



Année Universitaire : 2012- 2013



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Titre**  
*Flore microbienne, identification des bactéries  
thermophiles et caractérisation de leurs molécules  
bioactives*

**Présenté par:**  
SLAOUI Kenza

**Encadré par:**  
Pr. K. FIKRI BENBRAHIM  
Dr. A. EL OUALI LALAMI

**Soutenu Le 24 Juin 2013 devant le jury composé de:**  
Pr. O. EL FARICHA  
Pr. S. RACHIQ  
Pr. K. FIKRI BENBRAHIM  
Dr. A. EL OUALI LALAMI  
Mme. L. ZBADI



## *Dédicaces*

**A mes très chers parents.**

**Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute mes reconnaissances et tout l'amour que je vous porte.**

**Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements.**

**Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.**

**Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !**

**A mes très chers frères, ainsi qu'à mes amis (e)**

**A tous ceux qui me sont chers.**

## *Remerciements :*

**Tout d'abord je tiens à remercier vivement le directeur du Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu Docteur EL OUALI LALAMI qui m'a donné l'opportunité d'effectuer mon stage de fin d'étude au sein de l'unité. Je le remercie pour sa générosité, sa patience ainsi que ses conseils qui m'ont, non**



seulement, permis de réaliser mon sujet d'étude, mais aussi de mieux comprendre le climat social de l'entreprise et de m'intégrer plus facilement.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire; Monsieur Aabouch, Madame Zbadi, Docteur Bennani ainsi que Docteur Berrada pour leur accueil chaleureux, leur bienveillance, ainsi que leurs conseils fructueux.

J'exprime ma reconnaissance et ma gratitude envers mon Professeur Fikri Benbrahim Kawtar qui a accepté sans réserve de diriger ce travail. Elle s'est grandement impliquée dans la conduite de ce projet. Je tiens à la remercier aussi pour cette liberté qu'elle m'a permise, sans laquelle, je ne saurais affirmer ma manière de penser et de procéder.

Mes remerciements s'adressent également au Pr.FARRICHA, Pr. RACHIQ qui ont consacré une partie de leurs temps pour examiner mon rapport.

Je remercie également Madame HOUTI Asmae pour son aide et pour m'avoir fait part de son matériel biologique, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire de biotechnologie microbienne ainsi que celui d'écologie fonctionnelle et d'environnement de la Faculté des Sciences et Technique de de Fès

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## *Liste des abréviations*

**ADH** : Arginine dihydrolase

**AMY** : Amygdaline



**ARA** : Arabinose  
**ASR** : Anaérobies sulfite réducteurs  
**API** : Appareillage et procédé d'identification  
**CF** : *Coliformes fécaux*  
**CIT** : Citrate de sodium  
**CMC** : carboxyméthylcellulose  
**CT** : *Coliformes totaux*  
**DO** : Densité Optique  
**FMAT** : Flore Mésophile Aérobie Totale  
**GEL** : Gélatine de Kohn  
**GLU** : Glucose  
**H<sub>2</sub>S** : Thiosulfate de sodium  
**IND** : indole  
**INO** : Inositol  
**LDC** : Lysine décarboxylase  
**LM** : Levures et Moisissures  
**LRDEHM** : Laboratoire de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu  
**MAN** : Mannitol  
**MEL** : Melibiose  
**NM** : Norme Marocaine  
**ODC** : Ornithine décarboxylase  
**ONPG** : Ortho-nitro-phenylgalactoside  
**P** : Piscine  
**PA** : *Pseudomonas aeruginosa*  
**PAM** : Procédés Alimentaires et Microbiologiques  
**R** : Réservoir  
**RHA** : Rhamnose  
**S** : Source  
**SAC** : Saccharose  
**SF** : *Streptocoques fécaux*  
**SOR** : Sorbitol  
**TA** : Titre Alcalimétrique  
**TAC** : Titre Alcalimétrique Complet  
**TDA** : Tryptophane désaminase  
**UFC** : Unité formant colonie  
**UI** : Unité internationale  
**URE** : Uréase  
**VP** : Pyruvate de sodium



## Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Hydrolyse de la cellulose par la cellulase	16
Figure 2	Hydrolyse de l'amidon par l'amylase	17
Figure 3	Hydrolyse de la pectine par la pectinase	17
Figure 4	Différents points de prélèvement	18
Figure 5	Aspect des <i>Coliformes</i> sur boîte	25
Figure 6	Aspect de <i>Streptocoques fécaux</i> sur boîte	26
Figure 7	Aspect d'ASR sur boîte	26
Figure 8	Aspect des levures et moisissures sur boîte	27
Figure 9	Aspect de la <i>FMAT</i> sur boîte	28
Figure 10	Aspect de <i>Pseudomonas</i> sur boîte	28
Figure 11	Mise en évidence de la fermentation du glucose et du lactose et la production de gaz ainsi que la formation de H <sub>2</sub> S chez les souches thermophiles	32
Figure 12	Identification par la galerie API 20 NE	35
Figure 13	Résultats obtenus au niveau de la station thermale Ain Allah	48
Figure 14	Résultats obtenus au niveau de la station thermale Sidi Harazem	50
Figure 15	Résultats obtenus au niveau de la station thermale Moulay Yacoub	53
Figure 16	Galerie API 20NE de la bactérie P	56
Figure 17	Galerie API 20 E de la bactérie F	56
Figure 18	Mise en évidence de l'activité amylase chez la souche F sur un milieu à base d'amidon	57
Figure 19	Mise en évidence de l'activité cellulase chez la souche RAI3 sur milieu CMC Agar	57
Figure 20	Cinétique de croissance de souches thermophiles isolées à partir de la station Sidi Harazem et Moulay Yacoub	58
Figure 21	Cinétique de croissance de souches thermophiles isolées à partir de la station Ain Allah	59
Figure 22	Gamme d'étalonnage de la concentration du glucose	60
Figure 23	Gamme d'étalonnage de la concentration du glucose	60



<b>Figure 24</b>	Cinétique enzymatique de souches thermophiles isolées à partir de la station Ain Allah	61
------------------	--	----

## *Liste des tableaux*

<b>Tableaux</b>	<b>Titre des tableaux</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1</b>	Eaux minérales et orientations thérapeutiques	7
<b>Tableau 2</b>	Différentes utilisations des enzymes en biotechnologie	15
<b>Tableau 3</b>	Valeur maximale admissible des différents paramètres	23
<b>Tableau 4</b>	Microorganismes recherchés dans les eaux thermales	24
<b>Tableau 5</b>	Milieux utilisés pour l'isolement et la purification des souches à Ph7.4+- 0.2	29
<b>Tableau 6</b>	Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale Ain Allah	39
<b>Tableau 7</b>	Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale Moulay Yacoub	42
<b>Tableau 8</b>	Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale Sidi Harazem	44
<b>Tableau 9</b>	Caractères biochimiques des bactéries thermophiles	55
<b>Tableau 10</b>	Mise en évidence de l'activité amylase et cellulase	56

## *Sommaire*



---

INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- Généralités sur les sources thermales.....	3
I-1 -Répartition géographique des sources thermales.....	3
I-2-Origines .....	3
I-3-Classifications.....	4
I-4-Intérêt médical.....	6
I-5-Norme de qualité.....	8
II- Aperçu générale sur les stations thermales se situant à proximité de la ville de Fès.....	8
II-1 Station thermale Moulay Yacoub.....	9
II-2 Station thermale Ain Allah.....	10
II-3 Station thermale Sidi Harazem.....	10
III- Notions générale sur les bactéries thermophiles.....	10
II-1Définition.....	11
II-2 Niche écologique.....	11
II-3 Adaptation physiologique à la thermophilie.....	11
II-4 Thermophilie et biotechnologie.....	12
II-5 Les actions menées dans le cadre du bassin de Guaymas.....	13
IV- Importance des enzymes en biotechnologie.....	13
Activité cellulase.....	16
Activité amylase.....	16
Activité pectinase.....	17
PARTIE PRATIQUE	
1 <sup>ère</sup> partie : Analyse physicochimique et microbiologique des eaux thermales.....	18
I- Analyse physicochimique des eaux thermales.....	18
I-1- La dureté totale.....	19
I-2- la dureté calcique.....	19
I-3 -Nitrate.....	20
I-4- Nitrite.....	20
I-5- Ammonium.....	20



---

I-6- Orthophosphate.....	21
I-7 -Phosphore totale.....	21
I-8 -Conductivité.....	22
I-9- Turbidité.....	22
I-10- Oxygène dissous.....	22
II- Analyse microbiologique des eaux thermales.....	23
Méthodologie.....	23
1-Recherche des Coliformes.....	25
2-Recherche des SF.....	26
3-Recherche des ASR.....	26
4-Recherche des LM.....	27
5-Recherche de la FMAT.....	27
6-Recherche des PA.....	28
2 <sup>ème</sup> partie : Identification des bactéries thermophiles et caractérisation de leurs molécules bioactives.....	29
I- Matériels et méthodes.....	29
Testes d'identification.....	29
a. Coloration de Gram.....	29
b. Activité oxydase.....	30
c. Activité catalase.....	30
d. Fermentation des sucres et production de H <sub>2</sub> S et CO <sub>2</sub> .....	31
e. Galerie API.....	33
II- Mise en évidence de l'activité enzymatique des bactéries thermophiles.....	35
II-1 Activité cellulase.....	35
II-2 Activité amylase.....	36
II-3 Activité pectinase.....	36
III- Cinétique enzymatique.....	37
Méthodologie.....	38
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	37
1 <sup>ère</sup> partie : Résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques des eaux thermales	
I-Résultats des analyses physicochimiques des eaux thermales.....	39

---





---

I-1-Résultats des analyses physicochimiques des eaux d'Ain Allah.....	39
I-1-Résultats des analyses physicochimiques des eaux de Moulay Yacoub....	42
I-1-Résultats des analyses physicochimiques des eaux de Sidi Harazem.....	44
II- Résultats des analyses microbiologiques des eaux thermales.....	46
I-1-Résultats des analyses microbiologiques des eaux d'Ain Allah.....	46
I-1-Résultats des analyses microbiologiques des eaux de Sidi Harazem.....	49
I-1-Résultats des analyses microbiologiques des eaux de Moulay Yacoub.....	51
2 <sup>ème</sup> partie : Identification des bactéries thermophiles et caractérisation de leurs molécules bioactives	
I-Résultats des testes d'identification.....	55
II-Résultats de la mesure de l'activité enzymatique.....	56
III-Résultats de la cinétique enzymatique .....	58
CONCLUSION.....	63
RECOMMANDATION ET PERSPECTIFES.....	64
REFERENCES.....	65
ANNEXES .....	68



# Introduction

L'eau représente un élément essentiel et irremplaçable pour assurer la continuité de la vie. Cependant, elle peut être aussi une source de maladies (EL HAISSOUFI et al., 2011), car elle peut jouer le rôle de vecteur d'agents potentiellement dangereux, notamment des micro-organismes pathogènes (HASSOUNE et al., 2010). La détérioration de la qualité des ressources en eau constitue une menace aussi importante que celle liée au déséquilibre quantitatif (EL ADDOULI et al., 2009b).

Les eaux souterraines, souvent protégées géologiquement, sont exposées à des pollutions agricoles, industrielles et / ou urbaines (EL ADDOULI et al., 2009a). Les eaux superficielles elles aussi, sont menacées par des rejets polluants divers: industriels, domestiques, agricoles, atmosphériques, thermiques... etc. Les activités anthropiques sont à l'origine de la plupart des problèmes de pollution des cours d'eau. Elles diminuent le potentiel des ressources hydriques de bonne qualité (EL ADDOULI et al., 2009b). Le climat marocain est à la fois méditerranéen et atlantique. Il présente une saison sèche et chaude (de Mai à Septembre) et une saison froide (d'Octobre à Avril). Au Maroc, les écoulements superficiels sont tributaires des précipitations et présentent une grande variabilité spatiale (BOUAICHA ET BENABDELFADE., 2007). En général, les ressources hydriques dont dispose le Maroc sont limitées et soumises à des variations cycliques extrêmes (ALIBOU et al., 2002). De même, la situation qualitative des eaux est loin d'être satisfaisante (CHAHLAOUI et al., 1997).

En partant de ces ressources hydriques, des stations thermales au Maroc s'en servent à des fins thérapeutiques, elles sont indiquées pour des maladies chroniques, en accompagnement d'un traitement classique ou en prévention de complications de certaines maladies. Mais la situation devient critique avec la présence de patients dont le système immunitaire est affaibli, ce qui pourrait constituer un risque sanitaire grave. En effet, des travaux de KHAYLI et al.,(2011) , SALAME et al.,(2013) ont montré la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui pourrait constituer un risque sanitaire grave affectant la santé de la population



En absence de l'application adéquate du plan de surveillance de ces eaux thermales, nous avons mené cette étude pour répondre aux objectifs suivants :

- Etude de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux thermales de la ville de Fès, afin d'évaluer le risque sanitaire lié à leurs utilisations par la population pour la baignade et la boisson.
- Isoler et étudier des potentialités enzymatiques des bactéries thermophiles.

Pour mener cette étude, nous avons réalisé des analyses physico-chimique et bactériologique des eaux de trois stations de la région de la ville de Fès (Moulay Yacoub, Ain Allah, Sidi Harazem). Ensuite, nous avons procédé à l'isolement des bactéries thermophiles à partir de ces eaux, et testé certaines de leurs activités enzymatiques (amylase, cellulase et pectinase) pour essayer d'optimiser la concentration de cette enzyme.

Ce manuscrit comprend :

- INTRODUCTION;  
où nous présentons la problématique et les objectifs de ce travail.
- MATERIELS ET  
METHODES; en détaillant les analyses effectuées.
- RESULTATS ET  
DISCUSSIONS ; en comparant nos résultats aux études préalables.
- CONCLUSION.



# Revue Bibliographique

## I-Généralités sur les sources thermales

### I- 1- Répartition géographique des sources thermales au Maroc

Le Maroc possède une réserve en eau souterraine non négligeable qui se manifeste sous forme de résurgences d'eau douce émergeant entre les formations argileuses sous-jacentes triasiques et celles de la plate forme carbonatée jurassique du domaine atlasique. Ce dernier constitue le plus grand réservoir en eau au Maroc. Cette réserve en eau alimente de nombreuses sources thermales soit au niveau des formations carbonatées jurassiques des Rides Sud Rifaines, soit dans les formations tertiaires à dominance marneuse du domaine rifain et du Sillon Sud Rifain (SSR). Ces sources chaudes constituent un système hydrothermal à la partie occidentale d'une ceinture orientée Est-Ouest allant depuis le Maroc jusqu'en Tunisie (EL WARTITI, 2007).

Il existe plusieurs sources thermales au Maroc, disséminées un peu partout dans le moyen Atlas, dans le Sud et dans le Rif et qui sont considérées comme des eaux à vertu thérapeutique de première qualité, mais à part l'unique et réelle station thermale Moulay Yacoub, les autres sources thermales sont exploitées de façon empirique et artisanale essentiellement par une population locorégionale.

### I-2- Origine

Schématiquement, au niveau du cycle de l'eau à l'échelle du globe terrestre:

- 60% de l'eau de pluie reste dans l'atmosphère et maintient le cycle d'évapotranspiration
- 15% ruisselle et rejoint les cours d'eaux.



· 25% s'infiltré dans le sol et alimente les nappes souterraines. Une partie infime de ces eaux va percoler jusqu'à une importante profondeur (-2000 m) pour former les eaux minérales, dont certaines d'entre elles alimenteront les stations thermales. Pendant ce circuit, l'eau va se réchauffer, acquérir de la pression, s'enrichir de minéraux l'eau souterraine sera d'autant plus riche en minéraux que le temps de contact avec la roche sera long et que la température sera élevée. En profondeur, l'eau peut encore s'enrichir de gaz, constituée de CO<sub>2</sub> ou d'H<sub>2</sub>S.

La remontée des eaux minérales se fait par des fractures de l'écorce terrestre (failles) selon un circuit plus ou moins compliqué et sera plus améliorée par la présence de gaz (EL WARTITI, 2007) .

### **I- 3-Classifications**

Aucune classification des eaux minérales ne peut être entièrement satisfaisante car il n'existe pas de parallélisme parfait entre leur composition chimique, leurs propriétés physicochimiques et leurs actions thérapeutiques (TRAISSAC et al., 2006)

#### **I-3-a Classifications physiques**

La classification physique des eaux thermales présentée par TRAISSAC et al .,(2006) est la suivante :

- **Température**

Autant que la composition des eaux, leur température à l'émergence est très variable d'une source à l'autre. Les eaux sulfurées neutres ont généralement une température basse, de 10 à 31 °C (hypo- ou mésothermales). Les sulfurées alcalines sont plus chaudes, de 35 à 70 °C, méso- ou hyperthermale.

- **Radioactivité**

Certaines stations thermales possèdent des sources radioactives. La radioactivité est liée au radon, sa période est courte (3 à 8 jours) et n'entraîne pas de risque d'accumulation. Donc, on distingue deux grands types d'eaux sulfurées :

- Sulfurées alcalines (ou sulfurées sodiques) : Elles ont un pH élevé; le cation prédominant y est le sodium, elles sont riches en silice, leur thermalité est élevée et leur origine est plus profonde.



- Sulfurées neutres (ou sulfurées calciques) : Elles ont pour cation prédominant le calcium ; elles sont particulièrement instables du fait de leur neutralité. Leur thermalité est plus faible, leur origine est plus superficielle.
- **L'origine géologique**
  - Eaux magmatiques : eaux dont l'origine est à caractère éruptif et le débit constant aussi bien de point de vue composition que de point de vue température.
  - Eaux telluriques : leur débit varie suivant l'époque de l'année puisqu'elles proviennent de l'infiltration des pluies.

### **I-3 –b Classifications chimiques**

C'est la classification présentée par TRAISSAC et al.,(2007) la plus utilisée, en effet, les eaux naturelles sont classées selon leur composition chimique.

Les eaux minérales seront distinguées selon qu'il existe ou non un anion remarquable, par sa concentration ou sa nature chimique. Il existe aussi des subdivisions selon la prédominance du Na<sup>+</sup> ou du Ca<sup>++</sup>. Pour faire partie d'une classe, il faut par convention, que l'anion remarquable ait une concentration de 12mEq/l au minimum. Les eaux sont :

- Bicarbonatées
- Sulfatées
- Chlorurées
- Sulfurées
- Oligo-minérales ou oligo-métalliques

#### ▪ **Les eaux bicarbonatées**

Ce sont des eaux d'origine profonde (région volcanique). L'élément de base est l'ion bicarbonate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ; ces eaux sont caractérisées par leur dégagement carbogazeux et une minéralisation spéciale.

Les eaux bicarbonatées constituent un groupe très important, tant par le nombre de sources que par leurs actions thérapeutiques. Ce groupe illustre bien l'absence de parallélisme entre la composition chimique et l'activité thérapeutique.

#### ▪ **Les eaux sulfurées**



Elles sont caractérisées par la présence de soufre sous forme réduite, directement utilisable par l'organisme. L'élément de base est l'acide sulfhydrique  $\text{SH}_2$  ou hydrogène sulfuré. On les divise classiquement en deux catégories, sulfurées calciques et sulfurées sodiques. Noter que l'on n'y rencontre jamais d'acide sulfureux ; ce qui doit abandonner la dénomination d'eaux sulfureuses.

▪ **Les eaux sulfatées**

Ces eaux ne comportent que des sulfates mais pas de soufre réduit, elles proviennent de la dissolution des sulfates dans le sol. Leur concentration en calcium est limitée par la solubilité du sulfate du  $\text{Ca}^+$  qui est d'environ 2g/l, ce qui en fait des eaux à minéralisation globale faible, de l'ordre de quelques g/l. On classe ces eaux sulfatées en :

- Eaux sulfatées calciques
- Eaux sulfatées sodiques
- Eaux sulfatées mixtes 30

▪ **Les eaux chlorurées**

Elles proviennent de la dissolution du sel gemme, le  $\text{NaCl}$  est en concentration parfois très importante, proche de la saturation (-300g/l) ; ces sources ont été exploitées pour l'extraction du sel de cuisine. Ces eaux sont caractérisées par leur richesse polymétallique qui favorise leur absorption, sans agressivité, sur la muqueuse. Ces eaux fortement minéralisées (magnésium, fluor, arsenic (As)) contiennent une quantité de fer (Fe) élevée à l'origine d'une coloration orangée après contact avec l'air, du  $\text{CO}_2$  libre d'accompagnement et l'hydrogène sulfuré, nettement perceptible à l'olfaction.

