

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de microbiologie  
Spécialité microbiologie fondamentale



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Etude de la résistance aux antibiotiques de  
la bactérie isolée des stations d'épuration**

Présenté par :

**Bekka Lydia & Bouaita Hanane**

Soutenu le : **12/09/2022**

Devant le jury composé de :

Mme Chibane N.

MCB

Présidente

Mme Tafoukt R.

MCB

Encadrante

Mme Bouktit N.

MAA

Examinatrice

**Année universitaire : 2021 / 2022**

## **Remerciements**

**Tout d'abord, Nous remercions Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.**

**Notre profonde gratitude est exprimée à notre promoteur M. Tafoukt Ryma qui nous' a fait l'honneur de diriger notre travail et nous a guidé tout au long de sa réalisation, ainsi que pour la qualité de son encadrement, sa constante disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.**

**Nous voudrions remercier également les membres du jury, pour avoir accepté de juger et d'examiner ce travail.**

**Nous tiens à exprimer toute notre gratitude à les personnelles des stations d'épurations et leur directeur de l'ONA (office nationale d'assainissement Bejaïa) une extrême bienveillance.**

**Sans oublier dans mes remerciements toute l'équipe du Laboratoire microbiologie, pour leurs conseils et leurs aides.**

**Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.**

## **Dédicaces**

**Je dédie le fruit de mes 19 ans d'études**

**A ma très chère mère**

**Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.**

**A mon très cher père**

**Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.**

**A mes très chers frères Nassim et Rahim et Fawzi.**

**Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.**

**À mon cher mari, Younes pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude. Merci infiniment**

**A mon oncle Aziz (papa) et ma tante Zakia (mama) pour leur soutien que Dieu les protège.**

**A Hanane, chère amie avant d'être binôme.**

**Lydia**

## **Dédicaces**

**J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à :**  
**Celle qui m'a donné la vie et éclaire mon chemin m'a**  
**toujours soutenu ma chère maman**  
**Mon grand-père, et toute ma famille**  
**Mon frère : Lounes**  
**Mes sœurs : Lamia, Nacira, Malak**  
**Mes chers amis : Saida, Wafa, Fatima, Lydia, Lounis**  
**Toutes personnes qui m'ont aidé de réaliser ce travail :**  
**Ahmed, Masilia, widade**  
**Ce qui je ressens eu de l'amour et du respect**  
**A ma cher binôme Lydia.**

**Hanane**

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction. ....01

## Matériel et méthodes

I. Présentation des différentes stations d'épuration .....06

II. Prélèvements.....08

III. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants.....09

III.1. Enrichissement.....09

III.2. Isolement et purification.....09

III.3. Identification des souches .....10

IV. Sensibilité des souches aux antibiotiques.....12

IV.1. Antibiogramme.....12

IV.2. Concentration minimale inhibitrice à la colistine.....13

V. Détection des phénotypes de résistance.....14

V.1.  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) .....14

V.2. Carbapénèmase.....15

V.2.1. Test de Hodge modifié.....15

VI.2 Test CIM.....16

## Résultat

I. Isolement des souches. ....18

II. Identification des souches.....18

II.1 Répartition des souches par antibiotique de sélection.....19

II.2. Distribution des souches par station d'épuration et par site de prélèvement .....	19
II.3 Répartition des souches par espace.....	20
III. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques. ....	20
III.1. Antibiogramme standard.....	20
III.2. Concentration minimale inhibitrice de la colistine.....	21
IV. Phénotypes de résistance probables.....	22
IV.1 Recherche de BLSE.....	22
IV.2 Recherche des carbapénémases.....	22
IV.2.1. Résultat de test Hodge.....	22
VI. Résultat de test CIM.....	22
Discussion .....	25
Conclusion.....	28
Références bibliographiques	
Annexes	

