



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

**Projet de Fin d'Etudes**  
**Licence Sciences & Techniques**  
**«BioProcédé, Hygiène & sécurité alimentaires»**

***Qualité bactériologique des eaux de puits en  
milieu rural (province de Kenitra)***

**Présenté par** : Mlle Razzoug yousra

**Encadré par** : Mr RACHIQ Saâd

**Soutenu le** : 15 juin 2015

Devant le jury composé de :

- Mr RACHIQ Saâd
- Mme MIKOU Karima
- Mme OUHID Malika

**Année universitaire**  
**2014/2015**



**A ceux qui n'ont jamais cessé de m'encourager, et me conseiller.**

**A ceux qui n'ont jamais été avares ni de leur temps ni de leurs  
connaissances pour satisfaire mes interrogations**

**A mes parents ; Mohammed et El-ghalya, mes grands-parents,**

**Mes frères, Mes sœurs (en particulière Nabila) et à tous ma famille**

**En témoignage de l'amour et de l'affection qui me lient.**

**A monsieur RACHIQ Saâd**

**A madame OUAHID Malika**

**A monsieur Rachid**

**Aux petits Sawsan et Rayan**

**A monsieur Karim**

**A tous mes professeurs**

**A tous mes amis...**



# Remerciement



L'accomplissement du présent travail n'a été possible qu'avec le soutien d'ALLAH et de certaines personnes :

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements ainsi que ma grande reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études et leur exprimer ma gratitude pour l'intérêt et le soutien qu'ils m'ont généreusement accordé, en particulier tous les enseignements du département des sciences de la faculté des sciences et technique de Fès.

Mes remerciements s'adressent à mes parents En reconnaissance des sacrifices qu'ils ont toujours consentis pour nous, de leur encouragement, de leur soutien, et de leur aide morale et matérielle permanente. Que ce modeste travail soit pour eux un témoignage de notre infini respect et notre profond amour.

Mes remerciements s'adressent à mes encadrants : Pr RACHIQ Saâd et Pr OUAHID Malika pour avoir dirigé mon projet de fin d'étude. La confiance et le soutien, qu'ils m'ont accordés, m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'exprime ma gratitude aux membres du jury qui ont daigné laisser leurs multiples occupations pour se donner la peine d'examiner ce travail, nous leur sommes infiniment reconnaissants. Leurs critiques et suggestions contribueront certainement à rehausser la valeur scientifique de ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Mme ILHAM, Mme NAJWA, Rachid et MOUSTAFA, pour avoir enrichi mes recherches dans le cadre de ce projet de fin d'étude.

Enfin je remercie tous les professeurs de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et en particulier ceux du Département de biologie.

## *Résumé*

*Dans* le but d'évaluer la qualité bactériologique des eaux de 10 puits, non traités dans le milieu rural de la province de Kenitra, 10 échantillons d'eaux ont été analysés par la technique de la membrane filtrante à la recherche et le dénombrement des coliformes, *E. coli*, des entérocoques intestinaux et des spores d'anaérobies sulfite-réducteurs. Nous avons procédé également à la recherche et au dénombrement des germes revivifiables à 22°C et à 37 °C par la méthode d'incorporation en gélose.

*Selon* la norme marocaine de la qualité de l'eau (NM 03.7.001 version 2006), 8 échantillons parmi 10 ne sont pas conformes.

*Le* niveau de contamination varie selon les puits :

- Pour les 8 puits non conformes, la flore totale présente des densités variant de 20 à  $2 \times 10^3$  UFC/ml), ainsi :
- Les coliformes totaux présents dans tous les échantillons avec des valeurs comprises entre 4 et  $2 \times 10^3$  UFC / 100 ml.
- *E. coli* a été retrouvé dans 6 échantillons, les densités observées s'échelonnent entre 10 et  $10^2$  UFC /100 ml.
- Les entérocoques intestinaux sont présents dans presque tous les échantillons avec des densités variant de 10 à  $3 \times 10^2$  UFC /100 ml.
- Les spores d'anaérobies sulfite-réducteurs sont détectés dans 6 puits avec un effectif compris entre 10 et  $3 \times 10^2$  UFC / 100 ml

# Sommaire

Résumé.....	4
Introduction .....	8
<b><i>Partie 1 : Revue bibliographique</i></b>	
I. Cycle de l'eau. ....	9
II. Critère de choix pour l'implantation d'un point d'eau souterraine.....	10
III. Les différents types de pollution des eaux.....	10
1. Les polluants chimiques.....	10
2. Les polluants physiques .....	10
3. Les polluants biologiques .....	11
IV. Les maladies à transport hydrique.....	11
1. Les maladies bactériennes .....	11
1.1. La choléra .....	11
1.2. La fièvres typhoïdes et paratyphoïdes .....	12
2. Les maladies virales .....	12
2.1. L'hépatite .....	12
2.2. La poliomyélite .....	12
3. Les maladies parasitaires .....	12
3.1. La dracunculose .....	12
3.2. Le paludisme .....	13
V. Les paramètres recherchés dans l'eau.....	13
1. Les bactéries aérobies revivifiables à 22°C et à 37°C.....	13
2. Les bactéries coliformes .....	13
3. <i>E coli</i> .....	13

4. Les entérocoques intestinaux .....	13
5. Les spores d'anaérobies sulfito-réducteurs .....	14
<b>VI. La norme marocaine pour la qualité des eaux d'alimentation humaine.....</b>	<b>15</b>

## *Partie 2 : présentation du laboratoire*

<b>I. Statut .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Missions.....</b>	<b>16</b>
<b>III. Organisation du laboratoire.....</b>	<b>16</b>

## *Partie 3 : Matériel et méthodes*

<b>I. Echantillonnage .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Réception .....</b>	<b>17</b>
<b>III. Analyses.....</b>	<b>17</b>
1. Préparation des dilutions .....	17
2. Dénombrement des bactéries .....	17
2.1. Dénombrement des bactéries revivifiables à 22°C et à 37°C .....	18
2.2. Dénombrement des coliformes totaux et d' <i>E Coli</i> .....	19
2.3. Dénombrement des entérocoques intestinaux .....	19
2.4. Dénombrement des spores d'anaérobies sulfito-reducteurs .....	20

## *Partie 4 : Résultats et discussion*

<b>I. Résultats .....</b>	<b>21</b>
<b>II. Discussion .....</b>	<b>25</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>27</b>
<b>Références bibliographique .....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>29</b>

## Liste des abréviations:

**B.A.R** : **B**actéries **A**érobies **R**evivifiables

**BEA** : **B**ile-**E**sculine-**A**zoture

**C** : Conforme

**E Coli** : *Escherichia Coli*

**NC** : Nom Conforme

**OMS** : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

**Spores d'A.S.R** : Spores d'**A**naérobies **S**ulfito-**R**éducteurs

**TSA** : Tryptone-Sulfite-Cyclosérine

**TTC** : Chlorure de 2, 3,5-TriphénylTétrazolium

**V.M.A** : Valeur **M**aximale **A**dmissible

## INTRODUCTION :

*L'eau* est un élément essentiel pour la vie humaine, animale et végétale. Le corps d'un être humain adulte est composé de 60 % d'eau et la consommation minimale de 1,5 litre d'eau par jour est nécessaire (1).

*Ainsi*, l'eau consommée doit être de bonne qualité sanitaire afin d'éviter la survenue de maladies qui peuvent être causées par des bactéries pathogènes, des virus ou des parasites. Les maladies associées à ces organismes sont très souvent liées à la consommation d'eau ne répondant pas à des critères de potabilité.