▪ **Les eaux oligo-minérales ou oligo-métalliques**

Aucun élément n'y est prédominant. Ces eaux sont faiblement minéralisées et leur richesse réside dans leur thermalité et/ou leur radioactivité, le très grand nombre d'oligoéléments, parmi lesquels on retrouvera le Fe, le Cu et l'As.



## I-4- Intérêt médical

Le thermalisme est recommandé pour le traitement des maladies chroniques, notamment lorsque le traitement médical devient soit insuffisant pour soulager le patient, soit trop lourd à supporter (BERNARD et al., 2001).

L'indication de la cure thermale ne semble pas envisagée d'emblée mais est prescrite dans le cadre d'une stratégie thérapeutique (ROQUES et al., 2009).

L'administration de la santé française classe en douze orientations thérapeutiques les traitements et les soins administrés par les stations agréées et conventionnées, en fonction notamment de la spécificité de leurs eaux, on cite à titre d'exemple :

**TABLEAU N°1 : Eaux minérales et orientations thérapeutiques essentielles**

Eaux	Orientations
Sulfurées	Rhumatologie, ORL, Respiratoire
Sulfatées	Neurologie, Rhumatologie Dermatologie, Stomatologie
Chlorurées sodiques	Rhumatologie Gynécologie Enfants
Bicarbonatées	Digestif, Diabète Phlébologie, Rhumatologie





<b>Bicarbonatées et chlorurées</b>	Respiratoire Rhumatologie, Dermatologie Stomatologie Enfants
<b>Oligo-minérales</b>	Urinaire Phlébologie, Rhumatologie

Ces 12 orientations ont des bienfaits avérés :

- Douleurs réduites : La médecine thermique agit de façon efficace sur de nombreuses pathologies (allergies, asthme, arthrose, rhumatismes, problèmes veineux, états dépressifs, surcharge pondérale...) (NONY P et al., 2006).
- Baisse de la consommation de médicaments : utilisée en complément de traitements « classiques », les cures thermales constituent une alternative à l'absorption de médicaments.
- Bien-être psychologique : le thermalisme a également pour avantage de sortir les curistes de leur contexte habituel et donc d'agir sur leur qualité de vie et leur psychisme. Le patient est traité sous un angle médical autant qu'humain.
- Éducation à l'hygiène de vie et prévention : le patient apprend à vivre au quotidien avec sa maladie et à la gérer de manière autonome (QUENNEAU P et al., 2000).

### I-5-N orme de qualité

Du point de vue législatif, les eaux thermales répondent à une réglementation stricte pour réprimer les abus, l'utilisation des eaux polluées ou mélangées à des eaux superficielles. Pour cette raison trois règles doivent être absolument respectées:

**Règle 1** : aucune source ne peut être exploitée sans autorisation préalable accordée par le ministère de la santé publique, après bien entendu un examen du rapport d'ingénieur des mines et après des analyses physicochimiques et bactériologiques.

**Règle 2** : une source thermo minérale une fois exploitée est soumise à une surveillance administrative assurée par :

- Service des mines : qui s'occupe de la surveillance du captage, de la conservation et de l'aménagement des sources jusqu'aux réservoirs.



- Les services médicales : qui assurent la surveillance de l'eau et ceci en effectuant au moins deux fois par an une analyse bactériologique réalisée par un laboratoire agréé.
- Le wali : qui veille au respect du règlement en vigueur.

**Règle 3** : les sources importantes sont considérées d'intérêt public et cette déclaration permettra de rendre impossible les détournements par les propriétaires des terrains voisins susceptibles de capter la source dans le sol. Ces sources sont alors pourvues d'un périmètre de protection contre les tentatives de détournement et ce périmètre interdira le dépôt des engrais, de mettre également du bétail et de creuser des puits.

## II-Aperçu général sur les stations thermales se situant à proximité de la ville de Fès

Les eaux thermo-minérales naturelles ont une large distribution mondiale et une vaste utilisation à des fins thérapeutiques. Leurs utilisations varient selon les habitudes des populations. Certaines eaux minérales de sources thermales sont commercialisées ou bien utilisées comme des bains thérapeutiques pour guérir certaines maladies (HAKAM et al., 2000).

A cause de l'augmentation de l'utilisation de ces eaux dans la dernière décennie, plusieurs travaux s'intéressaient à l'étude de la qualité hygiénique de ces eaux dans différentes régions du monde. Telles que l'étude réalisée en France s'intéressant à la qualité microbiologique des eaux minérales utilisées à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux (Direction Générale de la Santé en France, 2005), ainsi que celle au Québec (Institut national de santé public Québec, 2009).

Au Maroc, qui compte plus d'une vingtaine de sources thermales à vertu thérapeutique de première qualité certains travaux se sont intéressés à quelques unes de ces eaux thermales, comme ceux de (RIMI, 2001), (ZARHLOULE et al., 2007) et (LAKHDAR et al., 2007).

Afin d'évaluer le risque sanitaire lié à l'utilisation des eaux des ces stations thermales, nous avons étudié mensuellement la qualité physico-chimique et la qualité bactériologique au niveau de 3 stations thermales durant la période printemps-hiver. On distingue :

- **La station thermale Moulay Yacoub**

C'est un lieu de pèlerinage pour tous les marocains qui y venaient pour « prendre les eaux » mais également pour s'imprégner de la « baraka » des lieux et rendre visite aux deux Saints du site :



Moulay Yacoub et sa fille Lalla Chafia. Le nom de Moulay Yacoub prend son origine à l'époque médiévale en référence à un Sultan Marocain du nom de Yacoub qui aurait été miraculeusement guéri par ses eaux bienfaisantes. Une autre version parle de l'époque romaine où le Roi berbère, Jouba II, élevé auprès du grand empereur de Rome et qui avait Volubilis comme capitale (A 60 kms), aurait voulu, avoir sa propre Station Thermale. C'est Moulay Yacoub qu'il aurait choisi, d'où le nom de « Aquae Ioubae » ; Eaux de Juba en latin ou « Aqioub ». Une fois les Arabes venus, le nom aurait été dévié en Yacoub ou Jacob, nom sémite bien connu. Moulay (notre seigneur) est un signe de vénération des lieux (ALAMI et al., 2006).

Située à 20 Km au Nord Ouest de la ville de Fès, capitale spirituelle du Maroc. La station thermale M.Y. qui a été conçue en 1988, est caractérisée par son architecture alliant modernité et son style arabo-mauresque, et représente le 1<sup>er</sup> établissement thermal au Maroc qui offre à ses visiteurs tout le confort pour tirer le maximum de profit des équipements modernes. Ses eaux chaudes sont, de par leur minéralisation, leur température et leurs débits, les plus importantes et les plus visitées du Maroc pour leurs vertus thérapeutiques (AKHDAR et al., 2006).

➤ Propriétés physico-chimiques de l'eau de Moulay Yacoub :

Le complexe hydrothermal de Moulay Yacoub s'étend sur une superficie de 300 hectares. Il comporte un griffon principal et six résurgences secondaires. Le volume des roches gorgées d'eau dépasse 500000 m<sup>3</sup>, et le contrôle de l'évolution piézométrique des sources thermales M.Y. atteste la présence d'une nappe thermale en charge autour de la côte 284 m, mais ce niveau piézométrique diminue et de façon importante depuis 1988 vu les exploitations excessives après l'inauguration de la nouvelle station thermale.

Le débit des sources de MY peut dépasser les 70 l/s.

Les caractéristiques de l'eau de Moulay Yacoub expliquent ses vertus curatives. L'eau est extrêmement chargée en sels minéraux dissous et est considérée comme une eau de mer soufrée. Le soufre a une action antiseptique et sédative.

La température élevée agit contre les douleurs et les contractions musculaires.

- **La station thermale Ain Allah**



La source d'Ain Allah se situe à 14 kilomètres de la ville de Fès. L'eau de cette source a une température d'environ 40°C. La source d'Ain Allah est extraite par un forage artésien à 1650 mètres de profondeur.

L'eau de cette source est sans indication thérapeutique. Elle est destinée soit à l'irrigation, soit pour l'alimentation des piscines ouvertes à la baignade populaire. Mais, des activités de gommage et de massage naturel qui s'exercent au sein de ses piscines couvertes et de ses baignades caractérisent cette source.

- **La station thermale Sidi Harazem**

C'est la deuxième station thermale de la région de Fès- Boulemane. Elle se trouve à 30 kilomètres à l'est de la ville de Fès.

Découverte à l'époque romaine, sa relation avec le consommateur marocain remonte à des siècles pour des vertus curatives. Sidi Harazem est la première eau minérale embouteillée et commercialisée au Maroc, depuis 1968. Il s'agit d'une eau bicarbonatée magnésienne peu minéralisée. Sa composition pure, de même que ses qualités naturelles, font d'elle une eau réputée possédant des vertus curatives pour les maladies du foie et du rein.

### III-Notions générales sur les bactéries thermophiles

Les organismes thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein, aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer. Plusieurs définitions ont été proposées pour définir la thermophilie. La plus reconnue est celle qui a été proposée par THOMAS et al., (1964), le microbiologiste à l'origine de la découverte des micro-organismes thermophiles. Selon cette définition, un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-dessus de 60°C.

#### III-1-Définition

Une définition plus pratique et plus large a été proposée par (STETTER et al., 1980) et qualifie d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous catégories au sein des thermophiles :



- Les thermophiles modérés dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C
- Les thermophiles extrêmes dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C.
- Et les hyperthermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.

Des organismes thermophiles ont été isolés d'environnements naturels soumis au volcanisme ou au géothermalisme (sources hydrothermales océaniques profondes, sources chaudes terrestres, etc.), mais aussi de biotopes artificiels où les températures sont élevées (canalisations domestiques d'eaux chaudes, installations industrielles, etc.).

Les plus connues des bactéries thermophiles sont *Bacillus stearotherophilus* (Température maximale est de 60°C), une thermophile modérée gram positive proche de *Bacillus subtilis* et *Thermus thermophilus* (T max 80°C). Les bactéries du genre *Thermus* appartiennent au même groupe bactérien que la bactérie radiorésistante *Deinococcus radiodurans* (ce sont des bactéries gram négatives très éloignées d'*E. coli*). Ces thermophiles bactériens sont tous aérobies et hétérotrophes.

La bactérie *Thermus aquaticus* est un exemple d'organisme thermophile ; la haute résistance thermique de son ADN polymérase est utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne.

### III-2- Niche écologique

Les organismes thermophiles et hyperthermophiles peuvent être isolés de biotope comme des systèmes hydrothermaux volcaniques et géothermiques (sources chaudes, cheminées hydrothermales sous marines).

### III- 3-Adaptations physiologiques à la thermophilie

La vie à haute température est rendue possible par un certain nombre de mécanismes adaptatifs et/ou de molécules que l'on retrouve uniquement chez les (hyper)thermophiles. Les protéines des thermophiles et hyperthermophiles sont plus thermostables que celles de leurs homologues mésophiles et fonctionnent de manière optimale à haute température. Néanmoins, il n'existe aucune règle générale permettant d'expliquer cette thermostabilité, chaque protéine adopte sa propre stratégie de stabilisation. Cette thermostabilité intrinsèque des protéines en



général et des enzymes en particulier est le plus souvent due à des modifications mineures de la séquence en acides aminés favorisant le repliement de la protéine sous une forme compacte, avec un nombre réduit de cavités internes, un nombre élevé de ponts ioniques contribuant à maintenir l'ensemble et à résister à la dénaturation.

Dans certains cas, il a également été démontré que des protéines chaperonnes permettaient d'améliorer la thermostabilité. Chez certaines archées hyperthermophiles, la synthèse en grandes quantités de solutés osmocompatibles contribue également à protéger les protéines d'une dégradation thermique.

Chez les organismes vivants, la fluidité des membranes augmente avec la température. Les membranes cytoplasmiques des microorganismes thermophiles possèdent une structure particulière leur permettant de rester stables et fonctionnelles aux températures élevées. Celles des bactéries (hyper)thermophiles sont composées d'une bicouche lipidique formée d'acides gras liés à un glycérol par une liaison ester et sont exceptionnellement riches en acides gras saturés. Cette richesse en acides gras saturés permet d'augmenter la température de fusion de la membrane tout en maintenant une stabilité et une fluidité optimales dans des conditions de thermophilie. Les membranes des archées hyperthermophiles sont composées d'une monocouche lipidique de longues chaînes d'alcools isopréniques attachés au glycérol par des liaisons éther. Cette structure en monocouche est incontestablement plus thermostable que les structures en bicouche des bactéries.

### **III-4-Thermophilie et biotechnologie**

Les enzymes et composés organiques des thermophiles sont convoités pour divers procédés se déroulant à haute température et intéressant des domaines aussi variés que la chimie, la pharmacie, l'agro-alimentaire, ou encore la biologie moléculaire. Les enzymes issus des microorganismes des sources hydrothermales présentent un potentiel important en raison de leur thermostabilité et leur aptitude à résister à la dénaturation sous pression du fait de la piézophilie ou de la piézotolérance de leurs hôtes. Les enzymes de thermophiles ont déjà trouvé ou pourraient trouver des applications dans le blanchiment du papier, la conversion de l'amidon en dérivés sucrés, la dégradation de composés protéiques résistants, l'industrie textile ou le travail de laboratoire sur l'ADN. Plusieurs enzymes provenant de thermophiles des sources hydrothermales sont commercialisées : nombreuses polymérases, ligases, diverses protéases, phosphatases alcalines, beta-mannanases, etc.



### III-5-Les actions menées dans le cadre du bassin de Guaymas

L'une des particularités du bassin de Guaymas (BIG) est que son fond est recouvert d'une couche de sédiments très épaisse où percolent des fluides chauds, à des températures pouvant atteindre 200°C. Cette singularité fait qu'il s'établit un gradient thermique très abrupt entre la surface sédimentaire en contact avec l'eau de mer froide et les premiers mètres ou centimètres de dépôts sédimentaires traversés par les fluides surchauffés. La température y passe donc de 5°C à 200°C sur quelques mètres ou quelques centimètres, alors que d'ordinaire, le gradient thermique moyen qui s'établit dans les sédiments marins est plutôt de l'ordre de 30°C/km. Les microbiologistes ont tenté de mettre à profit cette singularité des sédiments chauds de Guaymas pour étudier sur des carottes sédimentaires de quelques centimètres, les communautés microbiennes et virales présentes le long du gradient thermique. Ils étudieront les communautés bactériennes, archéennes, eucaryotiques et virales à l'échelle de la cellule (cultures) et de ses macromolécules (ADN, ARN, etc). Le but ultime de ce travail sera de trouver la frontière thermique à partir de laquelle on ne retrouve plus de vie dans ces sédiments, la limite à partir de laquelle toutes les macromolécules des êtres vivants sont débobinées (KARINE et al., 2000).

## IV-Importance des enzymes en biotechnologie

Que ce soit pour les bactéries ou les êtres humains, les enzymes sont de véritables "clés de la vie". Elles sont aujourd'hui largement utilisées dans la fabrication des produits alimentaires.

### Importance des enzymes en biotechnologie

C'est au milieu des années 50 que la technologie des enzymes a connu un essor rapide. Le développement de la biochimie a permis une meilleure appréhension du large éventail d'enzymes présentes dans les cellules vivantes ainsi qu'une meilleure compréhension de leur mode d'action. On peut par exemple accroître leur efficacité à travers leur isolement et leur extraction à partir des micro-organismes.

Les enzymes ainsi purifiées ne perdent pas leurs propriétés ; au contraire, ces préparations " acellulaires " sont même plus efficaces.



Les enzymes, molécules protidiques que l'on retrouve au sein des organismes vivants, sont de véritables catalyseurs dans les réactions chimiques. Elles affectent le déroulement d'une réaction chimique tout en gardant leur intégrité.

Elles sont essentielles au métabolisme de tout être vivant ; mais elles peuvent également être utilisées de manière indépendante pour activer des réactions chimiques. Même s'il n'était pas volontaire, leur usage est ancien, comme le montre le rôle des micro-organismes dans la production de nourriture et d'alcool.

Leur efficacité, leur spécificité et leur parfaite intégration dans l'environnement expliquent le rôle de plus en plus important qu'ils jouent dans la fabrication des produits d'alimentation et dans de nombreux autres secteurs industriels.

L'industrie agroalimentaire utilise des polysaccharides (d'origine végétale ou de micro-organismes) pour améliorer ou modifier les propriétés rhéologiques des produits finis :

- Propriétés stabilisantes ou épaississantes : l'amidon, la cellulose, les hémicelluloses et le xanthane.
- Propriétés gélifiantes : les carraghénanes, les pectines et les alginates (susceptibles d'avoir aussi des propriétés stabilisantes et épaississantes en fonction de leur concentration)

Dans l'industrie agro-alimentaire, l'amidation est utilisée pour :

- Greffer des acides aminés essentiels sur les protéines.
- Protéger les groupements  $\epsilon$ -aminés contre la réaction de Maillard.

Dans le domaine de la santé, des recherches actuelles ont pour but :

- L'étude de l'inhibition de la PAM afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.
- La compréhension du mécanisme d'action des enzymes de maturation des précurseurs hormonaux.





Le tableau 2 regroupe les différentes applications des enzymes dans la biotechnologie.

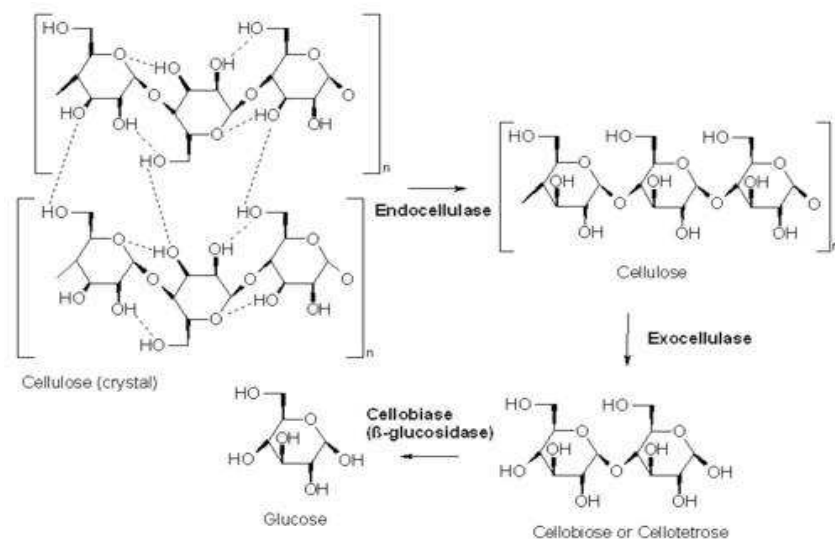
**Tableau N°2 : Différentes utilisations des enzymes en biotechnologie**

Applications	Enzymes utilisées	Utilisation
<b>Industrie de l'amidon</b>	Amylases, amyloglucosidases et glucoamylases  Glucose isomérase	Convertissent l'amidon en glucose et différents sirops.  Convertit le glucose en fructose pour produire des sirops à partir de féculents. Ces sirops ont des propriétés adoucissantes et des valeurs calorifiques plus basses que le saccharose pour le même niveau de douceur.
<b>Industrie de papier</b>	Amylases, xylanases, cellulases et ligninases	Hydrolysent l'amidon pour baisser la viscosité du papier et aident à sa découpe et à son surfaçage.  Les xylanases réduisent la quantité d'agents chimiques nécessaires au blanchiment; les cellulases lissent les fibres, améliorent le drainage de l'eau et facilitent l'enlèvement de l'encre; les ligninases hydrolysent la lignine pour adoucir le papier.
<b>Détergents biologiques</b>	Protéases excrétées par les bactéries  Amylases  Lipases  Cellulases	Pré-trempeage et applications liquides directes pour enlever les tâches d'origine protéique des vêtements.  Détergents pour enlever les résidus d'amidon résistants.  Utilisé pour enlever les taches grasses et huileuses.  Utilisé dans les adoucissants biologiques.
<b>Traitement de la nourriture</b>	Cellulase  Pectinase	Clarification des jus de fruit

Dans ce cadre, nous avons choisi de mettre en évidence l'activité enzymatique des souches préalablement isolés en recherchant l'activité amylase, cellulase et pectinase. Pour cela, nous nous limiterons à ces trois activités dans ce qui suit.

### Activité cellulase

La Cellulase est un complexe enzymatique qui décompose la cellulose en bêta-glucose. Elle est produite principalement par des bactéries symbiotiques dans le tube digestif de ruminants herbivores. Mais à part les ruminants, la plupart des animaux (y compris les humains) ne produisent pas de cellulase et sont donc incapables d'utiliser la plus grande partie d'énergie contenue dans la matière végétale. Par ailleurs, les cellulases sont largement distribués dans la biosphère et sont plus manifestes dans les organismes fongiques et microbiens.