## Liste d'abréviation

AMC : Amoxicilline-acide clavulanique

ATB : Antibiotique

ATM : Aztréonam

BB : Bassin biologique

BdR : Boue de retour

BGN : Bactérie Gram négatif

BLSE : B-Lactamases à Spectre Étendu

BMH : Bouillon Mueller Hinton

C2G : Céphalosporine de deuxième génération

C3G : Céphalosporines de troisième génération

CAZ : Céfotaxime

COL : Colistine

CS : Colistine sulfate

CTX : Céfotaxime

*E. coli* : *Escherichia Coli*

ETP : Ertapéném

FOX : Cefoxitin

I : Intermédiaire

IMP : Imipénème

MRP : Méropénème

OMS : organisation mondiale de la santé

R : Résistance

S : Sensible

STEP : Station d'épuration

VAN : Vancomycine



## Liste des tableaux

Tableau I : site de prélèvement au niveau des stations d'épuration.....	08
Tableau II : tests d'identification biochimiques.....	10
Tableau III: Liste des antibiotiques testés. ....	13
Tableau IV : tableau des volumes nécessaire de BMH pour chaque concentration ATB.....	14
Tableau V: Nombre de souches isolées par site de prélèvement.....	18

## Listes des figures

Figure n°1: Disposition des disques d'antibiotique utilisés lors du D-D test.....	15
Figure 2 : Test CIM.....	16
Figure n°03 : Répartition des bacilles à Gram négatif. ....	18
Figure n°04 :Nombre des souches isolées par antibiotiques pour chaque station d'épuration.	19
Figure n°5 : Distribution des souches par station d'épuration et par site de prélèvement.....	19
Figure n°6 : Répartition des souches isolées par espèces. ....	20
Figure n°7 : Taux de résistance des souches d'entérobactéries aux $\beta$ -lactamines.....	21
Figure n°08 : Photo de souche BLSE+ et souche BLSE- ....	22

# **Introduction**

Les antibiotiques sont des molécules antibactériennes, ils ont une origine biologique (B-lactames, aminosides, macrolides, polypeptide), semi-synthétique ou synthétique (sulfamides, quinolones) (Belouni et al., 2009). Ils ont également un effet bactéricide ou bactériostatique (Ternent et Dyson., 2005).

Au cours de ces dernières années l'utilisation de ces molécules a constamment augmenté pour le traitement des maladies humaines, il sont également utilisés en médecine vétérinaire et en élevage comme complément alimentaire (Servais et al., 2009).

La consommation annuelle mondiale d'antibiotiques dépasse les 100 000 tonnes (Danner et al., 2019). Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les antibiotiques utilisés dans l'industrie de l'élevage représentent près de 80 % de tous les antibiotiques d'importance médicale majeure dans certains pays. En tant que l'un des plus grands producteurs et consommateurs d'antibiotiques au monde, la Chine a consommé 92 700 tonnes d'antibiotiques en 2013, dont 52 % sont utilisés dans l'industrie de l'élevage (Zhang et al., 2015). Les molécules les plus utilisées dans l'industrie de l'élevage en Chine sont le chloramphénicol, la tétracycline, les macrolides, les sulfamides et les nitrofuranes (inhibent et tuent les bactéries et les protozoaires) (Di Marcantonio et al., 2020).

Klein et al., dans une étude publiée en 2018, rapportent que la consommation globale d'antibiotiques a augmenté de 65% entre 2000 et 2015, passant de 21,1 milliards de doses quotidiennes à 34,8 milliards de doses. Ces auteurs rapportent dans la même étude qu'en l'an 2000, les cinq premiers pays les plus consommateurs d'antibiotique appartenaient tous à la catégorie des pays à haut revenu comme la France, la Nouvelle-Zélande, l'Espagne, Hong Kong et les États-Unis. Alors qu'en 2015, c'est les pays à revenus intermédiaires, comme la Turquie, la Tunisie et l'Algérie, qui faisaient partie des pays aux taux de consommation d'antibiotiques les plus élevés (Klein et al., 2018).

L'utilisation irrationnelle de ces molécules favorisant l'émergence des souches bactériennes multi-résistantes (Laurence et al., 2013) telles que les entérocoques résistants à la vancomycine (Hocquet et al. 2016 ) et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Knight et al., 2012 ). Cette résistance aux antibiotiques au sein des populations bactériennes est devenue un problème important dans la santé clinique et publique (Guardabassi et al., 2000).