*La* plupart des germes pathogènes d'origine bactériennes incriminés dans les maladies liées à l'eau sont : *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A et B, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* entérotoxigène, *Escherichia coli* entérohémorragique, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*. (2)

*Selon* l'OMS, en 2012 dans les régions rurales du tiers monde, 97 personnes sur 100 n'ont pas accès à un approvisionnement en eau par canalisation (3), d'où l'utilisation des eaux de puits qui peuvent être une source de maladies contagieuses comme la choléra, la fièvre typhoïde et gastro-entérite, les hépatites virales et entérovirus, etc. car l'eau d'un puits ou d'une source clôturée n'est pas forcément potable pour autant.

*Il* est donc important de connaître la qualité de l'eau et de vérifier si les critères de potabilité sont respectés pour éviter ce risque commun et répandu pour la santé.

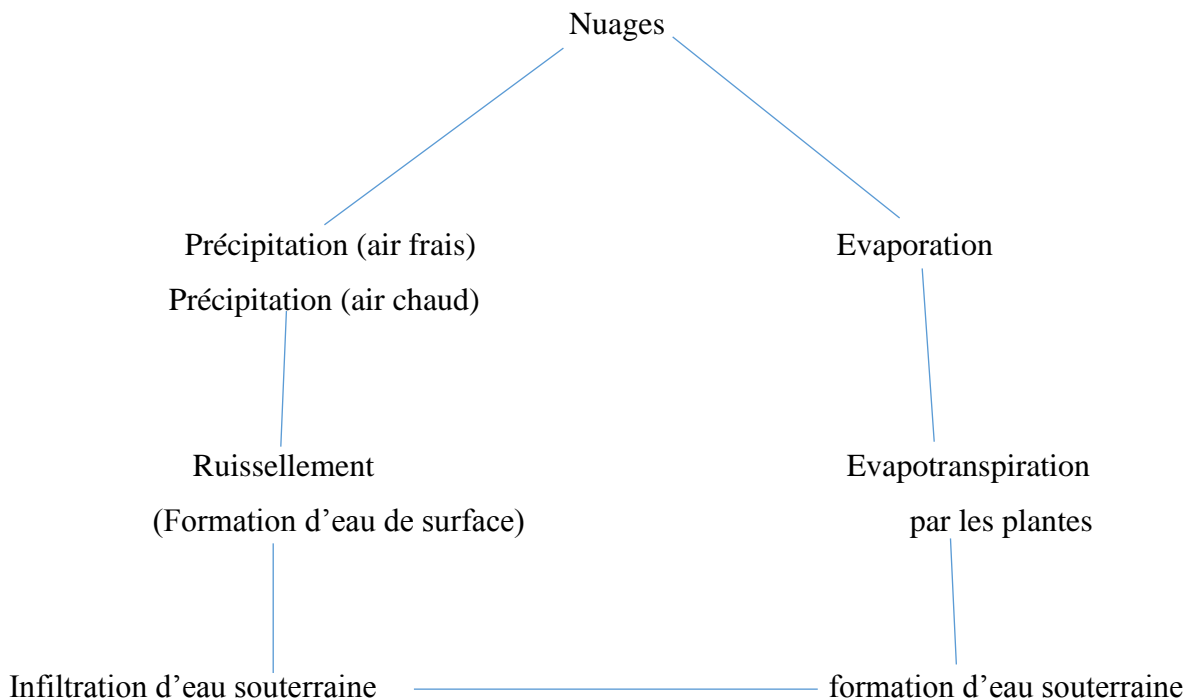
L'objectif de ce travail est d'apprendre dans une première étape la technique d'analyse bactériologique des eaux selon les normes établies et de faire l'application sur 10 échantillons d'eau de puits non traités prélevés dans le milieu rural de la province de Kenitra.



# Partie 1 : Revue bibliographique

## I. Cycle de l'eau :

L'eau, élément sous trois états (liquide, gazeux et solide), parcourt un cycle éternel. L'évaporation lente et incessante des fleuves, des lacs et des mers provoque la formation dans la haute atmosphère des nuages qui par condensation se transforment en pluie. Une fraction des eaux de pluie ruisselle à la surface du sol et va grossir les cours d'eau et les lacs, d'où elle est sujette d'une part à l'évaporation d'autre part à l'infiltration à travers le sol. Une partie des eaux d'infiltration est reprise par la végétation qu'elle alimente avant d'être rejetée dans l'atmosphère : c'est l'évapotranspiration. L'autre partie s'accumule dans le sous-sol pour former des nappes souterraines qui, à leur tour peuvent être à l'origine des sources émergentes à la surface du sol (4) (5).



De ce cycle nous pouvons dégager trois sources d'approvisionnement en eau.

**a. Les eaux de pluie :** les eaux de pluie peuvent être collectées à partir des toitures des maisons dans des récipients ou dans des impluviums. A l'origine ces eaux sont pures sur le plan microbiologique, mais sur le plan chimique, il leur manque souvent certains éléments indispensables à la santé comme le sodium, le magnésium, le manganèse, le fer, l'iode ...(4)

**b. Les eaux de surface :** composées d'eaux de mer, de fleuve, de rivière, de marigot, ces eaux couvrent la terre. La terre « planète bleue » en raison de la présence d'eau, 97,5% de

celle-ci consiste toutefois en eau salée dont l'essentiel est dans les océans et 2,5% seulement en eau douce (6). Grossies par les eaux de ruissellement elles reçoivent toutes sortes de déchets contenant des germes nuisibles pour la santé.

**3. Les eaux souterraines** : formées par les eaux d'infiltrations, les eaux souterraines sont exemptes de pollution. Cependant elles peuvent, d'une part être contaminées par la technique de puisage, la proximité des latrines ou d'autres sources de pollution, le manque de protection. D'autre part, elles peuvent être chargées par des éléments qui conduisent à des eaux saumâtres (Na Cl), eau dure (Ca<sup>++</sup>), eau ferrugineuses (Fe<sup>++</sup>) (4).

## **II. Critère de choix pour l'implantation d'un point d'eau souterraine**

Lorsqu'on a à choisir entre diverses sources d'approvisionnement en eau, la qualité de l'eau ne doit être l'unique considération. Il faut également tenir compte du débit de l'eau et de la pérennité du point d'eau. Compte tenu du coût élevé et de l'insuffisance des systèmes d'adduction d'eau, le captage des eaux souterraines avec les puits constituent l'une des meilleures sources d'eau de boisson dans les pays en voie de développement à condition que ces puits soient bien protégés. En général, le choix de l'emplacement du puits doit être fait par les services chargés de l'hydraulique en tenant compte des désirs de la population, de l'hydrogéologie du terrain. Un puits ne peut fournir de l'eau que s'il rencontre une nappe. Les nappes peuvent être partout mais leur qualité, leur débit et leur profondeur sont très variables (7) (4).

## **III. Les différents types de pollution des eaux**

On regroupe généralement les polluants de l'eau sous trois grandes catégories:

### **1. Les polluants chimiques**

On regroupe les polluants chimiques en cinq principaux types (8):

- ✓ Acides nitriques et sulfurique
- ✓ Nitrates et phosphates
- ✓ Métaux lourds
- ✓ Hydrocarbures
- ✓ Produits organiques persistants.

### **2. Les polluants physiques**

Les polluants de ce type regroupent des débris insolubles dans l'eau et non dégradables, tels que les plastiques. Ces déchets solides peuvent blesser certains animaux aquatiques ou encore

les étouffer. Ils peuvent aussi s'accumuler et former d'immenses décharges flottantes qui dérivent avec les courants marins. Les eaux chaudes rejetées par les systèmes de refroidissement des centrales thermiques et nucléaires représentent aussi un autre type de polluants physiques. En effet, ces eaux réchauffent les écosystèmes aquatiques ce qui peut nuire entre autres aux poissons, puisque ce réchauffement réduit la concentration en oxygène de l'eau et favorise l'eutrophisation. On qualifie parfois ce phénomène de pollution thermique de l'eau (8).