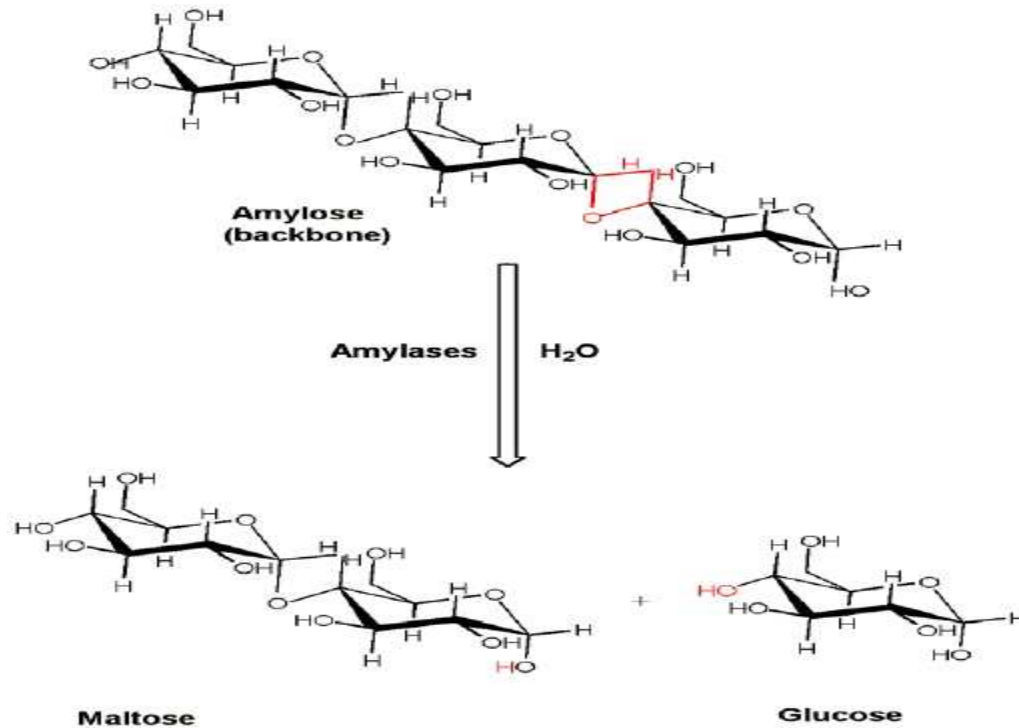
**Figure N°1 :** Hydrolyse de la cellulose par la cellulase

Les conditions optimales d'hydrolyse de la cellulose sont un pH entre 6,5 et 7 et une température entre 39 et 40 °C pour des cellulases classiques liées à la digestion des animaux.

### Activité amylase

L'amidon, est un polymère de l'amylose (polymère linéaire des molécules de glucose liées par liaisons 1,4-glycosidiques) et de l'amylopectine (polymère embranché des molécules de glucose liées par des liaisons 1,4- et 1,6-glycosidiques). Une chaîne se compose de quelques cent à quelques mille unités de glucose qui forment une structure hélicoïdale en laquelle de l'iode peut être

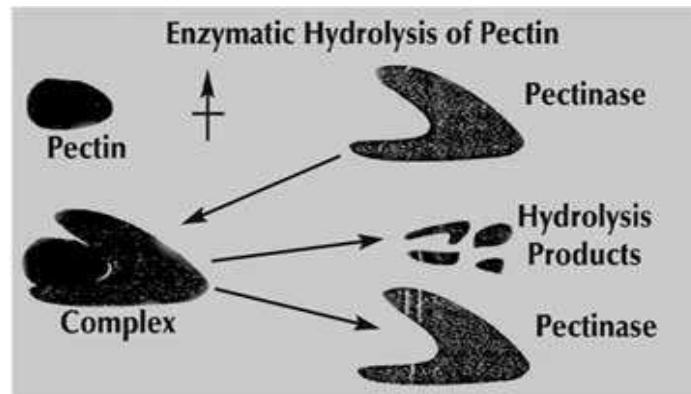
emprisonné. Les bactéries qui produisent l'amylase (amyloglucosidase) peuvent hydrolyser l'amidon en polysaccharides plus courts (dextrines) et finalement en disaccharides et monosaccharides.



**Figure N°2 :** Hydrolyse de l'amidon par l'amylase

### Activité pectinase

La Pectinase est un terme générique désignant des enzymes capables de décomposer la pectine, polysaccharide présent dans les parois cellulaires des plantes. L'une des pectinases les plus étudiées et les plus utilisées commercialement est la polygalacturonase. Elle peut être dénaturée par l'action néfaste d'une trop grande ou trop faible température ou de trop grandes acidités ou alcalinités. Son pH d'efficacité maximale se situe entre 4,0 et 5,0. Sa température d'efficacité maximale est de 45°C.



**Figure N°3:** Hydrolyse de la pectine par la pectinase

## Partie pratique

### 1<sup>ère</sup> partie : Analyse physicochimique et microbiologique des eaux thermales

#### Objectif :

Le présent travail vise à déterminer la qualité physico-chimique et bactéries pathogènes de l'eau à la source, au réservoir et à la piscine afin de détecter d'éventuelle pollution et tout danger ou risque sanitaire pouvant affecter la santé de la population

#### I-Analyse physicochimique des eaux thermales

Les échantillons sont collectés à partir des différents eaux thermales se situant à proximité de la ville de Fès (Moulay yacoub, Ain Allah et Sidi Harazem) dans des flacons étanches, leur transport jusqu'au Laboratoire d'écologie fonctionnelle et d'environnement de la faculté des sciences et techniques de Fès, se fait au moyen d'une glacière dont la température est d'environ  $5(+/-) 3^{\circ}\text{C}$ . Le prélèvement est réalisé en période d'Hiver-printemps de l'an 2013 au niveau de trois stations thermales à savoir :



Station thermale Moulay Yacoub (au niveau de R, S, P)



Station Sidi Harazem (au niveau du R)



Station thermale Ain Allah (au niveau du R et P)

**Figure 4** : Différents points de prélèvement

**NB** : Un prélèvement mensuel a été effectué, à l'exception de la station Moulay Yacoub où un prélèvement bimensuel a été réalisé.

Au moment du prélèvement, les échantillons sont contrôlés en mesurant la température, le pH, la conductivité, l'O<sub>2</sub> dissous et l'ammonium car ces paramètres sont sensibles aux conditions du milieu et sont susceptibles de varier dans des proportions importantes s'ils ne sont pas mesurés in situ (RODIER, 1996).

Pour les autres paramètres, l'eau est conservée dans une température d'environ 4°C et les analyses sont effectuées dans les 24h à 48h qui suivent le prélèvement.

**NB** : le prélèvement est réalisé mensuellement sauf au niveau de la station Moulay Yacoub où le prélèvement a été réalisé bimensuellement.

### **Paramètres mesurés :**

#### ***1-1- La dureté totale de l'eau***

La dureté totale d'une eau est la concentration totale en ions calcium, magnésium et autres cations bivalents et trivalents dans cette eau. La dureté calcique d'une eau est la concentration en ions calcium dans cette eau (Rodier, 1996)



**Principe :** le calcium et le magnésium présents dans l'eau sont complexés par l'éthylène diamine tétra acétate disodique(EDTA). Le noir d'ériochrome T, qui donne une couleur rouge foncée ou violette en présence des ions calcium et magnésium, est utilisé comme indicateur pour la détermination de la dureté totale et la dureté calcique.

L'acide calcone carboxylique est utilisé comme indicateur pour le dosage du calcium. Le magnésium est précipité lors du dosage sous forme d'hydroxyde et n'interfère pas.

**Protocole :**

Nous mélangeons 100 ml de l'échantillon avec 5 ml de la solution tampon (54 g de Chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) avec 350 ml d'ammonium concentré) en complétant à 1000 ml avec de l'eau distillée puis nous ajoutons une spatule d'indicateur noir d'ériochrome T.

Nous titrons par la solution complexométrique (EDTA : 0,02M) jusqu'au virage du rouge au bleu.

***1-2-La dureté calcique***

- Nous suivons le même protocole et nous titrons par la solution complexométrique (EDTA 0,02M ; 7,445g d'EDTA dans 1l d'eau distillée) jusqu'au virage du rose au bleu royal.

**Réactifs**

- Noir d'ériochrome T (indicateur)

Dans un mortier de porcelaine, nous broyons 100 g de (NaCl) avec 1g de noir d'ériochrome T jusqu'à obtention d'une poudre fine très homogène.

***1-3-Les nitrates (NO<sub>3</sub>-)***

La mesure des nitrates permet de détecter dans l'eau souterraine leur présence qui peut être due aux engrais, aux systèmes septiques, au stockage des engrais ou aux systèmes de diffusions.

**Protocole**

Nous mélangeons 10 ml d'échantillon avec 1ml de salicylate de Na (0.5%), que nous chauffons à sec (80°C) pour former un résidu que nous mélangeons avec 2ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 15 ml d'eau distillée,



ensuite nous ajoutons 15 ml de tartrate double de Na /K (400g de Na OH et 60g de tartrate double de Na /K par litre).

Nous effectuons la mesure spectrométrique à une longueur d'onde de 415 nm.

**N. B.** La Solution de salicylate de Na est préparée au moment de l'emploi.

#### **I-4-Les nitrites NO<sub>2</sub>-**

##### **Protocole**

Nous mélangeons 50 ml de l'échantillon avec 1 ml de réactif de diazotation (80 ml d'eau distillé + 10 ml d'acide ortho phosphorique + 4g de sulfanilamide), après solubilisation, nous ajoutons 0,2 g de N-naphtyl Ethylène diamine. Puis, nous complétons jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée. et on laisse reposer 10 min

Nous effectuons la mesure spectrométrique à 537 nm.

#### **I-5-L'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

L'ammonium est le principal indicateur chimique de pollution directe (Décomposition de la Matière organique et urée).

##### **Protocole**

Dans une fiole conique de 100 ml, Nous introduisons 20 ml d'échantillon avec 1 ml de solution de phénol – nitroprussiate (on dissous 3,5 g de phénol avec 0,04 g de nitroprussiate de sodium (Na<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>5</sub> NO, 2 H<sub>2</sub>O) dans 100 ml d'eau) et 1ml de solution alcaline complexant). Ces 2 solutions sont fixées sur le terrain.

Nous effectuons la mesure spectrométrique à la longueur d'onde d'absorption 630 nm à partir de 6h à l'abri de la lumière.

**NB :** la solution de phénol –nitroprussiate est conservée au réfrigérateur a l'abri de la lumière.

#### **I-6- LES orthophosphates**



La présence du phosphore dans les eaux naturelles vient principalement de l'utilisation des détergents ainsi que du drainage des terres agricoles fertilisées. En général, le phosphore n'est pas toxique pour l'homme.

### **Protocole**

Nous mélangeons 20 ml de l'échantillon avec 1 ml d'acide ascorbique (20g/l), après agitation, nous ajoutons 4 ml de réactif combiné (50 ml d'acide sulfurique (15% (V/V)), 5 ml de la solution de tartrate de potassium et d'antimoine (2,8 g/l), 15 ml de la solution de molybdate d'ammonium (40 g/l); 20 g de molybdate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O) dans 500 ml d'eau distillée (à conserver à 4°C dans un flacon en polyéthylène), q.s.p. eau 100 ml). Après 30 minutes, nous attendons le développement de la coloration bleue.

Nous effectuons la mesure spectrométrique à l'une des deux longueurs d'onde d'adsorption (700 ou 880 nm).

**N. B.** Le Réactif combiné est préparé dans une fiole jaugée de 100 ml et conservé à 4°C.

## **I 7- Le phosphore total**

Nous mélangeons 50 ml d'échantillon avec 1 ml d'acide fort (solution à environ 15% (V/V) d'acide) et 1 ml de persulfate d'ammonium. Après autoclavage 30 min à 120 °C, nous ajoutons une goutte de phenolphthaléine.

Nous neutralisons par la solution de NaOH (10N) jusqu'à coloration rose, ensuite nous décolorons par l'acide fort.

Après refroidissement, nous ajustons à un volume de 50 ml 4 ml du réactif fort. Après 10 minutes, nous pouvons voir le développement de la coloration.

Nous effectuons la mesure spectrométrique à la longueur d'onde d'absorption 882 nm.

## **I-8-La conductivité**

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau.

## **I-9- Le pH**





Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions  $H^+$  de l'eau. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14. Ce paramètre caractérise un grand nombre d'équilibre physico-chimique et dépend de facteurs multiples, dont l'origine de l'eau.

## I-10-La turbidité

La mesure de la turbidité permet de préciser les informations visuelles sur l'eau. La turbidité traduit la présence de particules en suspension dans l'eau (débris organiques, argiles, organismes microscopiques...). Les désagréments causés par une turbidité auprès des usagers sont relatifs car certaines populations sont habituées à consommer une eau plus ou moins trouble et n'apprécient pas les qualités d'une eau très claire. Cependant, une turbidité forte peut permettre à des micro-organismes de se fixer sur des particules en suspension. La turbidité se mesure sur le terrain à l'aide d'un turbidimètre.

## I-11-L'oxygène dissous :

L'eau absorbe autant d'oxygène que nécessaire pour que les pressions partielles d'oxygène dans le liquide et dans l'air soient en équilibre. La solubilité de l'oxygène dans l'eau est fonction de la pression atmosphérique (donc de l'altitude), de la température et de la minéralisation de l'eau : la saturation en  $O_2$  diminue lorsque la température et l'altitude augmentent.

La concentration en oxygène dissous est un paramètre essentiel dans le maintien de la vie, et donc dans les phénomènes de dégradation de la matière organique et de la photosynthèse. C'est un paramètre utilisé essentiellement pour les eaux de surface.

Une récapitulation des différents paramètres physicochimiques est schématisée dans le tableau ci – dessous :

**Tableau N° 3:** Valeur maximale admissible des différents paramètres physicochimiques recherchés dans les eaux de boissons humaines

Paramètres chimiques	Valeur maximale admissible (Rodier et al., 1996)
----------------------	---



<i>Dureté totale (TH en degré français)</i>	<i>10°C (référence)</i>
<b>Conductivité en microS. cm<sup>-1</sup> à 20 °C</b>	< 400 (conseillée)
<i>Nitrates en mg/l de NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	0,5
<i>Nitrites en mg/l de NO<sub>2</sub><sup>-</sup></i>	50
<i>Ammonium en mg/l de NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i>	0.5
<i>Oxydabilité au KMnO<sub>4</sub> à chaud en 10 mn en mg/l</i>	5
<i>Chlorures en mg/l de Cl<sup>-</sup></i>	200
<i>Sulfates en mg/l de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup></i>	250
<i>Titre Alcalimétrique Complet (en degré français)</i>	10 °
<i>pH à 20 °C</i>	> 6.5 et < 9
<i>Turbidité (u.NTU.)</i>	2

## *II-Analyse bactériologique des Eaux des sources thermales*

### *Méthodologie*

Nous effectuons le prélèvement dans des flacons stériles de 500 ml en verre à bouchon rodé, en laissant dans le flacon un espace d'air afin de faciliter la remise en suspension des micro-organismes par agitation avant l'ensemencement dans les milieux de culture appropriés (tableau 4). Les échantillons sont conservés dans une glacière afin de les transporter au LRDEHM.

Nous préparons une série de dilution pour chaque échantillon d'eau en allant de 10<sup>-1</sup> jusqu'à 10<sup>-2</sup>.

Nous appliquons la technique de filtration qui consiste à filtrer à travers une membrane (de porosité 0,45 µm pour les *Coliformes* et une porosité de 0,22µm pour les *Anaérobies sulfitoréducteurs*, un volume de 100ml de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane dans une boîte contenant un milieu de culture approprié. Les bactéries éventuellement présentes sur le filtre pourront ainsi se développer durant la période d'incubation et donner naissance à des colonies facilement identifiables. Le comptage des UFC (Unités Formants Colonies) permet d'évaluer la qualité



microbiologique de l'eau. Selon le milieu de culture (sélectif) où est déposé le filtre, dont le but de mettre en évidence la présence de différents microorganismes. C'est une méthode avantageuse car elle est rapide et peu coûteuse.

Le tableau suivant regroupe les différentes bactéries recherchées aux niveaux des eaux thermales.

**Tableau N°4: Microorganismes recherchés dans les eaux thermales**

Micro-organismes recherchés	Méthodes utilisées	Volume d'eau filtré	Milieu de culture	Incubation	Valeur maximale admissible (UFC/ml)	Référence de la méthode d'analyse étudiée
<i>Coliformes</i>	Filtration sur membrane (porosité de 0.45µm)	100ml	Tergitol au TTC	48h à 44°C	0 dans 95 % des analyses (eau non traitée) 0	ISO 9308-1, NM 03.7.003, 2007
<i>ASR (anaérobie sulfite réducteurs)</i>	Filtration sur membrane (porosité de 0.22µm)	100ml	SPS	37°C à 24h	1(20ml d'échantillon)	ISO 6461-2, NM 03.7.004, 2007
<i>FMAT</i>	Ensemencement en profondeur	1ml	Gélose à l'extrait de levure	37°C à 24h 22°C à 24h	2 10 <sup>3</sup> (22°C) 1 10 <sup>4</sup> (37°C)	ISO 6222, NM 03.7.005, 2007
<i>Streptocoques fécaux</i>	Filtration sur membrane (porosité de 0.45µm)	100ml	SLANETZ	48h à 37°C	0 (50 ml d'échantillon)	ISO 7899-2, NM 03.7.006, 2007
<i>Levure et moisissures</i>	Ensemencement en surface	0,1ml	Milieu SABOURAU D	37°C/24h à 48h	0	-----
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Filtration sur membrane (porosité de 0.45µm)	100ml	CITRIMIDE	37°C /24h	0	CC MA et MS N°1 du 09-05-1983

**NB :** L'ensemble des milieux de culture, méthodes et matériels ont subi un contrôle de qualité rigoureux

Les bactéries recherchées dans les eaux thermales sont les suivantes :

### 1-Recherche des Coliformes sur milieu Tergitol 7 au TTC

Nous utilisons la gélose Tergitol 7 au TTC pour les recherches et dénombrements des *Coliformes et Coliformes thermotolérants* des eaux par la méthode de la membrane filtrante. Le Tergitol 7 inhibe



la croissance des germes à gram positif, réduit l'envahissement du milieu par le Protéus et favorise le recouvrement des coliformes. Autre additif, le T.T.C est réduit très rapidement par la majorité des bactéries coliformes et forme un formazan de couleur rose ou rouge. Enfin, les micro-organismes capables de fermenter le lactose présents dans le milieu, donnent des colonies cernées de halos jaunes, coloration due au virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol.

## Lecture

Les colonies bleues ou vertes sont lactose -, les colonies jaunes sont lactose +. La réduction du TTC en composé rouge est faible avec *Escherichia coli* et *Enterobacter aerogenes* qui donnent donc des colonies jaunes alors que celles des autres coliformes seront rose-rouges et entourées d'un halo jaune.

Les cinq colonies suspectes sont ensemencé sur un milieu PCA, après incubation nous procédons au test oxydase (page 33)

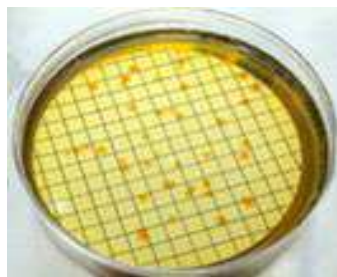
Un résultat oxydase positif subit un test à l'indole pour la recherche d'*Escherichia coli*. Un résultat indole+ signifie que la colonie concernée correspond à *Escherichia coli*

## Exemple

Si nous possédons au total 20 colonies dans la boîte ce qui est supérieur à 5, nous en identifions seulement 5 colonies.

Si nous obtenons parmi les cinq colonies identifiées, quatre colonies indole-

Ce qui correspond à  $(80\% * 20) = 16$  UFC/100ml



**Figure N°5** : Aspect des Coliformes sur boîte

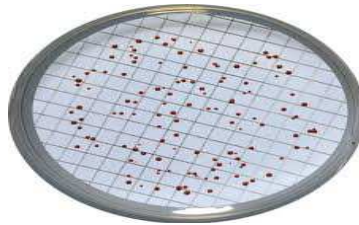
## 2-Recherche des Streptocoques fécaux sur milieu Slanetz et Bartley



Nous utilisons la gélose de Slanetz pour la recherche et le dénombrement des *Entérocoques* dans les eaux par la méthode de la membrane filtrante. Ce milieu de dénombrement contient de l'azide de sodium qui inhibe les bactéries Gram- et sélectionne les streptocoques

### Lecture

Les *Entérocoques* donnent des colonies roses ou rouges. Après incubation, nous déposons la membrane sur une boîte contenant la gélose BEA (bile, esculine, azide), puis nous l'incubons à 4h à 44°C. Cette gélose permet la sélection des *Entérocoques* et des *streptocoques* du groupe D, l'azide inhibe la croissance des bactéries Gram- et tous les *Streptocoques* sauf celle du groupe D, la bile de Bœuf inhibe la croissance des bactéries Gram+.



