



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



**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**  
**«BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires»**

**Qualité bactériologique et physicochimique des  
eaux de puits en milieu rural (el menzel)**

**Présenté par : - Issam Snoussi**

**Encadré par :**

**-Pr Mohammed Ali Tahri Jouti (FSTF)**  
**-Mr Mohamed Chrigui (Société)**

**Soutenu le : 02 /06/2019 à 9h30**

Devant le jury composé de :

- Pr **Mohammed Ali Tahri Jouti** FST-Fès
- Pr **Harki** FST-Fés

**Année universitaire**  
**2018/2019**

# Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chères amis pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mes encadrants interne et externe pour leur appui et leur encouragement et guidance.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire  
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien  
infaillible.

Merci d'être toujours là pour moi.

## Remerciements

A l'issue de ce fructueux stage, je tiens à exprimer ma gratitude à mon encadrant **Mr. Chrighi Mohamed**, pour sa collaboration, ses pertinentes directives et conseils, sa disponibilité, et son expérience qui m'a permis d'évoluer rapidement dans l'apprentissage dans le domaine du contrôle de qualité.

Je remercie vivement **Pr. AARAB Lotfi**, professeur à la faculté des sciences et techniques et coordinateur de la filière BPHSA pour son aide, ses conseils et ses grands efforts tout au long de l'année, et à **Pr. HARKI Houssaine** membre de jury, qui m'a honore en acceptant la soutenance de mon travail et qui a consacré son temps et effort pour lire et évaluer mon projet

Mes sincères remerciements s'adressent à **Pr. Mohammed Ali Tahri Jouti**, mon encadrant pédagogique, Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Fès, pour son encadrement exemplaire, pour ses précieux conseils, ses remarques et directives pertinentes et pour l'intérêt qu'il a porté à mon projet de fin d'études.

Mes remerciements s'adressent aussi à nos enseignants et tous les membres du corps professoral de la licence de la Faculté des Sciences et Technique de Fès.

Je suis très sensible à l'honneur que nous a fait le comité de jury, en acceptant de participer à l'évaluation de mon travail. Je Vous exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à cette soutenance.

je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribuées au bon déroulement de mon stage.

## Sommaire

➤ Introduction .....	1
➤ Présentation de LRDEHM .....	1
<b>Partie I : bibliographie</b>	
I)-les eaux souterraines .....	2
1)-les puits.....	2
II)- Contrôle bactériologique de l'eau .....	2
1)- Les microorganismes recherchés .....	2
1.1)- Les coliformes (C) : .....	3
1.1.1)- Coliformes Totaux .....	3
1.1.1)- Les coliformes fécaux(E.coli).....	3
1.2)- Entérocoques intestinaux (EI): .....	4
1.3)- Bactéries Clostridium sulfito réducteurs .....	4
1.4)-Microorganismes revivifiables.....	4
2.) Aspect législatif.....	5
<b>Partie II : MATERIEL ET METHODES</b>	
I)- Les analyses Physico-Chimiques .....	6
1)- Mesure du pH .....	6
2)- Mesure de la turbidité .....	7
3)- Mesure de la Conductivité.....	7
4)-dosage des chlorures.....	8
5)- dosage des nitrites.....	8
II)-Les analyses Bactériologiques .....	9
1) Echantillonnage .....	9
2) Réception.....	9
3) Analyses des échantillons.....	9
3.1) Préparation des dilutions.....	9
3.2) Milieux de culture .....	9
3.3) dénombrement des bactéries.....	10
3.2.1)- La recherche des CT et CF.....	11
3.2.2)- La recherche des Entérocoques Intestinaux.....	12
3.2.3)- La recherche des Bactéries Clostridium sulfito réducteurs.....	13
3.2.4)- La recherche des microorganismes revivifiables .....	14
<b>Partie III : Résultats et discussions</b>	
I)- Résultat des analyses physico- chimiques de l'eau brute .....	15
II)- Résultat des Analyses Bactériologique.....	16
➤ Conclusion .....	21
➤ Référence .....	22
➤ Annexes.....	23

## Abréviations :

**BEA** : Bile-esculine-azoture

**CT** : Coliformes totaux

**CF** : Coliformes fécaux

**EI** : Entérocoques intestinaux

**FMAT** : Flore mésophile aérobie totale

**ISO** : Organisation internationale de standardisation

**LMD** : Lutte contre les maladies diarrhéiques

**LRDEHM** : Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu

**NM** : Norme marocaine

**NTU** : Unité Turbidité Néphélobimétrie

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PH** : Potentiel d'Hydrogène

**SASR** : Spores d'anaérobies sulfite-réducteurs

**S.P.S** : Gélose Sulfite Polymyxine sulfadiazine

**TTC** : Chlorure de triphényltétrazolium

**UFC**: Unité formant colonies

**WEF**: World economic forum

## Introduction

L'eau est l'élément le plus demandé et le plus essentiel dans la vie. On l'utilise quotidiennement pour différentes applications, par exemple l'alimentation et le lavage des aliments ou de matériels...Et pour ces buts ou d'autres l'eau doit représenter des qualités microbiologique et physico-chimique satisfaisantes. car, elle peut jouer le rôle d'un vecteur d'agent potentiellement dangereux et par conséquent une source de maladie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, cinq millions de nourrissons et d'enfants meurent chaque année de maladies diarrhéiques dues à la contamination des aliments ou de l'eau de boisson.

L'eau destinée à la consommation humaine est considérée comme potable si elle répond à des exigences de qualité bien définies sur le plan de ses caractéristiques physicochimiques et bactériologiques qui ne doivent pas porter atteinte à la santé du consommateur.

Pour la qualité des eaux distribuées, on se réfère essentiellement à deux aspects :

- La satisfaction de l'utilisateur est subjective, car elle est fondée essentiellement sur la qualité organoleptique et visuelle «l'eau doit être aussi agréable à boire que les circonstances le permettent»;
  - La composition et sa compatibilité avec l'hygiène et la protection de la santé publique (qualité sanitaire).
- 
- ✓ Ce travail a pour objectif d'étudier la qualité de l'eau de certains puits de la région de sefrou . Pour ce faire, nous avons réalisé :
  - ✓ Des analyses de la qualité de l'eau en se basant sur les paramètres physico-chimiques et bactériologiques des eaux de puits.

## **Présentation de Laboratoire de Diagnostique Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu**

### **Historique :**

En 1977, le ministre de la santé a créé des laboratoires « à visée préventive » : Les Laboratoires de Diagnostique Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM). Ils constituent une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministre de la Santé dans le cadre de l'hygiène et l'environnement. Actuellement il existe 42 LRDEHM, 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. Le LRDEHM de Fès a été accrédité NM ISO/CEI 17025-2005. Il a été ainsi certifié aux normes internationales de recherche, diagnostic et analyse. Relevant de la direction régionale de la santé de Fès-Boulemane, le laboratoire a montré durant son processus d'accréditation qu'il est capable de fournir et produire des analyses fiables et de haute qualité

### **Description du lieu de stage :**

Le stage a été effectué au LRDEHM de Fès situé à l'hôpital EL GHASSANI relevant de la Direction Régionale de la santé au niveau de l'unité d'hygiène qui comporte :

- Une salle pour la préparation des milieux de culture,
- Une salle pour les analyses microbiologiques de l'eau et des aliments,
- Une salle pour l'incubation et la lecture des résultats,
- Une salle pour la décontamination et le lavage de la verrerie,
- Une salle pour les analyses physicochimiques de l'eau et des aliments.

## Partie 1 : Revue bibliographique

### I. Les eaux souterraines

Les eaux souterraines sont naturellement propres à l'utilisation humaine mais elles peuvent être parfois contaminées par une installation inappropriée du cuvelage ou du tubage de puits après une rupture du cuvelage ou à la suite d'une entrée d'eau de surface contaminée dans le puits. Ces ressources peuvent également être sujettes à la contamination dans les cas où les puits sont forés dans un substrat rocheux fissuré sans une couche suffisante de sol de protection et avec moins que la longueur de cuvelage ou de tubage minimale recommandée. Le pompage ou l'utilisation des eaux souterraines à des fins de consommation se fait à l'aide des puits ou forages (Adingni, 2011).