### **3. Les polluants biologiques**

Ce type de polluant regroupe des microorganismes (bactéries, virus, parasites) et des matières organiques produites par les êtres vivants (excréments, sucres, graisses, etc.). Ils proviennent majoritairement des eaux usées domestiques et industrielles (*via* les égouts) ainsi que des élevages d'animaux (lisier, fumier). Les matières organiques sont généralement faciles à dégrader. Toutefois, lorsqu'elles sont en trop grande quantité, leur dégradation enrichit l'eau en éléments nutritifs, ce qui favorise l'eutrophisation du milieu aquatique. Chez l'humain, l'eau contaminée par des microorganismes peut provoquer des diarrhées, des vomissements et des maladies parasitaires (8).

## **IV. Les maladies à transport hydrique**

Les pathologies biologiques liées à l'eau peuvent être d'origine bactérienne, virale, ou parasitaire (9) :

### **1. Les Maladies bactériennes**

Les eaux peuvent transmettre un certain nombre de maladies d'origine bactérienne. On peut citer :

#### **1.1. La choléra**

La choléra est une infection intestinale aiguë qui commence par une diarrhée aqueuse indolore, des nausées et des vomissements. La plupart des sujets atteints ont une diarrhée très bénigne ou une infection asymptomatique. Les personnes sous-alimentées en particulier ont des symptômes plus graves. Les cas graves de choléra se présentent avec une diarrhée et des vomissements abondants. La choléra grave, non traitée, peut provoquer une déshydratation rapide et entraîner la mort. En l'absence de traitement, 50% des personnes atteintes de choléra grave décéderont, mais un traitement rapide et approprié réduit ce pourcentage à moins de 1% des cas (10).

## **1.2. La fièvre typhoïde et paratyphoïde :**

La fièvre typhoïde est une infection bactérienne des voies intestinales et du courant sanguin. Les symptômes peuvent être bénins ou graves et comprennent une fièvre prolongée pouvant être aussi plus élevée que 39 - 40° C, des malaises, une anorexie, des céphalées, une constipation ou une diarrhée, des taches rosées sur la poitrine ainsi qu'une splénomégalie et une hépatomégalie. La plupart des sujets présentent des symptômes 1-3 semaines après l'exposition. La fièvre paratyphoïde a des symptômes similaires à la fièvre typhoïde mais elle est généralement moins grave (10).

## **2. Les maladies virales :**

Aux côtés des maladies d'origine bactérienne, nous avons des maladies virales. On peut citer :

### **2.1. L'hépatite**

L'hépatite, terme général désignant l'inflammation du foie, a un certain nombre de causes infectieuses et non infectieuses. Deux des virus qui causent l'hépatite (hépatite A et E) peuvent être transmis par l'eau et les aliments; l'hygiène est donc importante dans la lutte contre ces virus. La maladie débute par l'apparition soudaine de fièvre, une faiblesse de l'organisme, un manque d'appétit, des nausées, une gêne abdominale, suivis par un ictère quelques jours après. La maladie peut être bénigne (durant 1-2 semaines) ou grave et invalidante (durant plusieurs mois) (10).

### **2.2. La Poliomyélite**

La poliomyélite est une maladie très contagieuse provoquée par un virus (le poliovirus) qui envahit le système nerveux et qui peut entraîner en quelques heures des paralysies irréversibles. Depuis les années 60 cette maladie peut être prévenue grâce à des vaccins efficaces. Un programme mondial visant à éradiquer la maladie par la vaccination a été lancé sous le contrôle de l'OMS. La maladie commence à se manifester par des symptômes de type grippal, fièvre, fatigue, céphalées pouvant s'accompagner de vomissements, raideur de la nuque et douleurs dans les membres (11).

## **3. Les maladies parasitaires**

En plus des maladies d'origine bactérienne et virale, on trouve les épidémies d'origine hydrique dues à des parasites tels que :

### **3.1. La Dracunculose**

La dracunculose ou maladie du ver de Guinée est une infection causée par le parasite *Dracunculose medinensis* et que l'on ingère en buvant de l'eau contaminée. Le parasite provoque une pathologie handicapante et douloureuse qui commence par une vésicule, en

général sur la jambe. Au moment de l'éruption, il peut y avoir un prurit, de la fièvre, un œdème, des douleurs violentes et des sensations de brûlure (10).

### **3.2. Le Paludisme**

Le paludisme la maladie infectieuse parasitaire la plus importante dans le monde est transmise par les moustiques qui se reproduisent en eau douce ou parfois en eau saumâtre. Les symptômes du paludisme sont la fièvre, les frissons, les céphalées, les douleurs musculaires, la fatigue, la nausée et les vomissements, la diarrhée, l'anémie et la jaunisse (coloration jaune de la peau et des yeux). Des convulsions, un coma, une anémie sévère et une insuffisance rénale peuvent également survenir (10).

## **V. Les paramètres recherchés dans l'eau**

### **1. Les bactéries aérobies revivifiables à 22°C et 37°C**

Toute bactérie aérobie, levure et moisissure, capable de former des colonies dans un milieu de culture nutritif gélosé (12).

#### **➤ Signification**

Ils fournissent une indication sur la propreté et l'intégrité des systèmes de distribution. Ils peuvent également être utilisés pour évaluer l'aptitude à l'emploi de sources d'alimentation en eau pour la préparation d'aliments et de boissons qui ne devraient contenir que peu de micro-organismes afin d'éviter une contamination du produit par des germes contaminants (12).

### **2. Les bactéries coliformes**

Les coliformes constituent un groupe de bactéries Gram négatif, en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores (13). On les retrouve fréquemment dans l'environnement, par exemple dans le sol ou la végétation, ainsi que dans les intestins des mammifères, dont les êtres humains (13).

Les coliformes totaux n'entraînent en général aucune maladie, mais leur présence indique qu'une source d'approvisionnement en eau peut être contaminée par des micro-organismes plus nuisibles (13).

### **3. *Escherichia coli***

Ce sont des bactéries coliformes et qui produisent également l'indole à partir du tryptophane dans les  $(21 \pm 3)$  h à  $(44 \pm 0,5)$  °C (13).

La contamination récente par des matières fécales humaines ou animales représente la principale source de pathogènes dans l'eau potable :

- Fosses septiques et rejets d'eaux usées mal traités.

- Eaux de ruissellement.
- Lessivage de fumiers animaux.
- Animaux domestiques ou sauvages.

Pendant et après des précipitations, des bactéries et d'autres micro-organismes dangereux peuvent pénétrer dans les rivières, les lacs et les nappes phréatiques. Une source mal construite ou mal entretenue peut accroître les risques de contamination (14).

Les bactéries *E. coli* sont considérées comme le meilleur indicateur de contamination fécale. Leur présence dans l'eau signifie que cette dernière est contaminée par une pollution d'origine fécale et qu'elle peut donc contenir des microorganismes pathogènes responsables de maladies, comme des bactéries, des virus et des parasites (15).

#### ➤ Risques pour la santé

Les enfants en bas âge, les personnes âgées, ainsi que les personnes dont le système immunitaire sont affaibli, peuvent avoir des symptômes plus graves. Dans les cas extrêmes, certains pathogènes peuvent infecter les poumons, la peau, les yeux, le système nerveux, les reins, ou encore le foie, et les effets peuvent être plus graves, chroniques, voire mortels (14).

### **3. Les Entérocoques intestinaux :**

Les entérocoques sont définis comme des cocci, Gram positif disposés, le plus souvent en chaînettes (16), ce sont des micro-organismes vivants dans les matières fécales (17). Ils sont d'origine une contamination d'origine fécale (fosse septique, égout, animaux, fumier). Ils peuvent également prendre leur origine de l'eau de surface qui pénètre dans un puits non étanche (17). Elles sont utilisées comme indicateur d'efficacité de traitement (17).