Les bactéries ont développé quatre principaux types de mécanismes de résistance aux antibiotiques (Zhang et al., 2009 ; Wright, 2010): Les pompes à efflux, qui excrètent efficacement les antibiotiques de la cellule (Wright., 2011). L'inactivation des antibiotiques se produit lorsque l'activité de la substance antibiotique est directement entravée par l'hydrolyse ou par la conversion de groupes fonctionnels, etc...(Diaz et al., 2014). Contournement cible : les stratégies de contournement cible comprennent la création de nouvelles voies pour contourner l'enzyme initialement ciblée, la surproduction du composé cible (Munita et Arias, 2016), les changements structurels dans la paroi cellulaire (Vila et al., 2007) et empêche l'antibiotique de se lier à sa cible (Wright, 2010). Modification de la cible : se produit par la modification des cibles antibiotiques elles-mêmes (Wright, 2010). Plusieurs types de mécanismes de résistance peuvent conférer simultanément une résistance contre la même famille d'antibiotiques (de Sousa Oliveira et al., 2016). À l'inverse, un type de mécanisme de résistance peut également conférer une résistance à plusieurs types d'antibiotiques.

Les  $\beta$ -Lactamines sont parmi les antibiotiques les plus prescrits en médecine humaine. Toutefois, en raison de leur utilisation massive et souvent inappropriée, la résistance des entérobactéries à ces médicaments a nettement augmentée, notamment car elles ont acquis, par échange de matériel génétique, des  $\beta$ -lactamases. Ces enzymes sont des hydrolases qui catalysent l'hydrolyse irréversible de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame, inactivant ainsi les  $\beta$ -lactamines (Bush, 1999). Ces enzymes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques et produites d'une manière inductible ou constitutive.

Les entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE) peuvent causer aussi bien des infections nosocomiales que des infections communautaires. présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées ainsi que des surcoûts liés aux soins (Rodriguez-Villalobos et Struelens 2006). Les BLSE sont des enzymes qui hydrolysent aussi bien les pénicillines que les oxyimino-céphalosporines (ceftriaxone, céfotaxime, ceftazidime...) et les monobactames (aztréonam). Les céphamycines (céfoxitine, céfotétan, latamoxef) et les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème et doripénème) restent actifs, alors que les activités des C4G (céfépime, cefpirome) et celles des associations  $\beta$ -lactamines/IBL (amoxicilline outicarcilline associé à l'acide clavulanique, ou encore pipéracilline associé au tazobactam) sont variables (Arlet *et al.* 2003).

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices  $\beta$ -actamases à spectre étendu de (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence des souches de bactéries résistantes

également aux carbapénèmes (Gülmez et al. 2008). Cette résistance résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des  $\beta$ -lactamases. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique, plasmidique, ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines. Le second est lié à l'expression de carbapénémases,  $\beta$ -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet.,2014)

Les métallo- $\beta$ -lactamases (VIM, IMP) appartiennent à la classe B d'Ambler, hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'ATM (Overturf, 2010). L'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents. Ce sont des métalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques (Sefraoui.,2015).

Les oxacillinases constituent un groupe hétérogène. Elles sont caractérisées par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline et de la cloxacilline que de la benzylpénicilline. Les oxacillinases classiques sont inhibées *in vitro* par le chlorure de sodium (Mesli,2014).

La colistine a été réutilisée pour traiter des infections liées à des germes résistantes aux carbapénèmes. Néanmoins, depuis sa réintroduction, la résistance acquise à la colistine chez ces bactéries a émergé et les mécanismes expliquant la résistance à la colistine au sein des entérobactéries sont encore incompris (Charretier et al. 2018). La réintroduction de la colistine en thérapeutique et son utilisation croissante ont conduit à l'émergence de résistances chez plusieurs espèces d'entérobactéries : *E. coli*, *K.pneumoniae*, *S. enterica*...etc (Mitra et al. 2020).

