



Institut Pasteur
d'Algérie

Laboratoire de Bactériologie des aliments, des eaux et de l'environnement

Séminaire de Formation sur les Maladies à Transmission Hydrique -Bordj Bou Arreridj-

22 et 23 Juin 2025

Contrôle Microbiologique des Eaux

Haffaressas Yacine

Biologiste Principal

I- Introduction

L'eau est un élément essentiel au fonctionnement de tout écosystème, provient des eaux souterraines, les eaux douces de surface c'est-à-dire celle des ruisseaux, des rivières, des fleuves, des barrages, ou dans certains cas, par adoucissement des eaux de mer

La contamination microbiologique de l'eau peut être directe ou indirecte par les excréta humains ou d'animaux et surtout de la contamination fécale.

Le contrôle microbiologique, conforme aux exigences réglementaires nationales et aux normes algériennes et internationales en la matière regroupe l'ensemble des modes opératoires et techniques d'analyses en bactériologie des eaux.

L'objectif de l'analyse bactériologique d'une eau est de :

- Rechercher les espèces bactériennes indicatrices de contamination fécale.
- Rechercher certaines espèces bactériennes pathogènes courantes.

II-Réglementation algérienne dans le domaine de la microbiologie des eaux

Le choix des paramètres à analyser et l'interprétation des résultats doivent se faire conformément à la loi en vigueur.

Eau de consommation humaine

Décret exécutif n 14 96 du 2 Joumada El Oula 1435 correspondant au 4 mars 2014 modifiant et complétant le décret exécutif n 11 125 du 17 Rabie Ethani 1432 correspondant au 22 mars 2011 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine.

Groupe de Paramètres	Paramètres	Unités	Valeurs limites
Paramètres microbiologiques	Escherichia coli	n/100 ml	0
	Entérocoques	n/100 ml	0
	Bactéries sulfitoréductrices y compris les spores	n/20 ml	0

Eaux embouteillées (eaux minérales, eaux de source)

Arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006 fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées.

Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufe/g)	
		n	c	m	M
Eaux minérales naturelles et eaux de source	<i>Escherichia coli</i>	5	0	Absence dans 250 ml	
	Entérocoques	5	0	Absence dans 250 ml	
	Spores anaérobies sulfito-réductrices	5	0	Absence dans 50 ml	
	Coloformes totaux	5	0	Absence dans 250 ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0	Absence dans 250 ml	

Eaux de baignade

Décret exécutif 10 juillet 1993 eaux de baignades.

Paramètres	Unités	Valeur guides	Valeurs limites
MICROBIOLOGIQUES			
1 - Coliformes totaux	/ 100 ml	500	10 000
2 - Coliformes fécaux	/ 100 ml	100	2 000
3 - Streptocoques	/ 100 ml	100	-
4 - Salmonelles	1 L	-	0
5 - Enterovirus	PFU / 10L	-	0
6 - Vibrion cholérique	/ 450 ml	-	0

Eaux usées épurées utilisées à des fins d'irrigation

Arrêté interministériel du 8 Safar 1433 correspondant au 02 janvier 2012 fixant les spécifications des eaux usées épurées utilisées à des fins d'irrigation.

Paramètres Microbiologiques	Valeur
Coliformes fécaux (CFU/100ml)	<100
Nématodes Intestinaux (œufs/l)	Absence

Eaux de piscines

Absence de réglementation algérienne.

Paramètres obligatoires	Valeur
Bactéries revivifiables à 36°C	< 100 UFC/1 ml
Coliformes totaux	< 10 UFC/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Absence dans 100 ml
Staphylocoques pathogènes	Absence dans 100 ml pour 90% des échantillons
Paramètres optionnels	Valeur impérative
Entérocoques intestinaux	Absence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence

GERMES RECHERCHES ET MILIEUX DE CULTURE

a-Eau minérale, source, Forage :

Germe recherché	Milieu de culture	Volume of water to analyze
La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	Gélose TGEA	1ML
Coliformes totaux et fécaux	Gélose Tergitol TTC	250 ML
Pseudomonas aeruginosa	Gélose Cétrimide	250 ML
Entérocoques intestinaux	Gélose Slanetz et Bartley, BEA (Bile-Esculine- Azide)	250ML
Anaérobies sulfito-réducteurs ASR	Gélose Viande Foie	50ML

b- Eau de puits, forage, source et bête :

Germe recherché	Milieu de culture	Volume d'eau
Coliformes totaux et fécaux	Gélose Tergitol TTC	100 ML
Entérocoques intestinaux	Gélose Slanetz et Bartley, BEA (Bile-Esculine-Azide)	100 ML
Anaérobies sulfite réducteurs ASR	Gélose Viande Foie	20 ML

c-Eau de piscine :

Coliformes totaux et fécaux	Gélose Tergitol TTC	100 ML
Pseudomonas aeruginosa	Gélose Cétrimide	100 ML
Entérocoques intestinaux	Gélose Slanetz et Bartley, BEA (Bile-Esculine- Azide)	100 ML
Anaérobies sulfite réducteurs ASR	Gélose Viande Foie	20 ML
Staphylococcus aureus	Gélose Chapman	100 ML

d - Eau de robinet :

Germe recherché	Milieu de culture	Volume d'eau
Coliformes totaux et fécaux	Gélose Tergitol TTC	100 ML
Entérocoques intestinaux	Gélose Slanetz et Bartley, BEA (Bile-Esculine-Azide)	100 ML
Anaérobies sulfite réducteurs ASR	Gélose Viande Foie	20 ML

e-Eau à usage cosmétique et pharmaceutique :

Germe recherché	Milieu de culture	Volume d'eau
La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	Gélose TGEA	1ML
Coliformes totaux et fécaux	Gélose Tergitol TTC	100 ML
Pseudomonas aeruginosa	Gélose Cétrimide	100 ML
Entérocoques intestinaux	Gélose Slanetz et Bartley, BEA (Bile-Esculine- Azide)	100 ML
Anaérobies sulfite réducteurs ASR	Gélose Viande Foie	20 ML
Staphylococcus aureus	Gélose Chapman	100 ML

f-Eau de baignade:

Germes	Milieu de culture	Volume d'eau à analyser	Température et durée d'incubation
Coliformes totaux et fécaux	TTC Tergitol 7 Agar	100 ml	24h/37°C
Entérocoques intestinaux	Slanetz et Bartley Agar, BEA (Bile-Esculin-Azide)	100 ml	48h/37°C
Salmonelles	SFB	500 ml	48h/ 37°C
Vibrio cholerae	GNAB	450 ml	8h/37°C

III- PRELEVEMENT

III-1- Matériel de prélèvement

Choix et stérilisation des récipients :

On peut utiliser soit des flacons en verre (borosilicaté de préférence) de 500 et 1000 ml soit des flacons en plastique à usage unique stérilisés par le fabriquant.

