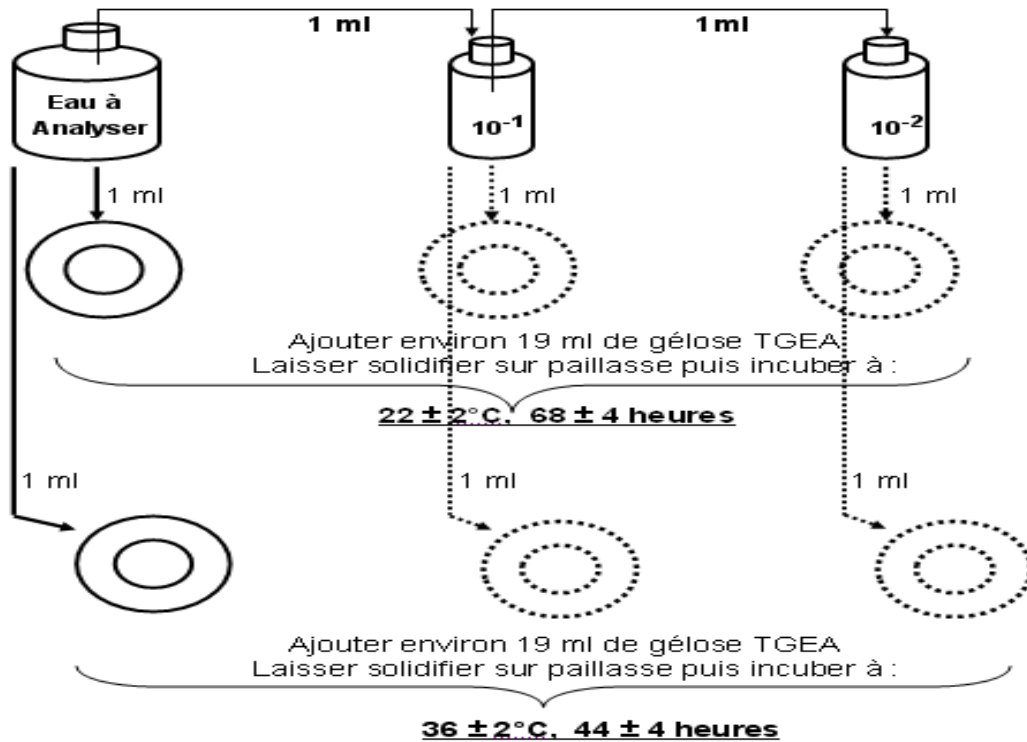


Fig.11. Recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22 et à 37°C dans les eaux. (Lebres *et al.*, 2008)

III.3. Dénombrement des coliformes :

III.3.1.Méthode générale de dénombrement en milieu liquide par détermination du nombre le plus probable (NPP)

III.3.1.1.Principe :

Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire (loi de Poisson). Dans ce type de méthode, les bactéries se multiplient librement dans le milieu liquide. En cas de présence, l'ensemble du milieu liquide inoculé vire à la « positivité » (trouble ou virage de l'indicateur). (Rodier, 2009)

III.3.1.2.Lecture :

Après incubation, on compte les tubes positifs (apparition d'un trouble, virage de colorant, dégagement gazeux) dans les dilutions successives et on retient le nombre caractéristique constitué par les trois chiffres écrit dans l'ordre des dilutions croissantes en commençant par le nombre correspondant à la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs. Ce nombre caractéristique obtenu correspond d'après la table de Mac Grady au nombre de bactéries présentes (NPP) dans le prélèvement correspondant à la plus faible dilution prise en compte. Le calcul de

concentration cellulaire dans la suspension initiale se fait en tenant compte les dilutions effectuées. **(Rodier, 2009)**

III.3.2. Définition :

La définition suivante a été adoptée par l'Organisation internationale de standardisation (ISO). Le terme « *coliforme* » correspond à des organismes en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatif, oxydase négative, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaries ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures, à des températures de 35 à 37 °C. Ils constituent un rassemblement assez hétéroclite du point de vue taxonomique qui regroupe un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant en fait à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ils comprennent entre autres les genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia*. **(Rodier, 2009 ; Guiraud, 2004)**.

Le terme de « *coliformes fécaux* » ou de « *coliformes thermo-tolérants* » correspond à des coliformes qui présentent les mêmes propriétés (caractéristiques des coliformes) après incubation à la température de 44 °C. **(Rodier, 2009)**

Le terme « *E. coli* » correspond à des coliformes thermotolérants qui produisent de l'indole à partir de tryptophane, à 44 °C. **(Rodier, 2009)**

III.3.3. But :

Le dénombrement des coliformes et leur présence dans l'eau constitue un indice de contamination fécale. **(Joffin, 1999)**

III.3.3.1. Technique:

La technique utilisée est celle de colimétrie en milieu liquide à deux test : présomptif (coliformes totaux) et confirmatif (coliforme fécaux) en utilisant comme milieu le BCPL (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol) à double et à simple concentration avec une cloche de Durham (NF EN ISO 9308-3, mars 1999).

III.3.3.1.1. Test présomptif :

En bactériologie des eaux, la technique du NPP à 3 tubes par série se fait comme suit :

- Ensemencer 3 tubes de appliquée bouillon BCPL à double concentration avec chacun 10ml de l'eau à analyser ;

- Ensemencer 3 tubes de bouillon BCPL à simple concentration avec chacun 1m de l'eau à analyser, puis suivant le même protocole ensemencher 3 tubes avec 1mL de chacune des dilutions décimales
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 24 et/ou 48 heures. (Delarras, 2007)

Lecture :

Sont considérés comme positifs (pouvant contenir des coliformes) les tubes où il se produit simultanément :

- Un dégagement de gaz dans la cloche de Durham (doit occuper au moins 1/10 du volume de la cloche).
- Une culture avec un virage de l'indicateur coloré (le virage du bromocrésol pourpre au jaune due à la fermentation du lactose).

Nous notons le nombre de tubes positifs dans chaque série, puis nous nous reportons à la table de Mac Grady pour déterminer le nombre de coliformes présents dans 100ml d'échantillon. (Rodier, 2009)

III.3.3.1.2. Test confirmatif : recherche et dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* : Test de Mac Kense

Dans la méthode de NPP, à partir de chaque tube positif sur le bouillon BCPL à double ou à simple concentration ensemencher un tube du milieu Schubert munis d'une cloche de Durham et incuber à 44°C pendant 48h. (Delarras, 2007)

Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble bactérien.
- Un dégagement gazeux (fermentation du lactose avec production de gaz à 44°C sans production d'indole, conclure à la présence d'au moins un coliforme thermotolérant dans le tube initial). (Delarras, 2007)
- Un anneau rouge en surface, témoin de la de la production d'indole par *Escherichia coli* après ajout de 2 à 3 gouttes de Kowacs (fermentation du lactose avec production du gaz à 44°C et production d'indole, conclure à la présence d'au moins un *E.coli* dans le tube initial).

On utilise la méthode du NPP à trois tubes par série en ne prenant en compte que des résultats positifs des milieux confirmatifs. (Delarras, 2007)

III.4. Recherche et dénombrement des Streptocoques D (fécaux) :

III.4.1. Définition :

Les streptocoques D sont des cocci Gram positif, immobiles en général et anaérobies facultatifs, catalase négative, possédant un antigène D et sont souvent dénommés « streptocoques fécaux » dans la législation européenne et française des eaux. Le milieu de Rothe (bouillon glucosé à l'azoture) est utilisé pour le test présomptif lors de la recherche et du dénombrement des streptocoques du groupe D. (Delarras, 2007)

III.4.2. But :

Les Streptocoques du groupe D sont constamment rencontrés dans les matières fécales et ont naturellement été décrits comme témoins de contamination fécale dans les eaux et certains aliments. Ils sont en général plus abondants que les coliformes fécaux dans les matières fécales animales (rapport Coliformes / Streptocoques D : < 1). La situation est inverse chez l'homme. (Lebres et al., 2008 ; Joffin, 1999)

III.4.3. Technique:

La méthode de recherche et du dénombrement des Streptocoques fécaux est pareille à celle de colimétrie en milieux liquides. Les milieux utilisés sont : le milieu de Rothe à Simple et à Double concentration, qui contient comme agent sélectif l'azide de sodium (inhibiteur de la flore secondaire Gram négatif) et le milieu d'Eva-Litsky qui renferme en plus de l'azide de sodium une faible concentration de cristal violet qui freine le développement des bactéries à Gram positif. NF EN ISO 7899-1 (mars 1999). (Rodier, 2005).

III.4.3.1. Étape présomptive :

On suit la technique du NPP à 3 tubes par série :

- Ensemencer 3 tubes de bouillon Rothe à double concentration avec chacun 10ml de l'eau à analyser ;
- Ensemencer 3 tubes de bouillon Rothe à simple concentration avec chacun 1ml de l'eau à analyser, puis suivant le même protocole ensemencer 3 tubes avec 1ml de chacune des dilutions décimales

- Incuber les tubes à 37 °C pendant 24 et/ou 48 heures. (Delarras, 2007)

Lecture : les tubes présentant un trouble bactérien sont positifs. Ils sont alors présomptifs du groupe D et ils doivent être obligatoirement confirmés sur le milieu de Litsky (Delarras, 2007)

III.4.3.2. Etape confirmative :

Chaque tube positif sur le bouillon de Rothe doit être ensemencé dans un tube de bouillon de Litsky.

Incuber les tubes à 37 °C pendant 24 à 48 heures. (Delarras, 2007)

Lecture : les tubes présentant un trouble et/ou un dépôt parfois violet dans le tube (à fond rond) sont positifs. Ils confirment la présence de streptocoques du groupe D. (Delarras, 2007)

Calculer par la méthode du NPP à l'aide de la table de Mac Graday, le nombre de streptocoque D par 100 ml d'eau, en se référant à la norme NF T 90-411. (Delarras, 2007)

III.5. Recherche de spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de Clostridium sulfito-réducteurs :

III.5.1. Définition :

Les bactéries sulfito-réductrices se sont des bactéries ont une forme de bacille Gram positif, se développant à 37 °C pendant 24 à 48 heures en gélose profonde de type gélose viande foie et donnent des colonies blanche entourées d'une auréole noire qui se résultent de la réduction du sulfite de sodium (Na_2SO_3) présent dans la gélose, en sulfure qui avec le Fe^{3+} donne le sulfure de fer de couleur noire. (Lebres et al., 2008)

III.5.2. But :

La recherche et le dénombrement de ces bactéries est un test de contamination fécale, éventuellement ancienne vu la résistance des spores à l'extérieur. (Joffin, 1999)

III.5.3. Technique: on suit la norme NF T90-415(1985)

- Au moment de l'emploi faire fondre un flacon de gélose Viande foie, le refroidir dans un bain d'eau à $45 \pm 1^\circ\text{C}$ puis ajouter une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de Sulfite de Sodium. Mélanger soigneusement et aseptiquement.
- Prendre 25 ml de l'eau à analyser
- Un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes,
- Puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet, dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.
- Ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, dans chaque tube comme l'indique la figure 13.
- Laisser alors les tubes, solidifier sur pailleasse pendant 30 minutes.
- Ces tubes seront ainsi incubés à 37°C pendant 16, 24 ou au plus tard 48 heures. (**Lebres et al ., 2008**)

III.5.4. Lecture : la première lecture doit se faire impérativement à 16 heures, car :

- d'une part les colonies de Clostridium sulfito-réducteurs sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant alors l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse est à refaire.
- d'autre part, il faut absolument repérer toute colonie noire ayant poussé en masse et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm.

