

Introduction

Pendant longtemps, les hommes se sont peu préoccupés de leur milieu naturel, s'ingérant dans la nature et usant d'elle sans compter, aménageant à tour de bras, et rejetant largement effluents et déchets de toutes sortes.

Croyant aux propriétés purificatrices sans limite de l'environnement aquatique, ils l'ont utilisé sans crainte comme poubelle du monde, déversant dans les eaux littorales tous les rejets, toxiques ou non, radioactifs ou pétroliers, aussi bien dans les estuaires qu'à proximité des côtes. Le constat a été dramatique....

Selon Lacaze et Ramade (1993), l'océan, lui-même, n'est plus considéré officiellement comme un réservoir infini. On a enfin réalisé les limites de sa taille comme celles de son pouvoir, ces limites qui ne sont pas loin d'être atteintes pour plusieurs zones côtières (lagunes, baies, anses, ports, estuaires...etc).

Pour les mers fermées, les menaces sont inversement proportionnelles à leur dimension (Lacaze et Ramade, 1993), Bordées par des nations industrielles et industrielles, la mer Baltique, la mer du Nord, la Manche, la Méditerranée... sont en danger. Leurs surfaces et leurs volumes sont limités et les brassages par les courants y sont faibles (Arrignon, 1991).

La Méditerranée qui ne représente que 1% de la surface des océans (Gallini, 2008), est l'un des milieux marins et côtiers les plus riches mais aussi l'un des plus vulnérables au monde du fait de son exposition à tout un ensemble de nuisances dont 80 % sont d'origine terrestre. Ses eaux baignent 22 pays riverains qui comptent plus de $4 \cdot 10^8$ habitants dont $143 \cdot 10^6$ résident dans les zones côtières ; à ceux-ci s'ajoutent chaque année quelque $175 \cdot 10^6$ de visiteurs, dont plus de la moitié de ses agglomérations urbaines ne disposant pas de stations d'épuration de leurs eaux résiduaires, 60 % d'entre elles déversent directement leurs eaux usées dans la mer et plus de 80 % des décharges de ces pays méridionaux et orientaux ne sont pas contrôlées, (MeHSIP, 2008).

Le milieu marin méditerranéen est particulièrement exposé au déversement de déchets agricoles, de particules en suspension dans l'air et d'eaux de ruissellement chargées d'agents pathogènes, de métaux lourds, de matières organiques polluantes, d'huiles et de substances radioactives, (MeHSIP, 2008), dont l'origine sont les activités industrielles, les transports maritimes (30% du trafic maritime mondial) et les activités domestiques avec des rejets en mer estimés à $6 \cdot 10^5$ tonnes chaque année, soit l'équivalent de 30 catastrophes de type "Erika" (Gallini, 2008).

Le littoral Algérien avec une façade maritime longue de 1200 Km, est caractérisé par une concentration de populations et des activités industrielles; ces dernières s'accaparent les meilleurs sites littoraux et se développent au détriment des autres usages liés à la mer, entraînant des risques réels pour les agglomérations limitrophes et les milieux marins (Kacemi, 2006).

Le golfe d'Annaba et le littoral d'El kala connaissent au même titre que le reste du littoral Algérien, les mêmes problèmes environnementaux; Ils sont exposés aux risques des différents types de pollutions d'origine anthropique qui ont un impact sur les organismes qui y vivent et sur l'homme.

L'eau polluée par les différents rejets (industriels, domestiques, agricoles,...etc), héberge et véhicule des bactéries en transit (Encarta, 2003). Le transfert physique de ces dernières (lié au ruissellement) dépendra des conditions climatiques, pédologiques et géographiques. Par ailleurs, leur survie sera fonction de leur capacité physiologique d'adaptation à des environnements divers ; les conditions hivernales apparaissent les plus à risque, compte tenu du ruissellement induit par les pluies sur des sols nus et du faible ensoleillement favorisant la survie bactérienne.

Beaucoup d'organismes marins accumulent les contaminants à de très fortes concentrations dans leurs tissus. Les bivalves filtrent l'eau de mer (de 100 à 650 l/heure /Kg d'animal vivant) pour en tirer les éléments nécessaires à leur survie (plancton), ils retiennent en même temps bactéries (de 100.000 à plus de 10^5 de germes par gramme de broyât), virus, et les concentrent (Brissou et Denis, 1980). Cette Bio-accumulation est variable selon les espèces de coquillages, leurs situations (immersion ou non) et bien sûr, selon la nature du contaminant. Les coques et palourdes, coquillages fouisseurs, se contaminent plus facilement que les autres. Leurs tubes digestifs plus longs favorisent un temps de rétention plus élevé (MSSF, 2003). En raison de cette capacité de filtration et d'accumulation importante des particules et polluants du milieu, les bivalves ont été retenus comme Bio-indicateur de la contamination, par excellence (Jorgensen, 1960).

La consommation des bivalves contaminés, expose le consommateur à un risque de toxoinfection : Fièvre typhoïde, Salmonellose, Shigellose, Campylobactériose, Choléra, Gastro-entérite virale et Hépatite A (Smith De Waal *et al.*, 2001 ; Potassman *et al.*, 2002, Hervé *et al.*, 2003). En France, des épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de coquillage, ont été enregistrées en 1983 (4000 cas) et en 1992 (huîtres de l'étang de Thau). Aux USA, entre 1990 et 2000, il a été répertorié 66 sortes d'épidémies, dont 3299 cas ont pour origine l'ingestion de mollusques bivalves (Smith De Waal *et al.*, 2001).

Pour préserver le consommateur, la communauté européenne (1991) a tout d'abord édicté des normes de concentration en coliformes fécaux, pris comme indicateur de contamination potentielle des eaux par des germes pathogènes : 10^2 *E. coli* /100ml dans les eaux de baignades et $2.3 \cdot 10^2$ *E. coli* /100ml dans les eaux de conchyliculture.

Par la suite, la directive européenne 91/492/EC (Communauté européenne, 1991) définit les critères microbiologiques pour les bivalves; cette dernière établit que la qualité microbiologique de ces aliments doit être contrôlée en mesurant les Coliformes fécaux (moins de 300 pour 100g), *Escherichia coli* (230 pour 100g), et les *salmonelles* (absence).

Notre travail entre dans le cadre d'un projet de recherche portant sur la bio-surveillance des plans d'eau et les risques de contaminations bactériologiques.