#### 1. Les puits :

Les puits sont des ouvrages creux verticaux et cylindriques de captage des eaux souterraines. Leur diamètre est généralement compris entre 1 et 1,20m pour les puits traditionnels et 1,40 à 1,80m pour les puits modernes (da Silveira, 2010). Ils sont réalisés avec un matériel beaucoup moins important et coûteux que celui nécessaire pour la réalisation de forage (PADEAR, 1997).

On distingue deux grands types de puits :

- Les puits traditionnels ne pénétrant que très superficiellement dans la nappe et sur une faible hauteur.
- Les puits modernes dont les parois sont tenus par des buses armés en béton avec une hauteur de pénétration dans la nappe beaucoup plus importante.

#### Les puits traditionnels :

De manière générale les puits traditionnels sont construits par les puisatiers ou la communauté elle-même. Ces ouvrages ne respectent en rien les normes standards de construction de puits. Ils sont faits pour la plupart sans cuvelage et ancrage de surface avec ou sans margelle mais souvent en terre de barre. Ces ouvrages sont sujets à des infiltrations d'eaux de ruissellement polluant ainsi l'eau destinée à la consommation.

#### Les puits modernes :

Ce sont des ouvrages de grands diamètres et construits en béton armé. Il comprend de haut en bas selon les normes :

- l'équipement de surface formé par la dalle anti-bourbier et la margelle,
- le cuvelage, constitué par des buses pleines en béton ou métalliques, descendu jusqu'au niveau d'eau et maintenu par les ancrages,
- le captage constitué par des buses crépines pénétrant sur une profondeur suffisante l'aquifère pour faire face :
  - Aux fluctuations saisonnières du niveau de la nappe
  - Au rabattement dû au puisage
- le captage est terminé par une dalle de fond et un matelas de gravier. Ces puits offrent l'avantage d'être plus durables, mais néanmoins reste plus chers et nécessitent un matériel plus important.

### II)- Contrôle bactériologique de l'eau

#### 1)- Les microorganismes recherchés :

L'analyse bactériologique de l'eau est indispensable afin de s'assurer de l'efficacité du traitement vis-à-vis des germes ci-dessous :

- Les coliformes totaux.
- Les coliformes fécaux.
- Les streptocoques fécaux.
- Les anaérobies sulfite-réducteurs.
- Les microorganismes revivifiables.

## 1.1)- Les coliformes (C) :

### 1.1.1)- Coliformes Totaux :

Les coliformes totaux sont des indicateurs d'une contamination fécale. Ils sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives Gram négatif, non sporulés; ils sont capables de croître en présence de sels biliaires. Les coliformes totaux possèdent la  $\beta$ -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35° C afin de produire des colonies rouges sur un milieu gélosé.



Figure 1 : Coliformes Totaux (experteau)

Les coliformes totaux croissent en aérobiose à 37°C en milieu liquide bilié lactosé au vert brillant en produisant d'acide et de gaz en 48h. (Instituts nationale de santé publique Québec).

### 1.1.1)- Les coliformes fécaux(*E.coli*) :

On parle aussi des Coliformes thermo tolérants, capables de fermenter le lactose à une température de 44°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli*, principale bactérie de contamination fécale. Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt d'eaux enrichies en matière organique. (Institut national de santé de Québec).

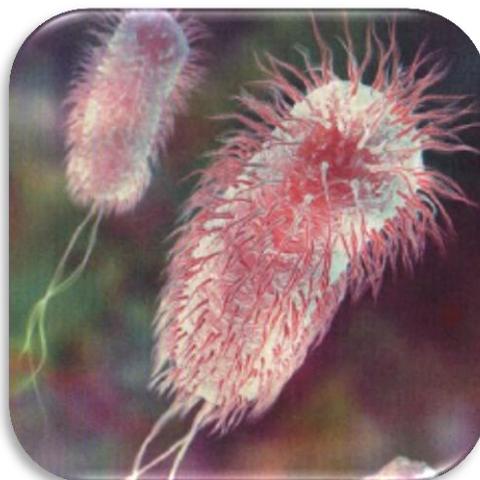


Figure 2 : coliformes fécaux(experteau)

### 1.2)- Entérocoques intestinaux (EI):

Ce sont des bactéries de forme sphérique au coccoïde, Gram+, disposées en pair ou en chaînette, dépourvues de catalase, capables de croître à 37 °C en 48h ; elles font partie de la flore intestinale normale humaine ou d'autres animaux à sang chaud. Ces bactéries constituent un indice de contamination fécale ancienne, capables d'hydrolyser l'esculine en présence de bile.

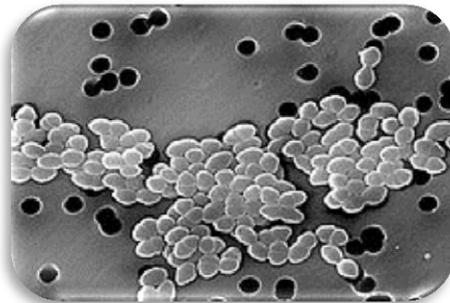


Figure 3 : Entérocoques intestinaux (experteau)

### 1.3)- Bactéries Clostridium sulfito réducteurs :

Les clostridiums sulfito-réducteurs sont des germes anaérobies appartenant à la famille bacillacées et au genre clostridium capables de sporuler et de se maintenir longtemps dans l'eau sous une forme végétative. Ils sont donc les témoins d'une pollution ancienne. Plus difficilement tués que les coliformes par les désinfectants, ils constituent aussi un bon indicateur de l'efficacité de la désinfection.

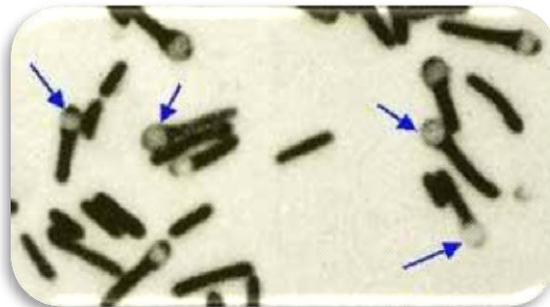


Figure 4 : Clostridium sulfito réducteurs (experteau)

### 1.4)-Microorganismes revivifiables :

La recherche des micro-organismes aérobies non pathogènes dits "revivifiables" permet de dénombrer les bactéries se développant dans des conditions habituelles de culture et représentant la teneur moyenne en bactéries d'une ressource naturelle. Ces germes n'ont pas d'effets directs sur la santé mais sous certaines conditions, ils peuvent générer des problèmes. Ce sont des bactéries aérobies anaérobies facultatives, elles nécessitent essentiellement de la matière organique comme source de carbone et une température optimale située entre 20 et 45 °C

## 2.) Aspect législatif :

Il est important de connaître les différentes normes et les indicateurs de potabilité de l'eau. Le contrôle de la qualité de l'eau est indispensable pour éviter autant de maladies et de mortalité, une eau avant d'être consommée sans danger pour la santé ; elle doit répondre à certaines normes de potabilité telle que la potabilité microbiologique. La présente norme fixe les exigences auxquelles doit satisfaire la qualité des eaux d'alimentation.

**Tableau1:norme marocaine relative à la consommation**

Germes recherchés	Norme Marocaine fixée
Les coliformes	0 UFC/100 ml
<i>Entérocoques intestinaux</i>	0 UFC /100 ml
<i>Les clostridium sulfite-réducteur</i>	0 UFC /100 ml
Les bactéries hétérotrophes revivifiables	20 UFC/1 ml à 37C° 100 UFC/1 ml à 22C°

## Partie II : MATERIEL ET METHODES

### ❖ Localisation des prélèvements :

Le Laboratoire de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM) a effectué une campagne de prélèvements des puits dans différents villages de la région de Séfrou pendant le mois le ramadan dont le but est la sensibilisation des habitants en les informant sur la qualité des eaux locaux, on a effectué 13 prélèvements au village de Zaouïa Bougrine .