Dans le cas où il n'y a pas de colonie caractéristique réincuber les tubes et effectuer une deuxième lecture au bout de 24 heures voire 48 heures. (**Lebres et al., 2008**)

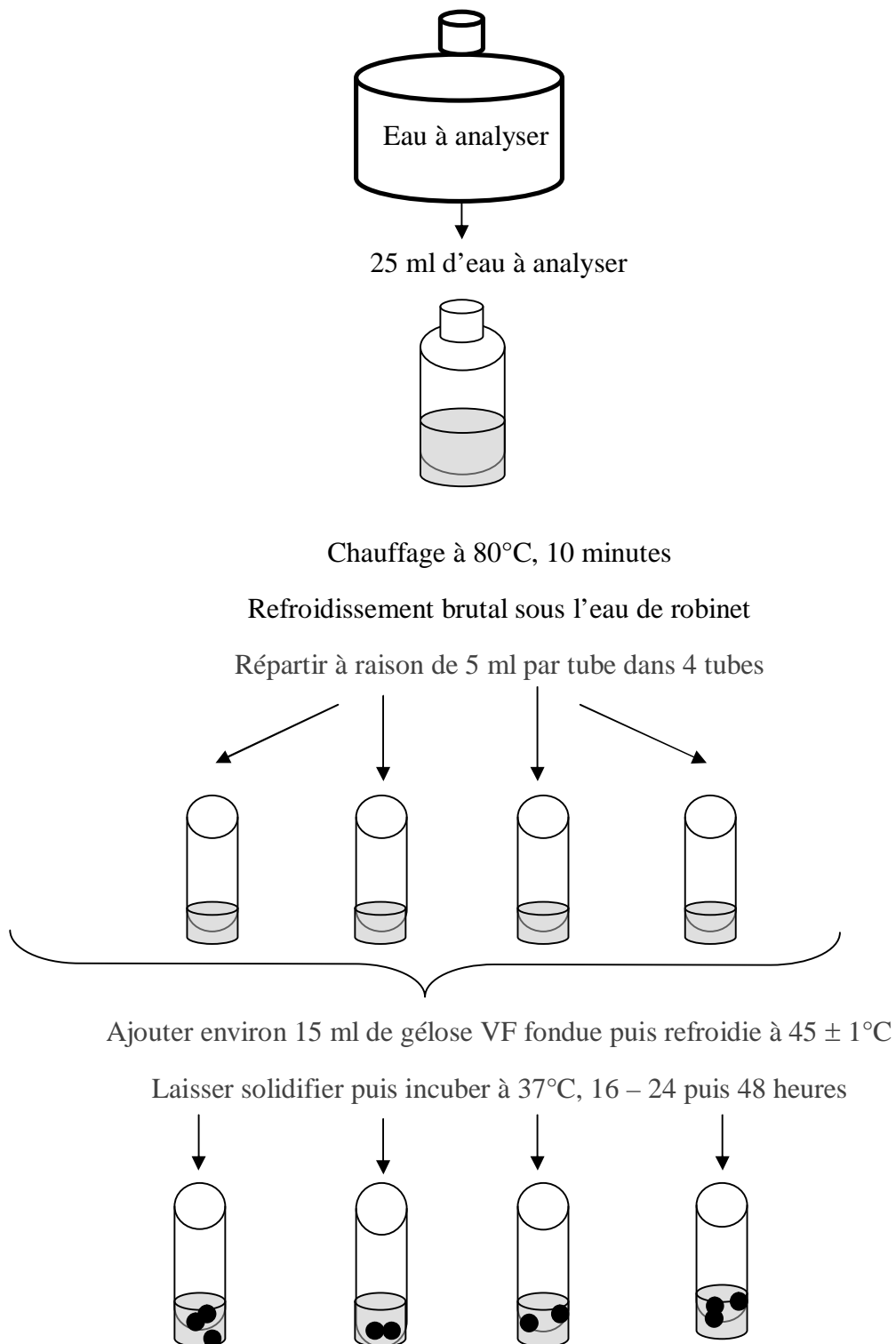


Fig.12. Recherche de spores de bactéries anaérobies sulfite-Réductrices et de *Clostridium* sulfite-réducteurs. (Lebres et *al.*, 2008)

III.6. Isolement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif:

Afin d'isoler les différents microorganismes présents dans l'eau à analyser on a utilisé quatre types de milieu de culture: Gélose nutritive, Mac Conkey, Hektoen et Chapman. Des cultures en stries à partir des échantillons bien homogénéisés sur des boîtes Pétri ont été effectuées sur ces milieux de culture. Les boîtes sont par la suite incubées en aérobiose à une température de 37°C, pendant 24 heures.

III.6.1. Isolement des Entérobactéries :

Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles, acidifiant le glucose par voie fermentative avec souvent production de gaz, ne possédant pas d'oxydase et réduisant les nitrates en nitrites. (Dabernat et al., 1992)

Sur les trois géloses mises en culture (Gélose nutritive, Mac Conkey et Hektoen) nous avons choisi les colonies suspectes ou désirées et les repiquées dans de nouvelles boîtes gélosées afin de vérifier la pureté des souches. Le repiquage sur milieu Mac Conkey et Hektoen permet aussi de vérifier si la fermentation du lactose est effective ou non. Ces milieux gélosés sont ensemencés en surface par stries et incubés à 37°C pendant 24 heures.

III.6.2. Isolement de *Pseudomonas aeruginosa* :

C'est un bacille à Gram négatif, aérobie stricte, mobile par cil polaire, métabolisme oxydatif, lactose négatif, oxydase positive et capable de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide. C'est une bactérie pourvue d'une odeur de seringa (odeur du jasmin) qui est aussi appelée bacille pyocyanique due à la production du pigment fluorescent (pyocyanine). (Delarras, 2007)

L'isolement peut être réalisé sur gélose Mac Conkey ou Hektoen où les colonies apparaissent respectivement sous une couleur beige (lactose-) et verte (lactose-). On ensemence avec une anse de platine l'eau à analyser par stries à la surface de la gélose puis on incube à 37°C pendant 24 heures. (Delarras, 2007)

III.6.2.1. Confirmation :

- ✓ Coloration de Gram.
- ✓ Examen directe entre lame et lamelle (état frais), il permet d'observer la mobilité des germes.
- ✓ Test oxydase.

- ✓ Identification biochimique par le système API 20E.

III.6.3. Isolement des staphylocoques à coagulase libre :

Ce sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Ils sont toutefois capables de fermenter le glucose (métabolisme anaérobie) à la différence des microcoques et habituellement capables de fermenter le mannitol. Le milieu Chapman est utilisé pour isoler et mettre en évidence ces germes. La fermentation se traduit par le virage au jaune du milieu de culture. L'espèce type est *S.aureus* qui forme des colonies jaunes d'or et qui est la seule qui possède une staphylocoagulase et les autres staphylocoques ont des colonies blanches porcelaines, jaunes claire ou roses. (Delarras, 2007)

III.6.3.1. Confirmation :

- ✓ Coloration de Gram.
- ✓ Test de catalase.
- ✓ Test de staphylocoagulase.

III.7. Tests complémentaires :

III.7.1. Caractéristiques morphologiques :

Dans les conditions données, chaque espèce bactérienne développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristiques. (Singleton, 1999)

Nous avons noté pour chaque type des colonies distinctes les caractères suivants : contour, élévation, couleur et surface.

III.7.2. Examen à l'état frais :

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

Technique :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine une fraction de la colonie sur milieu gélosé.
- Effectuer une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique en incorporant l'inoculum.

-Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulle d'air.

L'observation s'effectue à faible luminosité à l'objectif X10 ou X40. (Joffin, 1988)

III.7.3. Coloration de Gram :

La coloration de Gram permet une observation grossière des cellules. Elle est irremplaçable pour différencier les bactéries à Gram positif (colorées en violet) et à Gram négatif (colorées en rose).

Technique :

- Réaliser sur une lame propre un frottis puis le fixer.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol durant 1 minute.
- Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente et laisser 30secondes.
- Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de fuschine pendant 1 minute.
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher la lame à l'aide d'un papier buvard.

-L'observation s'effectue à immersion (objectif \times 100) après avoir déposé une goutte d'huile de cèdre sur la lame (observation à immersion. (Dégrément, 1998).

III.7.4. Identification biochimique par galerie API 20E :

L'étude du profile de fermentation des glucides et des tests enzymatiques, permet l'identification des espèces bactériennes par l'utilisation du dispositif commercialisé de la galerie miniaturisée API 20E. L'API 20E est un système miniaturisé standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et d'autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. Ce kits d'identification rapide permettant d'effectuer l'étude simultanée de nombreux caractères et, ceci, de façon très rapide. Il est constitué de 20 microtubes à ensemercer individuellement permettant de réaliser 20 tests biochimiques, dont 8 sont conventionnels et 12 d'assimilation. (BioMérieux, 2009)

III.7.4.1.Principe :

La galerie API 20E compte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les

réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. (BioMérieux, 2009)

III.7.4.2. Mode opératoire :

La figure suivante montre le mode opératoire de la galerie API 20E.

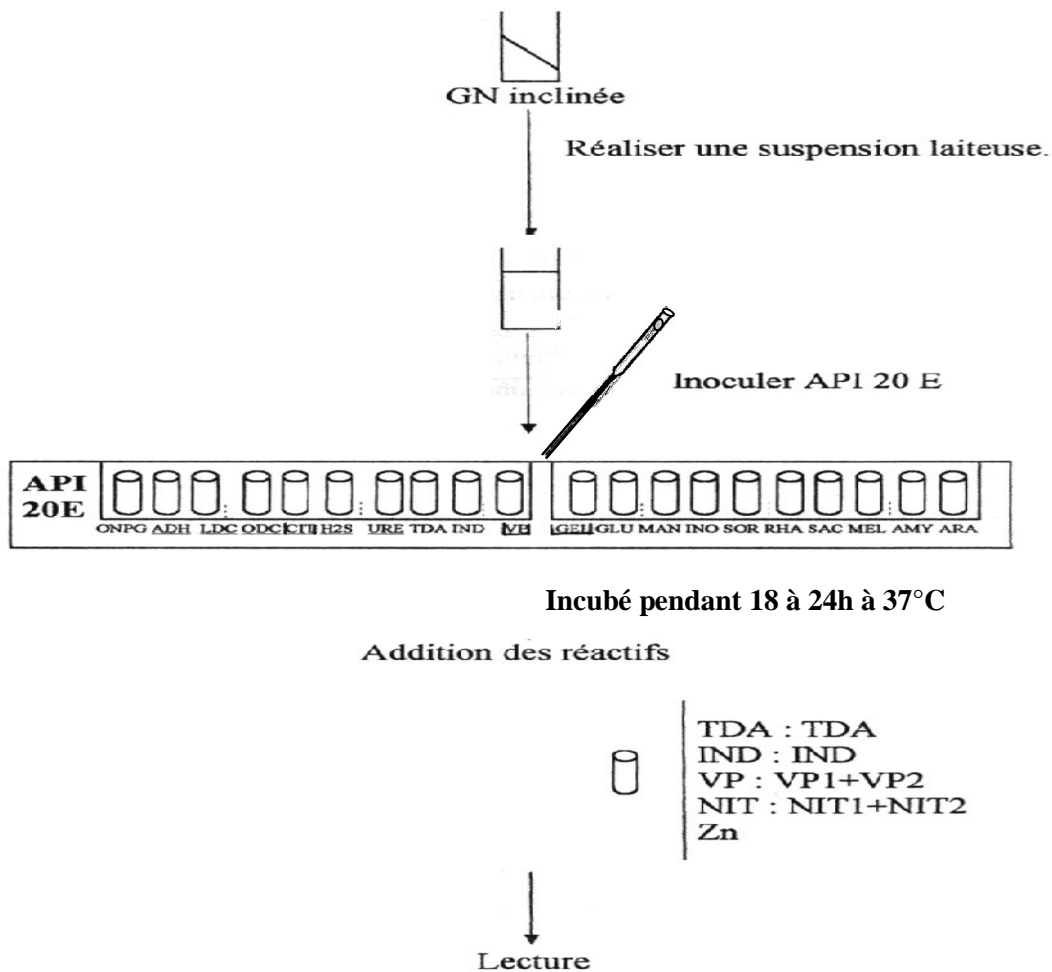


Fig.13. Mode opératoire de la galerie API 20E (Bendjama, 2007)

III.7.4.3. Préparation de l'inoculum : (voir partie annexe)

III.7.4.4. Inoculation de la galerie : (voir partie annexe)

III.7.4.5. Lecture: La lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture (voir partie annexe).

