CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

II.1.Objectif

Notre étude à pour but d'analyser bactériologiquement la fiente des deux espèces d'hirondelles nicheurs dans la ville de Tébessa, en particulier, l'hirondelle de fenêtre et rustique de la colonie de la cité Mouldi Achouri et d'effectuer une comparaison entre les espèces bactériennes de la fiente des deux espèces d'hirondelles, après isolement et identification, afin de montrer s'il y a une différence ou non entre la flore bactérienne des deux espèces d' hirondelles nicheurs dans la ville de Tébessa.

II.2.Cadre de l'étude

La wilaya de Tébessa se situe à l'Est de l'Algérie, sa superficie est de l'ordre de 13878 km2 et elle s'élève à environ 960 m d'altitude au niveau de la mer. S'étendant entre 34,75° et 36° de l'altitude Nord, et entre 7,25° et 8,5° de longitude Est, la wilaya est limité au Nord par la wilaya de Souk Ahras, au Sud par la wilaya d'El Oued, à l'Ouest par la wilaya d'Oum El Bouaghi et Khenchela, tandis qu'à l'Est par la frontière algéro-tunisienne **(Figure18)**. La région offre des paysages variés. Elle est divisée en 28 communes (Bouabida H., 2014).



Figure 18 : Présentation de la zone d'étude (Anonyme, 2007)

II.3. Matériel et méthodes

L'analyse bactériologique effectuée sur les échantillons de fiente des hirondelles fenêtre et rustique comprend plusieurs étapes : bactériologique, description morphologique macroscopique et microscopique. Suivie d'une identification par API 20E pour les entérobactéries isolées.

II.3.1. Matériel

II.3.1.1. Verreries

- Béchers de 50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000ml.
- Eprouvettes graduées.
- Erlenmeyer.
- Flacons en verres de 200 ou 250 ml, avec bouchon a vis.
- Fioles jaugées.
- Boites de pétri.
- Pipettes graduées de 1ml, 2 ml, 10 ml, 20 ml.
- Tubes a essais.
- Lames.
- Lamelles.

La verrerie doit être après un lavage propre puis un séchage recouvert par du papier Aluminium et stériliser au four pasteur pendant 30 minutes a température de 121°C.

II.3.1.2. Les instruments

- Anses de platines.
- Pince.
- Baro magnétique.
- Portoirs.
- Micropipettes de 100 µl, 1000 |µl.
- Spatules.
- Mortier.

Appareillage

- Autoclave.
- Microscope optique marque (OPTICA).
- Balance de précision, capacité 620g avec précision de 0,01g marque (KERNEW).
- Agitateur marque (Lab. TechR- ISO 9001).
- Bec benzène.
- Bain-marie marque (memmert).
- Four pasteur.
- Etuves réglées a: 30, 37°C, et 44°C marque (memmert).
- FRIGO (LG).
- Appareil photo (annexe 06)

II.3.2. Les milieux de cultures

Pour identifier les germes bactériens isoles a partir de la fiente des hirondelles de fenêtre et rustique nous avons utilise des milieux sélectifs suivants :

- ✓ **Le milieu EMB, (éosine bleu de méthylène) :** est un milieu sélectif pour le dénombrement et l'isolement des bactéries Gram négatives.
- ✓ **La gélose Mac conkey** : est un milieu sélectif utilise pour l'isolement des entérobactéries dans les eaux, les produites biologiques d'origine humaine ou animale.
- ✓ **La gélose Chapman -Mannitol Salt Agar :** est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des Staphylocoque, il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.
- ✓ **La gélose cétrimide** : est un milieu sélectif destine pour l'isolement et le dénombrement de *Pseudomonas* dans les déférents produits d'origine animale.
- ✓ **La gélose PCA :** (Plate Count Agar), est préconisée pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale. Les produits surgelés et les autres denrées alimentaires par la méthode du nombre le plus probable. La recherche s'effectue en 2 étapes, un test présomptif en bouillon de Rothe et transfert des cultures positives pour confirmation sur milieu de Litsky.

- ✓ **Le Milieu de Litsky :** est utilise pour la confirmation lors des recherches et dénombrements des *Streptocoques fécaux*.
- ✓ **La gélose nutritive** : est utilisée dans le cadre de la microbiologie alimentaire pour la culture d'une grande variété de microorganismes, en vue de la purification nécessaire et préalable aux étapes d'identification. Elle convient pour les germes ne présentant pas d'exigences particulières (annexe 01).

II.3.3. Réactifs utilisés

(Annexe 02).

II.3.4. Autre produit

Pour l'identification des entérobactéries, nous avons utilisé Api20E.

II.3.5. Matériel biologique

La fiente des hirondelles de fenêtre et rustique colonisant de la cité (Mouldi Achouri).