Avant usage, les flacons en verre ainsi que les bouchons sont soigneusement lavés, rincés, séchés puis enveloppés séparément dans un morceau de papier filtre puis stérilisés soit à l'autoclave (120°C) durant 15 min, soit au four Pasteur (170°C) durant 1h.

Il est souhaitable de disposer chaque flacon dans un étui adapté à sa taille, pour assurer sa protection durant les transports et éviter la déchirure de l'enveloppe de papier filtre.

Dans le cas de prélèvement d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, le désinfectant peut, au cours du transport, continuer d'exercer son action sur les bactéries présentes, et il est nécessaire de le détruire. Ajouter dans le flacon de prélèvement avant sa stérilisation du thiosulfate de sodium à raison de 17.5mg/l (environ 8mg par flacon de 500ml).

III-2-Méthodes générales de prélèvement

III -2-1 -Prélèvement au robinet

Enlever les brise-jets et tuyau de caoutchouc adaptés au robinet choisi, débarrasser celui-ci le cas échéant des concrétions calcaires, qui ont pu s'y déposer.

Se laver très soigneusement les mains et avant-bras, les rincer à l'alcool, laisser sécher.

Flamber le robinet pendant au moins 1 min, en utilisant, par exemple, une lampe à souder portative au gaz butane.

Ouvrir le robinet et laisser couler 3 à 5 min avant de faire le prélèvement. Durant cette attente, et durant le prélèvement, il est utile qu'un assistant maintienne la lampe à souder allumée, un peu au dessus du robinet ; l'opérateur, dans ses manipulations, pourra l'utiliser comme un bec bunsen au laboratoire.

Après avoir dégager l'emballage stérile, prendre le flacon de la main gauche, l'approcher des doigts libres de la main droite, enlever avec ceux-ci le coton bouchant le goulot.

Flamber rapidement le bord de goulot ; remplir presque entièrement le flacon, flamber à nouveau rapidement le bord du goulot et mettre le bouchon.

Le prélèvement terminé, inscrire sur l'étiquette les indications nécessaires à l'identification du prélèvement. Replacer le flacon dans son enveloppe de papier, en protégeant préférentiellement le bouchon et le goulot. Sur une feuille annexe, noter tous les renseignements utiles à l'interprétation de l'analyse. Introduire le tout, éventuellement, dans l'étui métallique.

III -2-2- Prélèvement dans un puits à l'aide d'un plongeur

Utiliser un plongeur stérile enveloppé de son papier protecteur et d'une corde, de longueur adaptée à la profondeur de puits, terminée par un mousqueton. Poser le plongeur sur le sol, déchirer la partie supérieure du papier de façon à dégager d'une part le paquet du bouchon, d'autre part la boucle de la cordelette.

Engager cette boucle dans le mousqueton de la corde, dégager de la main gauche toute la partie supérieure de l'appareil et notamment le goulot du flacon.

Durant ces manipulations éviter de mettre la cordelette en contact avec le sol.

Enlever le coton obturant le goulot, soulever l'appareil, le dégager totalement du papier protecteur et le descendre lentement dans le puits, en évitant de toucher les parois de celui-ci.

Lorsque le flacon est plein (aucune bulle ne sortant du plongeur), remonter l'appareil, dégager le flacon en le prenant par la base du goulot (l'anse du plongeur étant abaissée pour dégager l'ouverture), vider un peu d'eau, flamber éventuellement le bord du goulot, et l'obturer avec le bouchon dégager de son paquet.

III -2-3 - Prélèvement dans une rivière

Lorsque le prélèvement doit être fait d'un pont, procéder comme dans le cas précédent, en tenant compte cependant du courant de la rivière (se placer du côté aval du pont).

Afin d'éviter que le courant emporte le plongeur, il faut dégager environ 1 m de corde et de lâcher brusquement celui-ci.

Recommencer deux ou trois fois cette opération, si nécessaire, jusqu'au moment où l'absence de bulles témoigne du remplissage du flacon.

III -2-4 - Prélèvement dans un lac ou une rivière profonde

Procéder de la même façon. Pour obtenir un échantillon à une profondeur fixe, il est nécessaire d'avoir un lestage important, de dégager la longueur de corde correspondant à la profondeur choisie et de laisser tomber brusquement le plongeur.

Il est possible d'utiliser des appareils spéciaux ne s'ouvrant qu'une fois la profondeur désirée atteinte, et qui autorisent une meilleure précision.

Dans le cas d'une rivière profonde, où existe un courant notable, il est nécessaire que cet appareil soit d'un poids très élevé et d'une forme particulière pour échapper dans certaine mesure à l'entraînement par le courant.

III -2-5-Prélèvement aux griffons des sources

Il convient d'isoler en premier lieu le point d'émergence de l'eau, et de préparer un emplacement de captage, soit en enfonçant dans le griffon un tuyau qui canaliserà l'eau et faciliterà le prélèvement soit, si l'eau sort sans jaillissement du sol, en aménageant une rigole.

De toute façon, ces manipulations ne doivent être faites immédiatement avant le prélèvement, mais au moins 24h à l'avance.

III -3-Transport et conservation au laboratoire

La teneur initiale en germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon, après le prélèvement. C'est pour cela que toute analyse doit être effectuée le plus rapidement possible.

Si la durée de transport dépasse 1h et si la température extérieure est supérieure à 10°C, les prélèvements doivent être placés en enceinte réfrigérée.

Les flacons doivent être maintenus à une température comprise entre 4 à 6°C dans un conteneur approprié. Un réfrigérateur mobile branché sur la batterie du véhicule est préférable à une glacière portable à pains réfrigérants. L'idéal est de disposer d'un véhicule isotherme dont la caisse entière est réfrigérée.