#### ➤ Risque pour la santé :

Maladie gastro-entérite ... (17).

### **4. Les Spores anaérobies sulfite-réducteurs :**

Ce sont des micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfite-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacés et au genre *Clostridium*. Ils forment des colonies caractéristiques (entourées d'un halo noir) dans le milieu sélectif spécifié (18).

Les spores peuvent ainsi fournir des indications sur une pollution éloignée ou intermittente. Elles peuvent même être résistantes à la chloration dans. Les proportions habituellement utilisées pour le traitement des eaux, et sont donc ainsi utiles pour les besoins des contrôles, puisqu'elles survivent dans l'eau pendant longtemps, car elles sont plus résistantes que les formes végétatives à l'action des facteurs chimiques et physiques (18).

## VI. La Norme marocaine pour la qualité des eaux d'alimentation humaine

La norme fixe les exigences auxquelles doit satisfaire la qualité des eaux d'alimentation humaine(19).

On comprend par, «eaux d'alimentation humaine" :

- toute eau destinée à la boisson quel que soit le mode de production et de sa distribution;
- les eaux utilisées pour la préparation, le conditionnement ou la conservation des denrées alimentaires destinées au public.

L'eau d'alimentation humaine ne doit contenir en quantités dangereuses ni micro-organismes, ni substances chimiques nocifs pour la santé; en outre, elle doit être aussi agréable à boire que les circonstances le permettent. Les eaux d'alimentation humaine doivent satisfaire aux exigences de qualité spécifiées dans le tableau(19) :

**Tableaux 1:** les valeurs maximales admissibles par la norme marocaine de certaines bactéries recherchés dans l'eau.

paramètres bactériologiques	Références normatives	valeurs maximales admissibles (VMA) NM 03.7.001/2006
Micro-organismes revivifiables à 22°C	NM ISO 6222	100 UFC/1ml
Micro-organismes revivifiables à 37°C	NM ISO 6222	20 UFC/1ml
<i>Coliformes totaux</i>	NM ISO 9308-1	0 UFC/100ml
<i>E. Coli</i>	NM ISO 9308-1	0 UFC/100ml
Entérocoques intestinaux	NM ISO 7899-2	0 UFC/100ml
<i>Spores d'anaérobies sulfito-réducteurs</i>	NM ISO 6461-2	0 UFC/100ml

## *Partie 2 : présentation du laboratoire*

### **I. statut**

Le présent travail a été effectué au laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du milieu de Kenitra qui est un établissement public relevant du ministère de la sante. Il est lié, sur le plan administratif, à la Direction Régionale de la sante Gharb Chrarda Bni Hssen.

### **II. Missions**

Le laboratoire contribue au diagnostic et à la prévention des maladies à transport hydrique et alimentaire. Les missions des laboratoires Régionaux de Diagnostic Epidémiologique et d'hygiène du milieu ont été définies par la circulaire ministérielle N°000128 du 17-10-2012 et consistent en :

- ✓ L'analyse microbiologique des eaux (eau d'alimentation humaine, eau de baignade, eau de piscine, eau usées) ainsi que des denrées.
- ✓ Assure les analyses physico-chimiques des eaux pour l'ensemble des délégations de la région.
- ✓ Contribue aux investigations épidémiologiques mises en œuvre par les services compétents des délégations relevant de la Direction Régionale de la sante.
- ✓ En outre, le laboratoire assure, selon la demande et la disponibilité, des stages de formation de courte durée au profit des étudiants.

### **III. Organisations du laboratoire :**

Le laboratoire comprend :

- 1) Un Espace pour la réception des échantillons
- 2) Une unité de microbiologie pour les eaux et les aliments
- 3) Une unité d'incubation et de lecture
- 4) Une unité de préparation des milieux de cultures
- 5) une laverie
- 6) Une unité de physico-chimie des eaux
- 7) Une salle de réserve
- 8) Une salle de personnel
- 9) Des bureaux
- 10) Des sanitaires



## Partie 3 : Matériel et Méthodes

### **I. Echantillonnage**

Dix échantillons d'eau sont prélevés au niveau de 10 puits en milieu rural dans la province de Kenitra par des techniciens d'hygiène selon la norme marocaine (NM ISO 19458 version 2009, Echantillonnage pour analyse microbiologique) relative à l'échantillonnage. Les flacons de prélèvement sont stérilisés et préparés par le laboratoire. Le transport est fait dans des caisses isothermes à une température  $\leq 8$  °C.

### **II. Réception**

A la réception des échantillons, on procède à la vérification du bulletin de demande d'analyse qui comporte les renseignements suivants :

Les renseignements requis à la réception sont :

- ✓ Date et heure du prélèvement ;
- ✓ Identification du préleveur et de son établissement ;
- ✓ Nature de l'échantillon ;
- ✓ Référence de l'échantillon ;
- ✓ Identification du point du prélèvement ;
- ✓ Chlore résiduel si l'eau est traitée et ;
- ✓ Observations ayant un impact sur le prélèvement.

### **III. Analyses**

#### **1. Préparation des dilutions**

- ❖ Pour les échantillons d'eau de consommation traitée, il n'est pas nécessaire d'effectuer des dilutions.
- ❖ Pour les eaux de consommation non traitées, des dilutions doivent être effectuées comme suite: on prélève aseptiquement 10 ml de l'échantillon à l'aide d'une pipette stérile et on l'introduit dans un flacon contenant 90 ml d'eau distillée stérile. Après agitation vigoureuse, on effectue la dilution suivante en prélevant aseptiquement 10 ml de la dilution précédente et on l'introduit dans un flacon de 90 ml d'eau distillée stérile. L'opération peut être répétée plusieurs fois.

#### **2. Dénombrement des bactériens**

L'analyse bactériologique des eaux est effectuée selon des méthodes normalisées (tableaux) :

**Tableaux 2** : les méthodes de recherches de certaines bactéries et leurs références.

Paramètre	Méthode	Norme Marocaine
Les bactéries aérobies revivifiables à 22°C et à 37 °C	Incorporation sur gélose	NM ISO 6222 version. Recherche et dénombrement des microorganismes revivifiables
Bactéries coliformes et <i>E. Coli</i>	Filtration sur membrane	NM ISO 9308-1 Version 2007. Recherche et dénombrement des bactéries coliformes et des E. Coli
Entérocoques intestinaux	Filtration sur membrane	NM ISO 7899-2 version 2007. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux
Spoires d'anaérobies sulfite réducteurs	Filtration sur membrane	NM ISO 6461-2 Version 2007 .Recherche et dénombrement des spores d'anaérobies sulfite-réducteurs (Clostridia)

### **2.1. Dénombrement des bactéries aérobies revivifiable à 22°C et 37°**

Après désinfection de la surface de travail et identification les boites de pétri (numéro de l'échantillon, la dilution et température d'incubation), les flacons contenant les échantillons sont vigoureusement agités d'un mouvement vertical afin de bien homogénéiser le contenu. On met un volume de la prise d'essai (ou de dilutions) n'excédant pas 2 ml, 1 ml, 0,1 ml, 0,5 ml dans une boite de Pétri. Puis, on ajoute 15 à 20 ml de la gélose à l'extrait de levure fondue (45° à 47°C) et on mélange avec précaution par rotation lente dans les deux sens, en évitant l'éclaboussement de la gélose sur le couvercle de la boite de Pétri. Après solidification du milieu la boite est posée sur une surface plane. On ensemence au moins une boite par température d'incubation.

#### **➤ Incubation et examen**

Les boites sont retournées, un jeu est incubé à  $36 \pm 2$  °C pendant  $44h \pm 4h$  et un autre jeu est incubé à  $22 \pm 2$  °C pendant  $68h \pm 4h$ . Après incubation, on examine et on rejette toute boite présentant une croissance confluyente.