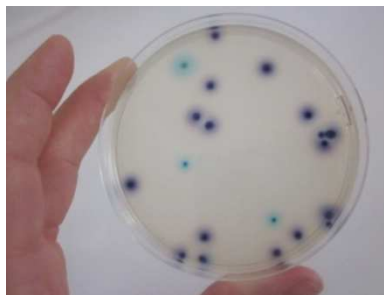
**Figure N°6 :** Aspect des Streptocoques fécaux sur boîte\_

### 3- Recherche des ASR (Anaérobies Sulfito Réducteurs)

Nous chauffons 100 ml de l'échantillon à 80°C pendant 15min afin d'éliminer la forme végétative puis nous filtrons à travers une membrane de porosité de 0.22µm que nous déposons sur une boîte contenant le milieu SPS.

Les colonies suspectes sont noires.

Si l'incubation est réalisée dans des jarres anaérobies à 37°C, nous devons lire les boîtes dans la demi-heure qui suit leur sortie de la jarre car le noircissement peut disparaître par oxydation à l'air.



**Figure N°7:** Aspect des ASR sur boîte

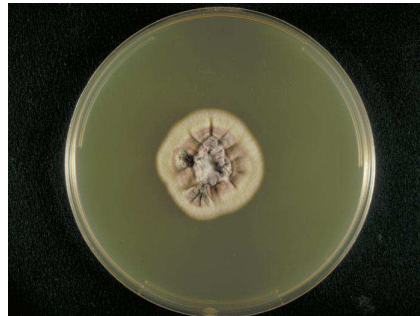


#### 4-Recherche des levures et moisissures sur milieu SABOURAUD

Nous ensemençons un volume de 0,1 ml de l'échantillon mère par étalement sur milieu sabouraud naturellement acide, elle inhibe la croissance de nombreuses bactéries.

##### **Lecture :**

Les champignons sont connus par leur morphologie typique.



**Figure N°8 :** Aspect des moisissures sur boite

#### 5-Recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale

Nous utilisons la gélose à l'extrait de levure en bactériologie des eaux pour le dénombrement des microorganismes revivifiants par comptage des colonies à 36 et 22°C. La méthode vise à mesurer l'efficacité de fonctionnement du traitement des eaux potables et plus généralement de tous les types d'eaux.

Les substances nutritives apportées par la Tryptone et les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

##### **Lecture :**

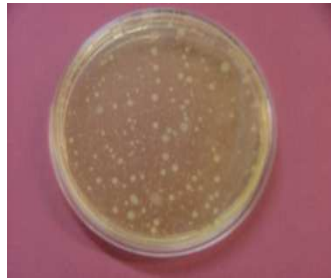
Chaque colonie provient d'une UFC (Unité Formant Colonie) cela veut dire que l'on considère que la colonie est issue soit d'une unité microbienne: un micro-organisme ou d'une spore.

Seules les boites contenant 30 à 300 colonies sont considérées.

Concentration bactérienne:

$(\text{Nombre de colonies} * \text{Facteur de dilution}) / \text{Volume ensemencé}$

Avec facteur de dilution (1/d).



**Figure N°9:** Aspect de la FMAT sur boîte

## 6-Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

Nous utilisons la gélose Cétrimide sélectif, pour la croissance et l'identification des *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide inhibe la croissance des bactéries autres que le *P. aeruginosa* et favorise la production des pigmentations fluorescéine et pyocyanine. La méthode utilisée est la filtration sur membrane de porosité 0,45µm. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h à 48h.

A 37°C, nous avons le développement de *P. aeruginosa* et éventuellement, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. maltophilia*. A 42°C, on a un développement presque exclusif de *P. aeruginosa*.

Nous ensemençons les colonies suspectes dans des tubes King A et King B afin de détecter la fluorescence que nous incubons à 37°C pendant 24h.



**Figure N° 10:** Aspect de *Pseudomonas* sur boîte

## 2ème partie : Identification des thermophiles et caractérisation de leur molécules bioactives

### Objectif



Cette partie a pour but d'isoler des bactéries thermophiles à partir des eaux thermales étudiées et d'identifier certaines de leurs activités enzymatiques (amylase, cellulase et pectinase). Ainsi que de réaliser une cinétique enzymatique des souches les plus performantes dans le but d'optimiser la concentration de l'enzyme.

### *I-Matériels et méthodes*

Nous réalisons l'isolement des bactéries thermophiles au niveau des eaux thermales en utilisant un ensemble de milieux de culture (YAVUZ et al., 2000),( GOMRI., 2011) en ensemencant par étalement en surface. Nous incubons à 60°C pendant une période de 24h.

Le tableau ci-dessous regroupe la composition chimique des milieux de culture utilisés pour l'isolement des thermophiles :

**Tableau N°5:** Milieux utilisés pour l'isolement et la purification des bactéries à pH7.4+- 0.2

Milieu	1	2	3	4	5	6	Bouillon d'enrichissement (pour les sédiments)	Solution saline mère (30%)*
<b>Constituant</b>	<b>Quantités (% p/v, v/v)</b>							
NaCl	0,2		0,5				0,2	23,4
NaNO <sub>3</sub>				0,2				
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O				0,05				6
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O								4,2
KCl				0,05				0,6
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).3H <sub>2</sub> O				0,001				
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O								0,1
NaHCO <sub>3</sub>								0,02
NaBr								0,07
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				0,014				
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				0,12				
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>					0,1			
Glucose						0,1		
Amidon soluble		0,1						
carboxyméthycellulose								
Huile d'olive								
Tween 20								
Tween 80								
Caséine								
Gélatine								
Extrait de levure	0,4	0,1	0,25	0,002	0,1	0,5	0,4	
Peptone	0,8	0,5	0,5		0,1	0,5	0,8	
Extrait de viande			0,1					
Solution saline					1	7,5		
Agar	3	3	1,5	3	3	3		
Eau distillée **	100	100	100	100	100	100	100	100

\*Les solutions salines des milieux 5 et 6 sont les dilutions de la solution mère à 30% de salinité (Torreblanca *et al.*, 1986). \*\* l'eau distillée a été remplacée par de l'eau de source filtrée pour les milieux 1, 2, 3 et 4.

### *II-Testes d'identification des bactéries thermophiles :*





Les testes d'identification sont examinés après deux ou trois jours de l'incubation ;

### a-Coloration de Gram

- Nous réalisons une observation microscopique pour mettre en évidence la nature de la paroi en faisant appel à la coloration de Gram.

### Principe

Lorsque le frottis est bien fixé à la chaleur, nous réalisons le protocole suivant :

1. Nous déposons les lames sur le support au-dessus de l'évier.
2. Nous couvrons les lames avec le cristal violet qu'on laisse agir 60 secondes et nous rinçons à l'eau courante.
3. Nous exposons les lames avec une solution d'iode pendant 1 minute. Nous rinçons soigneusement avec l'eau du robinet. Enlever le surplus d'eau.
4. Nous couvrons les lames avec le mélange d'alcool-acétone pendant 10 secondes. Nous rinçons à l'eau du robinet.
5. Nous traitons les lames avec la safranine qu'on laisse agir 60 secondes. Nous rinçons à l'eau courante.

En suivant les étapes d'utilisation du microscope, nous examinons les frottis bactériens colorés en employant l'objectif à immersion.

### b-Activité oxydase :

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre (MARCHAL ET BOURDON, 1982).

### Technique

Sur une lame flambée, nous déposons un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-paraphénylènediamine. À l'aide d'une pipette pasteur flambée, nous prélevons d'une colonie de la bactérie à identifier (culture de 18-24heures) que nous déposons sur le disque.

### Lecture



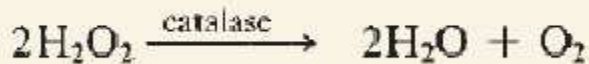
Apparition d'une coloration violette après 20secondes: la souche est dite oxydase positive.

### c-Activité catalase :

- L'activité catalase est déterminée par la formation de bulles d'air, qui mettent en évidence une production d'oxygène, en présence d'une solution de peroxyde d'hydrogène de 3%.

### Principe

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante (MARCHAL et BOURDON, 1982):



### Technique

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, nous déposons une colonie bactérienne sur une goutte de l'eau oxygénée (à 10 volumes).

### Lecture

Résultat catalase+ : effervescence.

Résultat catalase - : pas d'effervescence

### d-Fermentation des sucres, production du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S

- Le milieu Kligler permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose et du glucose (avec ou sans production de gaz), ainsi que de la production de sulfure d'hydrogène.

### Principe

- Les fermentations du lactose et du glucose, qui permettent la différenciation des entérobactéries, se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).



- Les microorganismes qui fermentent le glucose, mais pas le lactose (salmonelles ou shigelles), produisent initialement une pente jaune due à l'acidification obtenue par fermentation du glucose présent en faible quantité. Lorsque le glucose est complètement utilisé dans l'environnement aérobie de la pente, la réaction s'alcalinise par oxydation des acides produits, phénomène aboutissant à l'apparition d'une coloration rouge en surface. Cette alcalinisation n'apparaît pas en profondeur dans le culot, où la coloration se maintient au jaune.
- Les germes fermentant le lactose et le glucose font virer au jaune la pente et le culot par une production importante d'acide, ce qui suffit à maintenir un pH acide en surface.
- Les microorganismes ne fermentant aucun des deux glucides ne modifient pas la couleur du milieu.
- La production d' $H_2S$  se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.
- La production de gaz ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) résultant de la fermentation d'un hydrate de carbone, se traduit par l'apparition de bulles d'air ou bien par la fragmentation de la gélose.

### **Méthodologie :**

A partir d'une colonie suspecte, nous prélevons à partir d'un milieu d'isolement sélectif, nous ensemençons un tube kligler au niveau du culot par piqûre centrale et à la pente inclinée par des stries serrées.

L'incubation se fait à  $37^\circ C$  pendant 24 heures, capsules desserrées, de manière à favoriser les échanges.

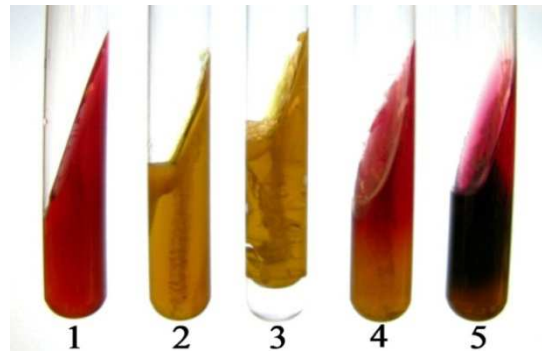
### **Lecture :**

Le milieu de Kligler fournit quatre renseignements principaux :

- (1) Fermentation du glucose : culot rouge : glucose non fermenté, culot jaune : glucose fermenté.
- (2) Fermentation du lactose : Pente inclinée rouge : lactose non fermenté, Pente inclinée jaune: lactose fermenté.
- (3) Production de gaz : Apparition de bulles de gaz dans le culot.



(4) Formation d' $H_2S$  Production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.



**Figure N°11 :** Mise en évidence de la fermentation du glucose et du lactose et la production de gaz ainsi que la formation de  $H_2S$  chez les isolats thermophiles

### e-Galerie API :

#### Principe:

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries.

Elle comprend 20 tests biochimiques.

Nous nous intéressons à identifier la souche F (Galerie API 20 E) et la souche PAITH (Galerie API 20 NE) afin de déterminer l'espèce bactérienne en question

#### Technique de la galerie API 20 E :

Inoculation de la galerie :

Nous remplissons les tubules par une suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie). Pour les substrats dont le sigle est encadré, nous remplissons la cupule de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, nous ajoutons de l'huile de



paraffine soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

Testes négatifs



Testes positifs :



Lecture et interprétation :

Après incubation pendant 18 à 24 h à 37°C, nous réalisons la lecture en suivant le développement des réactions colorées. Nous convertissons en un code à sept chiffres qui est appelé Analytical Profile Index, ce qui correspond d'ailleurs à l'abréviation donnée à ces galeries «API» permettant ainsi l'identification des espèces. La fiabilité de ce système est très élevée.

### **Technique de la galerie API 20NE :**

Inoculation de la galerie :

Nous remplissons les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, nous posons la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.



Nous ouvrons une ampoule du milieu d'API et on y transfère environ 200 µl de la suspension précédente. Nous homogénéisons avec la pipette en évitant la formation de bulles d'air

Nous remplissons tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.

Nous ajoutons de l'huile de paraffine aux cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.

Nous refermons la boîte d'incubation et incubons à  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures ( $\pm 2$  heures).

### Lecture et interprétation

Après incubation, nous nous référons au tableau de lecture.

Nous notons sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).

La révélation des deux tests  $\text{NO}_3$  et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, nous plaçons le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests  $\text{NO}_3$  et TRP.



**Figure N°12:** Identification par la galerie API 20 NE

## *II-Mise en évidence de l'activité enzymatique des bactéries thermophiles :*

### **Méthodologie (Shlegel et al., 1986).**

L'activité enzymatique est réalisée au sein du laboratoire de biotechnologie microbienne au sein de la Faculté des sciences et techniques de Fès, nous avons choisi de mettre en évidence :



## II-1-Activité cellulase

### Principe :

L'activité cellulase est mise en évidence en utilisant un milieu contenant de la carboxyméthyl cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Ce milieu estensemencé par les souches testées et leur croissance met en évidence la présence de l'enzyme cellulase.

### Mode opératoire

Nous procédons à l'autoclavage du milieu M9 (Annexe3) pendant 15min à 110°C. Ensuite, nous ajoutons les produits suivants :

1/ 0,01g de  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  (soit 1ml d'une solution à 0,1M)

2/ 0,24g de  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  (soit 1ml d'une solution à 1M)

Ensuite, nous procédons à l'autoclavage du 2<sup>ème</sup> milieu (CMC; Annexe 4) de nouveau pendant 15minutes à 110°C et nous le distribuons dans des boîtes de pétrie.

A partir d'une culture sur milieu solide, nous prélevons une colonie, ensuite nous la déposons sur une boîte contenant du CMC (carboxyméthyl cellulose) gélosé.

Nous incubons les boîtes de pétri durant 24 à 48h (bactéries à 37°C, levures à 30°C ) sur milieu solide.

Pour mettre en évidence l'activité cellulolytique, nous ajoutons une solution de rouge Congo à une concentration de 1mg/ml suivie de trois rinçages avec une solution de NaCl (1M). Pour cela, nous ajoutons un volume de 10 ml dans la boîte.

Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulase.

## II-2- Activité amylase

### Principe

Les souches à activité amylase sont détectées grâce à une mise en culture sur milieu à base d'amidon(Annexe1).

### Mode opératoire

Nous ajoutons 20g d'agar par litre du milieu à base d'amidon. Ensuite, nous procédons à l'autoclavage pendant 15min à 110°C.

A partir d'une culture sur milieu solide, nous prélevons une colonie, et nous la déposons sur boîte contenant un milieu à base d'amidon gélosé.



Pour mettre en évidence l'activité amylase, nous ajoutons 3 ml d'une solution iodée pendant 15 minutes suivie par deux rinçages à l'eau distillé.

Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité amylase.

## II-3- Activité pectinase

### Principe

Le criblage des souches productrices de l'enzyme pectinase est réalisé en utilisant un milieu qui contient l'acide polygalacturonique (PGA), substrat de la polygalacturonase.

### Mode opératoire

Nous ajustons le pH du milieu solide PGA (Annexe 2) à 5 -6 avec de la soude afin d'éviter une trop forte acidité qui empêche la solidification du milieu.

Après autoclavage 15min à 110°C, nous mélangeons les deux solutions en les versant dans les boîtes de Pétri (proportion : 80% de milieu solide et 20% de tampon).

Nous ajoutons une solution d'acétate de cuivre 7,5% dans chaque boîte pour mettre en évidence l'halo de l'activité pectinase, après nous procédons à trois rinçages à l'eau distillée.

### *III-Cinétique enzymatique*

L'activité enzymatique est mesurée selon la méthode de (MANDELS et al.,1976), en suivant une cinétique de la progression de production de l'enzyme au cours du temps, afin de déterminer le jour optimum de la production de l'enzyme. Nous avons choisi de mettre en évidence l'activité cellulolytique par le dosage de la quantité de glucose produit à partir du CMC en fonction de la mesure de l'absorbance (GHOS, 1987).

Les résultats sont exprimés en unités internationales :( 1UI=la quantité d'enzymes nécessaire pour libérer à partir du substrat soluble ou insoluble carboxyméthylecellulose (CMC), 1 $\mu$ mol de glucose dans 1 ml pendant 1 min.

### Méthodologie :

En premier lieu, nous préparons une courbe étalon à partir d'une solution mère de 1 g/l de glucose par des valeurs allant de 0 à 1g/l.





Nous utilisons les microorganismes les plus performants pour l'activité cellulase dans un milieu CMC liquide (Annexe 4). Après 24h ,48h ,72h ,96h et 120h d'incubation à 37°C, nous prélevons 1.2ml de la culture que nous centrifugeons à 7000 tpm pendant 10 min. Nous éliminons le culot, alors que le surnageant est subdivisé entre un tube témoin et un tube test.

En parallèle, à partir de ces cultures, nous faisons le suivi de la croissance bactérienne en mesurant l'absorbance à  $\lambda=600$  nm. Le nombre de colonies est obtenu par la relation suivante :

Une DO correspond à  $1 \cdot 10^8$  UFC (Unité Formant Colonie).

### **Tube Test :**

500 $\mu$ l de surnageant

500 $\mu$ l de substrat (CMC à 2% dans un tampon acétate de sodium 0,1M pH 4,8)

### **Tube Témoin :**

500 $\mu$ l du surnageant

500 $\mu$ l du tampon acétate de sodium (0,1M pH 4,8)

### **Le zéro des spectrophotomètres**

500 $\mu$ l de tampon acétate de sodium (0,1M pH 4,8)

500 $\mu$ l du substrat

Nous incubons l'ensemble des tubes à 50°C pendant 30min.

Une unité internationale de cellulase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole de glucose par ml pendant une minute. Elle est calculée selon la formule suivante.

L'activité CMCase en  $\mu$ mol /ml /min =

Concentration en glucose  
— 0,185mg de glucose / $\mu$ mol —

1ml d'enzymes x 30min



---

Avec 0,185mg/ $\mu$ mol, la masse molaire du glucose C<sub>6</sub> H<sub>12</sub> O<sub>6</sub>.

La concentration en CMC est obtenue grâce à la courbe de la gamme étalon.

# Résultats et Discussions

1ère partie : Résultats des analyses physicochimiques et bactériologiques des eaux thermales

## *I-Résultats des analyses physicochimiques des eaux thermales*

Les tableaux (6, 7, 8) suivants regroupent les différents résultats obtenus pour les paramètres physicochimiques au niveau des 3 stations thermales durant la période Hiver-Printemps.



La température et la conductivité sont des paramètres qui ont été mesurés in situ.

## **1-Résultats des analyses physicochimiques des eaux d'Ain Allah**

L'analyse mensuelle des paramètres physico-chimiques de la station Ain Allah sont illustrées sur le tableau 6 :

**Tableau N°6:** Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale Ain Allah

Mois /Paramètres	Février		Mars		Avril		Mai	
	R	P	R	P	R	P	R	P
Température °C	38,4	36,8	38,4	36,4	40,9	39,2	42,1	38
PH	7,1	7,08	7,1	7,09	7,1	7,25	7,09	7,1
Conductivité MS/cm	831	842	830	840	830	840	829	840
Nitrate mg/l	0,058	0,005	0,001	0,002	0,001	0,002	0,05	0,002
Orthophosphates mg/l	0,003	0,002	0,002	0,01	0,001	0,0125	0,021	0,04
Azote total mg/l	0	0	0	0	0	0	0	0
Phosphore total mg/l	0,004	0,005	0,0019	0,01	0,002	0,008	0,004	0,003
Ammonium mg/l	0,04	0,045	0,015	0	0,004	0,02	0,02	0,024
O2 dissous (mg/l)	43,9	36	44	30	501	47,5	34	24
TA meq/l	0	0	0	0	0	0	0	00
TAC meq/l	33	45,5	30	32	21	23,5	40	30,5
Dureté total milmol/titre	7,7	5,6	7,2	8	3,6	3	3,5	3,4

- ✓ Les variations temporelles de la température au niveau de la station thermale Ain Allah sont largement semblables: les plus basses sont enregistrées en hiver (36,8°C), les plus élevées au printemps (42,1°C). La température au niveau de l'eau de réservoir (38,62 °C) est largement inférieure à celle de l'eau de la piscine (39,88°C), ce qui concorde avec les résultats enregistrés (SALAME et al., 2013). Toutefois, les valeurs enregistrées à Ain Allah sont supérieures à celles enregistrées par BEN MOUSSA et al., (2010); (entre 29.10°C et 34°C).
- ✓ Le pH relevé ne montre pas de variations importantes entre les sites de prélèvement avec un pH proche de la neutralité aussi bien au niveau de l'eau de réservoir(7,1) qu'au niveau l'eau de piscine (7,08 à 7,25), ce qui concorde avec les résultats d'une étude préalable (SALAME et al.,



2013). Ces résultats sont conformes à la norme marocaine (03.07.001/2006) des eaux de boissons humaines.