Il est donc admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas excéder 24 h, l'échantillon étant maintenu à moins de + 4° C et qu'il est préférable de raccourcir ce délai lorsque l'eau est présumée très polluée.

Après la prise d'essai, il est recommandé de placer le reste du prélèvement non utilisé au réfrigérateur. Il peut arriver que les premières lectures bactériologiques, 24, ou 48 h après l'ensemencement, donnent des résultats inattendus, incitant à vérifier l'analyse.

IV- LES BACTERIES RECHERCHEES DANS LES EAUX

IV-1 –La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)

Définition :

La flore mésophile aérobie totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présente dans un produit ou sur une surface. Ce dénombrement se fait à 30 °C ce qui permet de dénombrer trois grands types de flore :

- La flore thermophile, température optimale de croissance à 45 °C ;
- La flore mésophile, température optimale de croissance entre 20 °C et 40 °C ;
- La flore psychrophile, température optimale de croissance à 20 °C.

Comme il s'agit d'un milieu ordinaire, la plupart des micro-organismes peuvent se développer, sauf ceux qui sont exigeants et les micro-organismes anaérobies stricts. Il est donc préférable de parler de Flore Mésophile Aérobie à 30 °C que de « flore totale ».

L'unité est l'UFC (Unité Formant Colonie) car une colonie observable sur la gélose peut venir d'un micro-organisme isolé, d'une spore ou encore d'une association de micro-organismes.

Dénombrement des microorganismes revivifiâbles à 22°C et à 37° (ISO 6222:1999)

Technique d'incorporation

Dans la zone stérile

Mélanger la bouteille d'eau à analyser et prendre aseptiquement 1 ml en double dans deux boîtes de Pétri vides, numérotées et préparées.

A partir de l'eau à analyser on fait des dilutions 10-1 et 10-2 (Schéma 1).

Distribuer l'inoculum dans la boîte.

Compléter ensuite avec environ 20 ml de gélose TGEA (TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR).

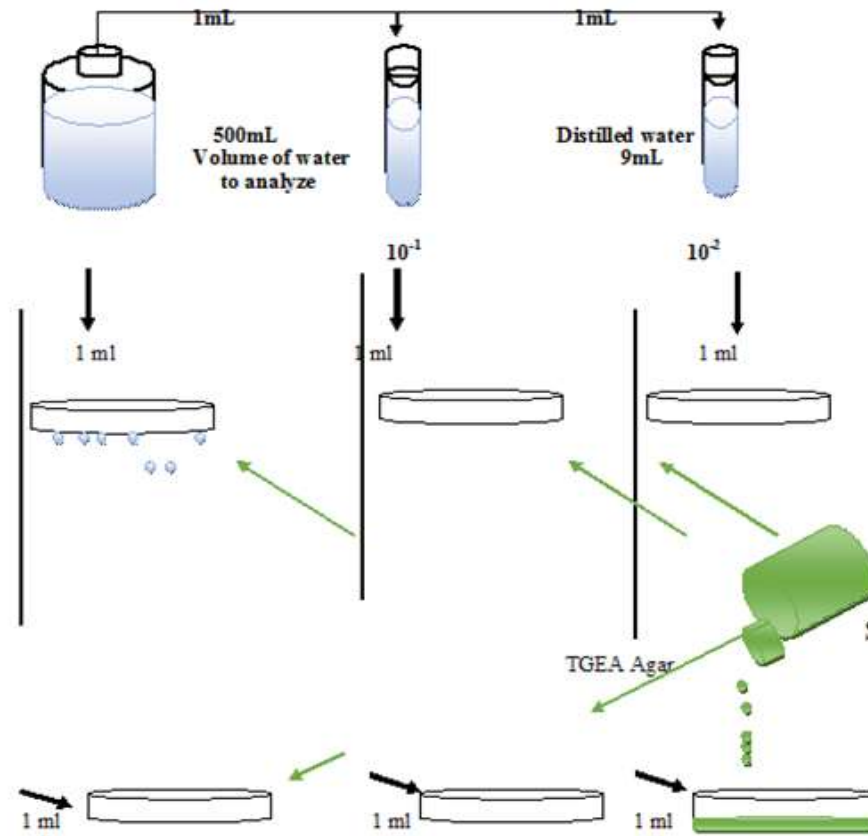
Faire ensuite des mouvements en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.

Laisser solidifier les boîtes sur paille.

Incuber les boîtes:

La première série sera incubée à 22 °C pendant 72 heures.

La seconde série sera incubée à 37°C pendant 24 heures.



Scheme 1: Enumeration of Microorganisms Revivifiable at 22 ° C and 37 ° C.

Lecture et interprétation:

Les colonies de microorganismes apparaissent en masse de différentes tailles, allant de petites colonies ponctuelles à des colonies plus larges, et leur couleur peut varier du blanc au crème.

Retenir les boîtes contenant moins de 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.

Calculer ensuite la valeur du nombre N, de microorganismes revivifiables à 22°C à part et celle du nombre N de microorganismes revivifiables à 37°C à part, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{1,1 \times d}$$

où :

Σc : est la somme des colonies dénombrées sur deux boîtes de dilutions successives retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs après la virgule.

Le résultat final de microorganismes revivifiables dénombrés à 22°C et à 37°C par ml d'eau est noté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x où x est la puissance appropriée de 10.

Exemple:

Un dénombrement de microorganismes à 37° C a donné les résultats suivants :

- à la première dilution retenue 10⁻² : on a 148 colonies.
- à la seconde dilution retenue 10⁻³ : on a 24 colonies.

$$N = \frac{\sum c}{1,1 \times d} = \frac{148 + 24}{1,1 \times 10^{-2}} = \frac{172}{0,011} = 15636$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 16000 ou mieux encore :

$1,6 \times 10^4$ microorganismes par ml d'eau à 22°C ou à 37°C.