III.7.4.6. Interprétation :

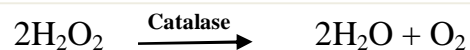
- Détermination du profil numérique : sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque

III.7.5.2. Résultat :

- Oxydase+ : coloration violette qui persiste pendant 15 minutes
- Oxydase- : La coloration n'est pas modifier dans le cas contraire. (Delarras, 2007)

III.7.6. Test de catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage, selon la réaction suivante :



La recherche de cette enzyme permet de différencier les staphylocoques qui sont catalase positive. (Delarras, 2007)

III.7.6.1. Technique:

- ✓ Prendre un tube à hémolyse contenant 1 ml d'eau physiologique stérile :
- ✓ Emulsionner une quantité suffisante d'une culture bactérienne de 24 heures prélevée sur milieu gélosé, afin d'obtenir une suspension épaisse.
- ✓ Ajouter 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 3% sans agiter. Attendre 1 à 2 minutes avant d'observer.

III.7.6.2. Résultat : Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase : test catalase positive. (Delarras, 2007)

III.7.7. Test de staphylocoagulase :

Parmi les cocci à Gram positif et qui sont catalase positive, les souches des *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma en 24 heures. (Delarras, 2007)

III.7.7.1. Technique:

- ✓ Mélanger dans un tube à hémolyse stérile 0.5 ml de plasma de lapin et 0.5 ml de la culture en bouillon de la souche à étudier.
- ✓ Incuber et mélanger à l'étuve à 37 °C pendant 24 h. (Delarras, 2007)

III.7.7.2. Lecture :

Les observations du test staphylocoagulase sont données dans le tableau suivant :

Tab.4. Test de la staphylocoagulase. (Delarras, 2007)

Observations	Test staphylocoagulase	Staphylocoques
Coagulation du plasma avec prise de masse totale, après ½ heure et moins de 24 heures d'incubation.	Coagulase +	<i>Staphylococcus aureus</i> en général.
Pas de coagulation.	Coagulase -	Autres espèces de staphylocoques.

III.8. Activité antibactérienne *in vitro*:

L'antibiogramme apprécie la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence d'antibiotique.

La méthode utilisée est celle de la diffusion en milieu gélosé. Cette méthode simple permet la détermination de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques à tester (**Fiche technique antibiogramme pasteur, 1995**).

III.8.1. Milieu utilisé

Le milieu utilisé est la gélose Muller Hinton (MH) coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.

III.8.2. Inoculum:

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ✓ Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum. (**Rahal, 2005**).

III.8.3. Ensemencement :

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. (**Rahal, 2005**).

III.8.4. Application des disques d'antibiotiques :

- ✓ Nous avons utilisé un distributeur de disque correspondants à raison de 6 disques d'antibiotique par boîte de Pétri. La liste des antibiotiques utilisés est mentionnée dans la partie annexe.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures. (**Rahal, 2005**)

Lecture :

Après la durée de l'incubation, mesurer le diamètre de la zone d'inhibition avec précision à l'aide d'un pied à coulisse métallique, puis faire correspondre les diamètres mesurés avec la fiche technique de l'antibiogramme. (**Fiche technique antibiogramme pasteur ,1995**)

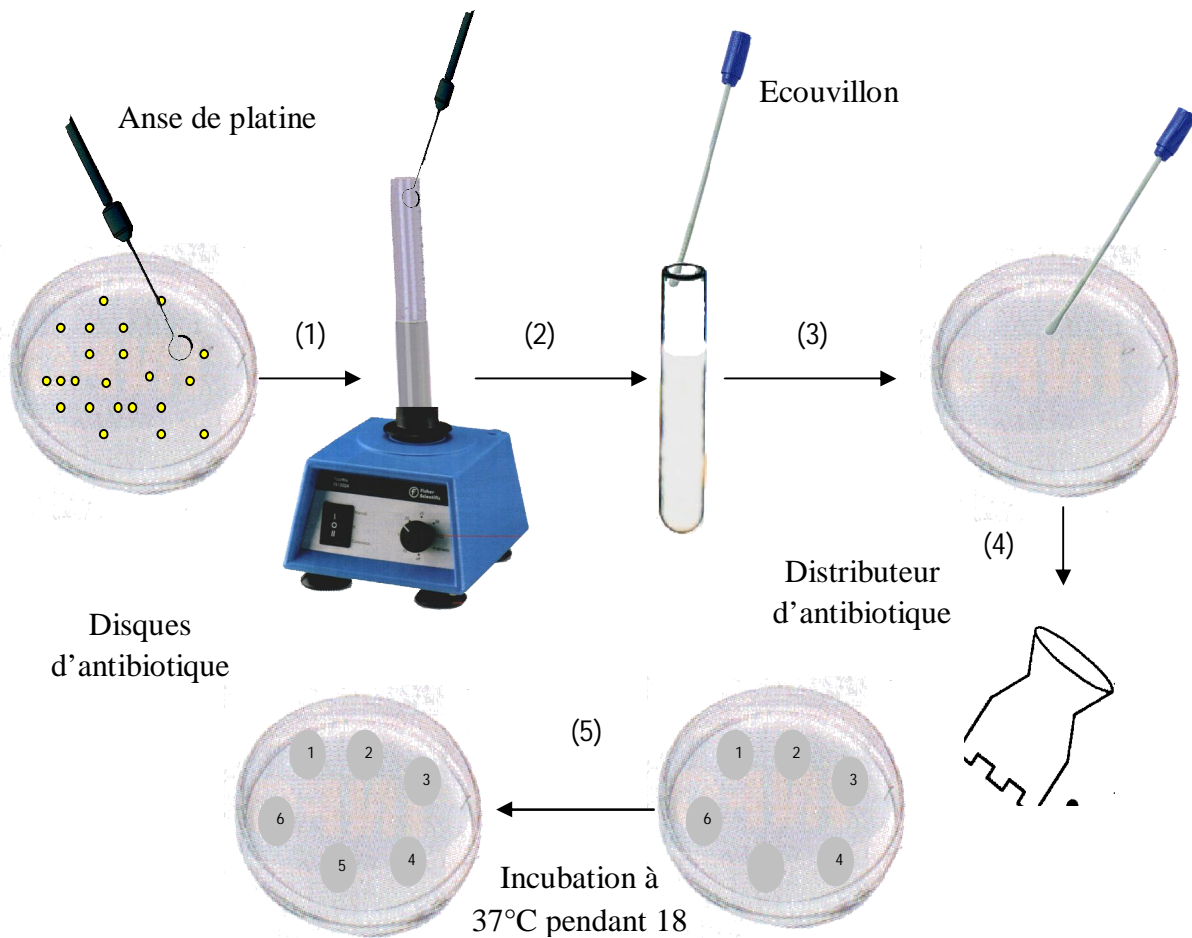


Fig.15. Technique de l'Antibiogramme. (Bendjama, 2007)

III.9. Isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus*:

- Vu que *Bdellovibrio bacteriovorus* est une bactérie viable non cultivable, son isolement est très délicat et s'effectue en milieu liquide et solide.

III.9.1. Milieu liquide :

La culture en milieu liquide passe par 3 étapes :

- 1- La filtration de l'échantillon à analyser par des membranes filtrantes de $0.45\mu\text{m}$; on a filtré l'eau prélevée de 4 points différents de l'entrée de la station d'épuration.
- 2- Choisir une espèce des entérobactéries préalablement isolée et identifiée ; puis à partir d'une culture inoculer cinq tubes du bouillon nutritif où le premier est considéré comme témoin alors qu'on ajoute 0.5ml de l'eau filtrée de chaque prélèvements aux autres tubes . Le tout est incubé à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 72 heures.

3-Bdellovibrio bacteriovorus provoque la lyse de la bactérie choisie et diminue le nombre des cellules bactériennes, donc durant l'incubation on a estimé le nombre des cellules par deux techniques :

- L'estimation directe (turbidimétrie) : en lisant la densité optique de la suspension bactérienne à 546nm. (Halassi, 2009)
- L'estimation indirecte en calculant l'indice NPP après inoculation dans le bouillon BCPL avec cloche de Durham à simple concentration. (Boukroune , 2008).

III.9.2.Milieu solide:

Pour isoler cette bactérie prédatrice on a utilisé la technique de la double couche du milieu YP (Yeast Peptone) décrite par Stolp et Starr (1963) (Halassi, 2009). Nous avons préparé le milieu au laboratoire et sa composition est citée dans la partie annexe.

La gélose Muller Hinton est également utilisée en deuxième temps pour l'isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus*.

- On a suivi les étapes suivantes pour l'isolement selon la technique de la double couche sur milieu YP :

- 1-ensemencer dans un tube de bouillon nutritif le même germe choisi en milieu liquide et incubé à 37 °C pendant 12 heures.
- 2- Dans une boîte de Pétri, couler la couche inférieure molle, laisser refroidir à 45 °C.
- 3- Étaler 0.5 ml de la suspension bactérienne, bien homogénéiser l'eau de l'échantillon et avec une pipette stérile déposer quelques gouttes.

4- Après 15min de dépôt, couler la couche supérieure du milieu, laisser solidifier et incubé à 37 °C pendant plusieurs jours et durant l'incubation procéder à déterminer le diamètre des plages de lyses. On a refait cette expérience trois fois.

- Les étapes d'isolement sur milieu Muller Hinton sont :
- 1-ensemencer dans un tube de bouillon nutritif le même germe choisi en milieu liquide et incubé à 37°C pendant 12 heures.
 - 2- Sur une boîte de Pétri contenant la gélose Muller Hinton, étaler 1 ml de la suspension bactérienne.
 - 3- Incuber pendant 4h à 37°C.
 - 4- Ajouter 10 gouttes de l'échantillon homogénéisé, étaler et placer le tout à l'incubation pendant 24h à 37°C. On a refait cette expérience trois fois. (Boukroune, 2008)

Remarque: les plages de lyse rapidement formés après 24 heures sont dues aux bactériophages alors que celles de *Bdellovibrio* deviennent visibles après 3 à 6 jours d'incubation, elles s'apparaissent comme de petits points au début et s'agrandissent pendant l'incubation continue (**Jurkevitch, 2006**).

III.10. La purification de *Bdellovibrio bacteriovorus* :

- Prélever une plage de lyse avec une lame bistouri stérile, la mettre en suspension dans un tube de bouillon nutritif.
- Filtrer la suspension sur membrane filtrante de $0.45\mu\text{m}$ et ensemercer une autre fois selon la technique de la double couche. Stolp et Starr estiment qu'après trois cultures successives, les *Bdellovibrio* obtenues peuvent être considérées comme descendantes d'une même cellule (clone). (**Halassi, 2009**)

À noter que les ensemencements ultérieurs de *Bdellovibrio* sont réalisés avec la même bactérie hôte initialement additionnée durant l'étape d'isolement.

I. Analyse physicochimique :

Les résultats de l'analyse physicochimique des eaux usées de la station d'épuration de Khenchela sont regroupés dans le tableau suivant :

Tab.5. Résultats des analyses physicochimiques.