L'étude a pour objectifs :

- o De déterminer la qualité bactériologique de l'eau et des bivalves par la recherche et le dénombrement des indicateurs de contamination et leur distribution spatio-temporelle.
- o De suivre l'évolution des paramètres physico-chimiques (Température, pH, Oxygène dissous, salinité et matières en suspensions) de l'eau mer.
- o De déterminer la source probable de la contamination.

Matériel et méthodes

1. Présentation de la zone d'étude :

La zone d'étude correspond à la partie extrême, Nord- Est du littoral algérien, délimitée à l'Ouest par le cap de Garde et à l'Est par le cap Segleb et comprend le Golfe d'Annaba et le littoral d'El kala.

1.2. Le Golfe d'Annaba :

Le Golfe d'Annaba est limité à l'Ouest par le Cap de Garde ($57^{\circ} 16' E$ $36^{\circ} 58' N$) et à l'Est par le Cap Rosa ($8^{\circ} 15' E$ et $36^{\circ} 58' N$). La façade maritime de cette zone s'étend sur une longueur d'environ 21,5 milles (40 Km) de côtes représentant un potentiel halieutique très important (fig.1).

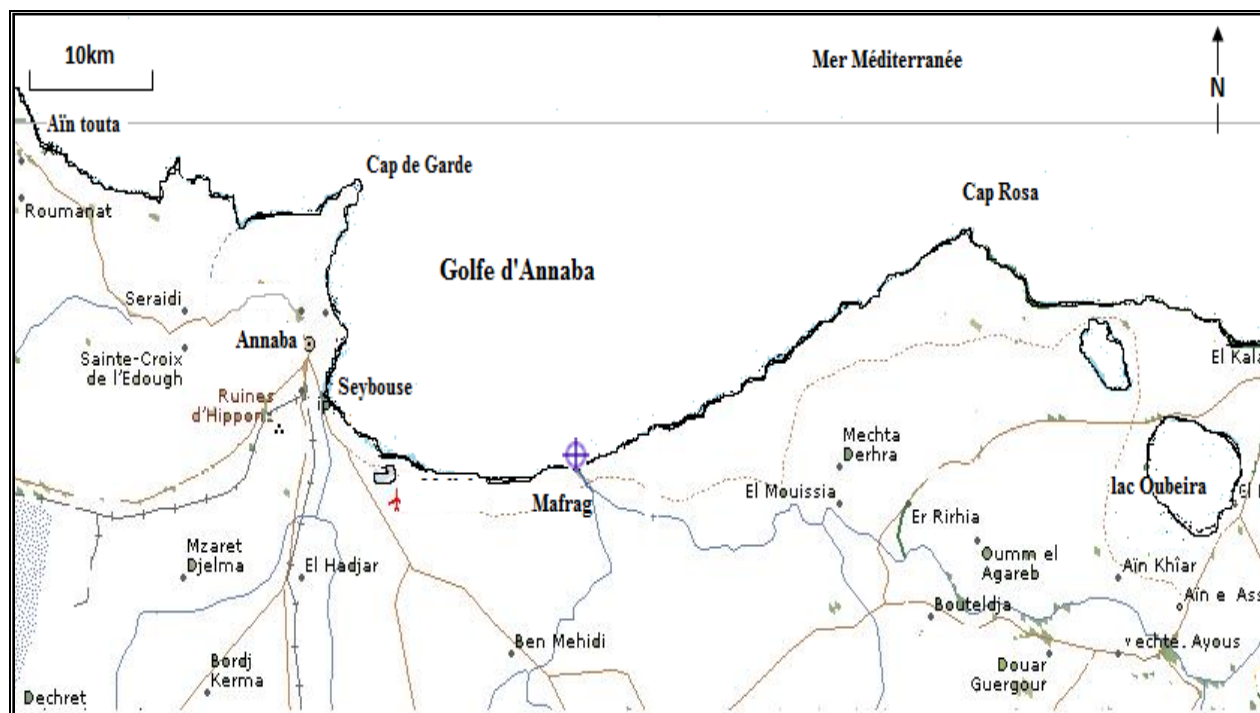


Figure 1 : Représentation du Golfe d'Annaba.

Le plateau continental est étroit et accidenté dans son ensemble avec un fond hétérogène surtout au voisinage des deux Caps. Il est nettement restreint au Nord du Cap de Garde (4,5milles), puis s'élargit dans le Golfe jusqu'à 14,5 milles avant de se rétrécir légèrement à l'Est au voisinage du Cap Rosa (Vaissiaire et Fredj, 1963).

Entre les deux Caps, la profondeur moyenne est estimée à 50 m avec une profondeur maximale de 63 m. La plate-forme continentale s'avance jusqu'à 10 milles seulement au large (Gruvel, 1926).

La bathymétrie entre les deux caps limitant le Golfe d'Annaba est estimée à 65m. Les isobathes -10 m et -20 m sont très rapprochées de la côte nord du Cap de Garde, les deux lignes s'éloignent l'une de l'autre, au niveau de l'oued Seybouse jusqu'au port (sud du golfe). L'isobathe -50 m est détachée des isobathes précitées (Vaissiaire et Fredj, 1963).

Concernant les caractères physico-chimiques, la température joue un rôle majeur dans les variations de la densité de l'eau.

D'après Frihi (1995) au Sud-Est du Golfe d'Annaba, la température moyenne varie entre 16°C en hiver et 28,8 °C en été avec une amplitude de 12,8 °C. Comme pour la température, la salinité diffère entre les deux secteurs, les valeurs varient de 31.4 à 37.5 mg/l avec une amplitude de 6.5 mg/l. Au Nord-Ouest, la salinité est sensiblement stable et varie entre 36.9 et 37.6 mg/l avec une amplitude réduite de 0.7 mg/l. Ces variations de salinité entre les deux régions sont dues aux rythmes du débit des oueds Seybouse et Boudjemâa.

D'après les travaux de Lacombe (1973), se rapportant à l'aspect physique des eaux méditerranéennes, la vitesse du courant atlantique circulant dans cette mer est de 0.5 à 0.7 m/s. En général l'hydrodynamisme sur le littoral Est Algérien est marqué par des mouvements de faible amplitude. Dans le golfe, il existe un courant dirigé d'Ouest vers l'Est avec des vitesses fluctuantes selon les saisons (0,8 à 2,5 noeuds), qui passe à quelques milles au large. Un autre de plus faible intensité (0,5 à 1,5 noeuds) circule à proximité de la rive Ouest (Anonyme, 1976).