### I. Analyses physico-chimiques

Pour faire une analyse d'eau destinée à la consommation humaine, il est nécessaire de réaliser quelques analyses physicochimiques qui sont essentielles pour la potabilité de l'eau.

#### 1)- Le potentiel d'hydrogène pH :

C'est un indicateur de l'acidité ou de l'alcalinité de l'eau ; C'est l'un des paramètres opérationnels de la qualité de l'eau. Le pH est lié à la nature géologique des terrains traversés. Les valeurs normales sont comprises entre 6,5 et 8,5. En dessous de 6, l'eau est corrosive et au-dessus de 8,5 il y a un risque d'entartrage et de mauvaise efficacité du chlore, Le pH est mesuré par un pH-mètre de paillasse étalonné en entrant l'électrode de l'appareil au béccher remplie d'eau.

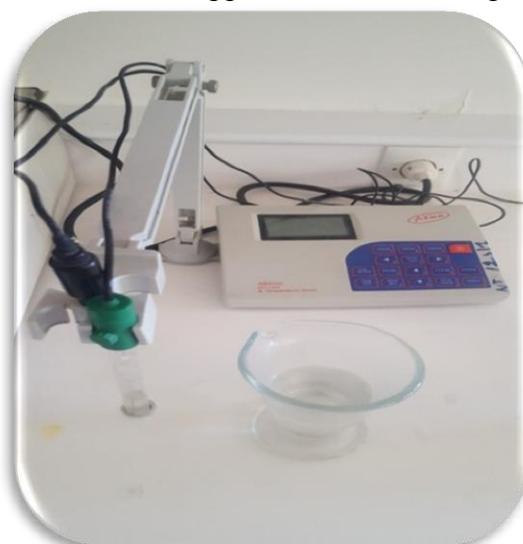


Figure 5 :PH-mètre

## 2) Mesure de la turbidité :

La turbidité traduit la présence de particules en suspension dans l'eau. Il s'agit des particules de sol, de matières ou débris organiques, organismes microscopique ou tous autres corpuscules d'origines différentes. La charge en matière en suspension dépend de facteurs météorologiques, hydrologiques, érosifs et anthropiques. La turbidité reflète les propriétés optiques d'une eau relatives à l'absorption ou à la diffusion de la lumière. Sa mesure permet de préciser des informations visuelles sur l'eau. La mesure de la turbidité est effectuée par un turbidimètre. L'unité d'expression est le NTU (unité de turbidité néphélométrie).



Figure 6 : Turbidimètre

## 3) Mesure de la conductivité :

La plus part des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions, la mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau, La mesure est effectuée par un conductimètre portable étalonné, en entrant l'électrode de l'appareil au bécher remplie d'eau, la lecture du résultat affiché doit correspondre à la température 20°C. L'unité est le micro siemens par centimètre ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ ).



Figure 7 : Conductimètre

#### 4) dosage des chlorures :

L'eau contient toujours de chlorures, mais en proportion très variable. Ainsi, les eaux provenant des régions granitiques sont pauvres en chlorures, alors que les eaux de s région sédimentaire en contiennent d'avantage. D'ailleurs, la teneur en chlorures augmente avec le degré de minéralisation d'une eau. Certaines eaux souterraines sont très saumâtres. L'eau de mer contient environ 20 000 mg/l d'ions chlorure et la salinité des rivières qui s'y déversent peut être très élevée au voisinage de l'embouchure.

Les chlorures sont dosés en milieu neutre par solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent (méthode de mohr).

#### 5) dosage des nitrites :

La méthode de dosage préconisée par la norme AFNOR est la spectrométrie d'absorption moléculaire : elle est applicable à des échantillons d'eau dont la concentration massique en nitrites NO<sub>2</sub> - est inférieure à 1 mg /L, la limite de détection se situant vers 0,001 mg/L.

- Principe Réaction de diazotation : en présence d'acide phosphorique (pH < 2), les ions NO<sub>2</sub> - sont sous la forme d'acide nitreux HNO<sub>2</sub> qui réagit avec l' amino-4 benzène sulfonamide pour donner un sel de diazonium. En présence de (naphtyl-1) éthylène diamine, le sel de diazonium forme un colorant azoïque de couleur rose susceptible d'être dosé par spectrométrie (Rodier T., 1997)

## II)- Analyses Bactériologiques :

### 1. Echantillonnage :

Les prélèvements sont effectués, dans des flacons stériles, par les techniciens d'hygiène selon la norme 19458. Le transport des échantillons se fait dans des caisses isothermes (température entre 2 et 8°C). L'origine des échantillons reste confidentielle.

### 2. Réception :

A l'arrivée des échantillons au laboratoire, on vérifie la conformité du prélèvement aux critères d'acceptabilité établi par celui-ci (la température doit être inférieure à 8 °C, délai d'acheminement inférieur à 24h, volume suffisant, le bulletin de demande d'analyse contenant tous les renseignements requis,...).

### 3. Analyse des échantillons :

#### 3.1. Préparation des dilutions :

- nous avons procédé une série de dilutions au 10ème comme suite : 10 ml de l'échantillon sont prélevés aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile et introduits dans un flacon contenant 90 ml d'eau distillée stérile. L'opération est répétée plusieurs fois après agitation vigoureuse.

#### 3.2. Milieux de culture :

- Le Tergitol 7 TTC : Ce milieu permet d'effectuer la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux, notamment celles destinées à la consommation humaine par la méthode de la membrane filtrante. Le Tergitol 7 inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif, limite l'envahissement par les *Proteus* et favorise la récupération des coliformes. Ces derniers présentent des colonies de coloration jaune, 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. (BIOKAR)
- Milieu Slanetz : C'est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des *entérocoques intestinaux* (streptocoque fécaux) dans les eaux d'alimentation, par la technique de la membrane filtrante. 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. (BIOKAR)
- Milieu S.P.S : Gélose Sulfite Polymyxine sulfadiazine (S.P.S.) utilisée pour l'isolement sélectif et le dénombrement de *Clostridium* dans les eaux destinées à l'alimentation humaine. (BIOKAR)
- Milieu B.E.A. : La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des *entérocoques intestinaux* dans les eaux. 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.
- Milieu Extrait de levure : La gélose à l'extrait de levure est utilisée en bactériologie des eaux pour le dénombrement des microorganismes revivifiables 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. (BIOKAR)

### 3.3. Dénombrement des bactéries :

- ✚ Tableau explicatif de méthodes utilisées pour le dénombrement et les normes imposés par la loi marocaine par rapport à la bactérie recherchée.

Paramètre	Méthode	Norme marocaine
<b>Bactéries coliformes et E.coli</b>	Filtration sur membrane	NM ISO 9308-1/2007 ; indice de classement NM 03.7.003 : qualité de l'eau recherche et dénombrement des <i>Escherichia coli</i> et des bactéries coliformes ; Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane
<b><u>Les entérocoques intestinaux</u></b>	Filtration sur membrane	NM ISO 7899-2/2007 ; indice de classement NM 07.3.006, qualité de l'eau recherche et dénombrement des <i>entérocoques intestinaux</i> dans les eaux d'alimentation humaine : Méthode par filtration sur membrane
<b>Bactéries <u>Clostridium sulfito réducteurs</u></b>	Filtration sur membrane	MN ISO 6461-2/2007 : qualité de l'eau-recherche et dénombrement des spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs ( <i>clostridia</i> ) partie 2 : Méthode par filtration sur membrane
<b>Bactéries revivifiables à 22°C et à 37°C</b>	Incorporation sur gélose	NM ISO 6222/2007, indice de classement NM 03.7.005, qualité de l'eau-recherche et dénombrement des microorganismes dans les eaux d'alimentation humaine : comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture gélosé

### 3.2.1)- Recherche des CT et CF :

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 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. Pour le dénombrement des coliformes thermo-tolérants, l'incubation est faite à 44°C pendant 24h



Figure 8 : appareil de filtration sur membrane

Au terme des incubations, sont considérées des bactéries lactose-positives, toutes colonies typiques, quelle que soit leur taille, si le milieu sous la membrane présente une coloration jaune.