#### **➤ Dénombrement des colonies**

Les dénombrements sont effectués à l'aide d'un compteur de colonies pour les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC/ml (unité formant une colonie).

## **2.2. Dénombrement des coliformes totaux et *E. coli* :**

### **➤ Principe :**

Le dénombrement se fait par la technique de la **filtration sur membrane**, qui consiste à recueillir, identifier et dénombrer à la surface d'une membrane filtrante stérile de porosité 0,45 µm, les bactéries recherchées dans un échantillon.

100 ml de chaque dilution sont filtrés sur une membrane filtrante stérile, à l'aide d'un système de filtration sous vide préalablement stérilisé. Les filtres sont ensuite récupérés et posés dans une boîte de Pétri contenant de la gélose lactosée au TTC et au tergitol 7 tout en évitant la formation de bulles d'air qui sont signalées par des taches blanches. Les boîtes de Pétri sont incubées, en position inversée, à 37°C pendant 24h et à 44°C pendant 24h pour le dénombrement des **coliformes thermo-tolérants**.

### **➤ Confirmation :**

On examine les membranes et on considère comme bactéries lactose-positives, toutes les colonies typiques, quelle que soit leur taille, si le milieu sous la membrane présente une coloration jaune.

Pour les essais de l'oxydase et de l'indole, on repique les colonies typiques sur une gélose non sélective (gélose tryptonée au soja (TSA)) pour le test d'oxydase et dans un bouillon au tryptophane pour l'indole.

On incube la gélose non sélective à 37°C pendant 24h et on effectue l'essai à l'oxydase.

Le tube contenant le bouillon au tryptophane est incubé à 44°C pendant 24h pour mettre en évidence la production d'indole en ajoutant 0,2 ml à 0,3 ml de réactif de Kovacs. L'apparition d'une coloration rouge à la surface du bouillon confirme la production d'indole.

Toute colonie ayant une réaction négative à l'oxydase est considérée comme bactéries coliformes.

Toute colonie ayant une réaction négative à l'oxydase, mais positive à l'indole, est identifiée à *E. Coli*.

Les résultats sont exprimés en UFC /100ml (unité formant colonies par 100 ml d'échantillon).

## **2.3. Dénombrement des entérocoques intestinaux :**

Pour les entérocoques, on procède de la même manière que pour les coliformes, mais la

culture est faite sur milieu gélosé de Slanetz et Bartley. Les boîtes sont incubées à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant  $44\text{h} \pm 4$ .

➤ Confirmation :

Après incubation, on considère comme typiques toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble des colonies. S'il y a des colonies typiques, on transfère la membrane, au moyen d'une pince stérile, sans retournement, sur une boîte de gélose BEA (bile-esculine-azoture préchauffée à  $44^\circ\text{C}$ ) et on l'incube à  $44^\circ\text{C}$  pendant 2h.

On considère toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu environnant comme donnant une réaction positive, et on les identifie aux entérocoques intestinaux.

Les résultats sont exprimés en unité formant colonies par 100 ml d'échantillon.

➤ Assurance de la qualité

Les blancs d'entonnoirs effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies d'entérocoques ou de tout autre microorganisme.

La température des incubateurs doit être maintenue successivement à  $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  et  $44^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Toutes les exigences précisées dans le manuel du contrôle de la qualité en microbiologie doivent être respectés.

## 2.4. Dénombrement des spores de bactéries anaérobie sulfito-réductrices à $37^\circ\text{C}$

Les échantillons destinés à la recherche de ces spores sont chauffés dans un bain d'eau à  $75^\circ\text{C}$  ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) pendant 15 min à partir du moment où cette température est atteinte. Un flacon similaire contenant le même volume d'eau que celui de l'échantillon pour essai doit être utilisé parallèlement comme témoin afin de vérifier le temps de chauffage nécessaire.

Après, agitation vigoureuse de l'échantillon d'un mouvement vertical, on verse 100 ml d'eau préalablement chauffée et on dépose la membrane filtrante aseptiquement dans la boîte, ensuite on verse la première couche de la gélose TSC et on fixe la membrane avec une pince stérile, on coule une deuxième couche de la gélose TSC de façon à ramener l'épaisseur totale de la gélose à 5 mm environ. Après solidification du milieu, les boîtes sont incubées dans une jarre pour anaérobiose avec un sachet générateur d'anaérobiose à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24h à 48h.

Les résultats sont exprimés en UFC/ 100ml, les colonies suspectes sont noires (dû à la réduction des sulfites).

## Partie 4 : Résultats et discussion :

### I. Résultats :

**Tableaux 3 :** Résultats des analyses bactériologiques de 10 puits étudiant.

N° des puits	B.A.R à 22°C en UFC/ml	B.A.R à 37°C en UFC/ml	C.T en UFC/100ml	E.C en UFC/100ml	E.I en UFC/100m	Spores A.S.R	Résultats
<b>P1</b>	2× 10 <sup>3</sup>	2× 10 <sup>3</sup>	2× 10 <sup>2</sup>	20	2× 10 <sup>2</sup>	30	NC
<b>P2</b>	5× 10 <sup>2</sup>	6× 10 <sup>2</sup>	2× 10 <sup>2</sup>	50	10 <sup>2</sup>	00	NC
<b>P3</b>	2× 10 <sup>2</sup>	3× 10 <sup>2</sup>	2× 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	3× 10 <sup>2</sup>	30	NC
<b>P4</b>	10 <sup>2</sup>	7× 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10	10	10	NC
<b>P5</b>	10 <sup>2</sup>	4× 10 <sup>2</sup>	2× 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10	20	NC
<b>P6</b>	10 <sup>2</sup>	3× 10 <sup>2</sup>	2×10 <sup>2</sup>	20	16	20	NC
<b>P7</b>	30	10	00	00	00	00	C
<b>P8</b>	30	04	04	00	06	10	NC
<b>P9</b>	20	2× 10 <sup>2</sup>	05	00	00	00	NC
<b>P10</b>	10	10	00	00	00	00	C

**B.A.R :** bactéries aérobies revivifiables ; **C.T:** coliformes totaux

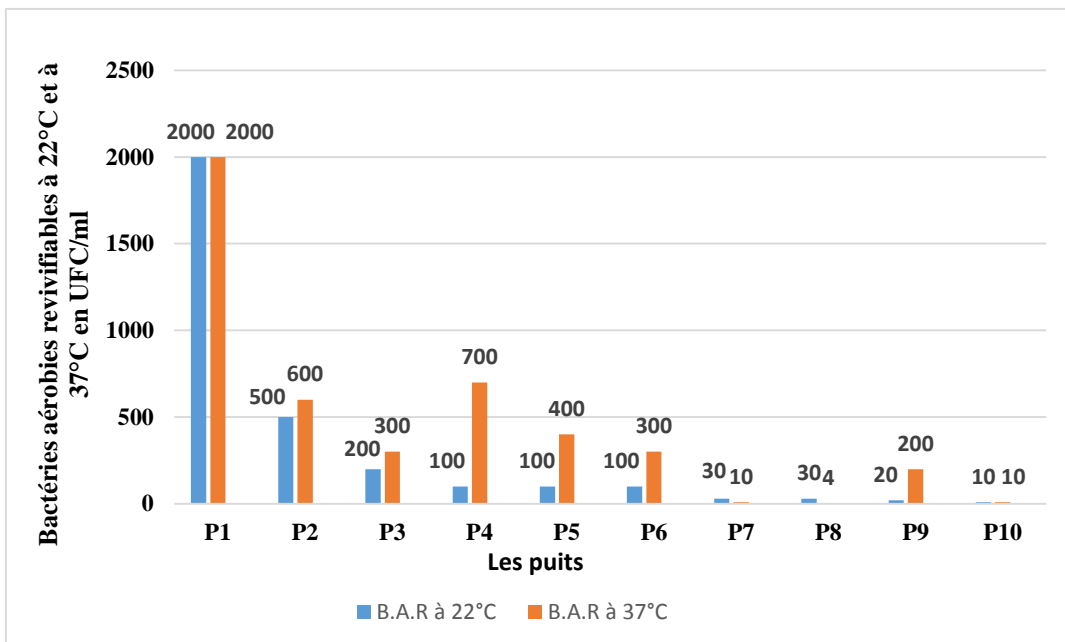
**E C :** *Escherichia coli* ; **Spores d'A.S.R :** Spores d'anaérobies sulfito-réducteurs ;