Les houles sont d'origine Nord-Ouest à Est-Nord-Est. Elles peuvent être classées en trois catégories : deux directions du large Nord-Est et Est-Nord-Est avec amplitude de 1.2 à 6 m ; deux directions Ouest et Ouest Nord-Ouest avec une amplitude de 1 à 5 m et des houles venant de différentes directions avec une amplitude de 1 à 2 m.

Le Golfe d'Annaba reçoit des rejets directs de plusieurs industries installées sur la côte (tab. 16) en particulier celle des produits phytosanitaires (Fertial), il reçoit également les eaux usées urbaines (tab. 17) qui ne subissent qu'un traitement sommaire au niveau de la station de Sidi Brahim ; Les autres stations sont destinées à la collecte des eaux usées (Tab. 18). Il existe aussi beaucoup d'autres sources de contaminations qui sont réparties tout au long du littoral (Oued Seybouse, Oued Mefrag, Oued Bedjmâa, émissaires Rezgui Rachid et Rizzi Amor).

1.3. Le littoral d'El Kala:

Le littoral d'El Kala est situé à l'extrême Est de la côte Algérienne ; il s'étend du Cap Rosa à l'Ouest (8°15' E et 36° 58' N), au Cap Segleb (la frontière Tunisienne) à l'Est.

Le plateau continental est relativement étroit à l'Est et s'élargit à l'Ouest ; les isobathes -20 m et -100m sont en effet situés à 7 Km à l'Est et atteignent 30 Km à l'Ouest (Fig.2).

Le littoral généralement intégré au détroit de Sardaigne duquel il est très proche, est le siège d'intenses transports de l'Eau Atlantique Modifiée, coulant en surface vers l'Est et de l'Eau Levantine Intermédiaire qui coule en profondeur vers l'Ouest (Manzella et la Violette, 1990 ; Perkins et Pistek, 1990).

Il reçoit très peu d'extrusions continentales en raison des faibles apports d'eau douce (rivière); toutefois, le lac El Mallah évacue dans le littoral 180 millions de m³ d'eau saumâtre d'une salinité comprise entre 3 et 25 ‰ ; de ce fait, ce plan d'eau qui effectue des échanges hydrodynamiques avec le littoral au rythme des marées, a tendance à fertiliser ce milieu en sels nutritifs tout en diminuant la salinité de la bande côtière (Retima, 1999).

Selon Ghaidalia et Bourgeois, (1961), la Méditerranée est une mer chaude où les écarts de températures entre les couches superficielles et les couches profondes sont relativement accentués (jusqu'à moins de 400m à 500m) ; à cette profondeur la température se stabilise autour de 13°C- 14°C. Par ailleurs, Ounissi et *al*, (1996), rapportent que l'écart de température entre l'eau de surface et celle se trouvant à 50m de profondeur, dépasse 4°C ; quant à la salinité, la différence entre l'eau de surface et cette profondeur, elle n'excède pas 1 g/l.



Figure 2 : Représentation du Littoral d'El Kala
(Benyacoub, 1996 modifiée)

1.4. Sites d'échantillonnages :

5 sites ont été retenus dans le cadre de cette étude (fig.3).



Figure 3 : Positionnement des sites d'étude (Google, 2008 modifiée).

o Site 1 : Cap de Garde:

Il se situe à l'Ouest de la zone d'étude ($36^{\circ}57'59.94''$ N $7^{\circ}47'38.30''$ E), il est supposé n'être exposée à aucune source de pollution du fait de sa localisation assez éloignée des divers rejets, mis à part la présence de quelques habitations, non reliées au réseau d'assainissement ainsi que son accessibilité en saison estivale (fig.4).



Figure 4: Image satellitaire montrant le site 1 : Cap de Garde (Google, 2008 modifiée).

o **Site 2 : Rezgui Rachid (Ex St Cloud) :**

Il est situé dans la zone côtière centre ($36^{\circ}55'2.68''N$ $7^{\circ}46'4.83''E$). Il reçoit les rejets urbains des quartiers centre et Ouest d'Annaba sans traitement préalable ainsi que les eaux de pluie. Il est, par ailleurs, très fréquenté en période estivale (fig.5).



Figure 5: Image satellitaire montrant le site 2 : Rezgui rachid (Google, 2008 modifiée).

o **Site 3 : Sidi Salem :**

Il se situe à l'Est de la ville d'Annaba ($36^{\circ}52'18.13''N$ $7^{\circ}46'8.32''E$) dans la commune d'El Bouni entre oued Seybouse et Bedjimâa, il reçoit les rejets industriels du complexe d'engrais phosphatiés de Ferial ainsi que les rejets urbains d'une grande partie de la ville d'Annaba par le biais de oued Bedjimâa et des agglomérations situées dans le bassin versant de oued Seybouse. Bien que non autorisé à la baignade, il est très fréquenté en période estivale (fig.6).



Figure 6: Image satellitaire montrant le site 3 : Sidi Salem (Google, 2008 modifiée).

o Site 4 : H'naya :

Il se situe à l'Est du Golfe d'Annaba ($36^{\circ}53'6.59''\text{N}$ $8^{\circ}4'8.70''\text{E}$), il est supposé n'être exposé à aucune source de pollution du fait de sa localisation assez éloignée des divers rejets; il est fréquenté par les pêcheurs et les animaux ainsi que quelques estivants en été (fig.7).



Figure 7 : Image satellitaire montrant le site 4 : H'naya (Google, 2008 modifiée).

o Site 5 : Aouinate :

Il se situe dans la partie Est du littoral d'El Kala ($36^{\circ}54'26.89''\text{N}$ - $8^{\circ}30'30.68''\text{E}$), il n'est exposé à aucune source de pollution du fait de sa localisation assez éloignée des divers rejets. Cependant, il est fréquenté par les estivants en été. (fig.8).



Figure 8 : Image satellitaire montrant le site 5 : Aouinate (Google, 2008 modifiée).

2. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau:

Une mesure mensuelle, des paramètres physico-chimiques de l'eau a été effectuée de janvier à décembre 2008.