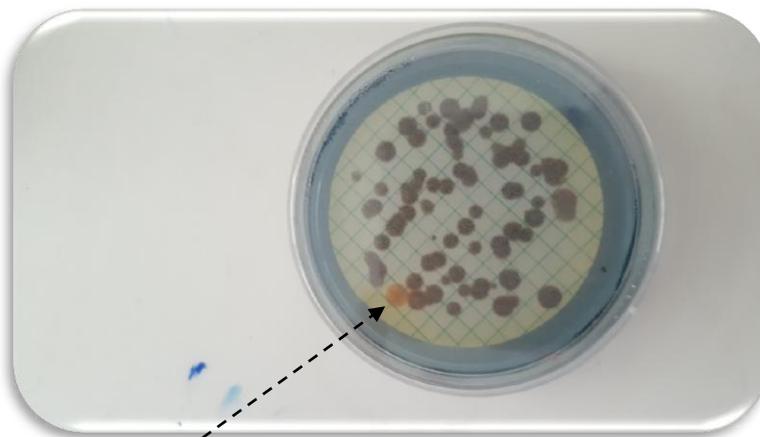


Figure 9 : coliformes fécaux et totaux après incubation

Pour les essais de l'oxydase et de l'indole, on a repiqué les colonies typiques sur une gélose non sélective (PCA) pour le test d'oxydase et dans un milieu urée-tryptophane pour l'indole. En troisième lieu, on a incubé la gélose non sélective à 37°C pendant 24h et on a effectué l'essai à l'oxydase et aussi le tube contenant le bouillon au tryptophane à 44°C pendant 24h. Pour mettre en évidence la production d'indole on ajoute 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.



Figure 10 : indole+



Figure 11 : indole-

- ❖ Si le test d'indole est positif on fait Les galeries Api20E Pour l'identification D' E. coli

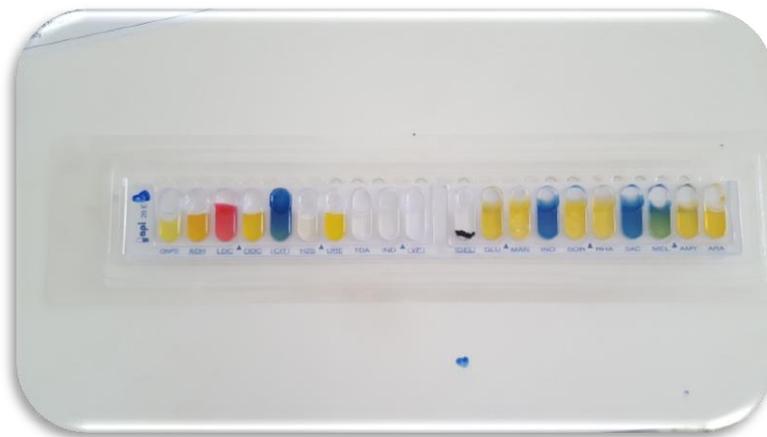


Figure 12 : Api20E

### 3.2.2)- Recherche des Entérocoques Intestinaux :

Le mode opératoire est identique à celui des coliformes, 100 ml d'eau est filtrée aseptiquement sur une membrane de nitrocellulose de 0,45µm de porosité. la membrane est déposée sur le milieu gélosé Slanetz. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h. Toutes les colonies présentant une couleur rouge, rose à marron sont Considérées positives.

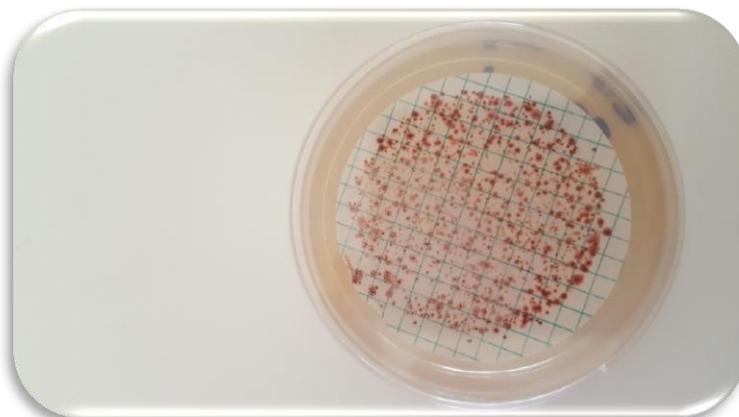


Figure 13 : Streptocoques fécaux après incubation

➤ **Test confirmatif**

on transfère la membrane, au moyen d'une pince stérile, sans retournement, sur une boîte de gélose BEA (bile-esculine-azoture) préchauffée à 44°C puis on incube à 44°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 compte comme entérocoques intestinaux.

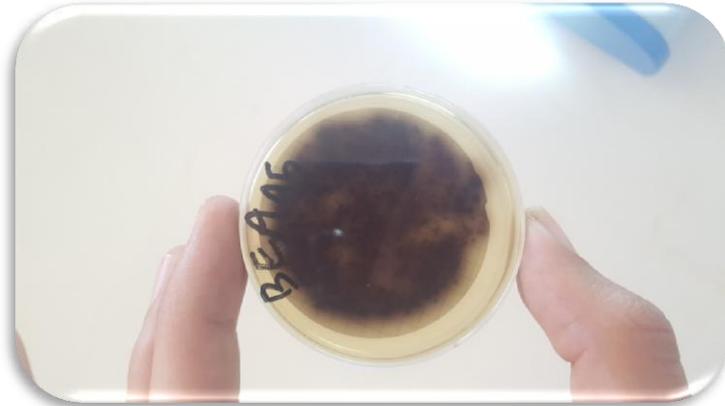


Figure 14 : Streptocoques fécaux dans BEA

3.2.3)- Recherche des Bactéries *Clostridium sulfito réducteurs* :

Les échantillons destinés à la recherche de ces spores sont chauffés dans un bain d'eau à 75°C ( $\pm 5$  °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 on a agité vigoureusement l'échantillon d'un mouvement vertical. On a versé 100 ml de l'échantillon d'eau préalablement chauffée. On a déposé la membrane filtrante de 0.2 $\mu$ m aseptiquement dans la boîte et on a versé une première couche de la gélose SPS puis on a fixé la membrane avec une pince stérile. On a coulé une deuxième couche de gélose SPS de façon à apporter l'épaisseur totale de la gélose à 5 mm environ, on a laissé le milieu solidifier et on a incubé dans une jarre pour anaérobiose avec un sachet générateur d'anaérobiose à la température 37°C pendant 24h à 48h. Finalement, on a compté toutes les colonies noires. Les résultats sont exprimés en UFC/ 100ml. Les colonies suspectes sont noires (dû à la réduction des sulfites).

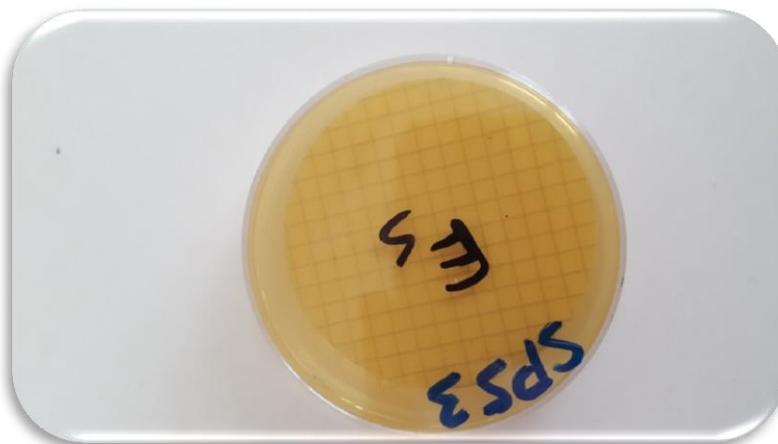


Figure 15 : milieu SPS de l'aspect négatif

### 3.2.4)- Recherche des microorganismes revivifiables :

La méthode utilisée est l'incorporation en gélose. 1 ml d'eau à analyser est versée dans chacune des deux boîtes de pétrie d'un diamètre de 90 mm, puis on fait couler la gélose de l'extrait de levure préalablement fondue. Après agitation pour homogénéiser le mélange, on laisse les boîtes lentement refroidir. L'incubation est faite à  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant  $68\pm 4\text{h}$  pour une boîte et à  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant  $44\pm 4\text{h}$  pour l'autre.