- ✓ L'eau de la station thermale étudiée est caractérisée par une conductivité inférieure à celle enregistrée par BEN MOUSSA et al., (2010) . Elle est largement supérieure au niveau de l'eau de la piscine qu'au niveau du réservoir, avec une valeur stable tout le long de la période d'étude, ce qui ne concorde pas avec les résultats précédents (la conductivité de l'eau du robinet et de la piscine sont respectivement  $843,93 \mu\text{s/cm}$ ,  $824,5 \mu\text{s/cm}$  (SALAME et al., 2013). Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les eaux de la station sont moyennement minéralisées et répondent aux normes en vigueur (NM 03.07.001).
- ✓ Le suivi des teneurs en nitrates montre qu'elles évoluent selon les saisons. Nous avons enregistré ainsi une augmentation des teneurs en nitrate en hiver ( $0,058 \text{ mg/l}$ ) par rapport au printemps ( $0,002 \text{ mg/l}$ ) avec une teneur plus élevée dans l'eau de piscine que dans celle de l'eau du réservoir. Ces valeurs enregistrées sont inférieures à celles de la station Ain Hamma Moulay Idriss en Hiver ( $3,15$  à  $12,49 \text{ mg/l}$ ) et au Printemps ( $2,59$  à  $8,18 \text{ mg/l}$ ) et concorde avec ceux rapportés (SALAME et al., 2013). La présence de nitrates dans l'eau est un indice de pollution d'origine agricole (engrais), urbaine (dysfonctionnement des réseaux d'assainissement) ou industrielle. Les teneurs en nitrates de l'eau de cette station sont conformes à la norme marocaine (03.07.001 /2006) relative aux eaux de boisson humaine.
- ✓ Les teneurs en orthophosphates présentent des valeurs faibles durant la période d'étude avec des valeurs supérieures au niveau de l'eau de piscine qu'au niveau du réservoir. Ces résultats sont inférieurs par rapport à ceux enregistrés par BENMOUSSA et al., (2010) ; ( $0,81 \pm 0,40 \text{ mg/l}$ ), et SALAME et al., (2013) ; ( $0,82 \text{ mg/l}$  pour l'eau du réservoir et  $2,23 \text{ mg/l}$  pour l'eau de la piscine).
- ✓ Les teneurs en azote totale sont nuls pendant toute la période Hiver-Printemps .Cela est contradictoire car nous avons enregistrés des teneurs moyennes en nitrate ( $0,0058 \text{ mg/l}$  en Hiver et  $0,002 \text{ mg/l}$  au printemps) .Ces résultats ne concorde pas avec les résultats de BENMOUSSA et al., (2010).



- ✓ Les teneurs en phosphore totale présentent des valeurs faibles, augmentent en Hiver et chutent au Printemps, cela concorde avec les résultats rapportés par NEAL, (2000) et SALAME et al., (2013).
- ✓ Les teneurs en ammonium présentent la même évolution que les teneurs en phosphore avec des valeurs inférieures à 0,5 mg/l (Valeur maximale admissible); (RODIER, 1984); l'ammonium est issu des déchets et déjection.
- ✓ Les teneurs en O<sub>2</sub> dissous ont donné des valeurs élevées pour les eaux du réservoir (43,9mg/l), ainsi dépassent la valeur maximale admissible. Cela ne concorde pas avec les résultats obtenues par BENMOUSSA et al., (2010); (2,59 ±0,80mg/l). Ce qui peut être expliqué par l'effet des températures des eaux de la piscine par rapport aux eaux du réservoir sur la solubilité d'oxygène.
- ✓ Les teneurs en titre alcalimétrique sont nulles alors que les teneurs en titre alcalimétrique complet révèlent une diminution en Hiver alors que les valeurs élevées sont enregistrés au printemps dépassant la valeur maximal admissible relative aux eaux de boissons humaines, cela est due à la présence des bicarbonates, de carbonate et d'hydroxyde.
- ✓ La dureté totale est plus élevée en Hiver qu'au Printemps et ces valeurs concorde avec ceux enregistrés par (BENMOUSSA et al., 2010).

D'après ces résultats, la composition physico-chimique de cette eau minérale naturelle est conforme aux normes marocaines, lui confère des propriétés favorables à la santé (PECASTING et al., 2009). C'est ainsi, plusieurs travaux ont étudié l'effet thérapeutique associé à certains éléments majeurs (JOLY et al., 1998). Des études menées sur les eaux d'Avène ont révélé le rôle bénéfique thérapeutique du calcium dans le traitement de certaines pathologies dermatologiques, la régulation de calcium intracellulaire au niveau des kératinocytes (JOLY et al., 1998). Donc, la composition de l'eau d'Ain Allah en calcium peut offrir à ces eaux des intérêts thérapeutiques et un effet curatif.

## **2-Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de Moulay Yacoub**



L'analyse bimensuelle des paramètres physico-chimiques de la station Moulay Yacoub sont illustrées sur le tableau 7 et nous permettent de constater que :

**Tableau N°7:** Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale  
Moulay Yacoub

Mois / Paramètres	Janvier			Mars			Mai		
	S	R	P	S	R	P	S	R	P
Température °C	43,7	42,2	37,6	43	42	37,2	43	42	37,2
PH	7,02	7,1	7,02	7,1	7,08	7,09	7,1	7,08	7,09
Conductivité MS/cm	47	45,6	45,3	47	45,5	45,1	47,8	46,5	45,1
Nitrate mg/l	0,025	0,0024	0,0005	0,004	0,00035	0,00027	0,0004	0,0003	0,0002
Orthophosphates mg/l	0,044	0,0385	0,0478	0,032	0,05	0,044	0,032	0,005	0,044
Azote total mg/l	0,3	0,005	0	0,299	0,004	0,001	0,199	0,004	0,001
Phosphore total mg/l	0,0003	0,0004	0,001	0,0002	0,0005	0,001	0,0002	0,0005	0,001
Ammonium mg/l	0,015	0,019	0,019	0,00095	0,018	0,001	0,00055	0,0018	0,001
Titre alcalimétrique meq/l	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAC meq/l	89,5	29,5	19,5	94,5	34,5	13	96,2	35	22,8
Dureté total	30	22	20	26	22,2	20	25,8	23,4	21,3



- ✓ Les variations temporelles de la température au niveau de la station thermale Moulay Yacoub révèle une stabilité tout le long de la période Hiver-Printemps. La température la plus faible est enregistrée en eau de piscine et la plus élevée en eau de réservoir et de source. Ces valeurs concordent avec les résultats rapportés par SALAME et al., (2013); (39,93°C en Réservoir, 39,88°C en piscine).
- ✓ Le pH relevé ne montre pas de variations importantes entre les saisons avec un pH proche de la neutralité aussi bien en eau de réservoir qu'en eau de piscine, ce qui est comparable avec les valeurs enregistrés de (BENMOUSSA et al., 2010) et (SALAME et al., 2013).
- ✓ L'eau de la station thermale étudiée est caractérisée par une conductivité stable tout le long de la période d'étude avec des valeurs en eau de source très légèrement supérieures à celle des valeurs obtenues en eau de piscine et du réservoir. Ces valeurs sont inférieures à celles enregistrées par NEAL et al., (2000) .
- ✓ Les teneurs en nitrate sont stable durant la période Hiver-Printemps, sont faibles par rapport à celles de la station Ain Hamma Moulay Idriss en (3,15 à 12,49 mg/l). Les faibles valeurs sont enregistrées en eau de réservoir (0,0005mg/l) par rapport à l'eau de piscine (0,025mg/l). Cela concorde avec les résultats obtenues au niveau de la station thermale Ain Allah et diffère de ceux enregistrés (SALAME et al., 2013), (BENMOUSSA et al., 2010); (1,6 mg /l en eau de réservoir et 2,23 en eau de piscine).
- ✓ Les résultats obtenus pour les teneurs d'orthophosphates sont stables durant la période d'étude et sont faibles par rapport à ceux trouvés au niveau de la station Ain Allah (SALAME et al., 2013); (0,81 ±0,40mg/l).
- ✓ Les teneurs en azote totale sont élevées en saison d'Hiver et faibles au Printemps. La valeur supérieure est enregistrée en eau de réservoir et de source (0,3mg/l) et la valeur la plus faible en eau de piscine (0,001mg/), ce qui concorde avec les résultats enregistrés de (BENMOUSSA et al., 2010).
- ✓ Les teneurs en phosphore totale ont donné des résultats comparables pendant la période d'étude avec des valeurs enregistrées en eau de réservoir inférieures à celles enregistrées en eau



de piscine. Ces valeurs sont inférieures à celles enregistrées (SALAME et al., 2013);(1,6mg /l en eau de réservoir et 2, 23mg/l en eau de piscine)

- ✓ Les teneurs en ammonium ont donné des valeurs inférieures à 0,5 mg/l (Valeur maximale admissible) ; (RODIER, 1984).
- ✓ Les teneurs en titre alcalimétrique sont nulles alors que les titre alcalimétrique complet révèlent une diminution en Hiver alors qu'au printemps dépassant la valeur maximal admissible.
- ✓ La dureté totale est plus élevée en Hiver qu'au Printemps et ces valeurs obtenues concordent avec celles enregistrées par (BEN MOUSSA et al., 2010).

Les eaux thermales de Moulay Yacoub sont caractérisées par une faible minéralisation, une stabilité de ces paramètres tout le long de la période Hiver-Printemps, une faible teneur en azote totale et phosphore totale. Les eaux de cette station expliquent ses vertus curatives.

### **3-Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de Sidi Harazem**

L'analyse mensuelle des paramètres physico-chimiques de la station Sidi Harazem sont illustrées sur le tableau 8.

#### **Tableau N° 8 : Résultats des différents paramètres physicochimiques de la station thermale Sidi Harazem**





Mois /Paramètres	Février	Mars	Avril	Mai
Température °C	38,5	38,9	39	38,5
PH	7	7	6,9	7
Conductivité MS/cm	1649	1640	1648	1642
Nitrate mg/l	0,004	0,005	0,006	0,005
Orthophosphates mg/l	0,014	0,018	0,017	0,013
Azote total mg/l	0,025	0,0325	0,0122	0,020
Phosphore total mg/l	0,031	0,02	0,03	0,020
Ammonium mg/l	0,12	0,019	0,018	0,018
Titre alcalimétrique meq/l	0	0	0	0
TAC meq/l	85,5	84,4	80,5	80,5
Dureté totale milmol/titre	3,6	5	3,5	3,4

Nous constatons à partir de ces résultats que :

- ✓ Les variations temporelles de la température au niveau de la station thermale Sidi Harazem révèle une stabilité tout le long de la période Hiver-Printemps. Elle est Supérieure à celle rapportés par KHAYLI et al., (2011) où la température moyenne est de 34,6°C.
- ✓ Le pH relevé ne montre pas de variations importantes entre les saisons avec un pH comparable aux valeurs enregistrés de BENMOUSSA et al ., (2010) et de KHAYLI et al, (2011) où le pH est d'environ 6,92. Ces valeurs sont admissibles par la norme marocaine (03.07.001)/2006) des eaux de boisson humaine qui fixe le pH entre 6,5 et 8,5.



- ✓ L'eau de la station thermale étudiée est caractérisée par une faible conductivité par rapport à celle enregistré par BENMOUSSA et al., (2010) et (NEAL et al., 2000) avec une stabilité tout le long de la période Hiver Printemps. Toutefois, ces résultats sont supérieures à ceux enregistrés par KHAYLI et al., (2011) où la conductivité est de  $1395\mu\text{s}/\text{cm}$ . Ceci peut être expliqué par la nature des terrains que traversent cette eau. Cependant, ces résultats répondent aux normes en vigueur (NM 03.07.001).
- ✓ Le suivi des teneurs moyennes en nitrates concorde avec les résultats obtenus au niveau de la station thermale Ain Allah et sont inférieures à celle enregistré par BENMOUSSA et al., (2010) en Hiver (3,15 à 12,49 mg/l) par rapport au Printemps (2,59 à 8,18 mg/l) et celles de KHAYLI et al., (2011) où la teneur en nitrate est de l'ordre de 0,82mg/l. Généralement, Les teneurs de nitrates sont conformes à la norme marocaine (03.07.001 /2006) relative aux eaux de boisson.
- ✓ Les résultats obtenus des teneurs en orthophosphates concordent avec ceux trouvés au niveau de la station Ain Allah et sont inférieures à ceux enregistrée par BENMOUSSA et al., (2010); ( $0,81 \pm 0,40\text{mg/l}$ ).
- ✓ Les teneurs en azote totale sont élevées en Hiver et diminuent au Printemps, ce qui concorde avec les résultats rapportées (BENMOUSSA et al., 2010).
- ✓ Les teneurs en phosphore totale ont donné des valeurs semblables pendant la période d'étude avec des valeurs inférieures à celles enregistrées par (BENMOUSSA et al., 2010).
- ✓ Les teneurs en ammonium ont été tous inférieures à 0,5 mg/l (Valeur maximale admissible) ;(RODIER, 1996)
- ✓ Les teneurs en titre alcalimétrique sont nulles alors que les valeurs en titre alcalimétrique complet révèlent une diminution au Printemps et augmentent en Hiver, dépassant la valeur maximale admissible.
- ✓ La dureté totale est élevée en Hiver qu'au Printemps et ces valeurs concordent avec ceux enregistrées par (BENMOUSSA et al., 2010).

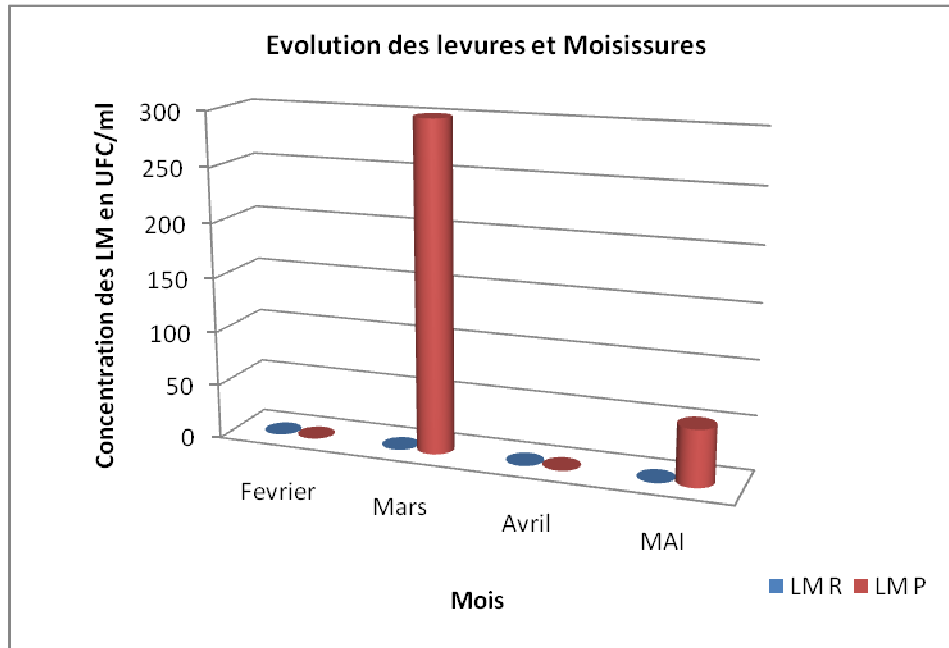
D'après ces résultats, l'eau de cette station est conforme aux normes marocaines, et montre une stabilité tout le long de la période d'étude. Sa composition pure, de même que ses qualités naturelles, font d'elle une eau réputé possédant des vertus curatives pour les maladies du foie et du rein, Ce qui concorde avec la littérature (SALAME et al., 2013) et (KHAYLI et al., 2011).



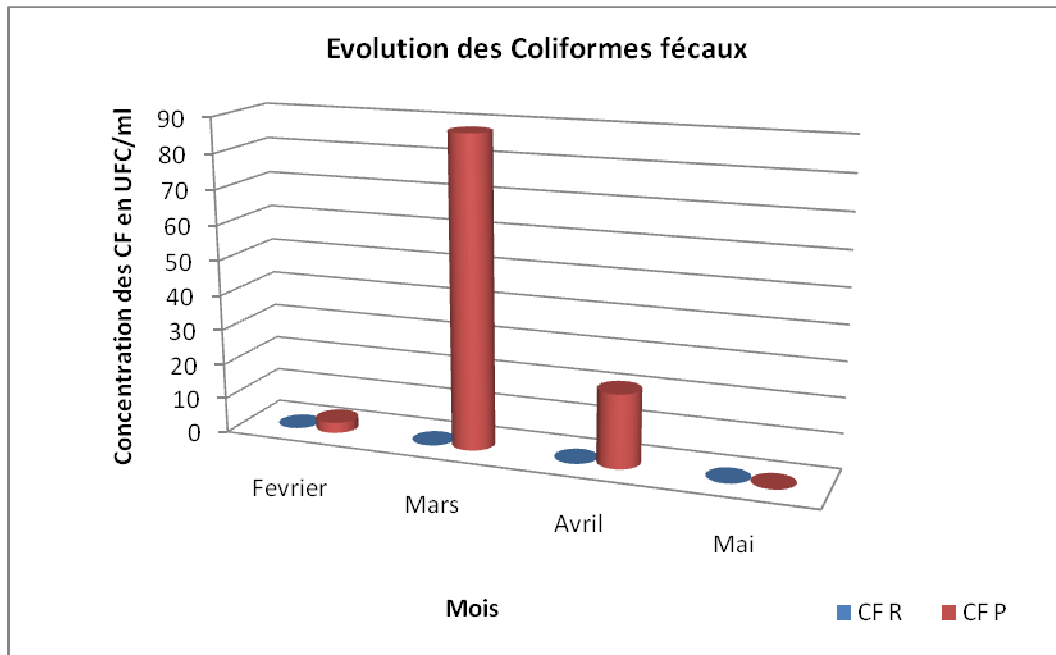
## II-Résultats des analyses microbiologiques des eaux thermales :

### 1-Résultats des analyses microbiologiques des eaux d'Ain Allah

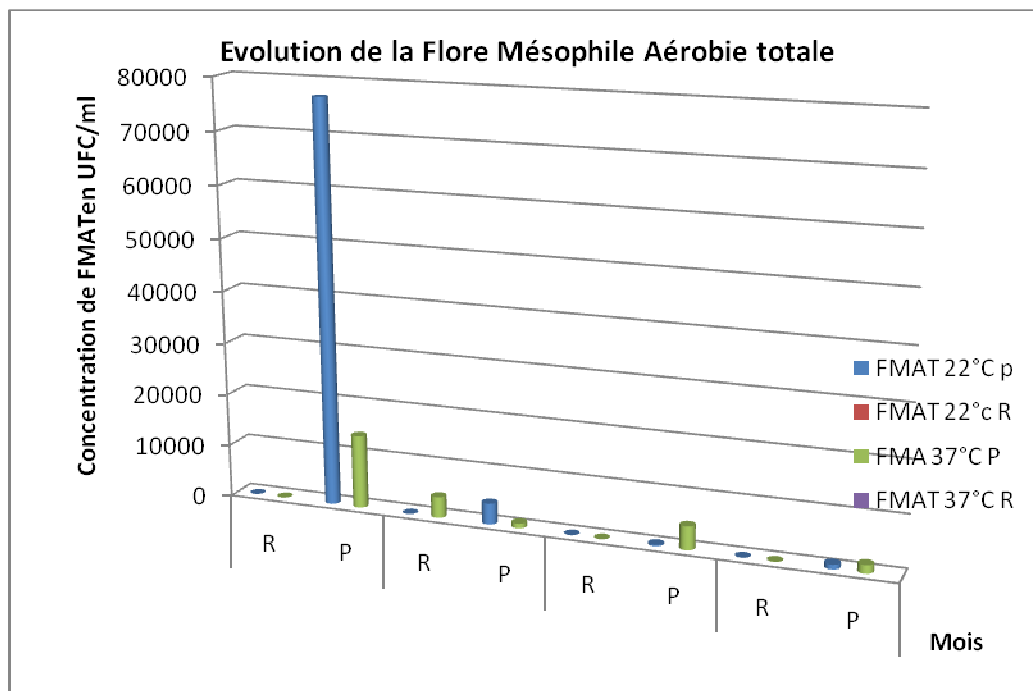
L'analyse bimensuelle des paramètres microbiologiques de la station Ain Allah est illustrée sur la figure 13 :