Paramètre	Température	pH	Conductivité	Turbidité	MES	NO ₃	DBO5
Point de prélèvement	°C		µs/cm	NTU	mg/l	mg/l	mg/l
Entrée des eaux usées	20.4	7.31	1093	98.92	125	1.1	140
Sortie des eaux usées	19.9	7.19	1064	38.83	8	0.4	4

I.1. Température :

La température est un facteur écologique très important qui a une grande influence sur les propriétés physico-chimiques des écosystèmes aquatiques. (**Ramade, 1993**). Pour les eaux usées la température a tendance à augmenter avec les saisons, ainsi que la situation de la station d'épuration (le contact avec l'air) peut influencer ce paramètre avec un certain pourcentage. (**Gaujous, 1995**)

La température est une mesure momentanée, en fonction de l'heure et du lieu de prélèvement. (**Rodier, 2009**). Les mesures ont été réalisées au mois de juin entre 9h et 10h.

Les valeurs de la température sont proches dans les deux points de prélèvements permettant la prolifération intense des microorganismes et l'activité microbienne c'est-à-dire le traitement biologique et l'autoépuration.

La température des eaux de la sortie a une valeur inférieure à 30°C qui est la valeur limite des rejets des eaux usées traitées destinées à l'irrigation des cultures. (**Eaux usées : Normes de rejet, 2001**)

I.2. Le pH :

Le pH est un facteur important qui influence directement la prolifération des microorganismes dans l'eau et qui conditionne un grand nombre d'équilibre physicochimique ; sa

mesure traduit la balance entre acide et base et doit être compris entre 5 et 9 pour permettre leur développement normal. Le pH dépend de facteurs multiples, dont l'origine de l'eau, la température et les apports des rejets des agglomérations, des industries et de l'agriculture. (Simmons, 1970 ; Leclerc, 1983)

Les pH des deux prélèvements sont compris entre 7.19 et 7.31 et se situent donc dans la limite tolérable (5 à 9) pour la plupart des espèces microbiennes et favorise leur multiplication comme ils indiquent une faible pollution. Au regard de ce constat, l'ensemble des deux valeurs obtenues pour le pH est acceptable, ainsi qu'il indique une pollution modérée.

Tab.6. Qualité des eaux usées en fonction du pH. (Eaux usées : Normes de rejet, 2001).

Classe	Pollution nulle ou faible	Pollution modérée	Mauvaise qualité
pH	6,5 à 8,5	6 à 6,5 et 8,5 à 9	< 6 et > 9

I.3. La conductivité électrique:

Elle est proportionnelle à la quantité de sels minéraux dissous dans l'eau donc la mesure de la conductivité électrique constitue un bon indicateur d'appréciation des concentrations des matières en solution dans l'eau. (Rodier, 1996).

Une conductivité électrique élevée est un signe de pollution du cours d'eau et traduit soit des pH anormaux, soit une salinité élevée ou une température élevée car la mobilité des ions augmente avec elle. (Halassi, 2009)

D'après Rodier 1996 on constate que la conductivité électrique dans les deux prélèvements est plus ou moins élevée et exprime une minéralisation élevée en raison de l'évaporation de l'eau et donc de la température. Ces résultats expriment une pollution modérée (< 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Tab. 7. Qualité des eaux usées en fonction de la conductivité électrique (Eaux usées : Normes de rejet, 2001).

Classe	Pollution nulle ou faible	Pollution modérée	Mauvaise qualité
Conductivité	< 750 $\mu\text{S}/\text{cm}$	< 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$	> 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$

I.4. Turbidité :

La turbidité est liée à la présence de particules organiques diverses, d'argile, de colloïdes de plancton, etc. Certaines conditions météorologiques peuvent modifier la turbidité de l'eau, comme les hautes chaleurs en été et la pluviométrie. (Rodier, 2009)

La turbidité des eaux de l'entrée est élevée qui est expliquée par la charge de l'eau en particules solides et colloïdes et reflète une pollution excessive. Alors que les eaux de la sortie ont une turbidité moins élevée traduite par l'élimination des particules surtout après le prétraitement.

I.5. Matières en suspension MES :

Les matières en suspension (MES) représentent l'ensemble des particules organiques ou minérales véhiculées par les eaux. Elles peuvent être composées de particules de sable, de terre et de sédiments arrachés par l'érosion, de divers débris apportés par les eaux usées ou les eaux pluviales très riches en matières en suspension, ou d'êtres vivants planctoniques. Elles peuvent modifier la turbidité de l'eau. (Khelif, 2009)

La concentration des matières en suspension dans les eaux de l'entrée est relativement élevée due à la charge en matières organiques et minérales engendrée par l'effluent et exprime une pollution modérée (< 150 mg/l). (Eaux usées : Normes de rejet, 2001)

A la sortie des eaux, cette concentration montre une baisse remarquable suite à l'élimination de ces matières par le traitement. La concentration est inférieure à 50mg/l la valeur limite des rejets des eaux usées traitées. (Eaux usées : Normes de rejet, 2001)

Tab.8. Qualité des eaux usées en fonction des matières en suspension (Eaux usées : Normes de rejet.2001).

Classe	Pollution nulle ou faible	Pollution modérée	Mauvaise qualité
MES	< 25 mg/l	< 150 mg/l	> 150 mg/l

I.6. Eléments indicateurs de pollution urbaine : Nitrates et DBO₅

Les eaux usées proviennent essentiellement des activités (humaines) domestiques de tous les jours. L'analyse la plus fréquente des éléments indicateurs de pollution urbaine comprend les mesures de la DBO₅ ainsi que les éléments azotés comme les nitrates NO₃⁻. (Derradji et al., 2007) Afin d'apprécier la qualité des eaux, nous allons référer à la grille de la qualité globale des eaux usées.

Tab.9. Grille de la qualité globale des eaux usées. (Eaux usées : Normes de rejet, 2001).

Classe de qualité	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Médiocre	Pollution excessive
DBO ₅	mg/l	<3	3-5	5-10	10-25	>25
NO ₃	mg/l	<5	5-25	25-50	50-80	>80

I.6.1. Nitrates (NO₃⁻):

Les nitrates sont en effet l'élément chimique majeur qui conditionne la vie des microorganismes dans un écosystème aquatique. Ils représentent la forme la plus oxygénée et la très soluble de l'azote. Les bactéries ont toujours besoin de source azotée pour synthétiser leurs protéines. Sa présence dans l'eau est liée à l'utilisation des engrais chimiques, les excréments des animaux et les matières azotées dans les protéines végétales et animales. **(Faurie, 2003)**

Les nitrates dans les eaux de l'entrée sont en faible concentration qui dépend de la saison, les précipitations et les cultures agricoles. On peut interpréter la concentration très faible des nitrates dans les eaux de la sortie par leur utilisation par les bactéries lors de traitement biologique. Les eaux traitées sont donc d'une excellente qualité et qui ne forme aucune nuisance sur le milieu récepteur.

I.6.2. Demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

L'effet principal d'un rejet de matière organique biodégradable dans le milieu naturel est la consommation d'oxygène qui en résulte. L'oxygène est un élément fondamental du maintien et du développement de la flore et de la faune présentes dans le milieu naturel, la détermination de la DBO₅ est donc pour but d'évaluer cette nuisance. **(Rejsek, 2002)**

Les eaux de l'entrée ont une DBO₅ élevée par le fait de la charge importante de la matière organique dans l'effluent.

Les eaux de la sortie présente un taux moins élevé de DBO₅ résultant de la consommation d'O₂ par les microorganismes pour dégrader la matière organique dans l'eau lors du traitement biologique. Ce taux est inférieur à 40mg/l la valeur limite des rejets des eaux usées traitées. **(Eaux usées : Normes de rejet, 2001)**

II. Analyse bactériologique :

II.1. Dénombrement :

II.1.1. Germes totaux (FTAM) :

Lors du dénombrement des germes totaux à 37°C et à 22°C, la majorité des boîtes présentent un nombre très élevé de germes qui ont proliférés en nappes ce qui avait imposé une difficulté dans le dénombrement.

Tab.10. Résultats des germes totaux.

Prélèvement	Germes totaux à 22°C/ml	Germes totaux à 37°C/ml
Eaux de l'entrée	9.92×10^{17}	5.81×10^{17}
Eaux de la sortie	8.22×10^{17}	3.70×10^{17}

Le nombre de germes totaux dans les eaux de l'entrée est très élevé qui est expliqué par la charge immense en microorganismes dans l'effluent et par l'effet de la température sur la croissance de ces microorganismes.

La diminution de la concentration de ces germes dans les eaux traitées de sortie est due au traitement malgré cette diminution n'est pas importante.

On remarque aussi que le nombre est très élevé dans les boîtes incubées à 22°C qu'à 37°C qu'on réfère à la contamination des microorganismes du laboratoire.

II.1.2. Coliformes totaux et fécaux :

La présence de bactéries coliformes dans un milieu signifie forcément une contamination fécale. (Delarras, 2003).

Les résultats concernant la recherche et le dénombrement des coliformes totaux sont résumés dans le tableau suivant :

Tab. 11. Résultats des NPP pour les coliformes totaux.

Prélèvement	Coliformes totaux/100ml
Eaux de l'entrée	140×10^5
Eaux de la sortie	15×10^5

Les résultats mentionnés dans ce tableau montrent une grande concentration de coliformes totaux dans les eaux usées de l'entrée ce qui signifie une dense contamination des eaux et l'influence de la température.

Cette concentration est remarquablement diminuée dans les eaux traitées de sortie sous l'effet de traitement biologique et des clarificateurs.

Le tableau suivant regroupe les résultats des coliformes fécaux :

Tab.12. Résultats des NPP pour les coliformes fécaux.

Prélèvement	Coliformes fécaux/100ml
Eaux de l'entrée	30×10^5
Eaux de la sortie	2×10^5

Les mêmes constatations pour les coliformes fécaux ce qui prouve une contamination fécale, à noter que leur nombre a réduit dans les eaux traitées de sortie par le fait du traitement.

II.1.3. Streptocoques D :

Le nombre des streptocoques D dans l'eau est lié à la concentration de la matière fécale dans cette eau. Ces bactéries sont très sensibles aux variations physicochimique du milieu et indique souvent une contamination récente de ce milieu. (Joffin, 1999)

Les résultats de leur recherche sont exprimés dans le tableau ci-dessous :

Tab.13. Résultats des NPP pour les Streptocoques D.

Prélèvement	Streptocoques D/100ml
Eaux de l'entrée	90×10^3
Eaux de la sortie	3×10^3

Le nombre des streptocoques D est assez élevé dans les eaux de l'entrée et cela due à la température qui est le seul facteur influençant leur développement.

Pour les eaux de la sortie, le nombre a diminué sous l'effet du traitement.

Le rapport coliformes fécaux/ streptocoques fécaux :

L'estimation du rapport coliformes fécaux/streptocoques fécaux (CF/SF) est considéré comme un indicateur de contamination par les bactéries fécales humaines ou animales.

- Source de contamination selon le ratio CF/SF:

Tab.14. Ratio CF/SF et source de contamination. (Halassi, 2009).

Ratio CF/SF	Source de Contamination
$R < 0.7$	Principalement ou entièrement d'origine animale
$0.7 < R < 1$	Mixte à prédominance animale
$1 < R < 2$	Origine incertaine
$2 < R < 4$	Mixte à prédominance humaine
$R > 4$	Source exclusivement humaine

Après avoir calculé les ratios CF/SF de nos prélèvements, nous avons obtenues les résultats suivants :

- Eaux de l'entrée : $CF/SF = \underline{33.33}$
- Eaux de la sortie : $CF/SF = \underline{66.66}$

On conclue de ces résultats que la source de contamination est exclusivement humaine.