La mesure de la température, du pH, de la salinité et de l'oxygène dissous, leur mesure a été réalisée *in situ*, à l'aide d'un multi paramètres de terrain (Consort C535) ; ce dernier doit être préalablement étalonné puis calibré ; La sonde est ensuite immergée dans l'échantillon d'eau pendant quelques secondes, le résultat obtenu, s'affiche à l'écran avec l'unité de mesure correspondante.

Quant à la détermination des matières en suspension (MES) de l'eau, on a utilisé la méthode par filtration sur disque filtrant. Elle repose sur la séparation des matières particulaires en suspension grâce au filtre wattman GF/C de 0,45 µm pour des volumes définis ; Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé 100 ml d'eau de mer.

Préalablement pesés, puis séchés à 105°C pendant une heure, les filtres sont pesés une deuxième fois, ce qui nous permet d'estimer par la suite la part des matières en suspension, et ceci en faisant la différence du poids des filtres avant et après filtration.

La teneur en matières en suspension est exprimée en milligramme par litre (mg/l) (Rodier, 1978), et donnée par la formule suivante :

$$\text{M.E.S (mg /l)} = \frac{(M_1 - M_0) \ 1000}{V}$$

M_0 = masse du filtre avant utilisation (mg).

M_1 = masse du filtre après utilisation (mg).

V = volume filtré (ml).

3. Analyse bactériologique des échantillons:

Dans cette étude, nous avons recherché les bactéries indicatrices de pollution (Coliformes, Streptocoques et anaérobies sulfito-réducteurs), et les bactéries pathogènes strictes ou pathogènes opportunistes.

Pour la recherche des bactéries indicatrices de pollution, nous avons procédé à un dénombrement en utilisant une méthode simple, qui est la colimétrie. Celle-ci désigne « la technique de numération en tubes multiples » (TNTM) avec détermination du nombre de germes le plus probable (NPP) à partir de la table de Mac Grady extraite de la norme NF T90-413, préconisée par l'unité de coordination de PAM (Plan d'Action pour la Méditerranée) (Anonyme 1987). C'est l'examen le plus important et le plus pratiqué dans les analyses de l'eau ou de fruits de mer, répondant à des préoccupations sanitaires (Rodier, 1978).

Pour la mise en évidence des bactéries anaérobies sulfito- réductrices, considérées aussi comme des témoins de pollution fécale, nous avons utilisé, la recherche et le dénombrement par incorporation en gélose.

Quant à la recherche des bactéries pathogènes (*Salmonelles*, *pseudomonas* et *staphylocoques*), elle a été effectuée par ensemencement sur gélose spécifique.

3.1. Prélèvement de l'eau :

Les prélèvements d'eau sont effectués mensuellement durant la période s'étalant de janvier à décembre 2008.

Pour cela, nous utilisons des flacons en verre d'une capacité de 250 ml soumis au préalable à un nettoyage rigoureux (un rinçage à l'eau potable puis 3 rinçages à l'eau distillée) séchés, bouchés, enveloppés séparément dans un morceau de papier filtre (Rodier, 2005) puis stérilisés à l'autoclave à une température de 121° C pendant 15mn (O.M.S.1983). Les flacons stériles sont plongés à une profondeur d'environ 50 cm de la surface de l'eau puis ouverts à contre courant. Une fois remplis, ils sont refermés sous l'eau pour éviter la formation de bulles d'air et tout risque de contamination lors du transport.

Une fois les prélèvements effectués, les flacons sont étiquetés et placés dans une glacière à l'abri de la lumière et à une température de 4°C car la teneur en germes des eaux risque de subir des modifications dans les flacons, après le prélèvement. L'évolution est d'ailleurs assez difficile à prévoir et dépend de nombreux facteurs ; température, concurrence bactérienne des espèces présentes, composition chimique de l'eau. C'est pour cela que toute analyse doit être effectuée le plus rapidement possible.

La norme NF T 90-420 de février 1987 indique que les échantillons doivent être maintenus à une température comprise entre 1 et 4°C dès leur prélèvement. Ils doivent être analysés le jour même, il est donc admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas excéder 24 heures, aussi il est préférable de le raccourcir lorsque l'eau est présumée être très polluée (Rodier, 2005)

En ce qui concerne, la surveillance des eaux côtières, l'analyse au laboratoire débute dans un délai maximum de 8 heures après le prélèvement de l'échantillon selon les recommandations de Rodier (1984).

Tout prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignement sur laquelle on note :

- o Lieu de prélèvement.
- o Date et heure de prélèvement.
- o L'état de la mer.
- o Le vent (la direction).

3.2. Récolte des bivalves et préparation des échantillons :

L'espèce *Perna perna* est retrouvée au niveau des zones rocheuses des sites précités. La récolte s'effectue manuellement et de façon aléatoire. Les bivalves récoltés sont au nombre de 4 à 7 selon la taille; ils sont placés dans des sacs de congélations propres et étiquetés, sur lesquels on note la date, le site et l'espèce.

Ensuite, ils sont entreposés dans des glacières à une température comprise entre 4°C à 10°C (A.C.I.A, 2004) pour être acheminés au laboratoire.

Une fois au laboratoire, les moules sont débarrassées des byssus et des épizoaires présents sur leurs coquilles, puis brossées sous l'eau du robinet et enfin désinfectées superficiellement par un jet d'alcool et flambage rapide.

Après ouverture aseptique, le contenu entier : chair et liquide inter-valvaire est recueilli stérilement, puis dilué, et soumis au broyage par un broyeur homogénéiseur, Ultra-Turrax, préalablement nettoyé (15 000 t/mn pendant 30 secondes), afin d'obtenir un broyat homogène considéré comme la dilution mère de l'échantillon à tester (OMS, 1983).

L'analyse porte donc sur la chair et le liquide inter-valvaire (Guiraud, 2003).

3.3. Analyse bactériologique de l'eau

3.3.1. Préparation des dilutions décimales:

Conformément aux normes AFNOR NF VO8-010 et ISO 6887-1, on effectue des dilutions décimales pour chaque échantillon à l'aide d'eau distillée stérile; ou tampon phosphate. Elles doivent être effectuées dans des conditions aseptiques et minutieuses. Les dilutions suivent des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométriques : 0.1 ; 0.01 ; 0.001 ; ...etc.