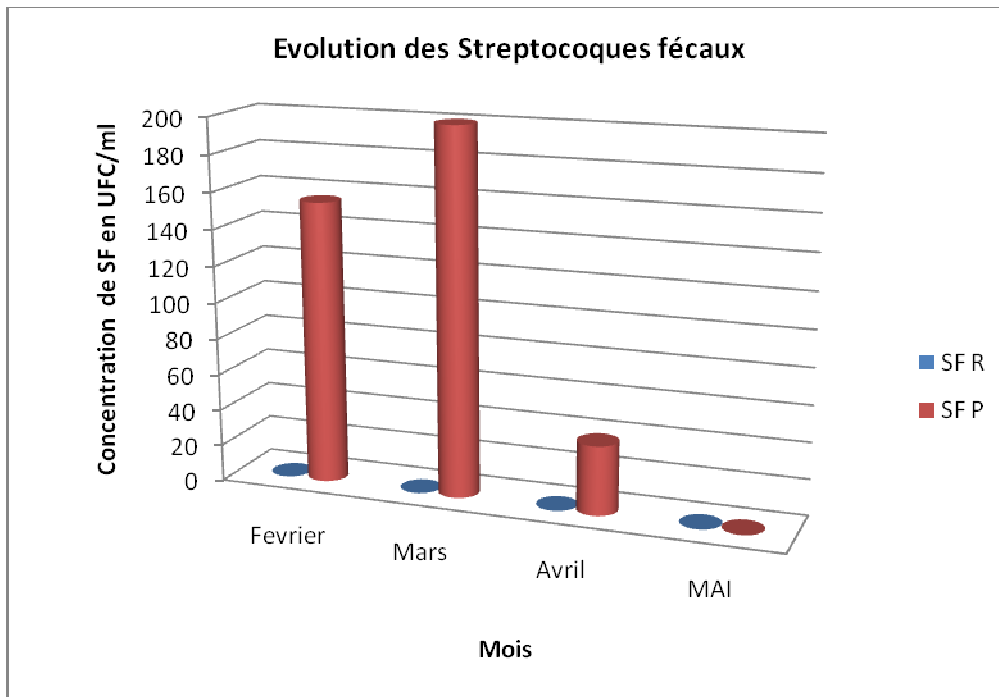
**Figure a** : Evolution de la concentration en levures et moisissures dans la station Ain Allah au cours des quatre mois d'étude



**Figure b :** Evolution de la concentration en *Coliformes fécaux* dans la station Ain Allah au cours des quatre mois d'étude



**Figure c :** Evolution de la concentration en FMAT dans la station Ain Allah au cours des quatre mois d'étude



**Figure d** : Evolution de la concentration en SF dans la station Ain Allah au cours des quatre mois d'étude

**Figure N°13:** Résultats microbiologiques au niveau de la station thermale Ain Allah

Les résultats des analyses des eaux du réservoir renseignent sur une faible contamination par les germes totaux à 37°C et à 22°C (21UFC/ml, 5UFC/ml) au Printemps. On observe une absence des germes totaux à 22°C en Hiver. De plus, ces eaux sont caractérisées par l'absence des bactéries indicatrices de la contamination fécale (*Coliformes totaux*, *Streptocoques fécaux* et les bactéries anaérobies sulfito-réductrices), ainsi que de *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui concorde avec les résultats rapportés (SALAME et al., 2013) ainsi que les résultats physicochimiques avec une faible contamination par les polluants organiques. Cela permet de dire que cette eau est assurée par une bonne protection contre toute contamination. Ces résultats répondent aux valeurs fixées par la circulaire marocaine du 9 Mai 1983 relative à l'analyse bactériologique des eaux minérales de boisson et à la norme marocaine 03.07.001 /2006 relative aux eaux de boisson.

Pour les eaux de la piscine, elles sont plus chargées en Germes totaux dénombrés à 37 °C en Hiver (1410<sup>3</sup>UFC /1ml) qu'au Printemps (1610<sup>2</sup>UFC /ml). Le dénombrement mensuel des germes totaux à 22°C montre que ces bactéries présentent une évolution similaire à celle des germes totaux à 37°C avec des valeurs comprises entre 263UFC/ml et 77 10<sup>3</sup> UFC /ml. Ces valeurs dépassent largement



celles enregistré par BENMOUSA et al., (2010) et SALAME et al., (2013); ( 241 UFC/ml en Juillet et 51 UFC/ml en Février).

Les variations temporelles des Coliformes Totaux montrent, dans les eaux de piscine, une valeur d'1 UFC /ml en Hiver et une absence de ces germes au Printemps. D'une manière générale, les valeurs mensuelles des coliformes fécaux n'évoluent pas de la même manière que celles des coliformes totaux, la valeur maximale est observée en Hiver avec 88 UFC/ml noté en Mars, la valeur minimale est enregistrée au printemps avec 21UFC/ml en Avril. Ces résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par SALAME et al., (2013); (les faibles charges sont enregistrées en Hiver avec 54 UFC/ml en décembre).

Concernant les *Streptocoques fécaux*, nous avons enregistré une valeur maximale de 200UFC/ml en mois de Mars, alors qu'une valeur minimale de 38UFC/ml en Avril, ce qui ne concorde pas avec ceux enregistrés par SALAME et al., (2013); (les concentrations les plus élevées sont observées au Printemps avec des faibles fluctuations durant la période d'étude et avec un maximum de 115 UFC/250ml en Juin.

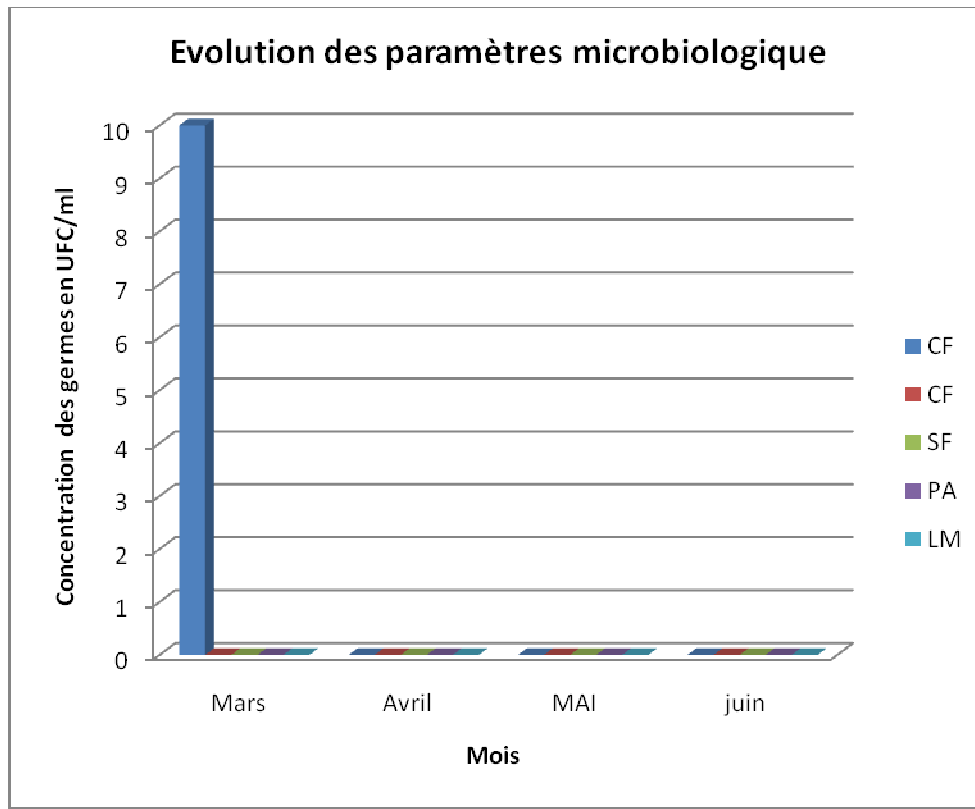
Ces eaux sont également caractérisées par l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que des Anaérobies Sulfite Réducteurs, ce qui concorde avec les résultats rapportés (SALAME et al., 2010).

Les levures et moisissures sont présentes en Hiver plus qu'au Printemps.

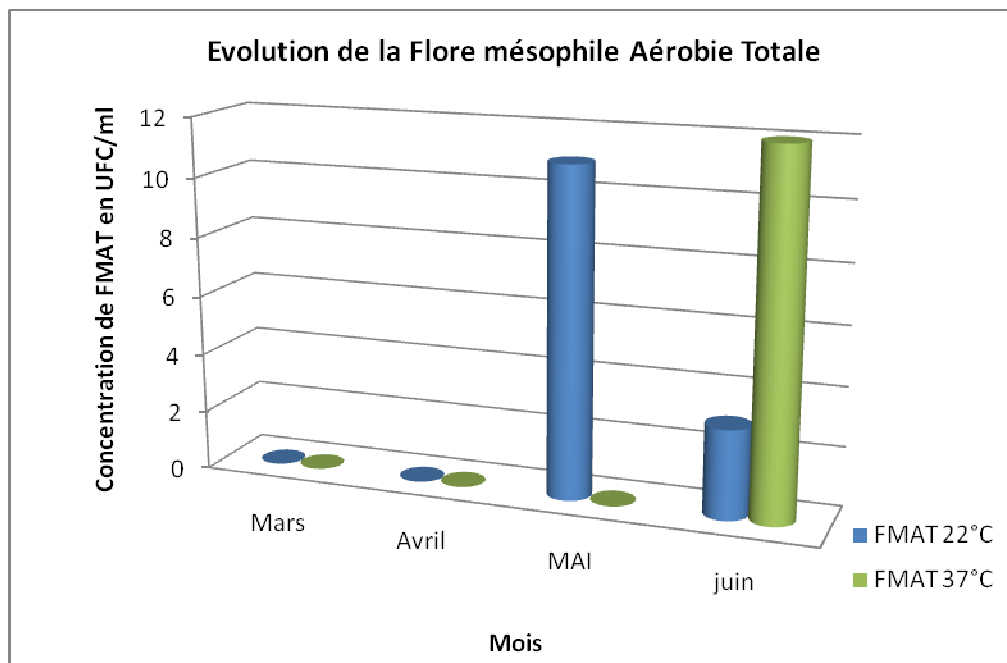
L'évaluation de la qualité hygiénique des eaux de la piscine montre que les charges les plus élevées des germes totaux à 37°C et à 22°C, *Coliformes totaux*, *Coliformes fécaux*, *Streptocoques fécaux* sont enregistrées durant la période hivernale, ce qui indique que cette contamination serait d'origine anthropique et pourrait être due au nombre important des baigneurs et la fréquentation de cette station par les curistes pendant cette saison. Ces résultats concordent avec ceux enregistrés par (BEN MOUSSA et al., 2010).

## **2-Résultats des analyses microbiologiques des eaux de Sidi Harazem**

L'analyse mensuelle des paramètres microbiologiques au niveau de la station Sidi Harazem sont illustrées sur la figure 14 et nous permettent de constater que :



**Figure a :** Evolution de la concentration des germes dans la station Sidi Harazem au cours des quatre mois d'étude



**Figure b :** Evolution de la concentration de la FMAT dans la station Sidi Harazem au cours des quatre mois d'étude



**Figure N°14:** Résultats obtenues au niveau de la station thermale Sidi Harazem

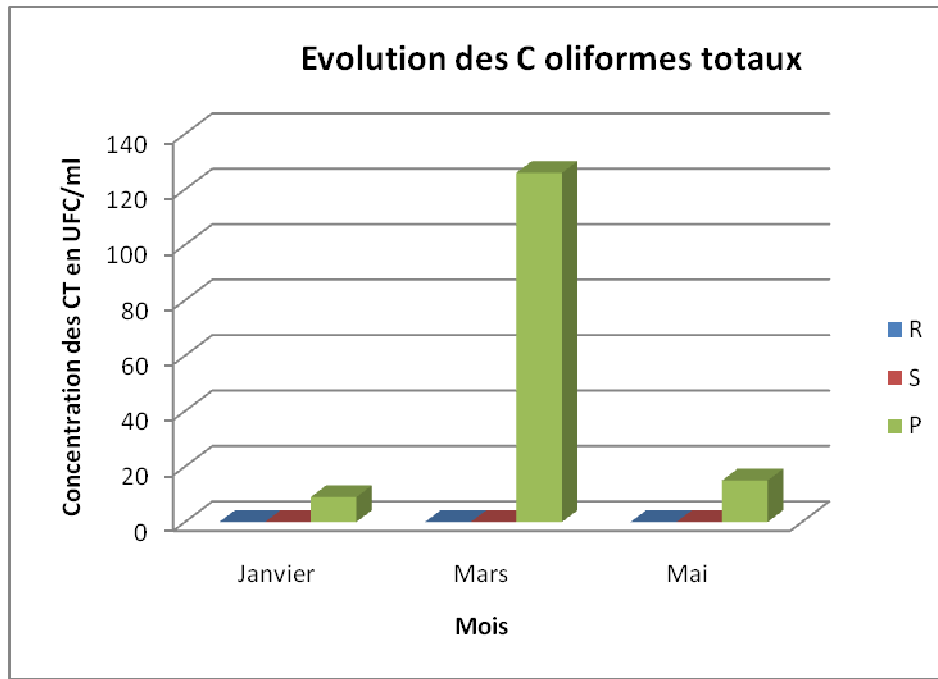
Les résultats des analyses des eaux de boisson de Sidi Harazem renseignent sur une faible contamination par les Germes totaux cultivés à 37°C et à 22°C au Printemps (12UFC/ml, 11UFC/ml) alors qu'on a une absence de ces germes en Hiver. Ces résultats sont inférieures à celles enregistrées par KHAYLI et al., (2011) où le nombre des germes totaux cultivés à 37°C et à 22°C sont respectivement (614UFC/ml, 571 UFC/ml). Ces eaux sont caractérisées par la présence des *Coliformes totaux* avec un nombre inférieur de celui enregistré par BENMOUSSA et al., (2010) avec 54 UFC/ml en Décembre. Cette contamination est peut être liée à l'origine anthropique et pourrait être liée au nombre important des baigneurs et la fréquentation de cette station par des curistes pendant cette saison. Ces résultats concordent avec ceux enregistrés par (BENMOUSSA et al., 2010) et (KHAYLI et al., 2011). Nous notons l'absence également des bactéries indicatrices de la contamination fécale (*Coliformes fécaux*, *Streptocoques fécaux* et de *Anaérobies Sulfite Réductrices*), ainsi que *Pseudomonas aeruginosa*. Contrairement à ce que nous avons obtenu, *Pseudomonas aeruginosa* a été dénombré au niveau du travail de KHAYLI et al., (2011), ce qui nous permet de constater que l'eau de cette source est protégée contre tout risque sanitaire.

Ces résultats répondent aux valeurs fixées par la circulaire marocaine du 9 Mai 1983 relative à l'analyse bactériologique des eaux minérales de boisson et à la norme marocaine 03.07.001 /2006 relative aux eaux de boisson humaine, et concorde aux travaux antérieurs. Ceci est peut être expliqué par les bonnes pratiques d'hygiène au niveau de cette station par les autorités

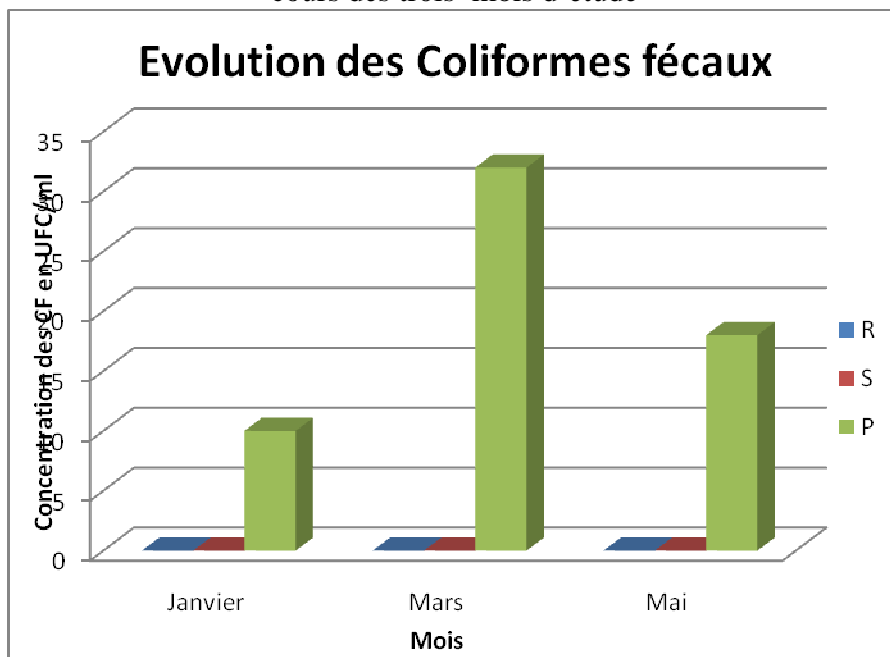
**2-Analyse microbiologiques des eaux de Moulay Yacoub**

L'analyse bimensuelle des paramètres physico-chimiques de la station Moulay Yacoub sont illustrées dans la figure 15 :

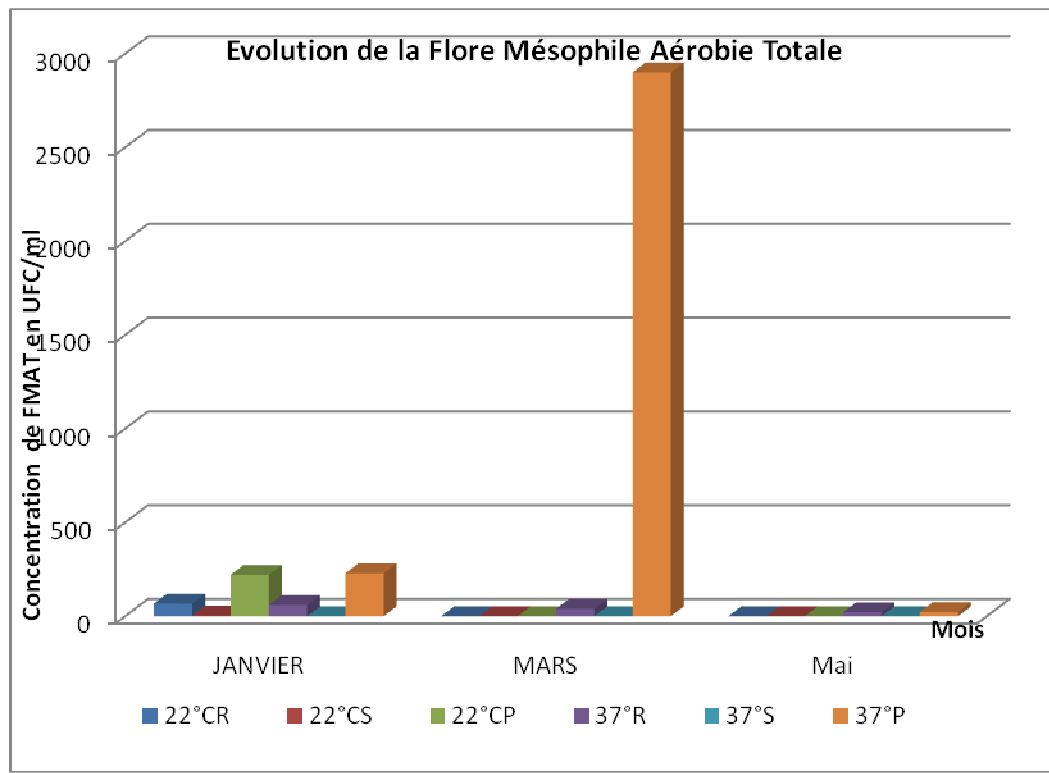




**Figure a** : Evolution de la concentration des coliformes totaux dans la station Moulay Yacoub au cours des trois mois d'étude



**Figure b** : Evolution de la concentration des Coliformes fécaux dans la station Moulay Yacoub au cours des 3 mois d'étude



**Figure c** : Evolution de la concentration de la FMAT dans la station Moulay Yacoub au cours des trois mois d'étude

**Figure N°15** : Résultats microbiologiques au niveau de la station thermale Moulay Yacoub

Les résultats des analyses de l'eau du réservoir et celles de la source renseignent sur une faible contamination en Hiver par les germes totaux à 37°C et à 22°C respectivement (60UFC/ml ,67UFC /ml pour l'eau de réservoir, 3UFC /1ml pour l'eau de source).