**C :** conforme ; **NC :** non conforme ; **E.I :** Entérocoque intestinaux ; **UFC :** unité formant colonie

## 1. Les bactéries aérobies revivifiables à 22°C et à 37°C

### 1.1. Les bactéries aérobies revivifiables à 22°C

Le dénombrement de la charge mésophile totale à 22°C révèle que le nombre de colonies revivifiables à 22°C varie de 10 UFC /1ml (P10) à  $2 \times 10^3$  UFC/1ml (P1). A l'exception des puits P1, P2 et P3 tous les autres puits montrent des eaux potables puisque leurs charge en ces bactéries obéissent à la norme marocaine des eaux potables (100 UFC /ml).



*Figure 1: Densité des bactéries aérobies revivifiables à 22 et à 37°C*

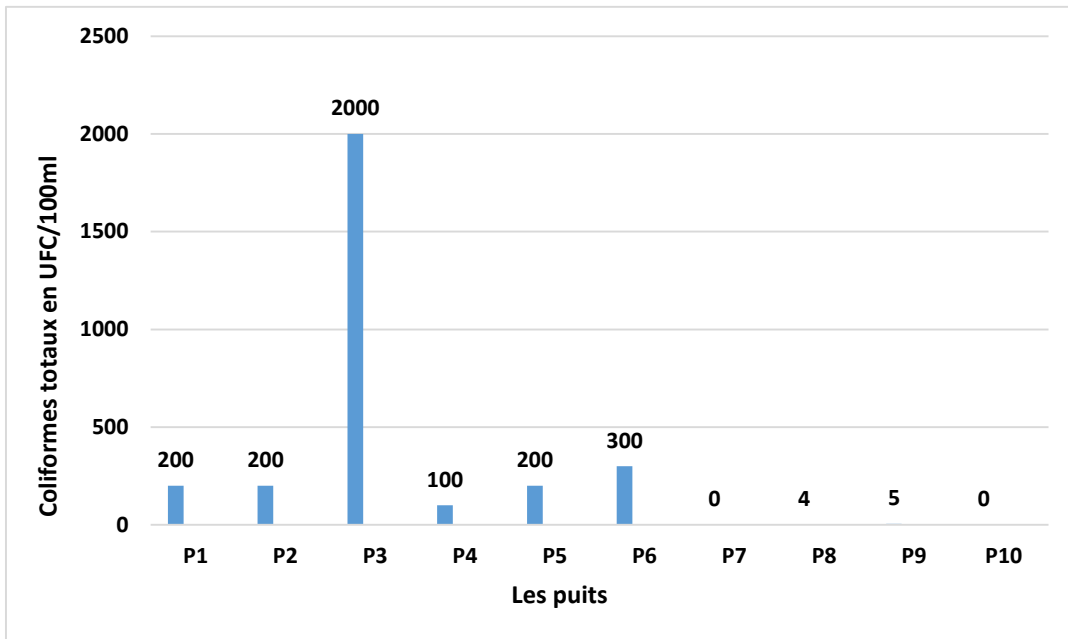
### 1.2. Les bactéries aérobies revivifiables à 37°C

Le dénombrement des bactéries aérobies revivifiables à 37°C révèle que le nombre de colonies varie de 4 UFC /1ml (P8) à  $2 \times 10^3$  UFC/1ml (au niveau du puits P1) (figure 1). On constate que seuls les puits P7, P8 et P10 qui présentent des eaux potables puisqu'ils remplissent la condition de potabilité des eaux par contre tous les autres puits dépassent cette norme ce qui signifie alors que les eaux de ces puits ne sont pas potables.

## 2. Les coliformes

### 2.1. Les coliformes totaux

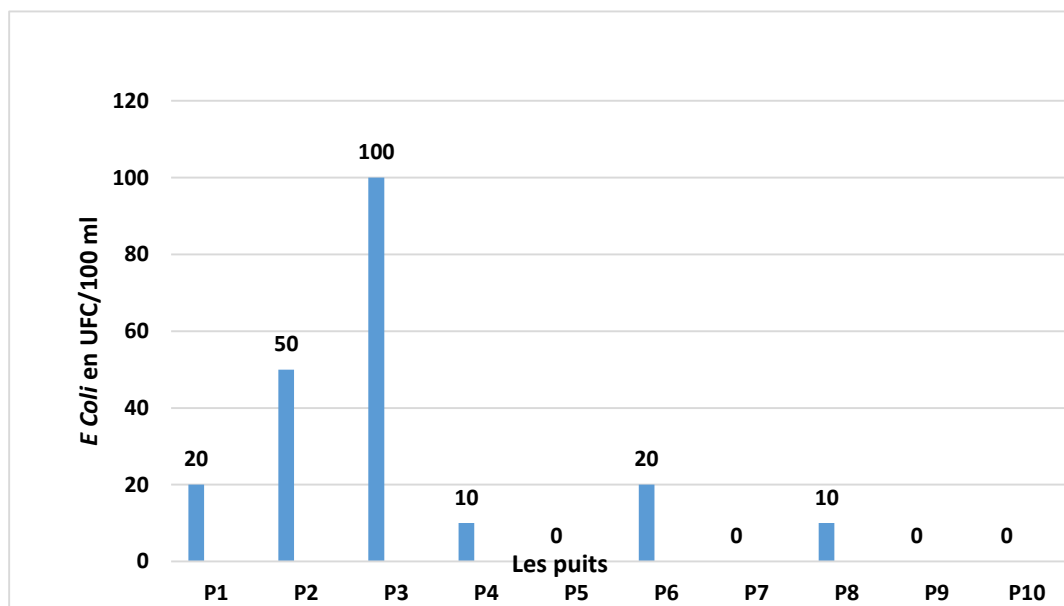
Les puits P7, P10 qui représentent 20% des puits, ont des eaux potables puisqu'ils sont exempts de coliformes alors que les 80% des puits ne sont pas conformes à la norme (0 UFC/100 ml). Pour les puits contaminés, ils ont des densités variant entre 4 et  $2 \times 10^3$  UFC/100 ml (figure 2).



*Figure 2 : Densité des coliformes totaux*

## **2.2. E Coli :**

Le nombre d'*E Coli* varie de 0 UFC/100ml à  $10^2$  UFC/100 ml. Environ 40% des puits sont conformes à la norme car leurs charges en *E coli* sont nulles, alors que 60% des puits présentent de fortes contaminations. Leurs densités bactériennes (*E coli*) oscillent entre 10 et  $10^2$  UFC/100 ml, par conséquent ne sont pas conformes à la norme marocaine des eaux potables.