Les antibiotiques administrés sont excrétés, soit sous forme inchangée, soit métabolisés, les métabolites pouvant eux-mêmes être actifs. Les antibiotiques appliqués dans les fermes d'animaux s'infiltrent dans les cours d'eaux usées et des eaux souterraines; les antibiotiques pulvérisés sur les plantes peuvent dériver par voie aérienne (Allen et al., 2010). cinq processus sont responsables de la dégradation et/ou de l'élimination des molécules d'antibiotiques: biodégradation, thermolyse, hydrolyse, adsorption et photolyse (Tong et al., 2011). Le sort et le devenir des molécules d'antibiotiques est différent selon la famille à laquelle elles appartiennent. Les  $\beta$ -lactamines ont été détectées dans les systèmes de traitements des eaux usées, et cela malgré que ces antibiotiques ne soient pas persistants dans l'environnement hydrique à cause de l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame (Borjesson, 2009).

Plusieurs familles d'antibiotiques ont été détectés telles que les macrolides, tétracyclines, sulfamides et quinolones et cela dans différents compartiments de l'environnement à savoir des effluents d'hôpitaux, eaux usées municipales, effluents des

usines de traitement des eaux usées, eaux de surface et dans certains cas des eaux souterraines. (Kümmerer, 2004).

Peu est connu sur la dynamique des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques dans les stations de traitement des eaux usées (STEP) (Borjesson, 2009). Ces stations reçoivent les bactéries qui sont déjà exposées aux antibiotiques à partir des ménages privés, des hôpitaux et des animaleries, et sont considérés comme des points chauds pour le transfert horizontal de gènes à cause de leur richesse nutritionnelle et de la haute densité bactérienne (Schluter et al., 2007). Des gènes de résistances tels que *vanA*, *ampC*, genes de resistance à la gentamicine mais aussi des bactéries résistantes telles que *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Camylobacter spp.* et *E.coli*, ont été rapportés dans les eaux usées municipales (Kümmerer, 2004).

Actuellement, en Algérie, peu d'études ont été effectuées sur la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux usées. L'étude de Alouache et ses collaborateurs en 2014, s'est portée sur la description de la résistance aux antibiotiques des souches isolées d'une station d'épuration à Alger. Ils ont rapporté la présence des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu de type CTX-M -15 chez *E.coli*, ce qui peut signifier que la contamination de l'environnement hydrique par des bactéries résistantes peut entraîner la propagation des gènes de résistance. C'est dans ce contexte que nous proposons d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolés des eaux usées des différentes stations d'épuration de la wilaya de Bejaia.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons adapté la méthodologie suivante :

- Prélèvement des échantillons d'eau;
- Isolement des bactéries à Gram négatif;
- Identification des souches par la galerie biochimique classique;
- Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques;
- Détermination des phénotypes de résistance probables.

## **Matériel et méthodes**



## **I. Présentation des différentes stations d'épuration**

### **❖ Sidi Ali Labhar**

La station d'épuration de Sidi Ali Labhar est entourée à l'est par l'aéroport, à l'ouest par une base d'installation chinoise, au nord par la mer, et au sud par des fermes agricoles. Elle est implantée sur un ancien terrain agricole avec une superficie totale de 27000 m<sup>2</sup>. Elle a été conçue dans le but d'épurer les eaux usées urbaines pour protéger le milieu récepteur, en l'occurrence la plage de Sidi Ali Labhar.

La station d'épuration des eaux usées de Sidi Ali Labhar (Bejaia) est entrée en service industriel le 30/01/2013. Elle est d'une capacité de traitement de (3000 m<sup>3</sup>/j), équivalent de 2500 habitants.

Le procédé de traitement mis en place est le traitement par boues activées à faible charge. La STEP dispose d'un matériel de dernière génération ainsi que de procédés conformes aux normes européennes. Elle possède aussi un laboratoire d'analyse physicochimique et biologique afin d'accomplir un suivi journalier de la station.

La station d'épuration est alimentée par des effluents d'origine domestiques. Ces rejets domestiques proviennent essentiellement de la zone de Sidi Ali Labhar.