Nous remarquons une faible contamination par les Germes totaux cultivés à 22°C par rapport aux germes totaux cultivés à 37°C pendant la période d'étude. Ces eaux sont caractérisées par une l'absence des bactéries indicatrices de la contamination fécale (*Coliformes totaux*, *Streptocoques fécaux* et les bactéries anaérobies sulfito-réductrices), ainsi que *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui concorde avec les résultats enregistrés par SALAME et al., (2010).

Les eaux de la piscine sont plus chargées en Germes totaux dénombrés à 37 °C en Hiver avec 29 10<sup>3</sup>UFC /ml, qu'au printemps avec 22 UFC /ml. Le dénombrement mensuel des germes totaux à 22°C montre leur présence au mois de Mars avec 320 UFC/ml. Ces valeurs dépassent largement celles enregistrées par BEN MOUSSA et al., (2010) et SALAME et al.,(2013); ( 241 UFC/ml en Juillet et 51 UFC/ml en Février).



La variation de *Coliformes totaux* montre, dans les eaux de piscine, une valeur maximale de 126 UFC /en Hiver, avec une faible contamination de ces germes au Printemps. Ainsi, les valeurs mensuelles des coliformes fécaux évoluent en fonction du temps, de la même manière que celle des *Coliformes totaux*, la forte charge est observée en Hiver avec 32 UFC/ml noté en mois de Mars. Ces résultats ne concorde pas avec ceux enregistrés par SALAME et al., (2013) ; (La forte charge est observée au cours de la période estivale avec un maximum de 200 UFC/250ml noté en Juin et les faibles valeurs sont enregistrées durant l'hiver avec 54 UFC/250ml en Décembre.

Les eaux de cette station sont caractérisées par l'absence de *Streptocoques fécaux*, *Pseudomonas aeruginosa*, et Anaérobies Sulfite Reducteurs en Hiver, ce qui concorde avec les résultats enregistrés de SALAME et al., (2013).

D'après ces résultats, les eaux de cette station répondent aux normes fixées par la circulaire marocaine du 9 Mai 1983 relative à l'analyse bactériologique des eaux minérales de boisson et à la norme marocaine 03.07.001 /2006 relative aux eaux de boisson.

L'évaluation de la qualité hygiénique des eaux de la piscine ont montré que les charges les plus élevées des germes totaux à 37°C et à 22°C, *Coliformes totaux*, *Coliformes fécaux*, sont enregistrées durant la période hivernale. Ce qui pourrait constituer un risque sanitaire pour les baigneurs .Il serait donc obligatoire de rappeler aux usagers de la piscine le respect des règles d'hygiène corporelle : passer aux toilettes, se doucher, se moucher, se démaquiller, se rincer les pieds dans un pédiluve et de veiller au traitement de seaux de piscine d'une manière périodique par les responsables de l'établissement (KHAYLI et al., 2011)

## 2ème partie : Identification des thermophiles et caractérisation de leur molécules bioactives

Plusieurs microorganismes ont été isolés à partir de 3 stations thermales à proximité de la ville de Fès en utilisant cinq milieux de culture différents : Milieu1, Milieu2, Milieu3, Milieu4, Milieu 5 et Milieu thermophile.

La majorité des bactéries ont poussé sur le milieu M1, ce qui montre que ce milieu de culture est optimal pour leur croissance.



## I-Résultats des tests d'identification

Les caractères biochimiques des différents isolats bactériens issus des sources thermales étudiées sont regroupés dans le tableau 9

**Tableau N°9** : Caractères biochimiques des bactéries thermophiles

Bactéries	Gram	Catalase	Oxydase	Fermentation du Glucose	Fermentation du Lactose	Présence du gaz	H <sub>2</sub> S
<b>F</b>	Bacille gram -	+	+	+	-	-	-
<b>G</b>	Cocci gram +	+	-	-	-	-	-
<b>I</b>	Cocci gram +	+	-	+	-	+	-
<b>M</b>	Bacille gram -	+	+	+	+	-	-
<b>L</b>	Bacille gram -	+	+	+	+	+	-
<b>B</b>	Cocci gram +	+	-	+	+	+	-
<b>C</b>	Cocci gram -	+	+	+	-	-	-
<b>P</b>	Bacille gram -	+	-	+	-	-	-
<b>(R)</b>	Cocci gram +	+	-	+	+	-	-
<b>Y</b>	Cocci gram -	+	-	+	+	-	+
<b>X</b>	Cocci gram -	+	+	-	-	-	-
<b>E</b>	Cocci gram +	+	-	+	-	-	-

A partir de ce tableau, Nous distinguons les bactéries qui sont des bacilles gram -, fermentent l'un des sucres et qui sont oxydase - tel que (I, B, P, R et E) et qui peuvent appartenir à la famille des Enterobactériaceae, et celles qui ne fermentent pas le lactose et le glucose et qui sont oxydase + tel que (F, G, M, L, C,...) peuvent appartenir à une famille autre que Enterobactériaceae

On s'est intéressé à identifier deux isolats bactériens ; La bactérie F par la Galerie API 20 E et la bactérie P par la Galerie API 20 NE afin de déterminer leurs espèces relatives. Après 48h d'incubation on obtient les résultats suivants et qui sont représentés dans la figure 16 et 17 :



**Figure N°16:** Galerie API 20NE de la bactérie P



**Figure N°17 :** Galerie API 20 E de la bactérie F

D'après les résultats des galeries API 20, API 20NE et en se référant aux différents codes du catalogue. Nous n'avons pas trouvé d'identification à ces deux espèces bactériennes.

## II-Résultats de la mesure de l'activité enzymatique :

Le tableau suivant regroupe les résultats obtenus en mesurant le diamètre d'auréole caractéristique de chaque bactérie.

**NB :** les bactéries thermophiles que nous avons isolées des eaux thermales ne montrent pas une activité pectinase en raison de non apparition d'auréole d'inhibition autour de la colonie.

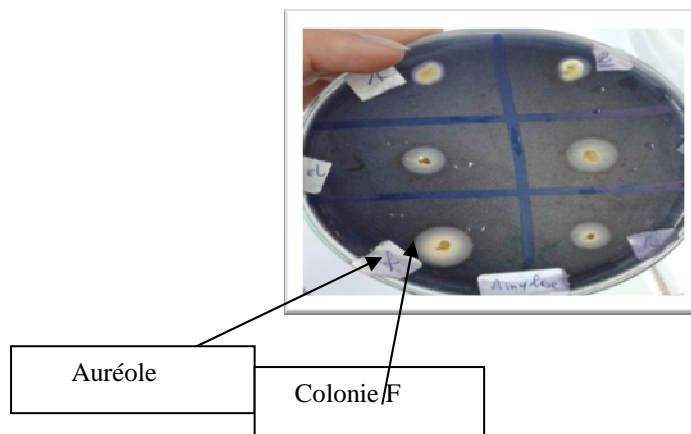
**Tableaux N°10 :** Mise en évidence de l'activité amylase et cellulase

Isolats bactériens	Diamètre d'auréole(Amylase) (cm)	Diamètres d'auréole(Cellulase) (cm)
<b>G</b>	0,2	0.4
<b>M</b>	0.6	0.2
<b>L</b>	0.4	0.1
<b>B</b>	0.6	0.8
<b>C</b>	0.7	1.1
<b>P</b>	1.2	0.7
<b>R</b>	0.8	1.4

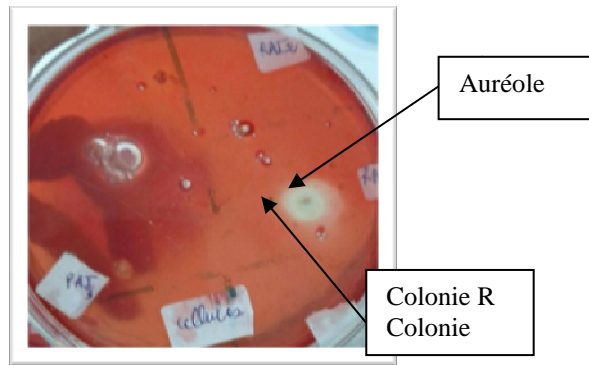
<b>B</b>	0.9	0.7
<b>C</b>	1.2	0.5
<b>I</b>	0.7	0.6
<b>E</b>	1,7	1
<b>R2</b>	1,1	0
<b>F</b>	1.7	0.6

Seul un isolat parmi les treize testés, n'est pas capable d'utiliser la cellulose comme source de carbone (R2), les autres isolats bactériens ont formés un halot clair autour de leur colonies lors de l'ajout de la solution de Rouge de Congo sur la boîte de pétrie contenant le milieu CMC mettant en évidence l'activité cellulase, avec un diamètre variant de 0 à 1,4cm. Ces isolats possèdent à la fois une activité cellulase et amylase avec la formation d'un halot clair autour de leurs colonies lors de l'ajout d'une solution iodée tel que le lugol mettant en évidence l'activité amylase, avec un diamètre variant de 0,2 à 1,7 cm

Les isolats F et E montrent une activité amylase maximale avec un diamètre d'auréole de l'ordre de 1,7cm. Ceci est représenté dans la figure 18



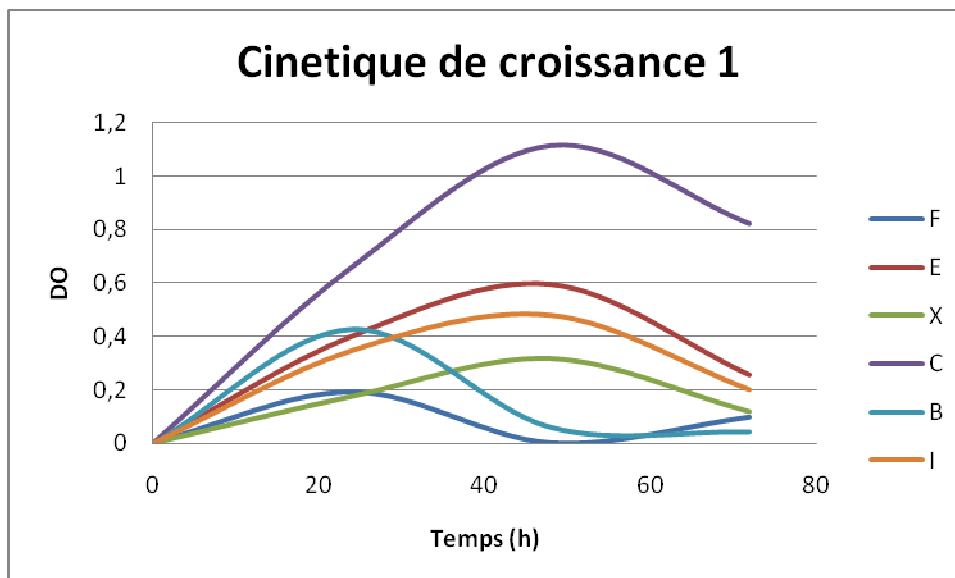
**Figure N°18:** Mise en évidence de l'activité amylase chez la bactérie F sur un milieu à base d'amidon. La bactérie R1 montre une activité cellulase maximale, avec un diamètre d'auréole de l'ordre de 1,4cm. Ceci est représenté dans la figure 19:



**Figure N°19:** Mise en évidence de l'activité cellulase chez la bactérie R sur milieu CMC Agar

### III- Résultats de la cinétique enzymatique :

Après 24h, 48h et 72h de la mise en culture des isolats thermophiles dans le milieu CMC liquide, nous mesurons leurs DO et tracer les courbes de croissance qui sont représentés dans les graphes figures 20 et 21 :

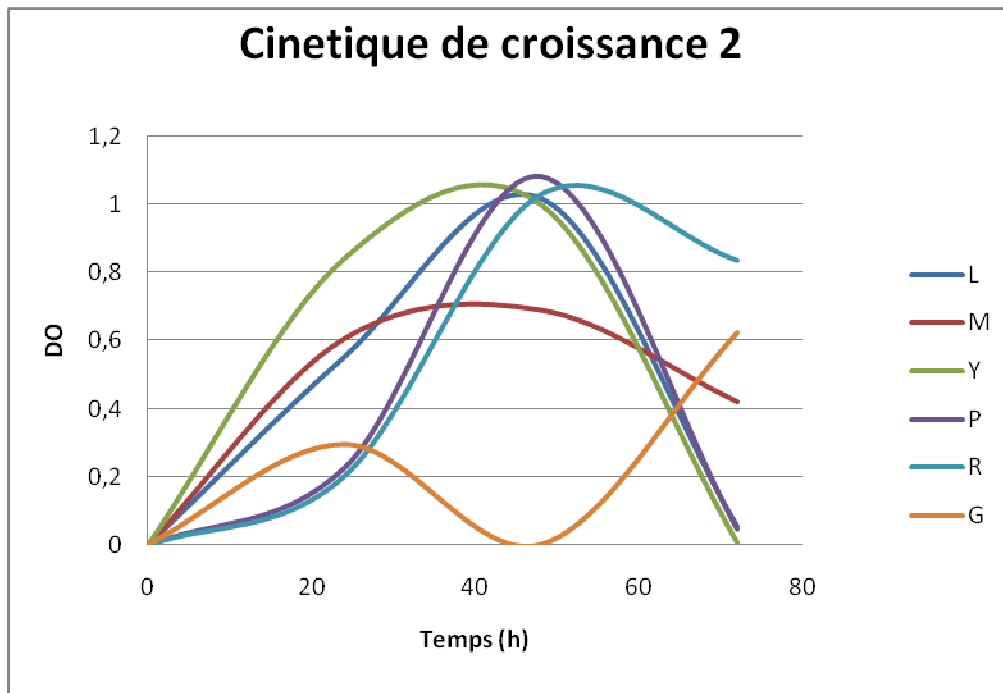


**Figure N°20:** Cinétique de croissance des isolats thermophiles isolés à partir de la station Moulay Yacoub

La figure 20 représente la cinétique de croissance des isolats thermophiles de la station thermale Moulay Yacoub dont la bactérie C présente une phase de latence inaperçue, la vitesse de la croissance est importante par rapport aux autres isolats bactériens avec une durée de 50h et atteint un maximum et rentre en phase de déclin. La bactérie B vient en 2ème rang avec une durée de 30h, suivie par la bactérie E qui présente la même durée de la phase d'accélération que la bactérie C,



ensuite la bactérie I qui suit la même allure que la bactérie E. La bactérie F connaît une phase d'accélération de deux phases où la première est d'une durée de 10h, la deuxième après 60h. La bactérie X connaît une phase d'accélération avec un maximum moins important que les autres isolats bactériens, la durée de cette phase est de 50h où la division cellulaire demeurent constante.



**Figure N°21:** Cinétique de croissance des bactéries thermophiles isolées à partir de la station Ain Allah

Les isolats bactériens de la station Ain Allah connaissent des vitesses de croissance plus importante que celles la station thermale Moulay Yacoub et Sidi Harazem. La bactérie Y présente une vitesse de croissance importante par rapport aux autres isolats bactériens avec une phase d'accélération qui s'étend de 40h de la période d'incubation, et atteint un maximum après 50h puis entre en phase de déclin. La bactérie M vient en 2ème rang avec une durée de 30h, suivie par la bactérie L qui présente la même allure que la bactérie P, ensuite la bactérie G qui connaît une phase d'accélération de deux phase où la première est d'une durée de 10h, la deuxième après 50h. La bactérie P et R présentent la même allure avec une phase d'accélération moins importante que les autres souches d'une durée de 50h où on assiste par la suite à la phase de déclin.

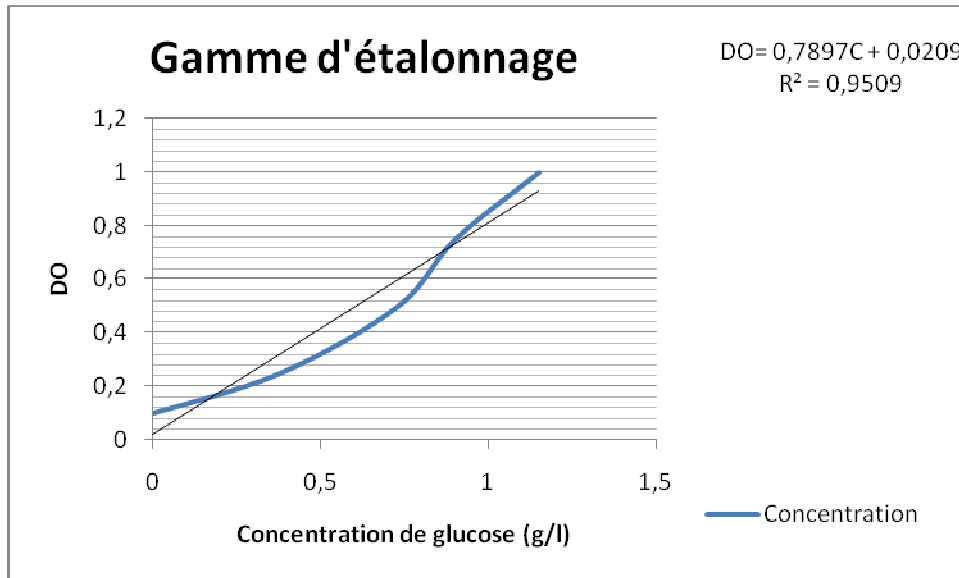
La bactérie C ainsi que la bactérie Y présentent une vitesse de croissance plus importante par rapport aux autres isolats bactériens. Ce résultat peut être expliqué par leur adaptation rapide avec les éléments nutritifs du milieu CMC liquide et de la nature physicochimique de l'environnement.





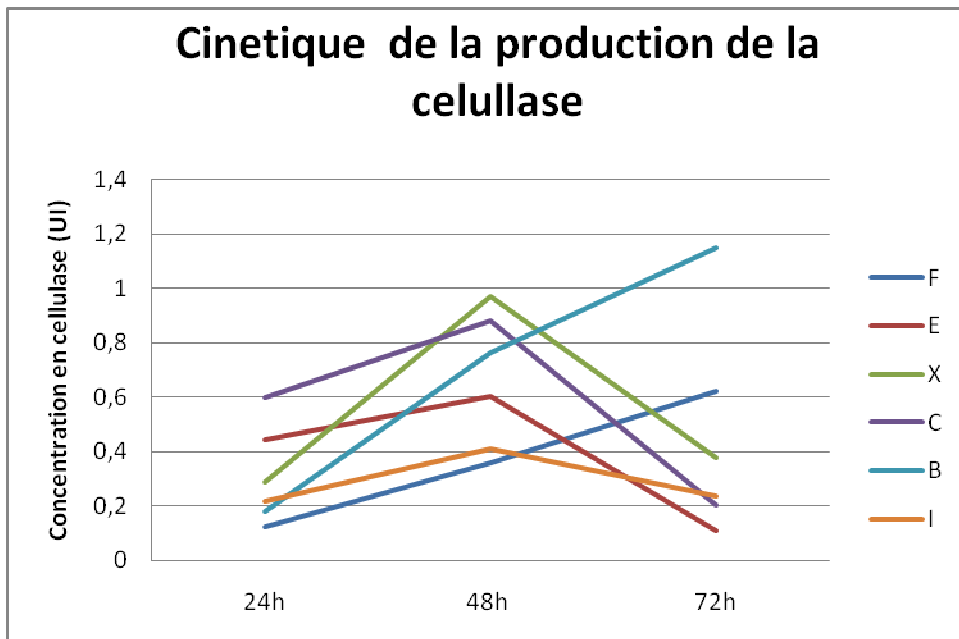
Les exigences bactériennes comprennent les sources de nourriture, d'énergie, d'eau, mais aussi une température appropriée ainsi qu'un pH et une concentration en O<sub>2</sub>.

Une courbe étalon d'une solution mère de 1g/l de glucose pour des valeurs allant de 0 à 1g/l est représentée dans la figure 21 dont le but de déduire la concentration en CMC.