II.1.4. Les anaérobies sulfito-réducteurs :

Pour cet examen on a obtenue un résultat négatif dans les tubes incubés des deux prélèvements qui signifie l'absence de ces germes dans nos échantillons. Dans ce cas les eaux de la sortie peuvent être utilisées pour l'irrigation des cultures agricoles, donc un bon recyclage de ces eaux.

II.2. Isolement et identification des souches bactériennes :

II.2.1. Résultats des caractères morphologiques et coloration de Gram :

La purification des colonies par leur repiquage successif nous permet de distinguer de différents caractères de toutes les colonies sur leurs milieux d'isolement. Les résultats de l'isolement sont résumés dans le tableau suivant :

Tab.15. Résultats de l'aspect macroscopique et microscopique des colonies.

Culture	Observation macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies
Gélose nutritive (GN)	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes colonies circulaires, lisse, bombée, brillante, crème, 2mm de diamètre. • Petites colonies, circulaires, lisses, plate, brillante 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilles isolés Gram négatif.
Mac Conkey	<ul style="list-style-type: none"> • Petites colonies, élevée, lisse, brillante, circulaire, 1mm à 2 mm de diamètre, rose, lactose positif. • Petites colonies, circulaires, élevées, incolores et beiges, lactose négatif. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilles isolés, Gram négatif. • Bacilles isolés, Gram négatif
Hektoène	<ul style="list-style-type: none"> • Colonies circulaires a contours régulier, plates, soit pigmentées en: <ul style="list-style-type: none"> ➤ vert avec odeur du jasmin germes lactose négatif. ➤ jaunes, lactose positif de 2mm de diamètre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bacilles isolés, Gram négatif. • Bacilles isolés, Gram négatif.
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> • Petite, lisse, bombée, à contour régulier, de couleur blanche. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cocci groupés en grappe de raisin, Gram positif.

On constate du point de vue cytologique une grande part de bâtonnet Gram négatif alors que les cocci Gram positif sont faiblement représentés. Le taux de croissances des colonies est presque nul dans les cultures des eaux de la sortie en comparaison de celle des eaux de l'entrée.

II.2.2. Résultats des tests de confirmation :

II.2.2.1. Staphylocoques :

Les deux tests suivant sont appliqués sur les colonies blanches sur Chapman.

➤ **Test de catalase :**

- Le résultat est positif, catalase positive.

➤ **Test de staphylocoagulase :**

- Le test donne un résultat négatif, staphylocoagulase négative.

Ces deux tests donnent comme résultat final que l'espèce bactérienne des colonies blanches sur Chapman n'est pas *Staphylococcus aureus* mais il s'agit de *Staphylococcus epidermidis*.

II.2.2.2. Pseudomonas:

Les tests suivants sont appliqués sur les colonies vertes avec odeur de jasmin sur Hektoen.

➤ **Etats frais :**

- L'observation sous microscope optique montre des cellules de forme bacillaire (bâtonnet) et mobiles.

➤ **Test oxydase :**

- Le test est positif, oxydase positive.

De ces résultats le germe susceptible peut être *Pseudomonas aeruginosa* ce qui nous amène à l'étape de l'identification biochimique pour une confirmation exacte.

II.2.3. Résultats d'identification biochimique :

Ce type d'identification a été appliqué sur les germes isolés sur MacConkey et sur Hektoen. L'identification biochimique a permis de détecter la présence des bactéries suivantes:

- *E. coli*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pantoea spp*
- *Pseudomonas aeruginosa*.

Les photos suivantes représentent respectivement les résultats de l'identification biochimique des souches bactériennes (*E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea spp* et *Pseudomonas aeruginosa*) par l'API 20E.



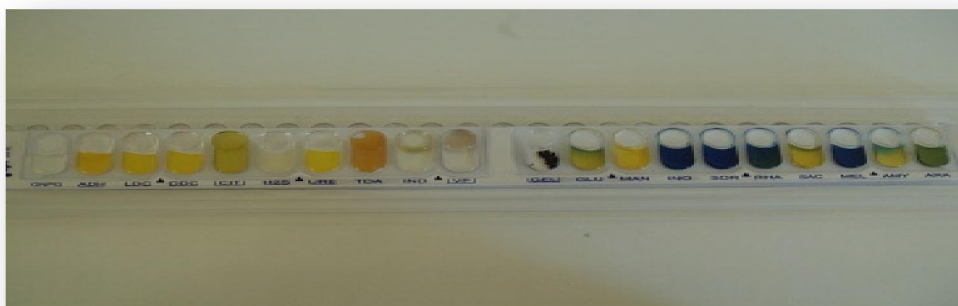
A. E. coli



B. Aeromonas hydrophila



C. Klebsiella pneumoniae



D. Pantoea spp 1



E. Pseudomonas aeruginosa

Fig.16. Résultats de l'identification biochimique par API 20E

II.3. Interprétation de l'antibiogramme :

On a contrôlé l'activité antibactérienne *in vitro* de trois souches isolées et identifiées (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*). Les résultats obtenus sont motionnés dans les tableaux 16, 17 et 18 :

Tab.16. Résultats de l'antibiogramme d'*E. coli*.

Antibiotique	Diamètre d'inhibition	Résultat
FOS	32	S
AN	33	S
FEP	38	S
ISP	32	S
CIP	42	S
SXT	28	S
C	30	S
CS	26	S
CF	25	S
AM	0	R
IPM	22	S
CTX	33	S
AMC	0	R
FOX	0	R
TIC	36	S

Tab.17. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*.

Antibiotique	Diamètre d'inhibition	Résultat
FOX	32	S
RA	30	S
P	42	S
TE	28	S
FOS	32	S
OX1	23	S
FA	36	S
C	29	S
CIP	26	S
E	30	S
L	32	S
ISP	28	S

Ta
b.1
8.
Rés
ult
ats

de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Diamètre d'inhibition	Résultat
CS	22	S
CIP	36	S
ISP	26	S
AN	26	S
FOS	35	S
TIC	27	S
PIP	25	S
IPM	24	S
FEP	26	S
CAZ	28	S
CFS	28	S
TZP	30	S

S : sensible **R** : résistante

Les noms complets de tous les antibiotiques utilisés sont mentionnés dans la partie annexe.

✓ **Bactéries Gram négatif:**

Résistantes à : Pénicilline G et Glycopeptides

Sensibles : Colistine sauf *Proteus* et *Serratia*. (Caillon, 2005)

✓ **Bactéries Gram positif :**

Sensibles à : Vancomycine, Teicoplanine.

Résistantes à : l'Acide nalidixique Colistine résistance naturelle. (Caillon, 2005)

1. Les résultats de l'antibiogramme d'*E. coli* indiquent qu'elle est sensible à plusieurs antibiotiques utilisés avec différents diamètre d'inhibition. La souche présente une résistance naturelle à l'ampicilline (AM) et l'ampicilline-acide clavulanique et à la céfoxitine (FOX).
2. Selon Caillon ,2005 *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à : la bactrim, le negram, la pénicilline G(P) et A, l'augmentin, la céfotaxime (CTX) et la ceftriaxone. Alors qu'elle est sensible à : la ticarcilline, l'imipénème (IPM), la pipéracilline (PIP) et la céftazidine (CFS). Les résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* confirme sa sensibilité à l'imipénème, la pipéracilline et à la céftazidine. Ainsi les différents diamètres d'inhibition des autres antibiotiques utilisés indiquent la sensibilité de cette souche.
3. La souche *Staphylococcus epidermidis* présente une sensibilité totale à tous les antibiotiques appliqués. Les diamètres ont de différentes valeurs.
 - On peut conclure qu'aucune souche des souches étudiées présente une résistance acquise et qu'elles sont toutes des souches sensibles.

II.4.Résultats de l'isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus* :

On a choisi *E. coli* comme proie pour l'isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus* sur milieu liquide et solide.

II.4.1.Résultats en milieu liquide :

II.4.1.1.Résultats de la lecture de la densité optique :

Les résultats obtenus concernant la lecture de la densité optique à 546nm de chaque suspension bactérienne d'*Escherichia coli* sont exprimés dans le tableau suivant :

Tab.19. Résultats des variations de l'absorbance des suspensions bactériennes d'*Escherichia coli* additionnées à 0.5ml d'eau filtrée de chaque prélèvement.

Cultures	Témoin	Prélèvement1	Prélèvement2	Prélèvement3	Prélèvement4
Temps (heures)					
24	2.125	1.910	1.065	2.278	2.102
48	2.273	2.341	1.210	2.454	2.143
72	>2.5	>2.5	2.396	>2.5	2.230

On a pu constater une augmentation hautement significative dans tous les prélèvements durant toute la durée d'incubation. L'étude comparative de ces résultats nous permis de conclure l'absence de l'agent auto-épurateur dans les quatre prélèvements (une densité optique élevée = pas de cellules mortes).



Fig.17. Résultats des suspensions bactériennes avec de l'eau filtrée des différents prélèvements.

II.4.1.2. Résultats de la lecture de NPP :

L'évaluation du pouvoir bactéricide des eaux usées de la station d'épuration de Khenchela se fait aussi par estimation du nombre probable des cellules viables appartenant au groupe des coliformes existant dans les échantillons des eaux de l'entrée. Les résultats sont exprimés dans ce tableau :

Tab.20. Variations du nombre des cellules viables dans les suspensions bactériennes (*Escherichia coli*) additionnées chacune à 0.5ml des eaux filtrées de chaque prélèvement.

Cultures	Témoin	Prélèvement1	Prélèvement2	Prélèvement3	Prélèvement4
Temps (heures)					
24	140×10^3	110×10^3	110×10^3	30×10^3	110×10^3
48	140×10^3	140×10^3	140×10^3	45×10^3	140×10^3
72	140×10^3	140×10^3	140×10^3	140×10^3	140×10^3

L'addition de l'eau des prélèvements n'a pas provoqué une diminution du nombre en cellules viables des coliformes dans toutes les cultures en tube qui ont presque le même nombre de cellules viables.

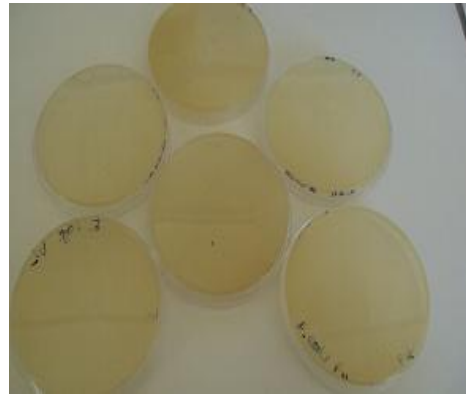
- Les résultats de la mesure de la densité optique et du dénombrement ont pour signification : absence de l'agent auto-épurateur (*Bdellovibrio bacteriovorus*) dans nos prélèvements.

II.4.2. Résultats en milieu solide :

Les cultures des quatre prélèvements précédents incubées pendant plusieurs jours démontrent l'absence de plaque de lyse du germe recherché. Des plages de lyse est formées après 24h d'incubation dans l'une des cultures et qui ont cessé de croître après les 24 h, donc leur origine est un bactériophage.