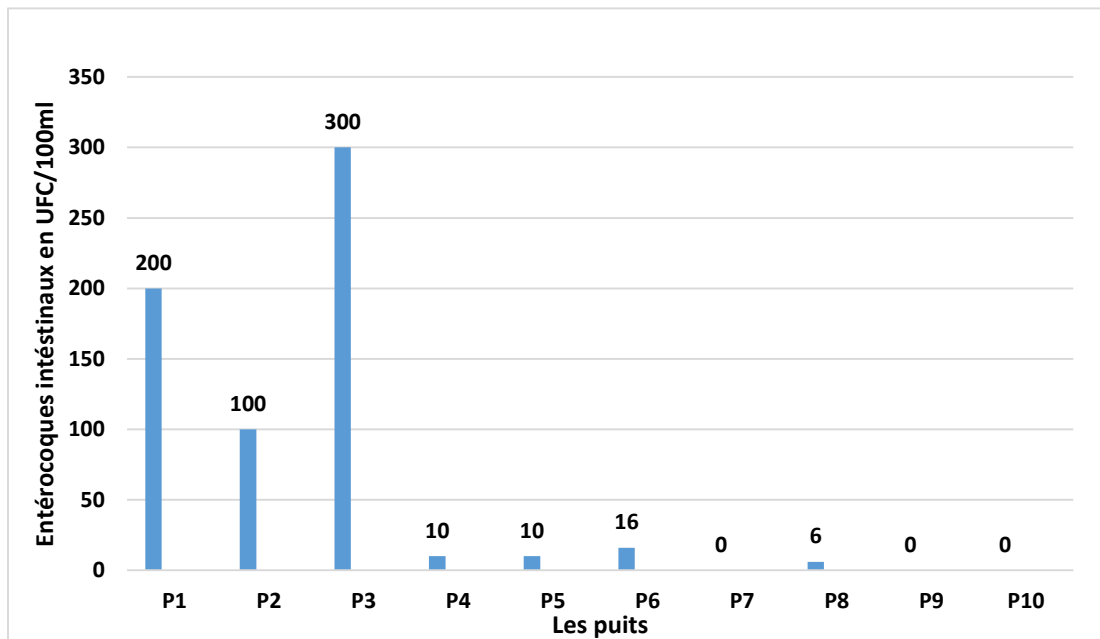


*Figure 3 : Densité des E coli*

### 3. Les entérocoques intestinaux

Le dénombrement des entérocoques intestinaux montre que la charge bactérienne des puits P1, P2, P3, P4, P5, P6 et P8 est supérieure à la valeur maximale admissible par la norme (0 UFC/100ml) (figure 4).

Par contre les puits P7, P9 et P10 sont conformes à la norme de potabilité, car leur charge en entérocoques intestinaux est nulle.



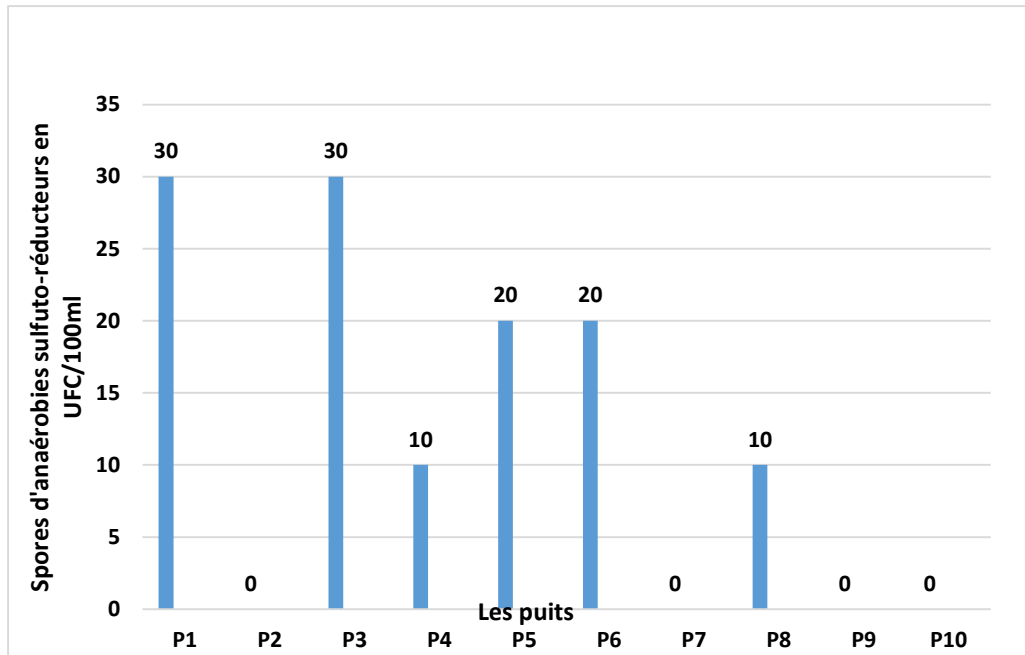
*Figure 4 : Densité des entérocoques intestinaux*

### 4. Les spores d'anaérobies sulfito-réducteurs :

Le dénombrement des spores anaérobies sulfito-réducteurs montre que les puits P1, P3, P4, P5, P6 et P8 ne sont pas conformes à la norme (figure 5), ils ont un nombre compris entre 10 et 30 UFC/100 ml, donc supérieur à la valeur maximale admissible (0 UFC/100 ml).

Les puits P2, P7, P9 et P10 sont conformes à la norme de potabilité, car ils ne contiennent aucun germe de spores d'anaérobies sulfito- réducteurs.





*Figure 5 : Densité des spores d'anaérobies sulfito-réducteurs*

## **II. Discussion :**

Les résultats des analyses bactériologiques montrent que les puits P7 et P10 qui représentent 20 % sont conformes à la norme marocaine car la charge bactérienne de la flore mésophile aérobie revivifiable à 22°C et à 37°C est acceptable par la norme marocaine des eaux potables (100 UFC/ml pour les bactéries aérobies revivifiables à 22°C et 20 UFC/ml pour les bactéries aérobie revivifiables à 37°C) et celle des coliformes totaux, des *E coli*, des entérocoques intestinaux et des spores d'A.S.R est non détectable (la valeur admissible est de 0 UFC/100ml pour les trois germes). Ces puits présentent une bonne qualité de point de vue bactériologique, leur consommation à l'état brute ne constitue alors aucun danger sur la santé du consommateur. Malheureusement, 80 % des puits examinés (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P8 et P9) ne remplissent pas les conditions de potabilité car la charge bactérienne de la quasi-totalité des germes recherchés est largement supérieure à la valeur maximale admissible par la norme marocaine des eaux potables. Les eaux de ces puits ne sont donc pas potables et leur consommation à l'état brute représente un risque sur la santé du consommateur.

Nos résultats sont comparables de point de vue bactériologiques à d'autres études (20) qui ont porté sur l'analyse bactériologique et physicochimique des eaux souterraines dans la plaine du Haouz, et qui ont montré que seulement deux puits parmi dix-huit c.-à-d. plus de

11% qui sont potables du côté bactériologique. Ces études nous renseignent sur l'état de salubrité des eaux des puits en milieux ruraux ainsi que la souffrance de leurs habitants.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces données alarmantes. On peut citer, une mauvaise protection des puits, une non application des mesures d'hygiène élémentaires, une mauvaise conception des puisards et des latrines, une mauvaise évacuation des eaux usées, la présence de dépôts d'ordures dans la zone d'alimentation de la nappe phréatique et parfois les faibles profondeurs des puits. Cependant, une charge bactérienne très élevée en coliformes totaux dans l'eau d'un puits n'indique pas forcément une contamination d'origine fécale mais plutôt une dégradation de la qualité bactérienne de l'eau(15), cette dégradation peut être attribuée entre autre à l'infiltration d'eau de surface dans les puits ainsi que leur présence indique qu'une source d'approvisionnement en eau peut être contaminée par des microorganismes plus nuisibles(15), la plupart des espèces peuvent se trouver naturellement dans le sol et la végétation. La présence d'*E Coli* dans l'eau d'un puits met en évidence une pollution d'origine fécale humaine ou animale et constitue un signe de la présence possible de germes pathogènes entériques (15) (14). Les entérocoques intestinaux mettent également en évidence une contamination d'origine fécale (15) (17) mais sans en connaître l'origine, car il y a plusieurs sources possibles de contamination (fosse septique, égout, fumier, animaux etc.). En fin, les spores d'A.S.R peuvent fournir des indications sur une pollution éloignée ou bien intermittente car ces spores sont plus résistantes aux facteurs chimiques et physiques, donc capables de survivre pendant longtemps (18).