**Figure N°22** : Gamme d'étalonnage de la concentration du glucose

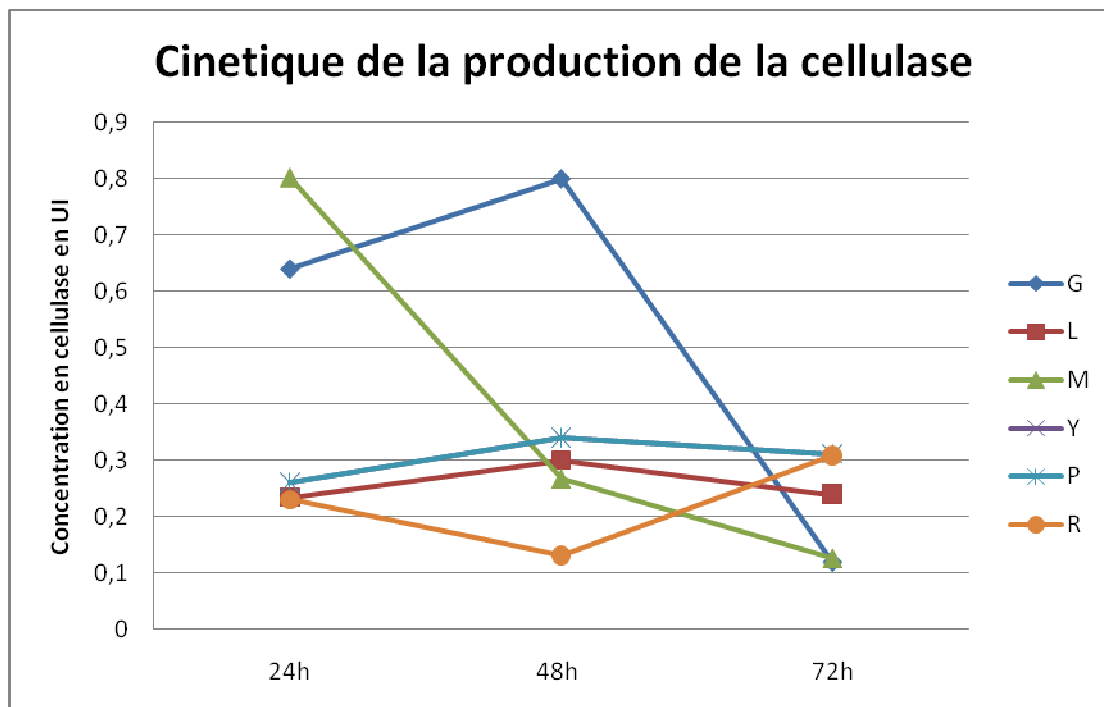
Quant à la cinétique enzymatique de la cellulase des différentes souches isolats bactériens que nous obtenons à partir de la courbe de la gamme d'étalonnage, sont représenté dans les deux figures 23 et 24 :





**Figure N °23 :** Cinétique de production de la cellulase d'isolats thermophiles issus de la station Sidi Harazem et Moulay Yacoub

La production de la cellulase des isolats thermophiles issues des deux stations connaît une concentration maximale de la cellulase (1UI) chez la bactérie X, suivie par la bactérie C avec une concentration maximale de cellulase de l'ordre de 0,9UI, ensuite la souche E (0,6UI), et en dernier rang la souche I avec une concentration de la cellulase de l'ordre 0,4UI. Ces 4 isolats bactériens présentent la même allure avec une concentration maximale de l'enzyme après 48h de la période d'incubation et chute brusquement après que le milieu soit appauvri de substrat CMC. La bactérie B ainsi que la bactérie F connaissent une production exponentielle tout le long de la période d'incubation avec un maximum de l'ordre de 0,8UI de la concentration du glucose.



**Figure N°24 :** Cinétique enzymatique d'isolats bactériens issus à partir de la station Ain Allah

La cinétique de la production cellulase des isolats thermophiles issus des deux stations montre une concentration importante de la cellulase de la bactérie G (0,8UI). Après 48h de la période d'incubation, cette concentration connaît une chute brusque et atteint une valeur de 0,1UI. En 2eme rang la bactérie M, qui connaît une concentration de 0,8UI après 24h de la période d'incubation, cette valeur connaît une chute brusque et atteint une valeur de 0,1g/l après les 48h qui viennent. Ensuite la bactérie P et I qui présentent la même allure avec une concentration maximale



respectivement de l'ordre de 0,35UI, et 0,30UI. La bactérie R connaît une concentration de cellulase de l'ordre de 0,25UI après 24h de la période d'incubation, puis chute brusquement et atteint un maximum de 0,3UI après les 24h qui viennent.

La bactérie G isolé issue de la station thermale Ain Allah, ainsi que la bactérie X issue de la station thermale Moulay yacoub ont donné toutes les deux une concentration importante de la cellulase respectivement de l'ordre de 1UI et 0,8UI. ces bactéries peuvent être exploités dans différents secteurs industriels.

D'après des études antérieures, l'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ses vastes applications (Industries alimentaires, Industrie des textiles et des détergents, Papeterie, Nutrition animale, Domaine thérapeutiques ...etc.).

En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui, une fois fermentée permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir des alcools, des acétones et des acides organiques notamment des acides gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases, ce qui pourrait être exploité à différentes applications industrielles.



# Conclusion

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que les eaux thermales de Ain Allah qui, Sidi Harazem, Moulay Yacoub sont de bonne qualité sur le plan physico-chimique, ce qui explique leur réputation. Sur le plan bactériologique nous avons constaté que les eaux de boisson (Ain Allah, Sidi Harazem) sont généralement de bonne qualité et répondent aux valeurs fixées par la norme marocaine 03.07.001/2006 relative aux eaux de boisson humaine et la circulaire marocaine du 9 Mars 1983 relative aux analyses bactériologiques des eaux minérales. Toutefois, l'eau de piscine de ces deux stations montre une contamination en Hiver probablement due à la fréquentation de ces stations par un nombre important de visiteurs.

Nous avons pu mettre en évidence chez quelques isolats thermophiles une capacité de dégrader à la fois l'amylase et la cellulase. Ainsi, nous pourrions exploiter leurs enzymes en différents secteurs industriels.



## Recommandations et Perspectives

Dans le but d'améliorer la qualité hygiénique de ces eaux nous recommandons :

- Le respect rigoureux du système de surveillance de ces stations, par des analyses quotidiennes (physicochimique et bactériologique).
- Le renforcement des bonnes pratiques d'hygiène au niveau des piscines.

Nous envisageons dans cette étude comme perspectives de :

- Elargir l'étude des analyses physicochimiques dans le temps et dans l'espace.
- Etude moléculaire des bactéries non identifiées par la Galerie Api.
- Etude de la cinétique enzymatique de l'activité amylase et pectinase.
- Exploitation des enzymes isolés des bactéries thermophiles dans différents secteurs industriels.



# Références bibliographiques

- AKHDAR L, TARMOUCHANT A N, RBEIRO ML, BEQQALI M, EL OUADEIHE K, ENAABIDATE LB, AHIRE MD, DRIUCHE Y, BEN SLIMANE A. Nouvelle Approche Géologique et Géodynamique du Complexe Hydrothermal de Moulay Yacoub (Bordure Septentrionale du Sillon Sud Rifain). *Comunicacoes Geologicas* , 2006, t. 93 , pp . 185-204.
- ALIBOU J. (2002). Impacts des changements climatiques sur les ressources en eau et les zones humides du Maroc. Table Ronde Régionale en Méditerranée Athènes, Grèce, pp1-39.
- BENMOUSSA A, CHAHLAOUI A.1, ROUR E.H.1, CHAHBOUNE M.1, ABOULKACEM A.22. Changing the quality of physicochemical waters of the Khoumane River in the vicinity citu of Moulay Idriss Zerhoun, 2012.
- BERNARD GD, CHAREYRAS JB. CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU SERVICE MÉDICAL RENDU THERMAL : Enquête sur les pathologies traitées dans le thermalisme, sur l'avis des patients sur l'utilité de leurs cures, et sur la place des cures thermales parmi les autres traitements utilisés, *Presse thermale et climatique* 2001; 138: 87-101.
- BOUCHRA SALAME, JAMILA BAHLOU, BAHIA BENNANI, RIDA HAJJI ,2013 .Bacteriological and physico-chemical quality of Ain Allah thermal water in Fez region(Morocco).
- CHAHLAOUI A., P. CUGNY, S. LEK, A. ZAID et M. RAMDANI (1997). Analyse quantitative de la qualité de l'eau de l'oued Boufekrane, Maroc. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle*. Toulouse, 133, 71-76.
- Crénothérapie en oto-rhino-laryngologie. *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 20-900-A-10. 2. GAINOT C. Le thermalisme en questions. Dossier de presse thermalisme- Thermalies; 1-11, 2006.
- EL ADDOULI J., A. CHAHLAOUI, A. BERRAHOU, A. CHAFI et A. ENNABILI (2009a). Qualité physico-chimique et biologique de l'oued Ouislane au sein de la ville de Meknès (centre - nord du Maroc). *Revue de l'Association Forum du Nord du Maroc*. N° double (4-5), 46-58ref3 BRICHA S., K.



- OUNINE, S. OULKHEIR, N. EL HALOUI et B. ATTARASSI. Étude de la qualité physico-chimique et bactériologique de la nappe phréatique M'nasra, Maroc. *Afrique SCIENCE* 03(3), 391 – 404 ,2007.
- EL ADDOULI J., A. CHAHLAOUI, A. BERRAHOU, A. CHAFI, A. ENNABILI et L. KARROUCH .Influence des eaux usées, utilisées en irrigation, sur la qualité des eaux de l'oued Bouishak- région de Meknès (Centre-Sud du Maroc). *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire Et Environnementale*. Vol 3, N°1, 56-75 ,2009b.
  - EL HAISSOUFI H., S. BERRADA, M. MERZOUKI, M. AABOUCH, L. BENNANI, M. BENLEMLIH, M. IDIR, A. ZANIBOU, Y. BENNIS et A. EL OUALI LALAMI. Pollution des eaux de puits de certains quartiers de la ville de Fès, Maroc. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. Vol 5, N°1, 37-68),2011.
  - EL WARTITI M, MALAKI A, EL MAHMOUHI N. Hydrochimie et Vulnérabilité des aquifères souterrains. *LA GEOLOGIE APPLIQUEE AU SERVICE DE L'ETUDANT ET LA SOCIETE*, 2007.
  - EL WARTITI M., MALAKI A.; EL MAHMOUHI N. Origine de la minéralisation d'eaux; *LA GEOLOGIE APPLIQUEE AU SERVICE DE L'ETUDANT ET LA SOCIETE* ,2007.
  - Et Abdelhakim EL OUALI LALAMI. Etude de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux de la station thermale de Sidi Harazem(Maroc), 2011.
  - GHOSE T.K. Measurement of cellulose activities .*Pure Appl.Chem.*59; 257-268, 1987.
  - GOMRI Mohamed Amine. Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien Mémoire du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires Option : Biotechnologie Alimentaire ,2011 .
  - Guerrero D. Approche scientifique du traitement de la dermatite atopique à Avène-lesBains. *Presse Therm. Climat*, 135(1), 7-12, 1998.
  - HASSOUNE E., S. EL KETTANI, Y. KOULALI et A. BOUZIDI. Contamination bactériologique des eaux souterraines par les eaux usées de la ville de Settat, Maroc. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire Et Environnementale*. Vol 4, N°1, 1-21, 2010.
  - Imane KHAYLI, Mohammed MERZOUKI, Mohamed BENLEMLIH, Saâd MANIAR
  - JOLY F., Charveron M., Aries M.F., Bidault J., Kahhak L., Beauvais F., Gall Y. Effect of Avène spring water on the activation of rat mast cell by substance P or antigen, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 11, 111-116, 2010.
  - KARIN ALAIN, CLAIRE GESLIN, ANNE GODFROY, DANIEL PRIEUR. Les thermophiles
  - LAKHDARA., NTAMOUCHE A., RIBEIRO M.L., BEQQALI M., EL OUDEIH K., BENAABIDAT L, DAHIRE M., DRIUCHE Y., et BENSLIMANE, A. Nouvelle Approche Géologique et Géodynamique du Complexe Hydrothermal de Moulay Yacoub (Bordure Septentrionale du Sillon Sud Rifain). *Comunicacoes Geologicas*, t. 93, pp. 185-204 , 2006.



- MARCHAL ET BOURDON .Le cycle de l'eau. Réseau Partenarial des données sur l'Eau : Acteurs de l'eau en Portou-charentes : Observatoire Régional de l'Environnement PoitouCharentes., 1982.
- NEAL C., M. NEAL, H. WICKHAM, M. HARROW .The water quality of a tributary of the Thames, the Pang, southern England. The Science of the Total Environment. 251 / 252: 459-475. 2007.
- NONY P, CUCHERAT M, BISEL JP. Effets thérapeutiques des cures thermales : une méta-analyse des études avec tirage au sort.1er Syposium Thermal Européen, Aix les bains.novembre ; 15-17 ,2006 .
- Norme Marocaine 03.7.001, 2006. Qualité des eaux d'alimentation humaine.
- Norme Marocaine 03.7.050, 1996. Recherche des salmonelles dans les eaux usées.
- PECASTINGS S., DUBOURG M., ROQUES C. Evaluation de l'efficacité de techniques de désinfection utilisées en milieu thermal sur un réseau d'eau minérale naturelle pilote.Press Therm Climat.146:19-29 ,2009 .
- QUENEAU P. Médecine thermique - Faits et preuves. Paris : Masson ,2000.
- RodierJ., BazinC., BroutinJ.P., ChambonP., ChampsaurH., RodiL., 1996.L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, 8eédition, Dunod, Paris, France
- ROQUES CF, BOISEZON X, QUENEAU P. Médecine thermique : actualités médicales et scientifiques. Bull. Acad. Natle Med, 2009. 193, n° 5, 1165-1180, séance du 12 mai 2009.
- SAAD ALAMI Y. Les thermes de Moulay Yacoub sur les traces d'Aix-les-Bains. l'économiste ; 22/02/2006.
- Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol. 1982;43:777-780.
- TRAISSAC L, CANNELAS J, OHAYON-COURTES C, BRUNSHWIG D en oto-rhino-laryngologie. Encyclopédie Médico-chirurgicale 20-900-A-10.
- YAVUZ E, GUNES H S. Harsa1 and A.F. YENIDUNI. Identification of extracellular enzyme producing thermophilic bacilli from Balcova (Agamemnon) geothermal site by ITS rDNA RFLP. Journal of Applied Microbiology, 97, 810–817, 2004.





# Annexes

## *Milieux de culture :*

### 1) Milieu à base d'amidon pour les bactéries et les levures

6g de peptone

0,5g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,5g de K Cl

1g d'amidon de pomme de terre

H<sub>2</sub>O QSP 1 litre

### 2) Composition du milieu PGA:

#### Milieu solide :

5g d'extrait de levure

5ml de  $(NH_4)_2SO_4$  (10%)

0,5ml de  $MgSO_4$  1M

5ml de glycérol (50%)

2,5g de PGA (Polygalactirrique acide)

20g d'agar

H<sub>2</sub>O QSP 1 litre

#### Tampon ( pH = 8):

15g de  $Na_2HPO_4$

0,7g de  $NaH_2PO_4$

H<sub>2</sub>O QSP 1 litre

### 3) Milieu M9

a- Milieu minimum M9 :

6g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

3g de  $KH_2PO_4$

1g de  $NH_4Cl$

0,5g de Na Cl



---

H<sub>2</sub>O QSP 1 litre

**4) Milieu CMC**

10g de CMC

5g d'extrait de levure

2ml de glycérol (50%)

20g d'agar-agar

Tampon M9 QSP 1 litre

**5) Tergitol 7 au TTC :**

10g de Peptone

5g d'Extrait de viande

6g d'Extrait de levure

20g de Lactose

7 10 mg Tergitol

25 mg de TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride : nom anglais du Chlorure de Triphényl Tétrazolium)

50 mg de Bleu de bromothymol 50 mg

13g d'agar 13,0 g

pH = 7,2

**6) Slanetz**

10g d'Agar-agar

20g de Peptone

0,4g d'Azide de sodium

2g de Glucose

0,1g de TTC (chlorure de 2-3-5 triphényl-tétrazolium)

pH = 7,2

**7) Gélose au Cétrimide**

16g de peptone de gélatine



10g de peptone de caséine

0,2g de bromure de tétradonium (cétrimide)

15g d'acide nalidixique

10g de sulfate de potassium

1,4g de chlorure de magnésium

10g d'agar

### **8)Sabouraud**

10g de Peptone

20g de Glucose massé

15 gd' Agar-agar

100ml d'Eau distillée (qsp)

Vitamines et facteurs de croissance

pH = 6,0

### **8) Gélose de dénombrement**

5g de Tryptone

2,5 g d'Extrait de levure

4g de Glucose

9g d' Agar

pH = 7

Eau qsp 1L

### **Contrôle de qualité exercé au LRDEHM de Fès :**

Ce contrôle est basé sur les manipulations suivantes :

- Effectuer un calibrage de balance.
- Utiliser une eau distillée préalablement contrôlée (pH, conductivité,...)
- Préparer les milieux de cultures dans un champ stérile, à côté d'un bec benzène.
- Utiliser une verrerie contrôlée.
- Dissoudre complètement les composants du milieu préparé.



- 
- Respecter la durée et le temps d'autoclavage.
  - Contrôler le niveau d'eau de l'autoclave avant utilisation.
  - Contrôler l'efficacité de l'autoclave à chaque stérilisation par le ruban indicateur et mensuellement par l'indicateur biologique (Stérikon).
  - Couler les milieux Stérilisés dans un champ stérile.
  - Contrôler la stérilité du milieu préparer avant utilisation, par incubation d'une boîte si milieu solide ou d'un tube si bouillon à l'étude à  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 48H.



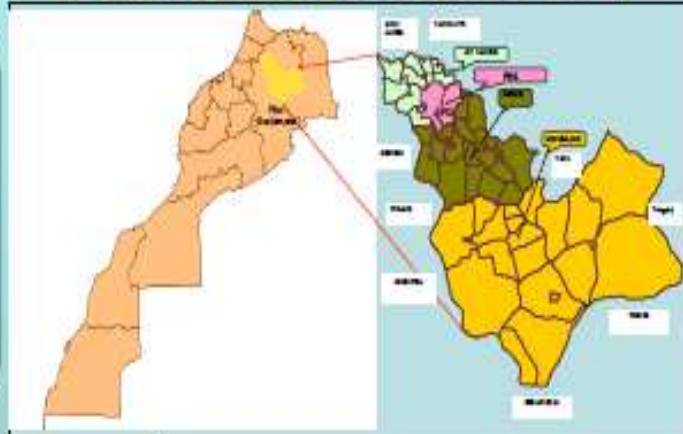
## LABORATOIRE REGIONAL DE DIAGNOSTIC EPIDEMIOLOGIQUE ET D'HYGIENE DU MILIEU DE LA VILLE DE FES

### HISTORIQUE

En 1977 Le Ministère de la Santé a créé des laboratoires "à visée préventive" : les Laboratoires de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LDEHM). Ils constituent une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministère de la Santé dans le cadre de l'Hygiène de l'environnement.

Actuellement il existe 42 LDEHM, Le laboratoire de Fès fait partie des 11 laboratoires régionaux qui ont vu le jour à partir des années 80. Il est implanté à l'Hôpital EL GHASSANI et est individualisé des Laboratoires d'analyses cliniques et de transfusion.

### SITUATION GÉOGRAPHIQUE DE LA VILLE DE FÈS



### Organisation fonctionnelle du LRDEHM



#### Mission du LRDEHM

- Soutien au programme de prévention et de lutte contre les maladies infectieuses et transmissibles,
- Appui technique (Diagnostic et confirmation des maladies) pour les structures de soins de santé de base (RSSB).

#### Assurance qualité au LRDEHM

- Une politique d'assurance qualité est mise en œuvre par le LRDEHM pour obtenir et garantir la qualité des analyses.
- Un système statistique informatisé est mis en place par le LRDEHM pour le traitement des résultats des analyses.

#### Rattachement du LRDEHM

Le LRDEHM est rattaché au SIAAP et à la Direction Régionale de la Santé de Fès. Il est également en étroite relation avec l'Institut National d'Hygiène et la Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies de Rabat.

#### Clients du LRDEHM

Le LRDEHM couvre les besoins des délégations médicales des provinces et préfectures de la région Fès-Boulemane (SIAAP, HOPITAUX REGIONAUX, SERVICES PREVENTIFS D'HYGIENE DU MILIEU, CENTRES DE DIAGNOSTIC EPIDEMIOLOGIQUE) ainsi que ceux des Bureaux Communaux d'Hygiène, CHU Hassan II.

### Perspectives

- Structurer la collaboration et la coopération du laboratoire avec son environnement
- Développer et réaliser des études épidémiologiques en relation avec ses activités
- Installer d'autres analyses:
  - Analyses toxicologiques de l'eau (recherches des pesticides et métaux lourds-)
  - Parasitologie des eaux
  - Sérologie et PCR du paludisme
  - Entomologie du moustique vecteur des leishmanioses