*Les dilutions :

- o Dilution 10^0 : consiste à la prise directe de la solution mère.
- o Dilution 10^{-1} : dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile, on ajoute 1ml d'eau à analyser (10^0).
- o Dilution 10^{-2} : Dans un deuxième tube à essai, on ajoute 1ml de la dilution 10^{-1} à 9ml d'eau distillée stérile (fig.9).

NB : L'agitation du contenu est nécessaire avant de préparer chaque dilution.

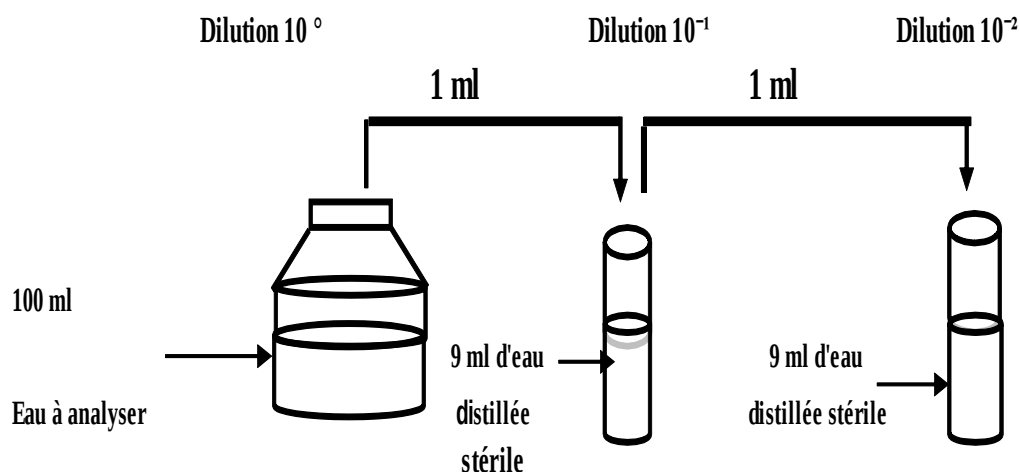


Figure 9 : Préparation des dilutions

3.3.2. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'*Escherichia coli* :

***Principe :**

Conformément à la norme NF T90- 413, il consiste à utiliser des milieux liquides de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB), dans des tubes munis de cloches de Durham. La présence des germes recherchés se traduit par :

- o Un virage de couleur dans toute la masse liquide.
- o Un dégagement de gaz dans les cloches.

***Mode opératoire :**

La colimétrie comporte deux tests: - Un test présomptif.
- Un test confirmatif.

Le dénombrement est effectué suivant la méthode du nombre le plus probable (NPP) de la table de Mac Grady (Annexe).

***Test présomptif: Recherche et dénombrement des coliformes totaux:**

On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9 ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) simple concentration, munis de cloches de Durham.

Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution 10^0 (solution mère). Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution 10^{-1} et 1 ml de la dilution 10^{-2} .

Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham.

L'ensemble des tubes ainsi préparés est incubé à 37° C pendant 24 à 48 h (fig.10).

Remarque :

Cette phase de la colimétrie se base sur la propriété commune des Coliformes à fermenter le lactose tout en produisant du gaz ; elle ne permet que de présumer de la présence des coliformes dans l'eau à analyser. De ce fait, l'application du test confirmatif s'impose.

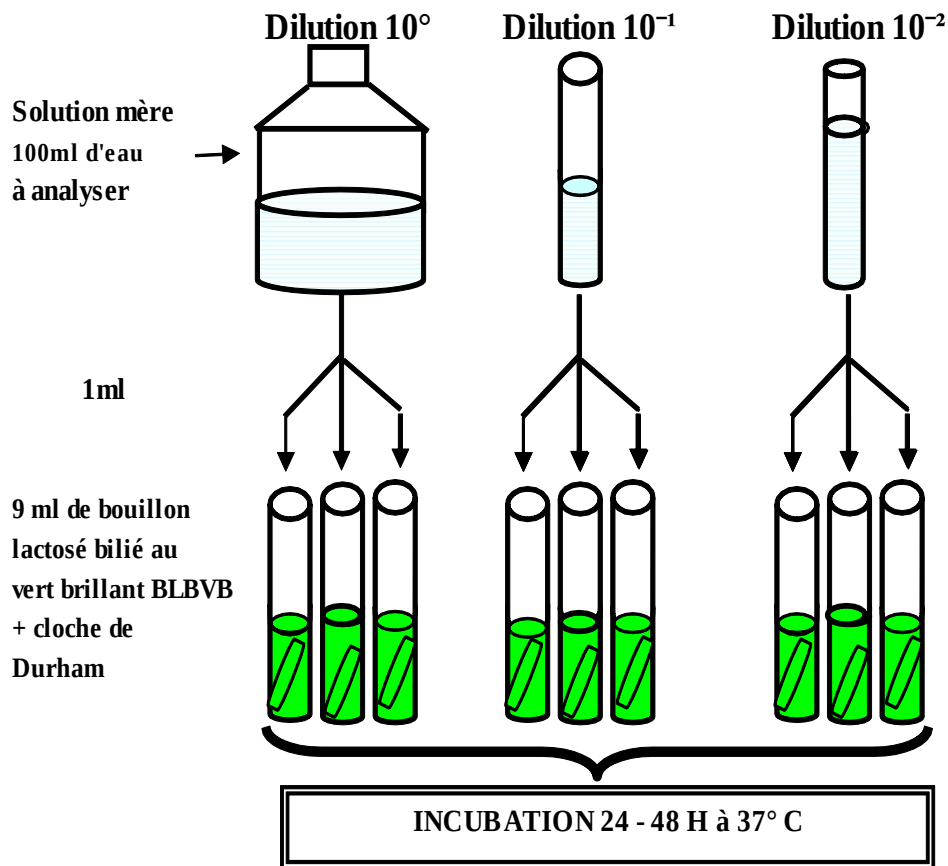


Figure 10 : Recherche et dénombrement des Coliformes fécaux (test présomptif)

***Test confirmatif : Identification des Coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) :**

Les tubes positifs présentent un virage de couleur ainsi qu'un dégagement de gaz dans la cloche de Durham ; ces derniers sont réensemencés dans des tubes d'eau peptonée exempte d'indole (épreuve Deikman). Pour cela nous prélevons 2 à 3 gouttes que nous rajoutons dans des tubes contenant de l'eau peptonée exempte d'indole. Les tubes sont refermés et incubés à 44° C pendant 24 à 48 h (fig.11).