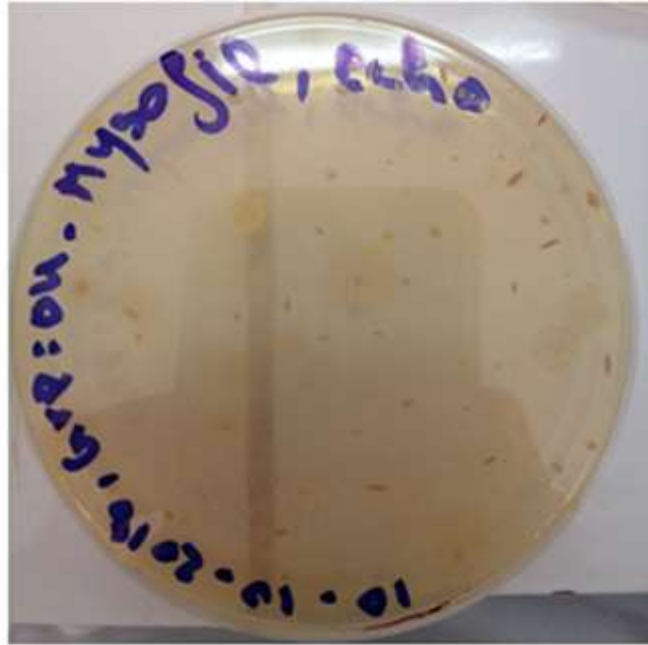


FIGURE 1. FMAT SUR TGEA

IV-2 –Les Coliformes

IV-2 –a- Coliformes totaux

Définition :

Les Coliformes totaux sont définis comme des bacilles à Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporulés, ne possédant pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 à 48 heures à une température comprise entre 36 +/-2°C. Ce sont des bactéries utilisées comme indicateur de la qualité microbiologique de l'eau. Soit 10 coliformes par ml et plus, annonce une contamination de l'eau potable.

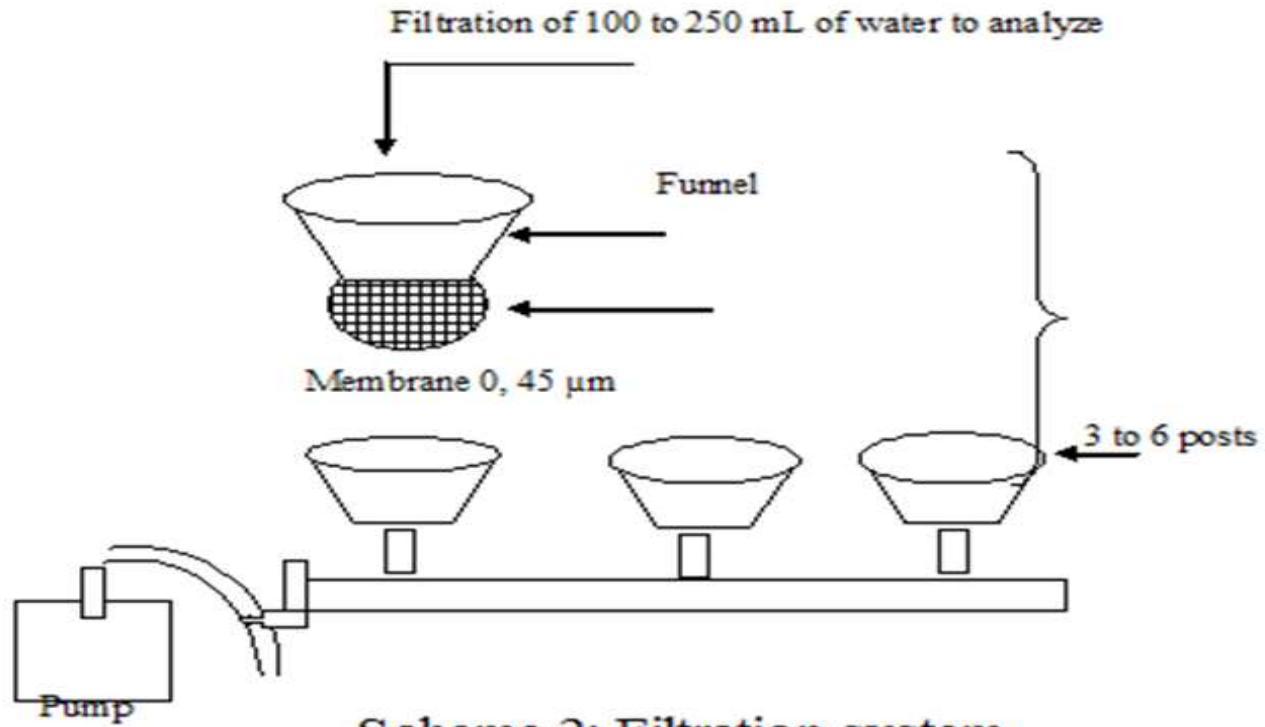
IV-2-b- Coliformes fécaux

Définition :

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (*E. coli*) et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. La bactérie *E. coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés.

Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt d'eaux enrichies en matière organique, tels les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de la transformation alimentaire.

Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (ISO 9308-1:2000)
Technique de filtration sur membrane



Scheme 2: Filtration system



Le dénombrement des coliformes par filtration sur membrane se fait selon les étapes suivantes :

- Stériliser l'entonnoir gradué ainsi que la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
- Les refroidir tout de suite après, avec l'eau à analyser si on en dispose en quantité suffisante ou bien avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre en place de façon aseptique une membrane de porosité $0,45\mu\text{m}$ entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Déposer ensuite aseptiquement 100 à 250 ml d'eau à analyser, selon les types d'eaux à analyser, devant un bec bunsen.
- Actionner ensuite la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane.
- Retirer l'entonnoir puis transférer immédiatement et aseptiquement la membrane à l'aide d'une pince stérile, sur la surface d'une plaque de gélose TTC Tergitol préalablement préparée.
- Incuber le tout à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 21 ± 3 heures.

- Cette boîte servira au dénombrement des bactéries coliformes, suivie de l'identification biochimique.

- **Lecture et interprétation:**

- Dénombrer les colonies après l'incubation qui se présentent sous forme de petites colonies pigmentées en jaune orangé ou en jaune (lactose positive).
- Repiquer de façon aléatoire 5 colonies sur la gélose TSI (Triple Sugar Iron) à des fins de confirmation basée sur le test à l'oxydase d'une part et la production d'indole d'autre part.

- **Test à l'oxydase.**

- Déposer une colonie caractéristique sur un disque d'oxydase.
- La réaction positive est immédiate et se traduit par un virage au violet foncé.