II.3.5.1. Site de prélèvement



Figure 19 : Cité Mouldi Achouri (https://earth.google.com).



Figure 20: présentation géographique de la cité Mouldi Achouri (https://earth.google.com).

II.4. Méthode de prélèvement

La collecte de la fiente a été effectuée, à l'aide d'une spatule stérile pour éviter toute contamination accidentelle.la fiente a été transmise dans un sac stérile étiquetés, transporter au laboratoire. Il est important de procéder à l'analyse bactériologique dans un délai très court ne dépassant pas 8 heures.

En effet, l'analyse bactériologique n'est pas seulement qualitative mais aussi quantitative par le calcul du nombre d'unité formant colonies (UFC) et des unités formant trouble(UFT) dans le cas des streptocoques.

II.4.1. Analyse bactériologique de la fiente des hirondelles

Le travail a été limité a la recherche sélective de certaines bactéries. On déterminera les autres, selon la disponibilité des milieux des cultures et des réactifs.

Premièrement, le broyage de la fiente a été effectue jusqu'a l'obtention d'une fient fine, puis, on passe la fiente dans un tamis de 0.25 mm de diamètre pour éliminer toutes les débris notamment, les plumes.

10 g de fiente fine ont été déposé dans un bécher stérile 100 ml d'eau physiologique stérile a été rajoutée et puis laissée décanter, pour procéder, ensuite, à des dilutions décimales jusqu'a l'ordre de 10^{-3}.

II.4.2. Préparation des dilutions décimales

Pour l'échantillon de la fiente, il convient de pratiquer plusieurs dilutions. Ainsi, après une homogénéisation de la solution mère par l'agitateur pendant une minute. Les dilutions allant de 10^{-1} jusqu'a 10^{-3} sont préparées avec l'eau physiologique stérile qui est distribuée stérilement dans les tubes a raison de 9 ml par tube.

A l'aide d'une pipette graduée stérile de 1 ml, on prélève 1ml de la suspension mère et l'introduire dans le premier tube, A partir de cette dilution 10^{-1}, prélevée par une autre pipette graduée stérile 1ml de la dilution et déposée dans le deuxième tube qui représente la dilution 10^{-2} et on fait la même chose pour le troisième tube pour obtenir la dilution 10^{-3}. Enfin, ces dilution vont servir pour l'ensemencement des différentes milieux de cultures qu'ils soient sélectifs ou non, solide ou liquide

II.4.3. Recherche et dénombrement de la flore aérobie mésophile totale

- **L'ensemencement**

-Prélever par pipette graduée ou la micropipette 1 ml de la suspension mère et de chaque dilution et la déposer dans les boites de Pétri correspondantes, à raison de 2 boites par dilution.

-Verser 15 ml de la gélose PCA en surfusion dans les boites de Pétri.

- Faire des mouvements de rotation ou de forme de 8 pour homogénéiser la gélose avec l'inoculum.

-Incuber les boites ensemencées dans l'étuve réglée à $30C^0$ pendant 24 heures à 48 heure

- **La lecture**

Le dénombrement de colonies apparut dans les boites de Pétri après incubation est multiplie par l'inverse du rapport de la dilution choisis pour les calculs.

Le nombre de germes totaux retenu est la moyenne arithmétique des nombres des germes trouves pour les différentes dilutions. Les résultats sont exprimes en nombre d'unités formant colonies (U.F.C) par millilitre.

II.4.4. La recherche des entérobactéries

- **L'ensemencement**

- Prélever par la pipette 0,1 ml de la suspension et des dilutions et l'étaler a la surface des milieux Mac Conkey et EMB, préalablement couler dans les boites de Pétri.
- Incuber les boites 24 h à 48 h à la température de 37°C.

- **La lecture**

Le dénombrement des colonies s'effectue sur celles apparue sur les milieux de cultures, sur milieu EMB ou Mac Conkey, la fermentation du lactose se traduit par le virage du pourpre de bromcrésol au jaune, les colonies lactose + sont jaunes alors que les colonies lactose - sont bleues violacées.

I.4.5. La recherche des staphylocoques

- **L'ensemencement**

A partir des dilutions préalablement préparées est ensemence le milieu de Chapman à la surface a raison de 2 boites par dilution et incuber à 37^0C pendant 24h à 48h.

- **La lecture**

Apres incubation, repérer les colonies suspectes : les *Staphylocoques* se présentent sur milieu Chapman sous forme de colonie de taille moyenne, et souvent entourée d'un halo jaune du a l'utilisation du mannitol.

I.4.6. La recherche des *Pseudomonas*

- **L'ensemencement**

0,1 ml des dilutions est étalé a la surface du milieu cétrimide préalablement couler dans les boites de Pétri puis incuber 24 à 48 heures à la température 37°C.