Les résultats de l'isolement sur milieu liquide et solide démontrent que *Bdellovibrio bacteriovorus* n'était pas isolée des eaux usées de la station d'épuration de Khenchela. Ce qu'on peut expliquer par :

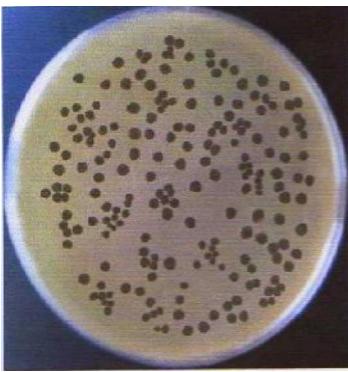
- des fautes de manipulation lors de l'isolement, ainsi la qualité des milieux de culture utilisés.
- les conditions physicochimiques influençant son développement dans les échantillons et surtout les détergents qui causent la mort de cette bactérie vue que les eaux usées sont un mélange de métaux lourds, de détergents et d'éléments chimiques toxiques pouvant inhibant sa croissance.(Jurkevitch, 2006)



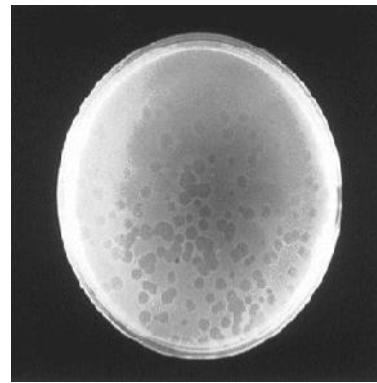
A. Plages de lyse formées par des bactériophages

B. Absence de plages de lyse.

Fig.18. Résultats l'isolement de *Bdellovibrio bacteriovorus* sur milieu solide.



A



B

Fig.19. Plages de lyse de *Bdellovibrio bacteriovorus* sur un tapis de:

(A) *E. coli*. (Halassi, 2009)

(B) *Pseudomonas corrugata*. (Jurkevitch, 2006).

Conclusion :

Au cours de l'étude réalisée sur les eaux usées prélevées de l'entrée et de la sortie de la station d'épuration de la wilaya de Khenchela durant la période de juin-juillet, dont le but est d'isoler une bactérie prédatrice *Bdellovibrio bacteriovorus*, ainsi qu'effectuer une analyse physicochimique et bactériologique on conclue ce qui suit :

➤ Au terme de l'évaluation de degré de pollution physicochimique, on peut constater que la température et le pH des eaux de l'entrée et de la sortie n'étaient pas très élevés mais permettent la croissance des microorganismes, aussi que la mesure des autres paramètres (matières en suspension, nitrates, conductivité, turbidité et DBO₅) des eaux de la sortie, situe ces eaux dans la tranche de pollution modérée, alors que les mesures des eaux de l'entrée ont été plus élevées indiquant la pollution excessive qui n'a pas subit aucun traitement. Il faut signaler que les résultats de tous ces paramètres étaient dans les limites des normes.

➤ Au terme de l'évaluation de contamination bactériologique :

-Le dénombrement des germes totaux exprime une forte charge bactérienne dans les eaux de l'entrée et de la sortie avec des pourcentages différents. Les eaux de la sortie contenant moins de germes totaux que celles de l'entrée qui est le résultat du traitement de ces eaux.

-Les coliformes totaux et fécaux étaient présents en très grand nombre dans les deux points de prélèvement avec des taux égaux, alors que les streptocoques fécaux étaient assez présents, le ratio de ces deux paramètres indique une contamination fécale des eaux d'origine humaine.

- Les résultats de l'analyse physicochimique et bactériologique expriment un taux élevé de pollution physicochimique et microbienne dans les eaux de la station d'épuration.

-La recherche et l'isolement des bactéries à Gram négatif et à Gram positif dans les deux points de prélèvements montrent une présence des Gram négatif plus que des Gram positif.

-L'étude de l'activité antimicrobienne *in vitro* montre une sensibilité des trois germes étudiés (*E.coli*, *Staphylococcus epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa*) à la plupart des antibiotiques utilisés avec une résistance naturelle d'*E.coli* à l'ampicilline (AM) et l'ampicilline-acide clavulanique et à la céfoxitine (FOX).

➤ *Bdellovibrio bacteriovorus* n'a pas été isolée des eaux prélevées de différents points de l'entrée ceci peut être expliqué par l'influence des conditions physicochimique.

Enfin, l'édification d'une station d'épuration dans la wilaya de est toujours un bénéfice pour l'environnement et principalement pour les zones humides « Chotts, Sebkhass et Gareats » dont cinq présentent un statut Ramsar et qui font la fierté de la région.

Références bibliographiques

Ademe, 2001. *Les boues d'épuration municipales et leur utilisation en agriculture.* Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie.

ANB Constantine, 2007.

Anonyme ,2008. Planche présentative de la station d'épuration de Khenchela.

Aubert M.et Aubert J, 1969. *Océanographie Médicale.* Gauthier Villars.Paris.

Baumont S., Camard J., Lefranc A., Franconi A, 2004. *Réutilisation des eaux usées : risques sanitaires et faisabilité en Ile de France.* Rapport ORS. 220p.

Barabote RD., Rendulic S., Schuster SC., MH Saïer Jr, 2007. A complete analysis of transport proteins encoded in *Bdellovibrio bacteriovorus* genome, *Genomics*.

Bendjama A., 2007. *Analyse microbiologique de l'eau potable du réseau de distribution et étude de la résistance aux antibiotiques de certaines souches bactériennes (cas de la ville de Annaba).* Mémoire de magister. Université de Annaba. 78-97 p.

BioMérieux, 2009. *Documentation API 20 E /API La galerie de référence et milieux de cultures.* bioMérieux S.A. RCS Lyon. 1-2-3-4- 10-12-18 p.

Boulkroune H., 2008. *Contribution à l'étude biologique du pouvoir auto-épurateur de l'eau : cas du marais d'El-Kennar.* Mémoire due Magister. Université de Jijel. 119p

Bousseboua H., 2005. *Eléments de microbiologie.* 2^{ème} édition, Campus-Club, Algérie. 185 p

Bouziani M., 2006. *L'eau de la pénurie aux maladies.* Edition Ibn-Khaldoune. 247 p.

Brame V, 1986. *Les procédés physico-chimiques d'épuration des eaux usées urbaines.* Série documents techniques A.F.E.E France.125p.

Branger A., Richer M., Rouster S, 2007. *Microbiochimie et alimentation.* Educagri éditions. Dijon.

Brigitte Genin, 2003. *Cours d'eau et indices biologiques.* 36 p.

Caillon Jocelyne, 2007. *Lecture et Interprétation de l'antibiogramme.* Bacteriologie Hôpital de Nantes. 28-45-50p.

Cameson A ., Gould D., 1975. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in seawater. In Gameson. *Edition Discharge of sewage from long sea press.* 219p.

Cover, W.H., Martinez, R.J., and S.C. Rittenberg., 1984. Permeability of the boundary layers of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J and its bdelloplasts to small hydrophobic molecules. *J. Bacteriol.* 157:385–390.

Dabernat H., Avril J.P., Denis.F et Monteil.H., 1992. *Bactériologie Clinique*. EDITION MARKETIN,148p.

Davet Pierre, 1996. *Vie microbienne du sol et production végétal*. INRA, Paris,

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

Delarras C, 2007.*Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. 68-76-128-129-247-339-357p.

Delarras C, 2003. *Surveillance sanitaire et microbiologie des eaux usées*. Tec et Doc.269p.

Denat Anne-Marie et Denat F.Pascal ,2001. *L'épuration de l'eau*. Agence des eaux France, 3-4p.

Derradji F., Bousnoubra H., Kherici N., Caruba R., 2007. Impact de la pollution organique sur la qualité des eaux superficielles dans le Nord-Est algérien. *Sécheresse vol. 18, n° 1*, 2p.

Donze, D., Mayo, J.A., and Diedrich D.L., 1991. Relationships among the bdellovibrios revealed by partial sequences of 16S ribosomal RNA. *Curr. Microbiol.* 23:115–119.

Duchene A, 1990. *L'épandage agricole des boues de station d'épuration d'eaux usées urbaines*. 65p.

Eaux usées : Normes de rejet, 2001. *Direction de l'environnement et des établissements classés*. Normes Sénégalaise, eaux usées Normes de Rejet.

Edeline F, 1997. *L'épuration biologique des eaux. Théorie et technologie*. Edition CEBEDOC, 298p.

El Guamri Y., Belghyti D., 2006. Etude de la qualité physico-chimique des eaux usées brutes de la commune urbaine de Saknia, rejetées dans le lac Fouarat (Kénitra, Maroc). *Journal Africain des Sciences de l'Environnement, Numéro 1*, 57-60.

Faurie C. , Ferra C. , Medor P. , Devaux J et Hemptinnet J., 2003. *Ecologies : approche scientifique et pratique* .TEC et DOC. 407p.

Fiche tehniue antibiogramme pasteur, 1995.

Flint K.P., 1987.The long-term survival of *Escherichia Coli* in river water. *Journal of applied bacteriology* Vol 63, p261-270.

- Fujioka et al ., 1981 Fujioka ., Hashimoto., Siwak EB., Young., 1981.** Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 41, p690-696.
- Gaid A., 1984.** *Épuration biologique des eaux urbaines.* Tome OPU, Alger (1984). 130-137-146-172 p.
- Gamrasni M A, 1984.** *Utilisation énergétique des boues et des déchets ; association Française pour l'étude des eaux.* Centre national de documentation et d'information sur l'eau, etude technique de synthèse, Paris,187p.
- Gaujous D., 1995.** *La pollution des milieux aquatiques : aide mémoire.* Technique et documentation. Lavoisier. Paris, 220p.
- Guillaume C, 2007.** *Ecophysiologie générale des bactéries.* SpectroSciences : article 59
- Guiraud J.P et Rosec J.P ,2004.** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire.* Afnor. 12-30-112p .
- Guiraud J. P., 1998.** *Microbiologie alimentaire.* Dunod. France, 86-94-215.
- Guirkinger, 2006.** *La gestion intégrée des boues urbaines. Les solutions des délégataires de services d'eau et d'assainissement ,*185p.
- Guivarch A, 2001.** *La gestion intégrée des boues urbaines. Les solutions des délégataires de services d'eau et d'assainissement.* (Spde) Syndicat professionnel des entreprises de services d'eau et d'assainissement,156p
- Guy, 2003 Guy A., 2003.** *Les boues d'épuration et leurs perspectives de gestion en Ile de France* .Rapport adopté par le CESR le 04/03/2003,136p
- Hakmi A., (2002).** *Traitement des eaux " analyse de l'eau de source bousfer ORAN,* Mémoire de magister. Université des sciences et de la technologie Oran.71p.
- Halassi I., 2009.** *Degré de contamination du Lac des Oiseaux et contribution à l'étude du pouvoir auto-épurateur de l'eau : Isolement et étude de Bdellovibrio bacteriovorus.* Mémoire du Magister. Université de Guelma. 37p.
- Hellmann J., 2001.** *Species interactions.* Stanford University Encyclopedia of Biodiversity, Volume 5. 2-5p.
- Hespell RB. Miozzari GF and Rittenberg SC., 1975.** Ribonucleic acid destruction and synthesis during intraperiplasmic growth of Bdellovibrio bacteriovorus. *J Bacteriol.*, 123:481-491.