- **Test à l'indole.**

- Transférer chaque colonie caractéristique séparément dans un tube contenant 3 ml de bouillon au urea indole ou bouillon eau peptonée exempte d'indole.
 - Incuber ce dernier à $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 21 ± 3 heures (bain marie).
 - Rechercher la production d'indole en ajoutant 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.
 - La présence d'une coloration rouge à la surface du bouillon traduit la production d'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu.

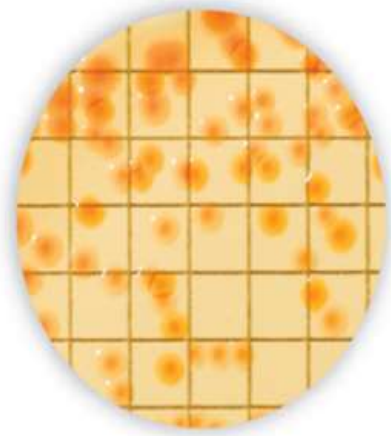


Figure 2. *E.coli* sur TTC TERGITOL



FIGURE 3. *E.coli* sur TSI

Figure 4. Test à l'oxydase



Figure 5. Test à l'indole



IV- 3-Entérocoques intestinaux

Définition :

Il s'agit de Cocci à Gram Positif (CGP) de forme sphérique ou ovoïde, se présentant en chaînettes plus ou moins longues, non sporulées, aéroanaérobies facultatives, ne possédant ni catalase ni oxydase.

La classification générale des Streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 80 par la création d'un nouveau genre, *Enterococcus*. Dans ce contexte, plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* ont été transférées vers le genre *Enterococcus*, ce dernier correspondant, grosso modo, aux Streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield. Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain. Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains, à des concentrations variant de 10^5 à 10^8 bactéries/g. Quant aux streptocoques du groupe D susceptibles de contaminer les eaux d'approvisionnement, ils sont plutôt typiques des déjections animales, comme *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus*.

Ces espèces colonisent le bétail, les chevaux et la volaille bien qu'elles peuvent parfois être présentes chez l'humain, en particulier *S. bovis* et elles n'ont pas été transférées dans le genre *Enterococcus*. Cette nomenclature, basée sur des modifications à la classification bactérienne, peuvent engendrer une certaine confusion d'autant plus que certains documents récents utilisent toujours le terme *Streptococcus* pour décrire des espèces du genre *Enterococcus*; c'est le cas du Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Recherche et dénombrement des Entérocoques intestinaux (ISO 7899-2:2000)

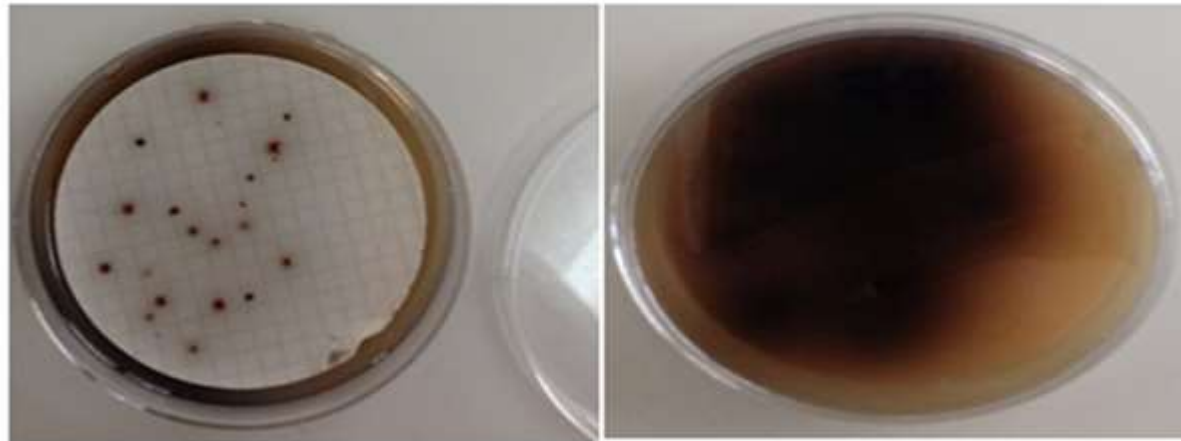
- La technique utilisée dans cette analyse est la filtration sur membrane.
- Stériliser l'entonnoir gradué en acier inoxydable ainsi que la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
- Les refroidir tout de suite après, avec l'eau à analyser ou bien avec de l'eau distillée stérile.
- Mettre en place de façon aseptique une membrane de porosité nominale de 0,45 µm entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Déposer ensuite aseptiquement 100 à 250 ml d'eau à analyser, devant un bec bunsen.
- Actionner ensuite la pompe à vide pour laisser passer l'eau à travers la membrane.
- Retirer l'entonnoir puis transférer immédiatement et aseptiquement la membrane à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose SLANETZ et BARTLEY préalablement préparée.
- Cette dernière sera incubée à $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 44 ± 4 heures.
- Après incubation, les colonies de Streptocoques fécaux apparaissent sur le milieu en donnant de couleur rouge ou marron.
- **Lecture et interprétation**
- Après la période d'incubation spécifiée, les entérocoques intestinaux ou Streptocoques du groupe « D » apparaissent sous forme de petites colonies pigmentées en rouge, marron.

Test de confirmation:

Transférer aseptiquement la membrane du milieu de Slanetz et Bartley sur de la gélose Bile esculine azoture (BEA). Cette dernière sera incubée à $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 2 heures.

Les colonies caractéristiques prennent alors une coloration noire traduisant ainsi l'hydrolyse de l'esculine présente dans le milieu.

Figure 6. Entérocoques intestinaux



IV- 4- Anaérobies sulfito-réducteurs

Définition :

Les spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridium*) sont largement répandues dans l'environnement. Elles sont présentes dans les matières fécales humaines et animales, ainsi que dans les eaux usées et le sol. À la différence des *Escherichia coli* et des autres organismes conformes, les spores survivent dans l'eau pendant longtemps, car elles sont plus résistantes que les formes végétatives à l'action des facteurs chimiques et physiques. Elles peuvent ainsi fournir des indications sur une pollution éloignée ou intermittente. Elles peuvent même être résistantes à la chloration dans les proportions habituellement utilisées pour le traitement des eaux, et sont donc ainsi utiles pour les besoins des contrôles.