***Lecture:**

- Formation d'anneau rouge à la surface des tubes d'eau péptonée après addition de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs témoignant de la production d'indole par *E.coli*, suite à la dégradation du Tryptophane grâce à la Tryptophanase.
- Production de gaz dans les cloches des tubes de BLVBVB

* Nous notons le nombre de tubes positifs et nous exprimons le nombre le plus probable de germes dans 100 ml d'échantillon d'eau, selon la table de Mac Grady (annexe).

3.3.4. Recherche et dénombrement des Streptocoques (Entérocoques) et identification des Streptocoques de groupe sérologique D de Lancefield:

La recherche des Streptocoques (Entérocoques) est associée à celle des Coliformes d'où la nécessité de les combiner ensemble (Rodier, 1978).

***Principe :**

Conformément à la norme NF T 90-411, le principe se résume à la recherche et au dénombrement des Streptocoques du groupe D en milieu liquide. Alors que les tubes primaires contiennent déjà une certaine quantité d'azide de sodium (milieu de Rothe), le repiquage des tubes positifs se fait sur un milieu nettement inhibiteur avec une concentration plus élevée en azide

de sodium et de cristaux violets (milieu Litsky), ne laissant se développer que les Streptocoques ou Entérocoques.

***Test présomptif : Recherche et dénombrement des Streptocoques totaux.**

On prépare 3 séries de 3 tubes contenant chacun 9 ml de milieu Rothe (simple concentration). Dans la première série de tubes nous rajoutons 1ml de la solution mère (10^0). On réalise la même opération avec les 2 autres séries en ajoutant aux 3 premiers 1 ml de la dilution 10^{-1} et aux 3 autres 1 ml de la dilution 10^{-2} , l'ensemble des tubes ainsi préparés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h (fig.12). Les tubes présentant un trouble bactérien sont considérés comme positifs.

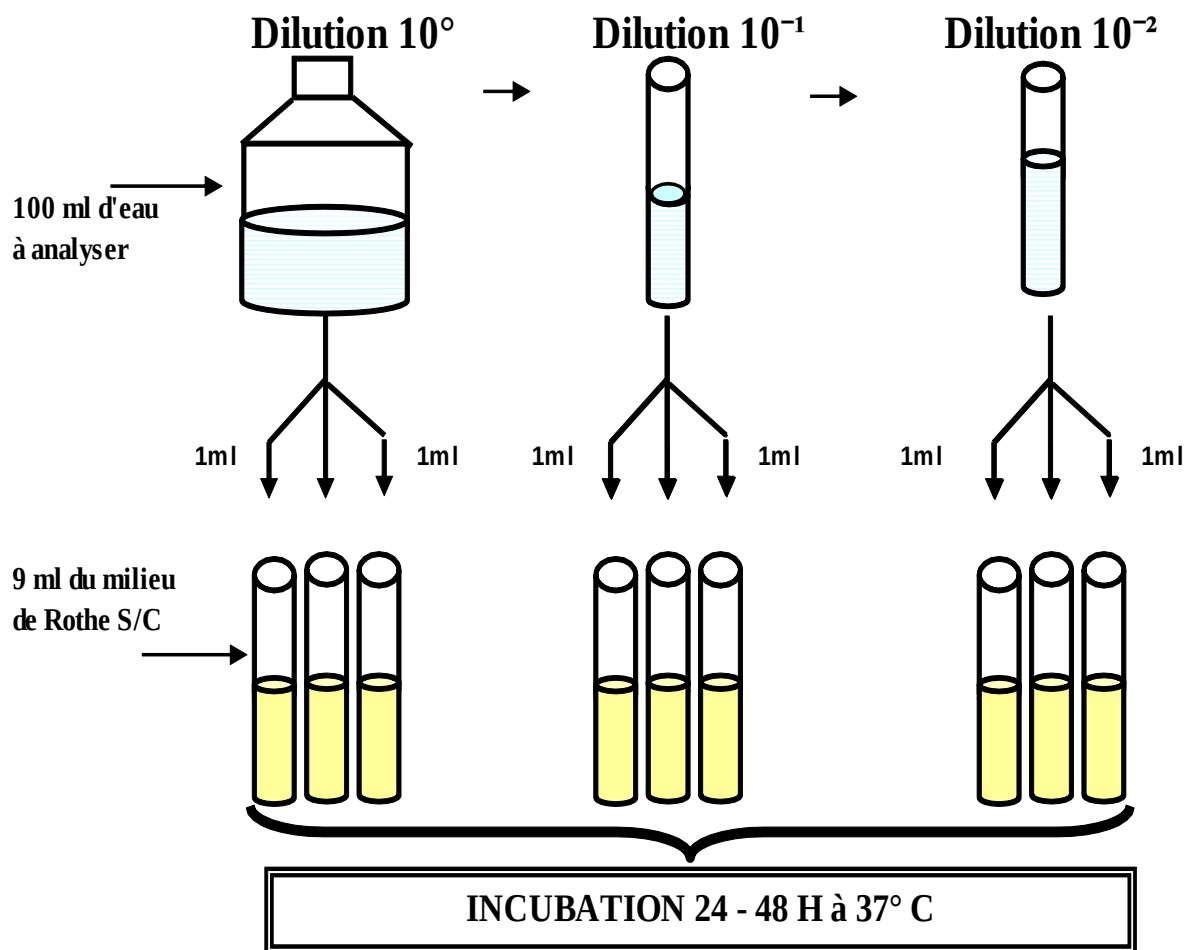


Figure 12: Recherche et dénombrement des *Streptocoques totaux* dans l'eau (test présomptif)

***Test confirmatif : Identification des Streptocoques du groupe sérologique D.**

Nous prélevons 2 à 3 gouttes de chaque tube positif présentant un trouble bactérien, que nous repiquons dans des tubes contenant 9 ml de milieu Litsky. Par la suite les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 h (fig. 13).

***Lecture:**

Nous considérons comme positifs les tubes dans lesquels il y a apparition d'un trouble bactérien qui confirme la présence des streptocoques fécaux; parfois, la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette de signification identique à celle du trouble bactérien. (Rodier, 1975).