- Joffin C. et Joffin J.N., 1999** .*Microbiologie alimentaire* 5^{ème} édition. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine,125p.
- Joffin J.N., Leyral G., 1988.** *Microbiologie technique*. Tome 1, 278 p.
- Jurkevitch E., 2006.** The Genus *Bdellovibrio*. *Prokaryotes* 7:12–30, 13-17-21-25 p.
- Jurkevitch E., Yair Shemesh.,Yaacov. D., and Koval .S., 2003.** Small eats the big : ecology and biodiversity of BALO and their dynamics in interactions predator-prey, *Agronomy* 23, 433-439 p.
- Kebich M., Benabid C., Adjal., 1999.** *Pollution des eaux superficielles dans un climat semi-aride : La région de Sétif (Algérie)*. Cahiers de sécheresse, vol 10 N°2. , 137-142 p.
- Khelif Safia, 2009.** *Etude de l'effet des effluents urbains sur le sol cultivé en zone semi-aride*. Mémoire de magister. Université de Batna. 41 p.
- Kelley, J.I., and H.N. Williams., 1992.** Bdellovibrios in *Callinectes sapidus*, the blue crab. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1408–1410.
- Koller E., 2004.** *Traitement des pollutions industrielles*. Dunod. 21-87-116-132-166 p.
- Koval SF, Bayer ME., 1997.** Bacterial capsules: no barrier against *Bdellovibrio*. *Microbiol* 143:749-753.
- Ladjel F, 2010.** *Les enjeux de la qualité dans le secteur de l'eau et de l'assainissement en Algérie : Eau usée épuration et valorisation*. 50p.
- Lagasque Marie-Paule., 1999** .*Modélisation de l'autoépuration bactérienne des rivières*.5p.
- Lambert C., Hobley L., Chien-Yi C.,Fenton A., Capeness M., and Sockett Liz .,2009.**A Predatory Patchwork: Membrane and Surface Structures of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Advances in microbial physiology*, Vol. 54 315.
- Lambert C, Evans KJ, Till R, Hobley L, Capeness M, Rendulic S, Schuster SC, Aizawa S.I ., and Sockett RE., 2006.** Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Microbiol* ,60:274-286.
- Lambert C , Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, Eppinger M, Baar C, Christa L, Keller H, Evans KJ., and Goesmann A.,2004.** A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303:689-692.

- Lansing M., Prescott ., John P. Harley., Donald A et Klein ., 2003.** *Microbiologie*. Edition McGraw Hill, 1164p.
- Lebres et Mouffok F., 2008.** *Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson*. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algérie, 53p.
- Leclerc, 1996.** *Microbiologie générale*. Doin. 368p.
- Leclerc H., Izard D., Husson M.O., Watre P et Jakubczake., 1983.** *Microbiologie générale*. Edition Doin. 368p.
- Lightfoot N. F., 2002.** *Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau*. Directives pour l'assurance qualité. 387 p.
- Martin, 1985.** *Bacteriologie des milieux aquatiques*, Tec & Doc. France ,354p
- Mayet J., Permo, 1994.** *La pratique de l'eau*. Le Moniteur, Paris, 2^e édition.
- McCann., Solimeo H.T., Cusick, Jr., Panunti B., and C. McCullen., 1998.** Developmentally regulated protein synthesis during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Can. J. Microbiol.* 44:50–55.
- Menon P., 1993.** *Mortalité des bactéries allochtones rejetées dans les milieux aquatiques*. Thèse en Sciences de la Terre, Paris, 140p.
- Mink F et Stode H ., 1977.** *Les eaux résiduaires industrielles*. Masson 2 édition.10p.
- NCBI Genome Database.**
- Neidhardt F-C., Ingraham J-Let Schaechter M., 1994.** *Physiologie de la cellule bactérienne: Une approche moléculaire (Broché)*. Edition Dunod, 487 p.
- Niewolak S., Koij H. et Chomutowska H., 1996.** Influence of some heavy metals on the survival of heterotrophic bacteria in bottom sediments of eutrophic lake. *Environ. Stud.* 21p.
- OMS.** Organisation mondiale de la santé.
- Pan C.L., HsuY.L., Chang,C.M., and Wang F.J., 1997.** Isolation and identification of *Bdellovibrio* from coastal areas of Taiwan. *Fish. Sci.* 63:52–59.
- Pilet C. et coll., 1987.** *Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne*. Doin. 371p.
- Rahal K., 2005.** *Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Selon les recommandations de l'OMS ;* Alger, ALGÉRIE., p116

- Ramade, 2000** .*Dictionnaire encyclopédique des pollutions*. Edition Science International. Paris , 689p.
- Ramade, 1998**. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau*. Edition Science International. Paris.28p
- Ramade, 1993**. *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. Edition Science Internationale. Paris, 822p.
- Rejsek F., 2002**. *Analyse des eaux*. Tec et Doc. 358p.
- Rodier J et coll., 2009**. *L'analyse de l'eau*.9^{ème} édition. Dunod. Paris.47-50-78-326-721-735-749-754 p.
- Rodier J. et coll., 2005**. *L'analyse de l'eau. Eaux naturelles. Résiduaires. Eau de mer*. 8^{ème} édition. Dunod. Paris, 1383p.
- Rodier J., 1996**. *Analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires*. 8^{ème} édition, Dunod, Paris,1115p.
- Roula S, 2005**. *Caractérisation physicochimique et valorisation des boues résiduaires urbaines pour la confection de substrats de culture en pépinière hors-sol*. Thèse de magister en science agronomique. Université de Batna, 84p
- Ruby E.G., A Balows, H.GTruper, M Dworkin, W Harder and K.H Schleifer., 1991**.The Prokaryotes.The genus Bdellovibrio. *Springer-Verlag. New York, NY*. 3400–3415.
- Schwudke, D., Bernhardt, A., Beck, S., Madela, K., Linscheid, M.W., Appel, B. and Strauch, E., 2005**. Transcriptional activity of the host-interaction locus and a putative pilin gene of Bdellovibrio bacteriovorus in the predatory life cycle. *Curr. Microbiol*, 51, 310–316.
- Schwudke D, Linscheid M, Strauch E, Appel B, Zahringer U, Moll H, Muller M, Brecker L, Gronow S, Linder B., 2003**.The obligate predatory Bdellovibrio bacteriovorus possesses a neutral lipid A containing alpha-D-Mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain B. bacteriovorus HD100 and its host-independent derivative HI100. *J Biol Chem*, 278:27502-27512.
- Schwudke D, Beck S, Strauch E, Appel B and Linscheid M., 2001**. Bdellovibrio bacteriovorus strains produce a novel major outer membrane protein during predacious growth in the periplasm of prey bacteria. *J Bacteriol*, 186:2766-2773.

- Servais P et Billen G., 1990.** *Le contrôle de la qualité bactériologique des eaux de baignade.* Tribune de l'eau, n°543.23-28 p.
- Sigee David C., 2005.** *Freshwater microbiology.* John Wiley & Sons Ltd Edition. 200 p.
- Simmons P. et Meunier R., 1970.** *Microbiologie industrielle et génie biochimique.* Masson et Cie.567p.
- Singleton P., 2005.** *Bactériologie : Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.* 6e édition Dunod, 526p.
- Singlleton P.(1999).** *Bacteriologie. 2eme cycle.*^{4ème} édition Dunod. 222- 319p.
- Socket R. E., and Lambert C., 2004.** *Bdellovibrio as therapeutic agents:a predatory renaissance.* *Nature reviews microbiology.* 2 :670-672.
- Thomazeau R., 1981.** Estimation de nitrification dans une station d'épuration à boues activées. *Ann. Microbio.* N° :3,11-25p.
- Tudor, J.J., and M.A. Karp., 1994.** Translocation of an outer membrane protein into prey cytoplasmic membranes by bdellovibrios. *J. Bacteriol.* 176:948–952.
- Tudor, J.J., McCann, M., and I.A. Acrich., 1990.** A new model for the penetration of prey cells by bdellovibrios. *J. Bacteriol.* 172:2421–2426.
- Vaillant J.R., 1974.** *Perfectionnement et nouveautés pour l'épuration des eaux résiduaires.* Eyrolles, Paris: 21-24, 236-237.
- Valiron F., 1991.** *Manuel d'assainissement spécifique pour les pays à faible revu.* Agence de coopération culturel et technique, Paris, 1130p.
- Varon, M., and M. Shilo. ,1978.** Ecology of aquatic bdellovibrios. Droop, M.R., and H.W. Jannash. *Advances in microbial ecology. Academic Press, London,* 1-48.
- WilkinsonJ., Wyer M., and Kayd D., 1995.** Modelling faecal coliform dynamics in streams and rivers. *Water research* Vol 29, 847-855.

Webographie

Google earth (consulté en 07/2011)

Annexes

A. Milieux utilisés :

Gélose nutritives (GN) : un est milieu de base qui assure la croissance des bactéries ne présentant pas d'exigences particulières. (Delarras, 2003)

✓ **Composition : (Institut Pasteur, 1978)**

• Peptone	5 g
• Extrait de viande	1 g
• Extrait de levure	2 g
• NaCl ou KCl	5g
• Agar	15 à 20 g
• Eau distillée	1000ml

pH = 7.6 à 7.8

Gélose Hecktoène : est un milieu utilisé également pour l'isolement des Entérobactéries pathogènes, il est sélectif par la présence de sels biliaries, de citrate de fer, hyposulfite, fushine et bleu de bromothymol.

1. Les micro-organismes qui fermentent l'un des trois sucres contenus dans le milieu donnent des colonies jaunes à jaune-saumon, les autres des colonies vertes à bleu-vert.

2. Les micro-organismes qui produisent de l'H₂S donnent des colonies à centre noir.

- Les colonies de *Salmonella* sont vertes à bleu-vert avec ou sans centre noir.
- Les colonies de *Shigella* sont vertes à bleu-vert sans centre noir.

3. Les microorganismes qui ne fermentent pas les sucres du milieu donnent des colonies vertes.

L'inhibition des germes Gram (+) est obtenue par un mélange de sels biliaries et de colorants.

(Guiraud, 1998; Documentation Bomerieux milieux de culture, 2007)

✓ **Composition : (Institut Pasteur, 1978)**

• Protéose peptone	12g
• Extrait de levure	3g
• Chlorure de sodium	5g
• Citrate de sodium	10g
• Thiosulfate de sodium	8.5g
• Sels biliaries	9g
• Citrate de fer ammoniacal	1.5g
• Lactose	12g
• Rouge neutre	0.025g
• Vert brillant	0.00033g
• Agar	14g
• Eau distillée	1000ml

pH = 7.5

Gélose viande foie (VF) :

✓ Composition : (Institute Pasteur, 1978)

1. Gélose de base :

- Base viande foie 30g
- Glucose 2g
- Amidon 2g
- Agar 11g
- Eau distillée 1000ml

pH = 7.2

2. Gélose complète :

Même formule que le milieu de base auquel sont ajoutés :

- Sulfite de sodium à 5% 50ml
- Alun de fer ammoniacal à 5% 10ml

Gélose de Chapman: Ce milieu est sélectif pour les bactéries halophiles c'est à dire les staphylocoques ou les microcoques. L'utilisation du mannitol par les bactéries est marquée par une coloration jaune autour des colonies Mannitol + et une coloration rouge autour des colonies Mannitol - du à l'indicateur de pH du rouge de phénol. (Delarras, 2003)

✓ Composition : (Institute Pasteur, 1978)

- Peptone bactériologique 10g
- Extrait de viande de bœuf 1g
- Chlorure de sodium 75g
- Mannitol 10g
- Rouge de phénol 0.025g
- Agar 15g
- Eau distillée 1000ml

pH = 7.4

Gélose de Mac Conkey : est un milieu d'isolement sélectif couramment utilisé pour la détection des bactéries à Gram- (entérobactéries, Pseudomonas, Vibrio...). Les sels biliaires et le cristal violet inhibent les bactéries à Gram+ ; le lactose du milieu peut être fermenté ou non par les bactéries. Ici l'indicateur de pH est le rouge neutre, rose à rouge en milieu acide (colonies lactose+) entourées d'un halo opaque dû à la précipitation des sels biliaires et incolore en milieu basique (colonies lactose-). Dans ce dernier cas, le milieu de culture et les colonies sont incolores ou beiges. Les bactéries lactose-positives donnent des colonies d'une couleur rouge brique ou rose,. Les bactéries lactose-négatives donnent des colonies incolores. (Delarras, 2003 ; Guiraud, 1998)

✓ Composition : (Institute Pasteur, 1978)

- Peptone bactériologique 20g
- Sels biliaire 1.5g
- Chlorure de sodium 5g
- Lactose 10g

- Rouge de neutre 0.03
- Cristal violet 0.001
- Agar 15g

pH = 7.1

Milieu Muller Hinton :

✓ Composition : (Institut Pasteur, 1978)

- Infusion de viande 2g
- Amidon soluble 1,5g
- Hydrolysât acide de caséine 17,5g
- Agar 17g

pH 7,4

Milieu Yeast Peptone (YP) :

✓ Composition : (Stolp et al, 1963)

1. La couche inferieure : pH.7.4

- Extrait de levure 5g
 - Bacto-peptone 5g
 - Agar 12g
 - Eau distillée 1000ml
 - NaoH 2ml
- Autoclavé 15 minutes à 120°C.