Leur présence en l'absence de germes fécaux dans les eaux peut être interprétée comme un défaut de protection de la nappe contre la présence d'une flore bactérienne étrangère.

Du fait de leur similitude de comportement avec les parasites, les spores constituent un bon indicateur pour ces micro-organismes. En outre, ces formes résistent à la chloration. Ceci explique que pour ce paramètre particulier, ce ne sont pas les bactéries elles-mêmes mais leurs spores qui sont recherchées.

Recherche et dénombrement des Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR)

NF T90-415 (85)

- La Méthode utilisée est l'incorporation en gélose en tubes profonds ; c'est une méthode qui permette la recherche et le dénombrement des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans les eaux par incorporation en gélose en tubes profonds.

Technique:

- A partir de l'eau à analyser :
 - Transférer environ 20 ml dans un tube stérile,
 - Chauffer les tubes au bain marie de l'ordre de 80°C pendant 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réductrices éventuellement présentes.
 - Refroidir immédiatement sous l'eau de robinet.
 - Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.
 - Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose Viande Foie.
 - Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air et de l'oxygène.
 - Laisser solidifier sur pailleasse pendant 30 minutes environ, puis incuber à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 44 ± 4 heures.

Lecture et interprétation

- La lecture se fera à 44 ± 4 heures.
- Dénombrer toute colonie noire de 0,5 mm de diamètre, ayant poussé en masse et rapporter le nombre total des colonies dans les quatre tubes à 20 ml d'eau à analyser.



Figure 7. ASR sur VF

IV- 5- *Vibrio cholerae*

Définition :

Les vibrions sont des bacilles à Gram négatif, incurvés, aérobies-anaérobies facultatifs, mobiles par un seul cil polaire. *Vibrio cholerae*, responsable du choléra, a été découvert en 1854 par PACINI à Florence et cultivé en 1883 par R. KOCH au Caire.

Vibrio cholerae se trouve dans les selles des malades et de certains sujets (porteurs sains). Il survit dans les eaux polluées ainsi que sur les objets contaminés. Entérobactéries et autres bacilles à gram négatif non exigeants p 74.

Recherche de *V. cholerae* (ISO/TS 21872-1:2007)

Technique:

La méthode utilisée pour la recherche de ce germe est la suivante :

Dans un flacon contenant 50 ml d'EPA (Eau Peptonée Alcaline), rajouter 450 ml de l'échantillon d'eau à analyser.

Incubation 8H à 37°C

Le 1er isolement : sans agiter, on prélève à l'aide d'une pipette depuis la surface une goutte et on l'ensemence sur boîte de pétri (gélose GNAB) puis on l'incube à 37 C° / 24H.

Et on dépose aussi 1mL de la solution mère dans un tube contenant de l'EPA, on l'incube à 37 C°/ 24H.

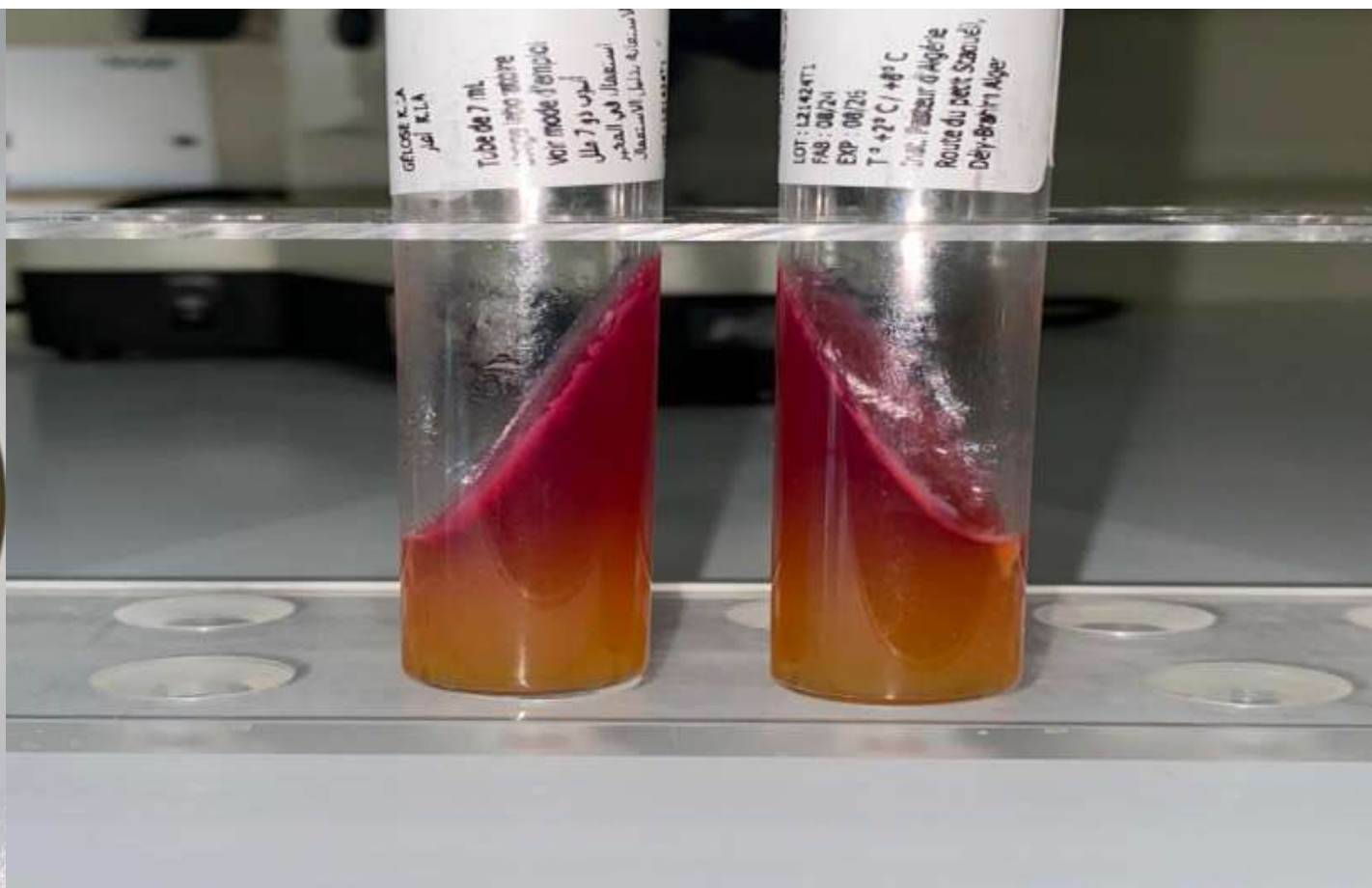
Le 2ème isolement: d'une goutte depuis le tube sur une autre boîte de pétri (gélose GNAB) on l'incube à 37 C°/ 24H.