3.4. Analyse bactériologique des bivalves :

L'analyse des échantillons de moules *Perna perna*, doit se faire dans les heures qui suivent leur récolte afin d'éviter une prolifération et une modification de la communauté bactérienne. Aucun échantillon ne doit être conservé pendant plus de 24h (ACIA, 2004).

3.4.1. Préparation des dilutions décimales :

Conformément à la norme NF VO8-010

- o Dilution 10^0 : Dilution mère (25g de chair et de liquide inter valvaire + 225 ml d'eau distillée stérile).
- o Dilution 10^{-1} : Dans un deuxième tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile, on ajoute 1ml du broyat (10^0).

- o Dilution 10^{-2} : Dans un troisième tube à essai, on ajoute 1 ml de la dilution précédente (10^{-1}) à 9 ml d'eau distillée stérile (fig. 14).

NB : L'agitation du contenu est nécessaire avant de préparer chaque dilution.

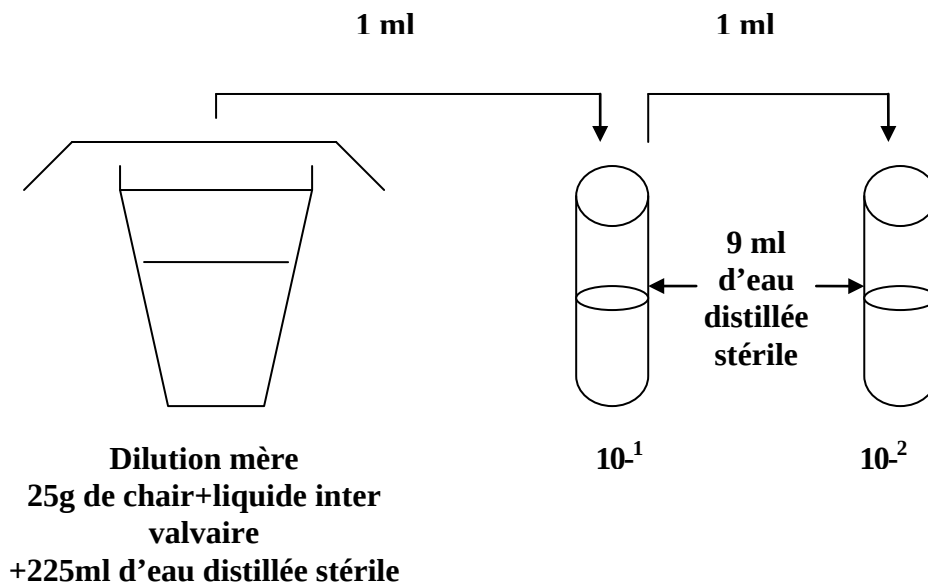


Figure 14 : Préparation des dilutions des échantillons à analyser

3.4.2. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'*Escherichia coli*:

***Principe :**

Conformément à la norme NF T90- 413 et de la même façon que pour l'eau, la recherche consiste à utiliser des milieux liquides de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB), dans des tubes munis de cloches de Durham. La présence des germes recherchés se traduit par le virage de la couleur avec dégagement de gaz.

***Test présomptif: Recherche et dénombrement des Coliformes totaux:**

On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9 ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) simple concentration, munis de cloches de Durham. Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution 10^0 (dilution mère). Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution 10^{-1} et 1 ml de la dilution 10^{-2} .

Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 à 48 h (fig. 15).