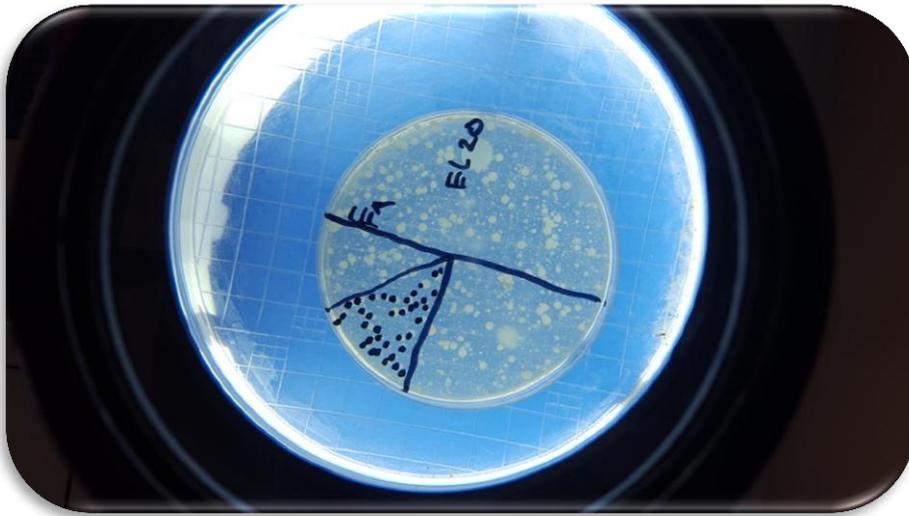


Figure 16: des colonies des bactéries revivifiables

## Partie III : Résultats et discussions

### D)- Résultat des analyses physico- chimiques de l'eau brute :

#### 1) Résultats :

Tableau 2 : résultats d'analyses physico-chimiques

Code de l'échantillon	pH	Turbidité (NTU)	Conductivité ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	Chlorure (mg/l)	Nitrite (mg/l)
E1	6.86	0.17	625	17.76	0
E2	7.31	0.26	757	20.54	0
E3	7.25	0.28	756	35.42	0
E4	7.28	0.25	742	36.14	0
E5	7.40	0.29	766	25.63	0
E6	7.24	0.30	801	30.41	0
E7	7.12	0.31	781	42.35	0
E8	7.37	0.24	745	36.25	0
E9	6.98	0.20	652	28.45	0
E10	7.31	0.19	741	41.12	0
E11	<b>13.6</b>	<b>1.1</b>	1300	56.24	0
E12	7.22	0.23	687	30.89	0
E13	7.35	0.28	721	31.65	0

#### 2) interprétation :

- **pH :**  
Le pH de l'eau de puits est compris entre  $6,5 < \text{pH} < 8,5$  fixée par la norme marocaine, sauf E11 qui est un pH inférieur à 6.5. Cette valeur est due aux bactéries qui acidifient l'eau.
  - **Turbidité :**  
La turbidité de l'eau de puits ne dépasse pas 1NTU fixée par la norme marocaine, sauf E11 qui est une valeur supérieure de 1 NTU.
  - **Conductivité :**  
On remarque que la conductivité de l'eau de puits ne dépasse pas  $2700 \mu\text{s}/\text{cm}$  fixée par la norme marocaine. Ces valeurs peuvent être variant selon la présence des ions dans l'eau de puits.
  - **Chlorure :**  
La teneur moyenne en chlorure de l'eau de puits ne dépasse pas 250 mg/l, fixée par la norme marocaine.
  - **Nitrite :**  
Absence totale des nitrites
- ✓ Donc tout les échantillons sont conformes par rapport aux normes marocaine. Sauf l'échantillon numéro E11 au niveau du pH et de la turbidité.

## II)- Résultat des Analyses Bactériologique :

### 1) Résultats :

Code échantillon	F.M.A.T à 22°C en UFC/1ml	FMAT à 37°C en UFC/1ml	C.T en UFC/100 ml	C.F en UFC/100 ml	E.I en UFC/100ml	S.A.S.R en UFC/100 ml	conformité
E1	0	0	19	0	0	0	NC
E2	0	0	0	0	0	0	C
E3	0	0	0	0	0	0	C
E4	0	0	0	0	0	0	C
E5	4	3	1	0	0	0	NC
E6	2	8	0	1	0	0	NC
E7	5	12	0	0	0	0	C
E8	0	0	0	0	0	0	C
E9	0	0	0	0	0	0	C
E10	0	0	0	0	0	0	C
E11	296	152	600	600	600	0	NC
E12	0	0	0	0	0	0	C
E13	0	0	4	0	0	0	NC