Lecture et interprétation:

Aspect du tube : trouble homogène

Sur GNAB : colonies caractéristiques : Bleues-transparentes > présence du *Vibrio cholerae* non agglutinant ou agglutinant.

Figure 8. *V.cholerae*



V.cholerae sur API 20 NE

Vibrio ATCC

Vibrio ATCC

api 20 NE CE 0724 B REF: Vibrio ATCC

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

24 h	+	+	+	-	-	N	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
48 h																						
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
	NO ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	IGLU	LABA	IMNE	IMAN	IMAG	IMAL	IGNI	ICAP	LAQU	MLI	LGIT	LPAC	OX	
24 h	7			0/4			7			6			7			4			5			
48 h																						

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : 24 h: V. cholerae à 87,8%

BIO-MÉRIEUX
 préparés en France - Prepared in France

IV- 6-Salmonelles :

Définition :

Les Salmonelles sont des entérobactéries dont les caractères essentiels sont de ne pas fermenter le lactose et de ne pas produire d'uréase.

Les Salmonelles appartenant à la famille des entérobactéries. Ce sont des bacilles à Gram négatifs, mobiles pour la plupart (ciliature péritriche), mais certaines sont immobiles, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase -, nitrate réductase +, fermentative du glucose, lactose -, H₂S + (ou -), uréase -, lysine décarboxylase +, utilisant la voie des acides mixtes, indole-, ne possédant pas la bêta-galactosidase, à forte contagiosité, responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïde et paratyphoïde (*S. typhi* et *S. paratyphi*).

Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose, une des principales causes de toxi-infection alimentaire collective (TIAC).

Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion à partir de l'eau (*S.typhi* surtout), des aliments (ex. produits laitiers, œufs, viande) ou d'animaux familiers porteurs (tortues).

Recherche de Salmonella (ISO 19250:2010)

- On utilise dans cette analyse la méthode par filtration, qui consiste en la recherche et l'identification de Salmonella présente dans les eaux destinées à la consommation humaine, par filtration.

Technique:

- La recherche de Salmonella par filtration sur membrane se déroule selon les étapes suivantes :
 - stériliser l'entonnoir gradué en acier inoxydable ainsi que la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
 - Refroidir l'entonnoir gradué tout de suite après, avec l'eau à analyser si on en dispose en quantité suffisante ou bien avec de l'eau distillée stérile.
 - Mettre en place de façon aseptique une membrane de 0,45 μm entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
 - Fixer ce dispositif la pince correspondante.
 - Déposer ensuite 500 ml ou plus selon disponibilité d'eau à analyser, devant un bec bunsen.
 - Actionner ensuite la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane.
 - Retirer la membrane à l'aide d'une pince stérile puis la placer dans un flacon contenant le milieu SFB double concentration (D/C) et ajouter 20 disques d'additifs SFB
 - Bien mélanger le filtre dans le milieu, puis incuber ce dernier à 37°C pendant 24 à 48 heures. Cette étape constitue l'enrichissement primaire.
 - Après incubation, procéder à un enrichissement secondaire en transférant 1 ml de l'enrichissement primaire sur le milieu SFB en tube (double concentration =D/C).
 - Bien mélanger le milieu et l'inoculum, puis incuber ce dernier à 37°C pendant 20 \pm 4 heures.
 - Après l'incubation, procéder à l'isolement sur milieu Hektoen et incuber à 36 \pm 2°C pendant 20 \pm 4 heures.

Lecture et interprétation:

- Repérer les colonies caractéristiques.
- Faire une identification biochimique basée essentiellement sur ONPG, TSI, Urée -Indole, LDC...
- Si nécessaire faire une identification antigénique basée essentiellement sur l'agglutination.

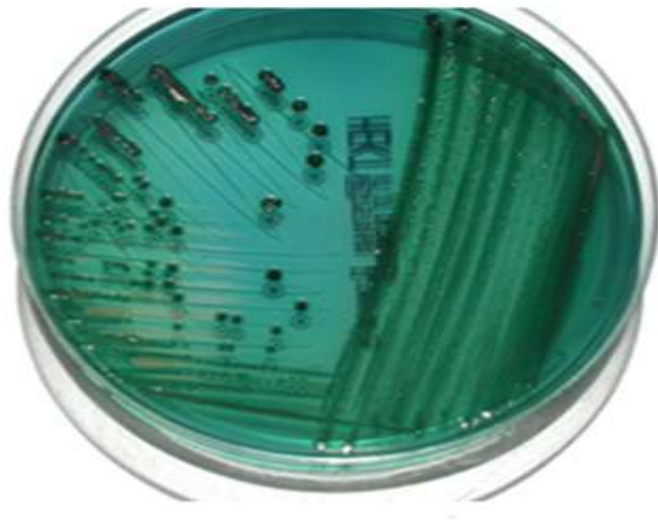


Figure.9. *Salmonella spp* sur Hektoen

Figure 10. *Salmonella ssp* sur TSI



IV- 7-Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266:2006)

La méthode utilisée dans cette analyse est la méthode par filtration sur membrane.

Technique:

- La recherche de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane nécessite une préparation au préalable qui se déroule selon les étapes suivantes :
 - Stériliser l'entonnoir gradué en acier inoxydable ainsi que la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
 - Les refroidir tout de suite après, avec l'eau à analyser si on en dispose en quantité suffisante ou bien avec de l'eau distillée stérile.
 - Mettre en place de façon aseptique une membrane de porosité nominale de 0,45 µm entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
- Déposer ensuite aseptiquement 100 ou 250 ml d'eau à analyser, selon les types d'eaux à analyser, devant un bec bunsen.
- Actionner ensuite la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane.
- Retirer l'entonnoir puis transférer immédiatement et aseptiquement la membrane à l'aide d'une pince à bouts arrondis stérile, à la surface d'une plaque de gélose au Cétrimide préalablement préparée.
- Cette dernière sera incubée à $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 44 ± 4 heures.