### **❖ Souk Et Tenine**

La station d'épuration des eaux usées urbaines de la Commune de Souk - El - Tenine est située à 35Km à l'est de Bejaia, implantée dans une zone de deux hectares, plus basse de la ville et à un niveau zéro d'altitude par rapport à la mer, à fin de faciliter l'acheminement des eaux usées gravitaires vers la station et leur évacuation une fois traitées vers Oued Agrioun dans l'axe Kherrata - Souk - El- Tenine et enfin vers la mer.

La station d'épuration de Souk El Tenine traite les eaux usées provenant du chef - lieu de Souk El Tenine et quelques villages limitrophes ainsi que la commune de Melbou. Cette station a été réalisée dans le cadre de la modernisation et de la protection de l'environnement, sa mise en service date de 2012 à fin 2013.

### **❖ Aokas**

Mise en place en septembre 2006, la station d'épuration d'Aokas (Bejaïa) est destinée à épurer les eaux usées urbaines et domestiques, d'une population de 14776 habitants, avec un débit journalier de 1000 m<sup>3</sup> / j et un débit moyen de 42 m<sup>3</sup> /h. Les milieux récepteurs des eaux

usées épurées et des sous-produits de l'épuration (boues) sont la mer et la décharge publique, respectivement.

### ❖ **Bougie Plage**

La station d'épuration Bougie Plage (Bejaia), inaugurée en 2010, est destinée à épurer les eaux usées urbaines et domestiques, d'une population de 80000 habitants, avec un débit journalier de 13000 m<sup>3</sup> / j. Le procédé de traitement mis en place est le traitement par boues activées. Elle possède aussi un laboratoire d'analyse physico-chimique afin d'accomplir un suivi journalier de la station.

### ➤ **Principe de fonctionnement des stations d'épuration**

Les eaux usées sont traitées de la manière suivante :

- Prétraitement par 3 étapes : dégrillage, dessablage et dégraissage-déshuilage pour éliminer les matières grossières. (au point d'entrée des eaux usées de la station ; la première station de traitement . C'est pour maintenir en place les déchets solide et encombrants ( papiers, feuilles, autres objets...).
- Traitement biologique pour éliminer la matière organique présent dans l'effluent par des microorganismes (aérobies, anaérobies).
- Décantation secondaire par le clarificateur en séparant les bous formées après 2 à 5 h.
- Traitement des boues récoltées dans les bassins de décantation pour réduire la masse organique par digestion aérobie ou anaérobie et pour réduire le volume des boues par épaissement.

## II. Prélèvements

Notre étude s'est déroulée durant la période allant de 10 Mai au 10 Juin 2022, au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'université A Mira de Bejaia. 20 prélèvements d'eaux usées ont été effectués dans quatre stations d'épuration de la wilaya de Bejaia (Tableau I).

**Tableau I** : site de prélèvement au niveau des stations d'épuration

Date du prélèvement	Station d'épuration	Nombre de prélèvements
09/05/2022	Sidi Ali Labhar	5
18/05/2022	Bougie Plage	6
22/05/2022	Aokas	4
30/05/2022	Souk El Ténine	5

Les prélèvements sont effectués d'une manière stérile, en introduisant le flacon à l'intérieur d'un récipient d'eau. L'ouverture et la fermeture du flacon se fait à l'intérieur pour éviter toute contamination, soit de l'environnement ou du sol. Les flacons sont maintenus à une température comprise entre 2 et 5 °C dans une enceinte réfrigérée.

Tous les prélèvements ont été effectués dans des flacons en verre d'une capacité de 250 ml préalablement stérilisés pour éviter toute sorte de contamination. Pour les boues, des parties ont été prélevées avec des gants dans des boîtes de Petri stériles. Les échantillons sont prélevés au niveau de :

- L'entrée des stations.
- Bassin biologique 1.
- Bassin biologique 2.
- Boue de retour.
- Boue.
- La sortie des stations.

### **III. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants**

#### **III.1. Enrichissement**

Nous avonsensemencé 50ml d'eau à analyser de chaque échantillon dans 50 ml de bouillon nutritif, additionné de deux solutions d'antibiotique colistine + vancomycine et un autre flacon additionné d'imipenème + vancomycine pour chaque échantillon.