F.M.A.T : Flore Mésophile Aérobie Totale

C.T : Coliformes totaux

C.F : Coliformes fécaux

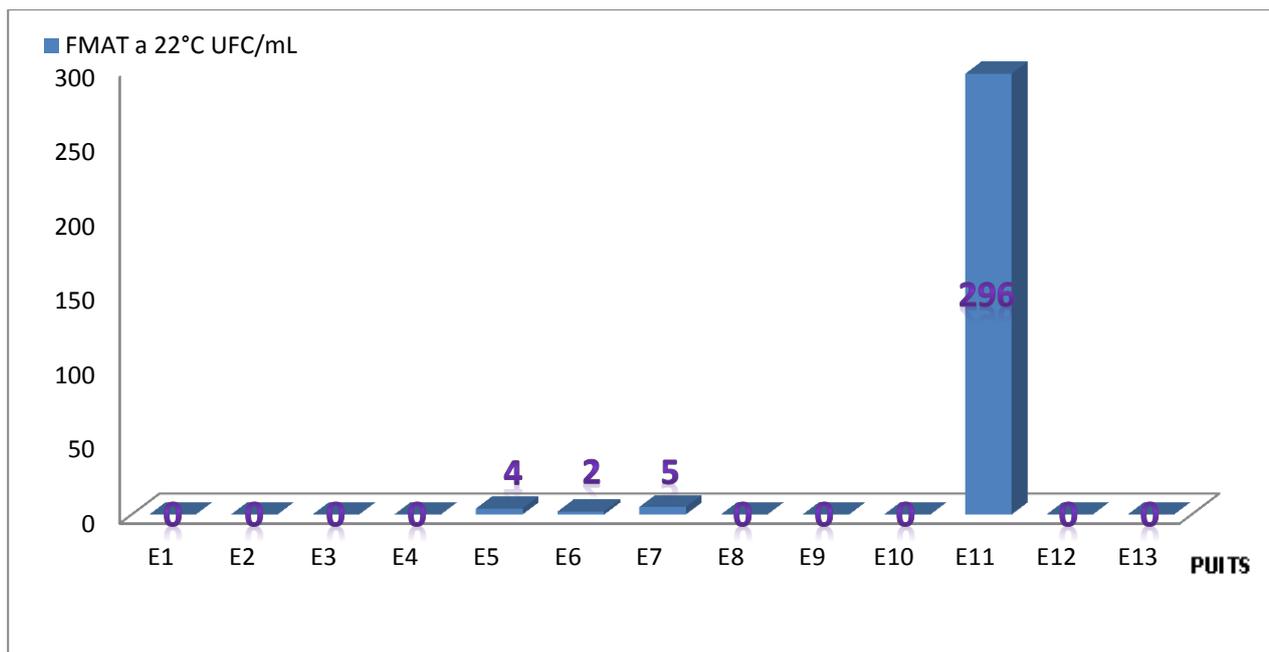
EI : Entérocoques intestinaux

S.A.S.R : Anaérobies sulfito-réducteurs

### 2) Interprétations :

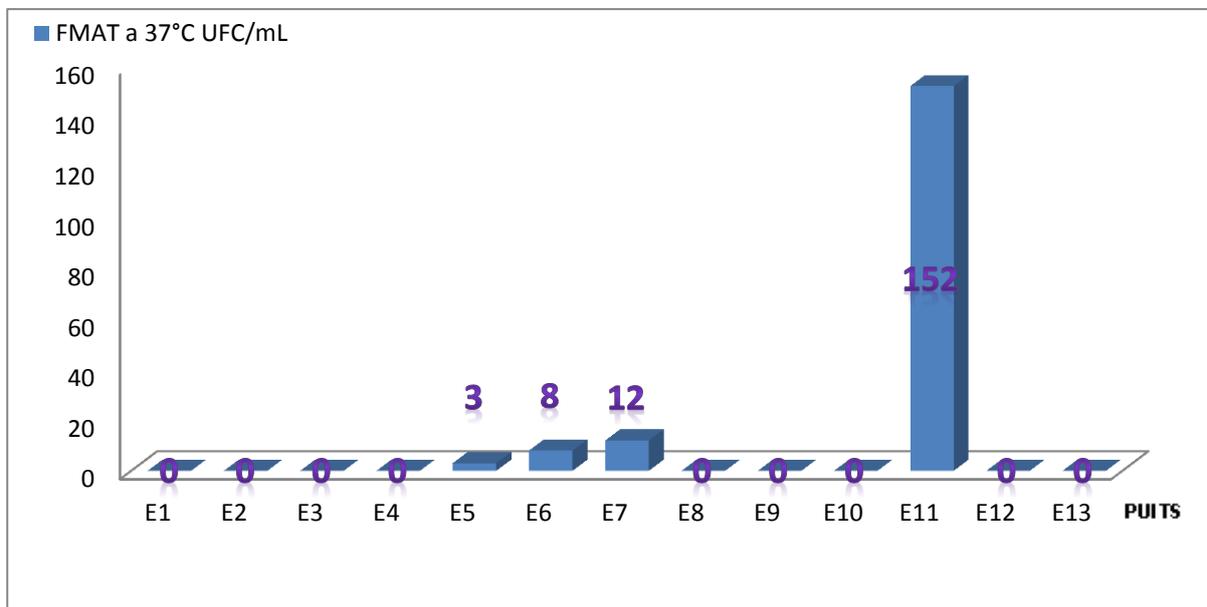
Dans notre travail, 8 puits sont conformes de point de vue bactériologique selon la Norme Marocaine relative à la qualité de l'eau (NM 03.7.001/2006). Ces huit puits sont propres pour la consommation humaine, car il y a absence de sources de contamination fécale, donc absence de risques sanitaires. Le reste des puits sont non conformes avec la NM 03.7.001/2006.

- Pour les F.M.A.T à 22°C, la densité maximale est de 296 UFC/1 ml, elle est enregistrée dans le puits E11 (Graphique 1) :



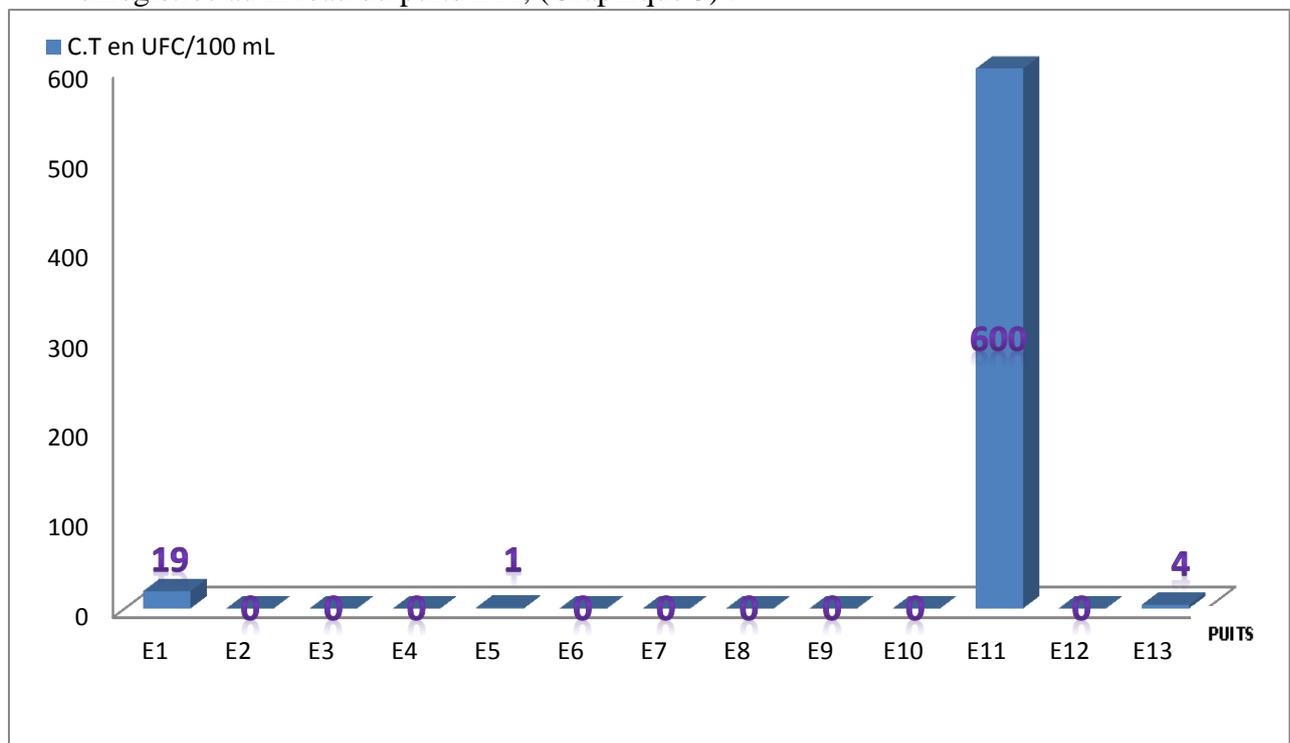
Graphique 1 : Représentation graphique de la répartition des F.M.A.T à 22°C dans les différents puits

- Pour les F.M.A.T à 37°C, la valeur de la densité maximale 152 UFC/1 ml est enregistrée au niveau du puits E11. (Graphique 2) :



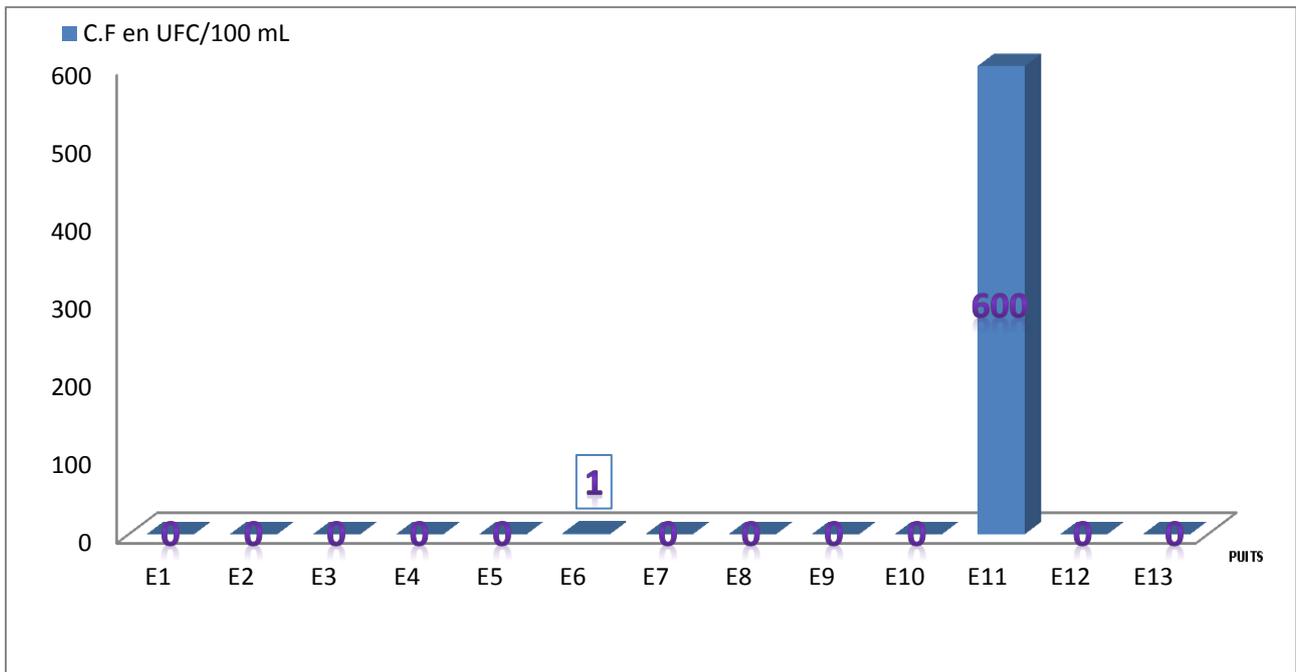
Graphique 2 : Représentation graphique de la répartition des F.M.A.T à 37°C dans les différents puits