2. La couche inferieure : pH7.4

- Extrait de levure 5g
 - Bacto-peptone 5g
 - Gélose 6g
 - Eau distillée 1000ml
 - NaoH 2ml
- Autoclavé 15 minutes à 120°C.

Bouillon lactosé au pourpre de Bromocrésol (BCPL) : pH = 6.7

✓ Composition : (Institut Pasteur, 1978)

1. Milieu simple concentration :

- Peptone 5g
- Extrait de viande 3g
- Lactose 10g
- Cristal violet 0.005g
- Pourpre de Bromocrésol 0.025g
- Eau distillée 1000ml

2. Milieu double concentration :

- Peptone 10g
- Extrait de viande 6g
- Lactose 20g
- Cristal violet 0.010g

- Pourpre de Bromocrésol 0.050g
- Eau distillée 1000ml

Milieu de Schubert : pH=7.6

✓ **Composition : (Institute Pasteur, 1978)**

- Tryptone 0.2g
- Acide glutamique 0.2g
- Sulfate de magnésium 0.7g
- Sulfate d'ammonium 0.4g
- Citrate de sodium 0.5g
- Chlorure de sodium 2g
- Tryptone oxid 10g
- Mannitol 7.5g
- Eau distillée 1000ml
- Tamp phosphate 500ml

Milieu de Rothe : pH = 6.8 à 7

✓ **Composition : (Institute Pasteur, 1978)**

1. Milieu simple concentration :

- Peptone 20g
- Glucose 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Phosphate bipotassique 2.7g
- Phosphate monopotassique 2.7g
- Azohydrate de sodium 0.2g

2. Milieu double concentration :

- Peptone 40g
- Glucose 10g
- Chlorure de sodium 10g
- Phosphate bipotassique 5.4g
- Phosphate monopotassique 5.4g
- Azohydrate de sodium 0.4g

Milieu de Litsky : pH = 6.8 à 7

✓ **Composition : (Institute Pasteur, 1978)**

- Peptone 20g
- Glucose 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Phosphate bipotassique 2.7g
- Phosphate monopotassique 2.7g
- Azohydrate de sodium 0.3g
- Ethyl-violet 0.0005g

B. Réactifs utilisés :

Réactif rouge de méthyle (RM) : (Institut Pasteur, 1978)

- Rouge de méthyle 0.5g
- Alcool à 60° 100ml

Réactif de Vosges Proskauer (VP): pour la recherche de l'acétoïne : (Institut Pasteur, 1978)

VP1:

- Hydroxyde de potassium 40g
- Eau distillée 100ml

VP2:

- Alpha naphthol 6g
- Ethanol 100ml

Réactif de Kowacks : la mise en évidence de la production d'indole : (Institut Pasteur, 1978)

- Paradiméthylaminobenzaldéhyde 5g
- Alcoolamylique 75ml
- HCl pur 25ml

Réactif de TDA : pour la recherche du tryptophane désaminase (Institut Pasteur, 1978)

- Peptone de fer 3,4g
- Eau distillée 100ml.

C. Numération en milieu liquide : Méthode de Mac CRADY (Table de Mac Grady)

3 tubes par dilution	
Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.3
010	0.3
011	0.6
020	0.6
100	0.4
101	0.7
102	1.1
110	0.7
111	1.1
120	1.1
121	1.5
130	1.6
200	0.9
201	1.4

202	2.0
210	1.5
211	2.0
212	3.0
220	2.0
221	3.0
222	3.5
223	4.0
230	3.0
231	3.5
232	4.0
300	2.5
301	4.0
302	6.5
310	4.5
311	7.5
312	11.5
313	16.0
320	9.5
321	15.0
322	20.0
323	30.0
330	25.0
331	45.0
332	110.0
333	140.0

D. Galerie Api20E

1. Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation. **(BioMérieux, 2009)**.

2. Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère (opacité 0,5 sur l'échelle de Mc Ferland) avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé. **(BioMérieux, 2009)**.

3. Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures. **(BioMérieux, 2009)**

Tableau de lecture de l'APi20E

micro tube	SUBSTRAT	REACTIONS/ENZYME	RESULTATS	
			NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	ortho-nitro-phenyl-B-D-galactopyranoside	beta-galactosidase	incolore	jaune
ADH	arginine	arginine dés hydrolase	jaune	rouge / orange
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orange
ODC	ornithine	ornithine décarboxylases	jaune	rouge / orange
[CIT]	sodium citrate	Utilisation de citrate	vert	bleu-vert/ bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	incolore	noir
URE	urée	uréase	jaune	rouge / orange
TDA	tryptophane	tryptophane désaminase	jaune	noir
IND	tryptophane	production d'indole	incolore	rose
[VP]	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<u>VP 1 + VP 2 / 10 (5)</u> incolore rose/rouge	
[GEL]	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	diffusion de pigment noir
GLU	glucose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune/ vert jaune
MAN	mannitol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	sorbitol	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	Jaune
RHA	rhamnose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	Jaune
SAC	sucrose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	melibiose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune

AMY	amygdalin	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	arabinose	fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
NO ₃ -NO ₂	GLU tube	production de NO ₂ reduction N ₂ gas	<i>NIT 1 + NIT 2</i> jaune	<i>2-3 min</i> rouge

Important : (Biomérieux,2009)

- (1)- Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2)- Une couleur orange apparaissant après 36-48 h de l'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 la cupule.
- (5)- Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

E. Liste des antibiotiques

Antibiotique	Sigle
Acide fusidique	FA
Amikacine	AN
Ampicilline	AM
Amoxicilline+ Acide clavulanique	AMC
Cefalotine	CF
Cefepérine	FEP
Cefotaxime	CTX
Cefoxitine	FOX
Cefsulodine	CFS
Ceftazidime	CAZ
Ciprofloxacine	CIP
Chloramphénicol	C
Colistine	CS
Erythromycine	E
Fosfomycine	FOS
Imipenem	IPM
Isepanycine	ISP
Linoconycine	L
Oxacilline	OX1
Piperacilline	PIP
Pénicilline G	P
Rifempicine	RA
Tazobactram+ Piperacilline / Pénicilline G	TZP
Tetracyline	TE
Ticarcilline	TIC

Nom : **MERRADI**

Prénom : **Manel**

Soutenu le : **04/04/2012**

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère
Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques**

Thème : Contribution à l'étude d'un agent microbien auto-épurateur de l'eau isolée d'un écosystème aquatique continental de la région de Khenchela

Résumé

L'eau comme tout autre élément dans la nature est un bon serviteur de l'homme mais celui-ci n'est pas un bon maître par ses extensions urbaines et ses déchets biologiques, il provoque une pollution microbienne de cette source précieuse de vie. Le volume d'eau potable et pure devient de plus en plus insuffisant et ne couvre pas les besoins vitaux. En effet, l'eau est dotée d'un pouvoir auto-épurateur naturel qui maintient l'équilibre écologique. Cette capacité d'autoépuration de l'eau est l'œuvre des microorganismes.

L'évaluation de la qualité physicochimique et bactériologique était l'objectif de notre étude réalisée sur les eaux usées de la station d'épuration de la wilaya de Khenchela ainsi la contribution à isoler un agent microbien auto-épurateur (*Bdellovibrio bacteriovorus*) de ces eaux. Le dénombrement des germes indicateurs de contamination microbienne exprime leur présence avec un grand pourcentage et indique une contamination fécale d'origine humaine. L'isolement de bactéries présentes dans ces eaux nous a permis de trouver des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea spp* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus epidermidis*. *Bdellovibrio bacteriovorus* n'a pas été isolée de ces eaux et donc on n'a pas pu étudier son pouvoir lytique envers *Escherichia coli* isolée.

Mots clés : pollution microbienne, pouvoir auto-épurateur, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Escherichia coli*, station d'épuration de Khenchela.

Devant le jury:

M. HOUHA Belgacem (MCA)	Université de Khenchela	(Président)
M. HOUHAMDJ Moussa (Prof)	Université de Guelma	(Encadreur)
M.DARBOUCHE Abdelhak (Prof)	Université de Khenchela	(Examineur)
M. BENOUNIS Messaoud (MCA)	Université de Khenchela	(Examineur)
Melle. METALLAOUI Sophia (MCB)	Université de Skikda	(Membre invité)
M. AYACHI Omar (MCB)	Université de Batna	(Membre invité)

الملخص:

الماء كغيره من عناصر الطبيعة يخدم الانسان لكن هذا الاخير لا يحسن استعماله فيتوسعه العمراني و مخلفاته البيولوجية يؤدي الى التلوث الميكروبي لاهم مصادر الحياة ما يجعل نسبة المياه الصالحة للشرب و النقية غير كافية و لا تغطي الحاجات، الا أنه يعرف للمياه قدرتها الذاتية على التصفية للحفاظ على التوازن البيئي ، هذه القدرة الطبيعية للمياه هي نتيجة عمل الميكروبات.

الهدف من هذه الدراسة تقييم النوعية الفيزيوكيميائية و البكتيرية للمياه المستعملة لمحطة معالجة مياه الصرف الصحي لولاية خنشلة اضافة الى محاولة عزل عامل جرثومي ذاتي التصفية بديلو فيريو بكتيريوفوروس من هذه المياه . تعداد الجراثيم المؤشرة للتلوث الميكروبي يظهر وجودهم بنسبة كبيرة و يدل على التلوث البرازي البشري المنشأ. كما أظهر عزل البكتيريا من هذه المياه وجود بكتيريا سالبة الغرام مثل: البكتيريا المعوية (ايشيريشيا كولاي) و ايروموناس ايدروفيللا و الكلبسيلة الرئوية و بانتويا ص1 و الزانفة الزنجارية مع وجود بكتيريا موجبة الغرام كالمكورات العنقودية البشرية. لم يتم عزل بديلو فيريو بكتيريوفوروس من هذه المياه و بالتالي لم نتمكن من فحص قدرتها القاتلة ضد البكتيريا المعوية المعزولة.

الكلمات المفتاح : التلوث الميكروبي، قدرة التصفية الذاتية، بديلو فيريو باكتيريوفوريس، بكتيريا معوية، محطة معالجة مياه الصرف الصحي لخنشلة.

Abstract:

As every natural element, water serves man which couldn't use it wisely; microbial pollution of this precious source of life and an infinite volume of drinking water were a result of urban extension and biological waste. In fact; water is endowed with a natural self-epuration that sustains ecological balance. This self-epuration capacity is the masterpiece of microorganisms.

The purpose of our study on waste water of the wastewater plant treatment of Khenchela is to assess the physicochemical and the bacterial quality of this waste water and also to underline a microbial self-epurator agent *Bdellovibrio bacteriovorus*. The count of germs indicators of microbial contamination those were present with a large number indicating a human fecal contamination. The isolation of bacteria gives as result Gram negative bacteria as *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea spp 1* and *Pseudomonas aeruginosa* and Gram positive ones as *Staphylococcus epidermidis*. *Bdellovibrio bacteriovorus* wasn't isolated from this waste water which didn't allow us to verify its lytic activity toward the isolated *Escherichia coli*.

Key words: microbial pollution, self-epuration capacity, *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Escherichia coli*, waste water treatment plant of Khenchela.