Lecture et interprétation

Après la période d'incubation spécifiée :

Les colonies pigmentées en bleu vert donc productrices de pyocyanine sont considérées comme des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 11 . *P.aeruginosa*

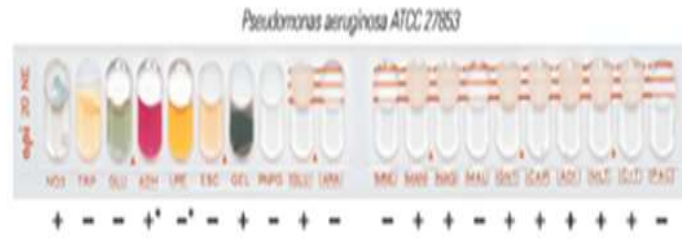
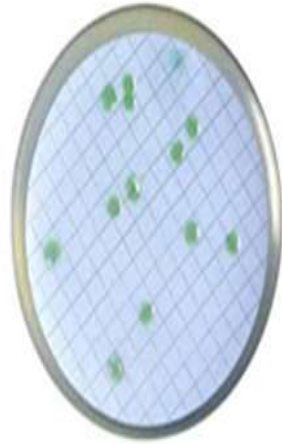


Figure 12. *P.aeruginosa*



IV- 8- *Staphylococcus aureus* :

Définition :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* 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.

Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. L'espèce *S.aureus* sera prise comme type de description.

S.aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux.

Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

Germe pyogène par excellence, *S.aureus* est le microbe de la suppuration.

Staphylocoques 30/122 Bactériologie - Service de Bactériologie 2002 - 2003

Certaines souches agissent aussi par libération d'une ou de plusieurs toxines (intoxication alimentaire, syndrome de choc toxique, impetigo).

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs

1. le caractère ubiquitaire du germe,
2. l'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, etc.,
3. la fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier.

Recherche de *Staphylococcus aureus* (XP T90-412)

- On utilise dans cette analyse la méthode par filtration sur membrane qui consiste en la recherche et le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive.

Technique:

- La recherche des Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus* par filtration sur membrane qui se déroule selon les étapes suivantes :
 - Tout d'abord, il faudrait stériliser l'entonnoir gradué en acier inoxydable ainsi que la membrane poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
 - Les refroidir tout de suite après, avec l'eau à analyser si on en dispose en quantité suffisante ou bien avec de l'eau distillée stérile.
 - Mettre en place de façon aseptique une membrane de porosité de 0,45 μm entre la membrane poreuse et l'entonnoir à l'aide d'une pince stérile.
 - Fixer ce dispositif avec la pince correspondante.
 - Déposer ensuite aseptiquement 100 ou 250 ml d'eau à analyser, selon les types d'eaux à analyser, devant un bec bunsen.
 - Actionner ensuite la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane.
 - Retirer l'entonnoir puis transférer immédiatement et aseptiquement la membrane à l'aide d'une pince à bouts arrondis stérile, à la surface de gélose Chapman au mannitol préalablement préparée.
 - Cette dernière sera incubée à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 44 ± 4 heures.

Lecture et interprétation:

- Après la période d'incubation, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies pigmentées en jaune (fermentation du mannitol).
- Prendre 3 à 5 colonies, une demi colonie servira au test à la catalase, l'autre demi sera triturer dans un tube contenant du bouillon BHIB, à incuber à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 20 ± 4 heures.

Test à la catalase

- Placer séparément deux gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes sur une lame de microscope. Prélever une demi colonie avec une tige de verre (pipette Pasteur) et l'émulsionner doucement dans une des deux gouttes.
- Observer immédiatement et après 5 minutes s'il y a apparition (catalase positive) ou absence (catalase négative) de bulles d'oxygène.
- Les observations peuvent se faire macroscopiquement ou à l'aide d'un microscope à faible grossissement.

Test à la coagulase

- Après incubation du bouillon BHIB, ajouter stérilement 0,1 ml de cette culture à 0,3 ml de plasma de lapin contenu dans un tube stérile à hémolyse, et incuber de nouveau à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 2 à 6 heures.
- Examiner la coagulation du plasma de lapin sinon ré-incuber et examiner de nouveau à 20 ± 4 heures.
- Considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus des trois quart du volume initialement occupé par le liquide.

Figure 13. Coagulase positive



Figure 14. *S.aureus* on Chapman



References

1. Jean RODIER Bernard LEGUBE, Nicole MERLET et coll. *L'Analyse de l'eau* Dunod Paris, 1959, pour la 1ère édition.
2. Haffaressas, Y, S Hamoudi and F Mouffok (2022) *Microbiological Analysis of Waters*. *Естественные науки (Natural Sciences)*, № 1 (6) 2022. p:20-39.
3. Manuel : *Contrôle Microbiologique des Eaux*. Laboratoire de Bactériologie des Aliments, des Eaux et de l'Environnement, Institut Pasteur d'Algérie.
4. Bactériologie, DCEM1, 2002 – 2003, Service de Bactériologie, Mise à jour : 24 mars 2003, 2/122 Bactériologie -Service de Bactériologie 2002 – 2003 p: 63 29 30 73.
5. Clausen, EM, BL Green and W Litsky (1977) *Fecal streptococci: indicators of pollution*. Dans: Hoadley, AW et BJ Dutka, édit., *Bacterial Indicators/Health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, ASTM STP 635, p : 247-264.
6. Edberg, SC, EW Rice, RJ Karlin et MJ Allen (2000) *Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection*. *Journal of Applied Microbiology*, 88 : 106S-116S.
7. Elmund, GK, MJ Allen et EW Rice (1999) *Comparison of Escherichia coli, total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency*. p: 332-339.
8. Gleeson, C. et N. Gray (1997) *The coliform index and waterborne disease*. E & FN Spon, 194 p.
9. www.bio-rad.com