- En ce qui concerne les coliformes totaux, la concentration maximale de 600 UFC/100 ml est enregistrée au niveau du puits E11, (Graphique 3) :



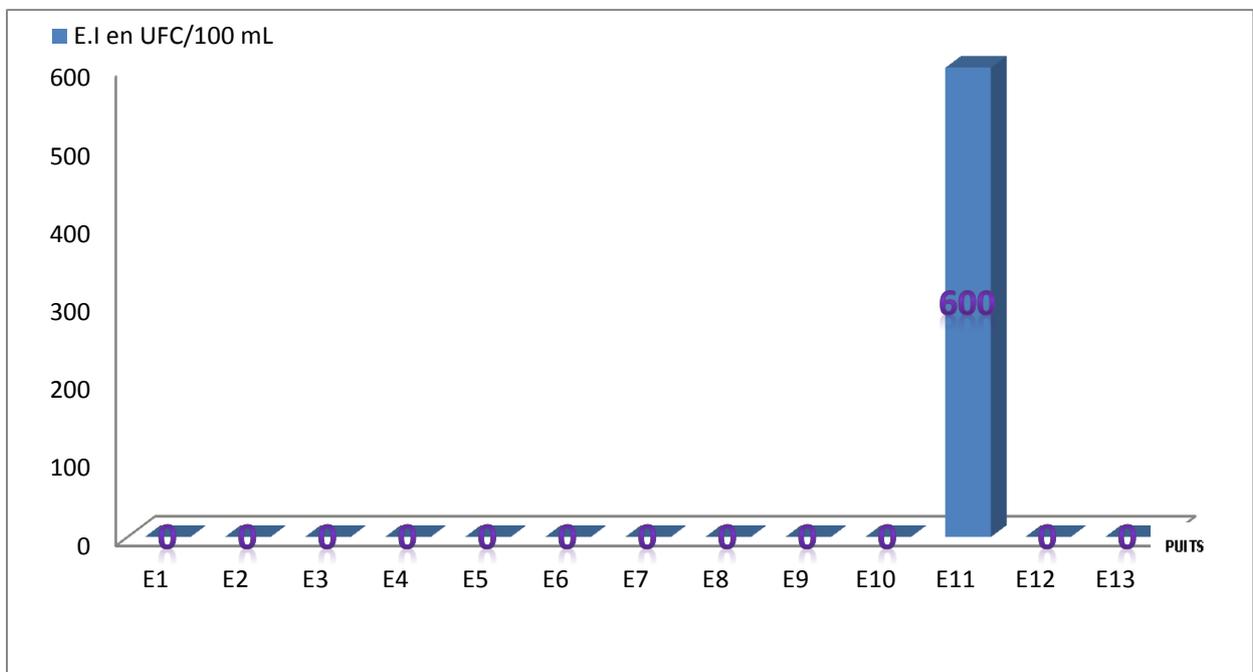
Graphique 3 : Représentation graphique de la répartition des C.T dans les différents puits

- C.F sont présent seulement au niveau des puits E6 et E11 dont les concentrations sont respectivement de 1 UFC/100 ml et 600 UFC/100 ml (Graphique 4) :



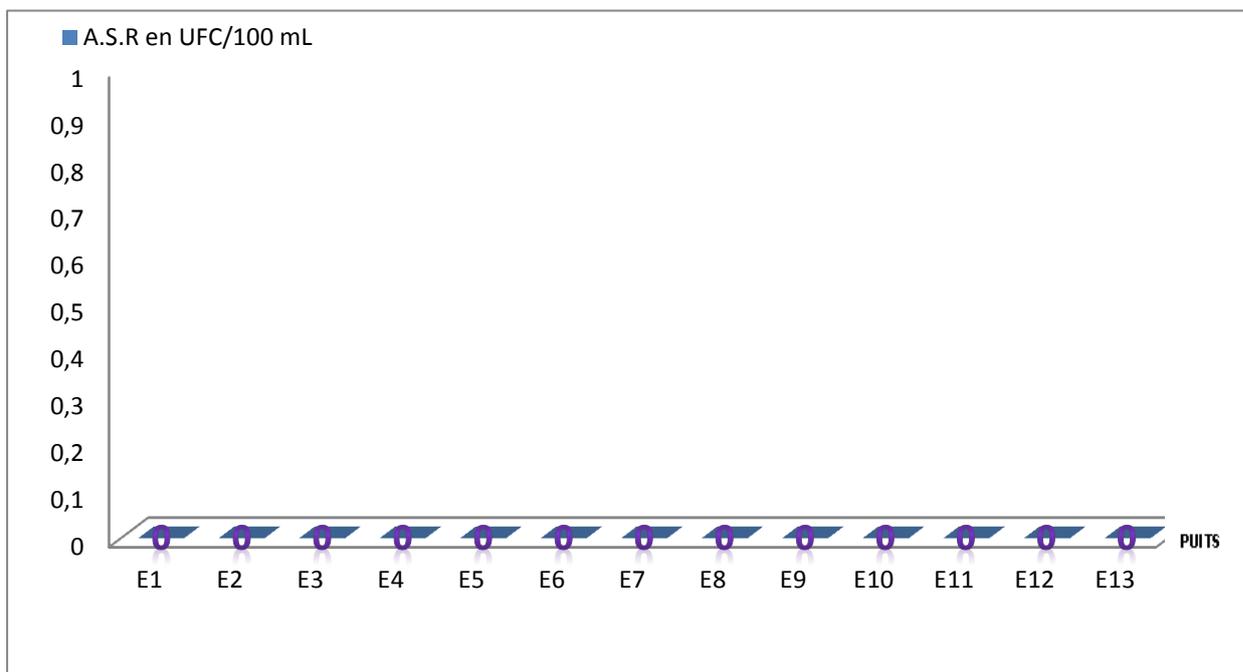
Graphique 4 : Représentation graphique de la répartition des C.F dans les différents puits

- Les entérocoques intestinaux ne sont présents qu'au niveau d'un seul puits E11 à d'une concentration de 600 UFC/100 ml (Graphique 5) :



Graphique 5 : Représentation graphique de la répartition des E.I dans les différents puits

➤ Absence totale des spores d'anaérobies sulfito-réducteurs (Graphique 6) :



Graphique 6 : Représentation graphique de la répartition des S.A.S.R dans les différents puits

### 3) discussion :

Les résultats de l'analyse bactériologique présentés dans ce travail, ont montrés que les eaux des puits E1, E2, E3, E4,E7, E8,E9, E10, E12, sont conformes de point de vue bactériologique. Ainsi, les valeurs obtenues sont conformes avec la norme marocaine relative aux eaux d'alimentation humaine (NM 03.7.001/2006) dont la valeur maximale admissible pour chaque bactérie est :

- Flore Mésophile Aérobie Totale à 37°C : 20 UFC/1 ml ;
- Flore Mésophile Aérobie Totale à 22°C : 100 UFC/1 ml ;
- Coliformes totaux : 0 UFC/100 ml ;
- *Escherichia coli* : 0 UFC/100 ml ;
- *Entérocoques intestinaux* : 0 UFC/100 ml ;
- Spores d'anaérobies sulfito-réducteurs : 0 UFC/100 ml ;

Par contre, les autres puits E5, E6, E11et E13 peuvent présenter un risque sanitaire pour le consommateur, car les valeurs de la densité de la plupart des bactéries recherchées sont supérieures à la valeur maximale admissible par la norme marocaine (NM 03.7.001/2006).