- **La lecture**

Les colonies de *Pseudomonas* ont un diamètre de 1,5 a 2 mm, un contour circulaire, une surface lisse et brillante, une couleur blanc crème ou plus ou moins jaunâtre, un aspect muqueux et sont par fois déjà accompagnées d'une production de pigment bleu-vert.

II.4.7. La recherche des Streptocoques fécaux

- **L'ensemencement**

- La recherche de ces germes est basée sur l'ensemencement d'un milieu liquide qui est le bouillon de Roth par l'introduction dans des tubes contenant 10 ml de bouillon Rothe de 1 ml de dilution.
- Ce milieu représente un teste présomptif qui sera suivie par un teste confirmatif sur le bouillon de litsky.
- Incuber les tubes a 37 ^{0}C pendant 24 à 48 heures.

- **La lecture**

Les tubes positifs présentant un trouble seront par la suite, soumis a un teste confirmatif sur bouillon Litsky, à raison de trois tubes de Litsky pour chaque tube positif de Rothe.

Incuber 24 à 48 heures à 37oC.

La présence des streptocoques fécaux signifies par la turbidité du milieu avec ou sans précipitations violettes au fond des tubes.

II.5. Purification et conservation et identification des isolats

II.5.1. Purification et conservation des isolats

A pour but de l'obtention d'une culture contient des colonies pure et identiques sur le plan macroscopiques et morphologique (même couleur, taille, aspect...) et aussi même aspect microscopiques (formes des cellules identiques et même type de Gram) (Figarella *et al* .2007).

La purification a été effectué après repiquage successifs, les colonies sont conservées aux réfrigérateurs a - 4°C.

II.5.2. Identification

II.5.2.1. Coloration de Gram

- **Principe**

Le principe de la coloration de Gram repose sur les différences de composition chimique de la paroi des bactéries (1 a 2.5 % des lipides chez les bactéries a Gram positif, 10 a 22% chez Gram négatif) (Tortora *et al.,* 2003).

- **Technique**

- On dépose sur une lame propre une goutte d'une suspension bactérienne.
- Faire sécher la lame par passage sur la flamme du bec benzène (fait un frotti).

- Déposer la lame sur le support au-dessus de L'évier.
- Poser des gouttes du colorant violet de Gentiane sur le frotti, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer la lame parfaitement par l'eau.
- Recouvrir la lame une autre fois par le lugol et laisser agir une minute puis rincer a l'eau;
- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant 30 secondes de l'alcool a 95° jusqu'à écoulement incolore, rincer immédiatement a l'eau.
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 1 minutes ; rincer a l'eau et égoutter.
- Egoutter entre 2 morceaux de papier buvard et laisser sécher.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif X 100.

- **Observation sous microscope**

Sous microscope, on peut observer deux types de colorant, celui de couleur rose représente les bactéries de Gram négatives et qui sont de couleur violette sont de Gram positives. Mais on observe des cellules bactériennes de déférentes formes (bacille, coccobacille, cocci, diplocoques ….).

II.5.2.2. Identification des entérobactéries par l'API 20E

L'identification biochimique des isolats est réalisée par la galerie API 20 E marque (biomerieux). Qui est une version miniaturisée des tests biochimiques destinée à l'identification des différentes espèces apparentant au groupe des entérobactéries (Geraldine, Delphine., 2003).

- **Principe**

La galerie API 20E comporte 20 micros tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inocules avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colores spontanées ou révèles par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait a l'aide du tableau **(Annexe03)** de lecture et l'identification est obtenue a l'aide du logiciel d'identification (Marchal., 1992).

- **Mode opératoire**

- Remplir par l'eau distillée stérile les alvéoles du support.

- Préparer une suspension bactérienne dense dans 5ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h.

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile puis appuyée à l'intérieur et sur le coté pour éviter la formation de bulles d'air.

-Pour les caractères soulignes ADH, LDC, ODC et H2S, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par le vaseline de paraffine stérile.

-Pour les caractères encadrés ce qui est le cas des en vp, gel tests : ensemencer le tubule et la cupule par la suspension.

-Pour les caractères non encadres, non soulignes ensemencer uniquement le tubule par la suspension.

-Refermer la boite d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **La lecture**

La lecture de la galerie API doit se faire en se référant au tableau de la lecture **(annexe03).**

-Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noté sur la fiche de résultats.

-Test IND : ajouter une goutte de réactif JAMES (Kovacs). Un halo de couleur rose apparue à la surface de la cupule indique une réaction positive a noter sur la fiche de résultats.

-Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

Logiciels d'identification

Il est présent sous la forme d'une feuille de calcul fonctionnant sous Windows avec Microsoft Excel **(Annexe 04).** Cette feuille de calcul est basée sur des tableaux pourcentages, en particulier, ceux fournis par (bio Mérieux). Elle calcule en fonction du profil de caractères introduit (positive + ou négative -), la probabilité de chaque taxon.