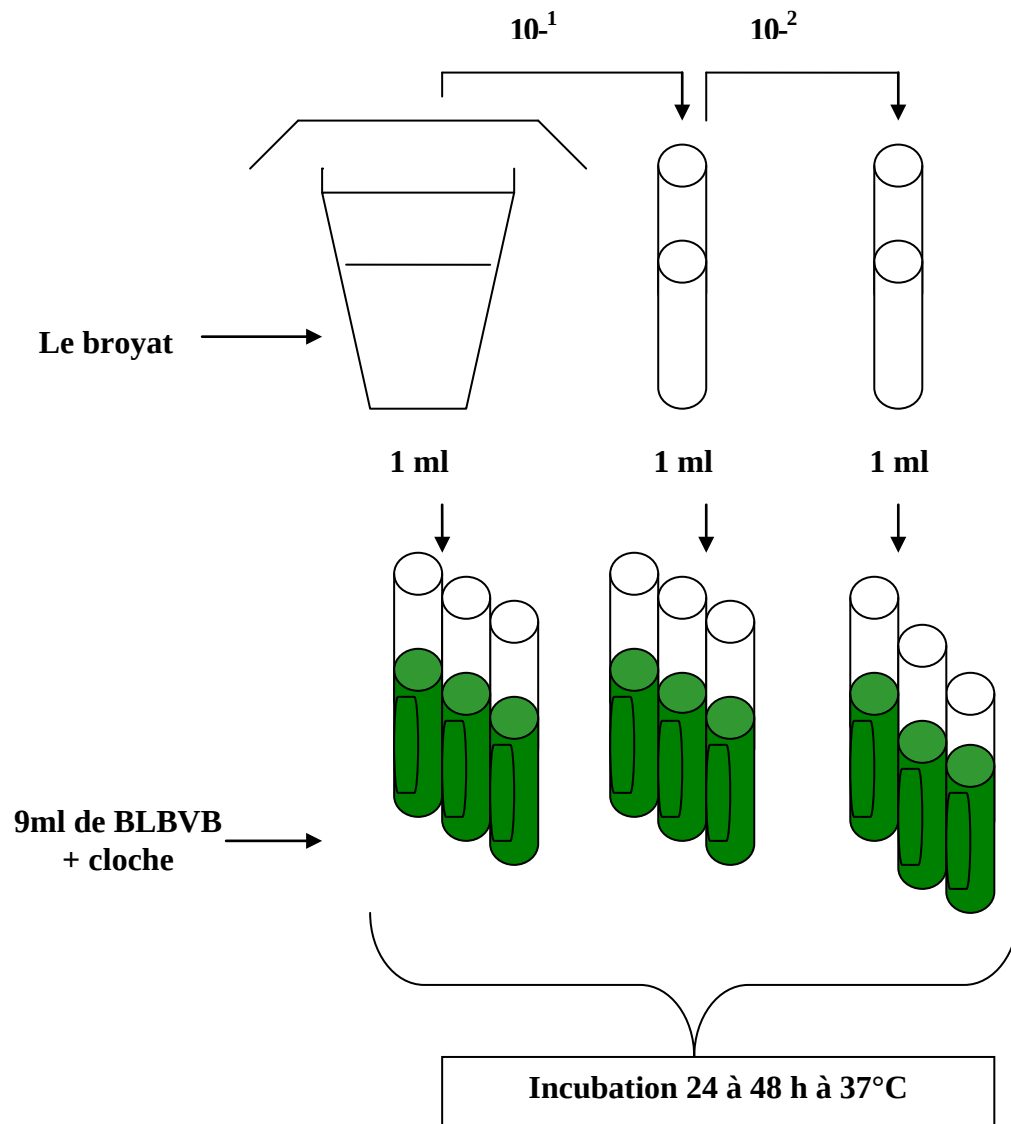


Figure 15 : Recherche et dénombrement des Coliformes totaux chez la moule *Perna perna* (test présomptif)

***Test confirmatif: Identification des Coliformes thermotolerants (*E. coli*) :**

Nous prélevons 1 ml des tubes positifs présentant un virage de couleur, ainsi qu'un dégagement de gaz dans la cloche de Durham, que nous rajoutons à un tube contenant 9ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) et 1ml que nous additionnons à un tube contenant 9ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les tubes ainsi préparés sont incubés à 44° C pendant 24 à 48 h (fig. 16).



3.4.3. Recherche et dénombrement des Streptocoques (Entérocoques) et identification des *Streptocoques* du groupe sérologique D de Lancefield.

***Test présomptif: Recherche et dénombrement des Streptocoques totaux.**

Conformément à la norme NF T 90-411, nous avonsensemencé 3 séries de 3 tubes contenant 9ml de bouillon de Rothe simple concentration (fig. 17).

- Une 1^{ere} série de 3 tubes avec 1ml de broyât à analyser de dilution mère
- Une 2^{eme} série de 3 tubes avec 1ml de la deuxième dilution (10^{-1}).
- Une 3^{eme} série de 3 tubes avec 1ml de la troisième dilution (10^{-2}).

Nous homogénéisons par agitation du contenu des tubes de façon à ce que les bactéries et la concentration en inhibiteurs soient identiques en tout point.

Nous incubons les tubes pendant 24 à 48h à 37° C, les tubes présentant un trouble bactérien sont présumés contenir des streptocoques et sont soumis à un test confirmatif.

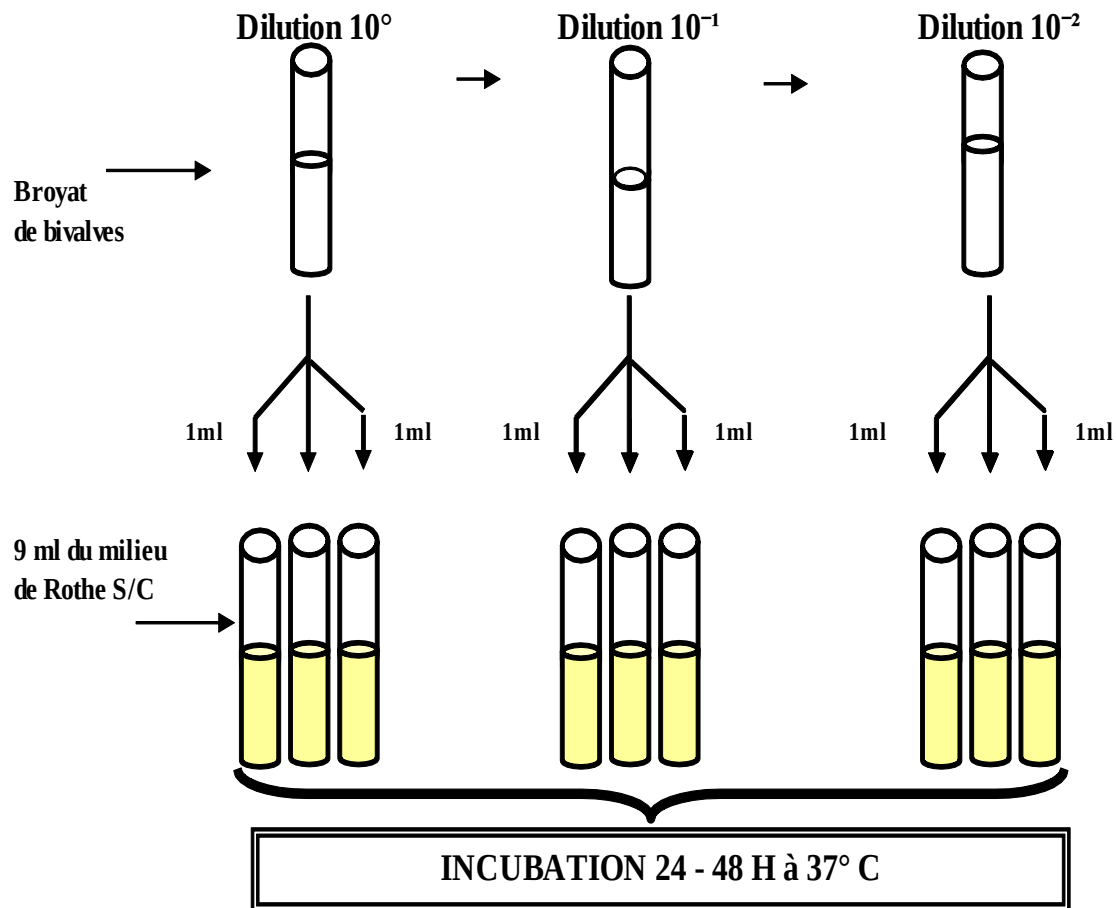


Figure 17: Recherche et dénombrement des Streptocoques totaux chez la moule *Perna perna* (test présomptif)

***Test confirmatif : Identification des Streptocoques du groupe sérologique D.**

Après agitation des tubes positifs nous prélevons 2 à 3 gouttes de chaque tube positif, et nous les repiquons dans un tube contenant du milieu Litsky; nous incubons à 37°C pendant 24 à 48 h (fig. 18).

Nous notons le nombre de tubes positifs et nous exprimons le nombre le plus probable de germes dans l'échantillon selon la table de Mac Grady (annexe).