Les résultats de notre travail, peuvent être comparables, à ceux obtenus par Benajiba et al. (2013) lors de leur évaluation de la qualité microbienne des eaux de 15 puits de la nappe phréatique de la ville de Martil, et qui a révélé une contamination importante de la nappe phréatique sur les 270 analyses réalisées de CT, CF et SF (90 analyses pour chaque groupe de bactéries). En effet, ils ont trouvés que 100%, 96,67% et 92,23% respectivement des résultats des bactéries précédentes se sont révélés positifs. Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs raisons parmi lesquelles on cite la position des puits par rapport aux sources estimées de contamination fécale : les puits E5, E6, E11 et E13seraient trouvés dans des zones caractérisées par une présence importante de sources de pollution rurale (fosses septiques non normalisées et leurs débordements, lac mort pollué, eaux usées jetées à ciel ouvert, ordures ménagères, puits moins profond). Les autres puits seraient situés dans des zones où les sources de pollution rurale sont mineures ou bien il s'agirait de puits assez profonds ou protégés.

## ❖ Conclusion :

- ✚ Pour conclure, on peut déduire d'après notre analyse et nos interprétations que les 8 puits sont exemptes de bactéries recherchées (FMAT, CT, E. coli, EI et SASR), et donc sont conformes, de point de vue bactériologique et physicochimique, aux valeurs admissibles par la norme marocaine de la qualité de l'eau. Mais cette conformité demeure suspecte, car il reste des analyses microbiologiques et physico-chimiques à faire comme les tests du *staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* du cote microbiologique et des tests du sulfates et nitrates du cote physico-chimique.
- ✚ Au contraire des puits E5, E6, E11 et E13 qui sont révélés positifs, de point de vue bactériologique et physicochimique, qui peuvent être considérés depuis cette petite analyse non propres à la consommation humaine.
- ✚ De nos jours. La technologie s'est tellement développée qu'on peut facilement détecter les germes ou mesurer le pH le plus rapide et précis possible sur place sans avoir besoin de se déplacer.
- ✚ Je crois que l'objectif a été largement atteint, car le Laboratoire de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu m'a donné la chance d'apprendre beaucoup de techniques aux côtés de professionnels et aussi il m'a permis de mobiliser mes connaissances et approfondir mes savoirs pour expérimenter des nouvelles méthodes. Au terme de ce stage qui a été l'occasion de mes premiers contacts avec le monde de l'entreprise, je retiendrai que la motivation et le savoir-faire sont deux éléments indispensables pour réussir une vie professionnelle.

## ❖ bibliographies :

- APHA, AWWA et WEF (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation, 20e édition, pagination multiple.
- Benajiba et al (2013). Evaluation de la qualité microbienne des eaux de la nappe phréatique de Martil au Maroc. Article d'érudit
- BABA-MOUSSA A. (1994). Étude de la pollution bactériologique de la nappe phréatique à partir d'une latrine en Afrique subtropicale. thèse de Doctorat. Université Lausanne, France, 251p
- BIOKAR.
- CEAEQ (2000) Recherche et dénombrement des entérocoques: méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnemental du Québec, gouvernement du Québec, 27 p
- DEGBEY C. et Al (2011). Facteurs associés à la qualité de l'eau de puits et prévalence des maladies hydriques dans la commune d'Abomey Calavi (Bénin). Études originales. Cahiers d'études et de recherches francophones. Santé, 21, 47-55.
- El Haissoufi et Al, A., Microbiol. Ind. San. Environn.
- Experteau
- Institut national de QUEBEC.
- OMS.
- Rodier T., 1997. Analyse de l'eau : Eaux naturelles, Eaux Résiduaire, Eaux de mer. Dunod
- Santé Canada (1991) La qualité bactériologique. Document de support aux « recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada ».
- <http://www.laease.com/eau-aerobies.html>.
- Edberg, SC, EW Rice, RJKarlin et MJ Allen (2000). Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, 88: 106S-116S.

❖ ANNEXES :

Milieu SLANETZ

-Tryptose.....	20,0 g/l
-Extrait de levure.....	5,0 g/l
-Glucose.....	2,0 g/l
-Hydrogénophosphatedipotassique(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	4,0g/l
-Azoture de sodium(NaN <sub>3</sub> ).....	0,4 g/l
-Agar-agar.....	8 g à 18 g/l
-Eau.....	1 000 ml

Milieu Tergitol TTC

-Peptone pancréatique de viande.....	10g/l -
Extrait de viande.....	5g/l -
Extrait autolytique de levure.....	6g/l -
Lactose.....	20g/l -
Tergitol -7.....	0,1g/l -Bleu
de bromothymol.....	0,05g/l -Agar agar
bactériologique.....	10g/l

La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) :

- Tryptone.....	17,00 g/l
- Peptone pepsique de viande.....	3,00 g/l
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g/l
- Bile de boeuf bactériologique .....	10,00 g/l
- Chlorure de sodium.....	5,00 g/l
- Esculine .....	1,00 g/l
- Citrate ferrique ammoniacal .....	0,50 g/l
- Azide de sodium .....	0,15 g/l
- Agar agar bactériologique.....	13,00 g/l

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,1

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

## Milieu SPS

Tryptone.....	15g/L
- Yeast extract.....	10g/L
- Ferric Citrate.....	0.5g/L
- Sodium Sulfit.....	0.5g/L
- Sodium Thioglycollate.....	0.1g/L
- Polysorbate.....	80 0.05g/L
- Sulfadiazine.....	0.12g/L
- Polymyxin B Sulfate.....	0.01g/L
- Agar.....	15g/L

## Api 20 E

### Tests négatifs

*Les 10 premiers tests :*

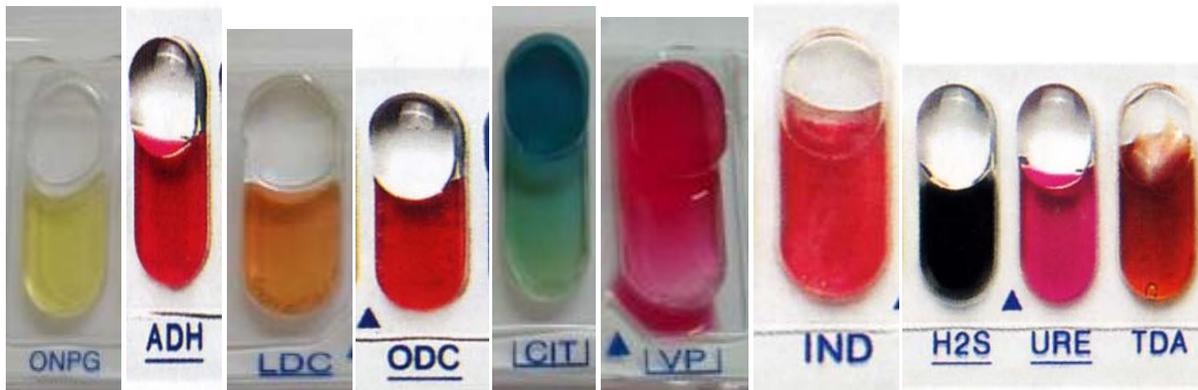


*Les 10 derniers tests :*



Tests positifs

Les 10 premiers tests :



Les 10 derniers tests :