## Conclusion :

L'étude microbiologique de ces eaux montre que 80% des puits étudiés sont soumis à une contamination fécale persistante (présence de coliformes totaux, d'*E coli*, de streptocoques intestinaux) et également d'une contamination éloignée justifiée par la présence de spores d'A.S.R. Sur les 10 puits analysés, seuls deux sont exempts de bactéries pathogènes qui ont fait l'objet de notre recherche et sur lesquelles insiste la norme marocaine des eaux potables.

D'après ce présent travail on a révélé que la presque totalité des eaux de puits non traités contiennent une charge bactérienne largement supérieure à la valeur maximale admissible par la norme marocaine (NM 03.7.001), par conséquent, elles ne doivent pas être consommées sans aucun traitement adapté et l'origine de la contamination fécale doit être déterminée et corrigée car elles présentent un risque pour la santé des consommateurs.

En fin, pour les deux puits potables ces analyses restent insuffisantes pour donner un jugement définitif sur la potabilité d'une eau destinée à la consommation humaine, car on a traité uniquement le côté bactériologique alors que les aspects physicochimiques et microbiologiques restent à déterminer.

## **Références bibliographiques :**

- 1-Direction générale de la Santé – 7 septembre 2005, Dossier d'information La qualité de l'eau potable en France Aspects sanitaires et réglementaires)
- 2-C.M .BOUR GEOIS , J .F MESCLE et J.ZUCCA, Microbiologie alimentaire, (p254)
- 3- [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/drinking\\_water\\_20120306/fr/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/drinking_water_20120306/fr/)
- 4-( Kassim Coulibaly, Etude de la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau des puits de certains quartiers du district de BAMAKO ,mémoire de fin d'étude Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat), la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie ,20 avril 2005)
- 5- Maïga Fatoumata Sokona Manuel du cour d'hygiène du milieu, F.M.P.O.S 2002)
- 6-AMH journée mondiale de l'eau 2003
- 7-(CIEH Comité interafricain d'Etudes Hydraulique : manuel de formation des formateurs villageois).
- 8-(<http://bv.alloprof.qc.ca/science-et-technologie/la-terre-et-l'espace/les-caracteristiques.>)
- 10-[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/diseasefact/fr/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/fr/).
- 11-www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info
- 12- 10-NM 03.7.005 version 2007, Dénombrement des micro-organismes revivifiable.
- 13-[NM 03.7.003 version 2007, Recherche et dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes.].
- 14- [Selon les Recommandations canadiennes pour la qualité de l'eau potable au Canada.].
- 15- [www.mddefp.gouv.qc.ca](http://www.mddefp.gouv.qc.ca) /© Gouvernement du Québec, 2015 /La qualité de l'eau de mon PUIT.
- 16-[NM 03.7.006 version 2007, Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux].
- 17- [SMi Laboratoire d'analyse S.M. INC.]
- 18- NM 03.7.004, Recherche et dénombrement des micro-organismes anaérobies (clostridia)
- 19-[NM 03.7.001 version 2006, Norme marocain : Qualité des eaux d'alimentation humaine].
- 20-Hafsa TOURAB, Contribution à l'étude de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux souterraines dans la plaine du Haouz,mémoire de fin d'etude pour l'obtention de la licence , Faculté des Sciences et Techniques Marrakech ,février 2013

# Annexe :

## Annexe 1: Les Milieux de culture : composition, principe et préparation

### I. Gélose à l'extrait de levure

- Tryptone 6,0 g/l
  - Extrait autolytique de levure 3,0 g/l
  - Agar agar bactériologique 10,0 g/l
- PH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

### II. Gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7

La gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 permet d'effectuer les recherches et le dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes dans les eaux, notamment celles destinées à la consommation humaine, par la méthode des membranes filtrantes.

#### ➤ **Composition : Type du milieu complet**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de viande .....10,0 g
- Extrait de viande .....5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....6,0 g
- Lactose .....20,0 g
- Tergitol 7 .....0,1 g
- Bleu de bromothymol .....0,05 mg
- Agar agar bactériologique.....10,0 g
- Chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolium 12,5mg .....1% V/V

#### ➤ **Principe :**

- Le Tergitol 7 inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif, limite l'envahissement par les Proteus et favorise la récupération des coliformes.
- Les coliformes présentent des colonies de coloration jaune ou orangée, à l'intérieur d'un halo jaune visible sous la membrane. Celui-ci est provoqué par l'acidification du lactose en présence de l'indicateur coloré, le bleu de bromothymol.
- Les autres microorganismes présentent des colonies dont la coloration rouge est due à la réduction du TTC en formazan insoluble.
- Les germes qui ne fermentent pas le lactose présentent des colonies entourées d'un halo bleu.

#### ➤ **Préparation :**

- mettre en suspension 51,1 g de milieu de base déshydraté (sans TTC) dans 1 litre d'eau

distillée ;

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes ;
- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C, ensuite on y Ajoute stérilement 1 % V/V de supplément TTC reconstitué et on veille à Homogénéiser parfaitement ;
- Couler en boîtes de Pétri stériles ;
- Laisser solidifier sur une surface froide.

### **III. Bouillon au tryptophane**

Le bouillon au tryptophane permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Ce milieu est surtout employé dans le contrôle des eaux pour l'identification D'Escherichia coli par la production d'indole.

#### **➤ Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

#### **➤ Principe :**

En aérobiose, Escherichia coli dégrade le tryptophane en indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase. L'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs.

#### **➤ Préparation :**

- Mettre en solution 15,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir 5 ml dans chaque tube à essai ;
- Boucher les tubes avec du coton ;
- Passer à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C.
- Stoker au réfrigérateur à 4°C une semaine au maximum.

### **IV. Gélose Slanetz et Bartley**

La gélose de Slanetz et Bartley est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux d'alimentation, les boissons, les eaux usées et divers produits biologiques d'origine animale, par la technique de filtration sur membrane.

#### **➤ Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptose .....20,0 g

- Extrait autolytique de levure.....5,0 g
- Glucose.....2,0 g
- Phosphate dissodique.....4,0 g
- Azide de sodium .....0,4 g
- Chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolium .....0,1 g
- Agar agar bactériologique.....12,0g

➤ **Principe :**

- L'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des microorganismes à Gram négatif.
- Le TTC est un indicateur de la croissance bactérienne. Il est réduit en formazan insoluble à l'intérieur de la cellule. Cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies de couleur rouge à marron.

➤ **Préparation :**

- Mettre en suspension 43,5 g de milieu de base déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ;
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C ;
- Homogénéiser parfaitement ;
- Couler en boîtes de Pétri stériles ;
- Laisser solidifier sur une surface froide.

## **VII. Gélose à la bile, à l'esculine et à l'azoture de sodium (BEA)**

La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques. Elle est également utilisée pour le dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux.

➤ **Composition :**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....17,00 g
- Peptone pepsique de viande .....3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....5,00 g
- Bile de boeuf bactériologique .....10,00 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- Esculine .....1,00 g
- Citrate ferrique ammoniacal .....0,50g

- Azide de sodium .....0,15g
- Agar agar bactériologique.....15,00g

➤ **Principe :**

- L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif.
- La bile de boeuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif.
- Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

➤ **Préparation :**

- Mettre en suspension 57,00 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ;
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution ;
- Répartir en tubes ou en flacons ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes ;
- Refroidir pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliquéfaction et maintenir à 47°C ;
- Couler en boîtes de Petri stériles ;
- Laisser solidifier sur une surface froide.











Des bureaux