- Colistine (COL) et vancomycine (VAN), à des concentrations finales de 1ug/mL, et 64ug/mL, respectivement.
- Imipenème (IMP) et vancomycine (VAN) à des concentrations finales de, 2µg/mL et 64ug/mL, respectivement

Les flacons sont incubés à 37 ° C pendant 18 à 24h.

à l'aide d'une anse de platine on prélève une ose de boue sèche de 3 endroits différents et on inocule chaqu'une d'elle dans 50 ml de bouillon nutritif additionné deux solutions d'antibiotiques pour deux flacons.

- Colistine (COL) et vancomycine (VAN), à des concentrations finales de 1ug/mL, et 64ug/mL, respectivement.
- Imipenème (IMP) et vancomycine (VAN) à des concentrations finales de 2µg/mL et 64ug/mL, respectivement

Les flacons sont incubés à 37 ° C pendant 18 à 24h.

#### **III.2. Isolement et purification**

à partir des bouillions d'enrichissements positifs (un flacon présentant un trouble) et à l'aide d'anse de platine, nous avonsensemencé deux gélose Mac Conkey additionnées de deux solutions d'antibiotiques.

- Colistine (COL) et vancomycine (VAN), à des concentrations finales de 1ug/ml et 64ug/ml, respectivement.
- Imipenème (IMP) et vancomycine (VAN) à des concentrations finales de 2µg/ml et 64ug/ml, respectivement.

Les boîtes sont incubées à 37 ° C pendant 18 à 24h.

Après 24 h d'incubation, les colonies ont fait l'objet de repiquages successifs sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

### III.3. Identification des souches

Elle est basée sur les caractères cultureux (couleur, taille, aspect des colonies), et les tests biochimiques.

Les tests effectués pour l'identification des souches (tableau II) sont les suivants :

- Utilisation des sucres sur milieu triple sugar iron (TSI).
- Utilisation du mannitol et vérification de la mobilité sur milieu mannitol mobilité.
- Utilisation de citrate comme source de carbone sur milieu citrate de Simmons.
- Le milieu Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose.
- Le milieu urée indole permet la recherche d'uréase, tryptophane désaminase (TDA) et la production d'indole.
- Le milieu bouillon nitraté permet la recherche du nitrate réductase.
- Production d'indole en utilisant l'eau péptonée exemple d'indole à (37et 44 ° C).

**Tableau II** : tests d'identification biochimiques

Tests	principe	lecture
<b>Fermentation des sucres, production de gaz et H<sub>2</sub>S sur milieu TSI.</b>	Fermentation des sucres, production de gaz et de H <sub>2</sub> S sur milieu TSI Ensemencement à partir d'une suspension bactérienne la pente par stries sériées puis le culot par pique centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virage au jaune du fond de tube : Fermentation de glucose (+)</li> <li>• Virage au jaune de la pente : Fermentation de lactose (+).</li> <li>• Apparition de bulles d'air : Production de gaz.</li> <li>• Noircissement de milieu : Production d'H<sub>2</sub>S.</li> </ul>
<b>Utilisation de citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate</b>	Ensemencement par stries sériées de la pente. Incubation à 37°C/24h à 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un virage au bleu indique un test positif.</li> </ul>

<b>de Simmons.</b>	jours.	
<b>Utilisation de mannitol comme seul source de carbone sur milieu mannitol mobilité.</b>	Une piqure centrale. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virage du culot au jaune : Fermentation de mannitol (+) La mobilité.</li> <li>• Apparition de bulles d'air : Production de gaz.</li> </ul>
<b>Réduction des nitrates sur bouillon nitraté.</b>	Ensemencement du bouillon à partir de la suspension. Incubation à 37°C/24h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Après l'ajoute des réactifs NRI et NRII Coloration rouge : nitrate réductase(+).</li> <li>• Nitrate réductase (-), ajouter poudre de zinc Coloration rouge (-), absence de coloration (+).</li> </ul>
<b>Production d'indole sur milieu eau peptonée exempte d'indole.</b>	Ensemencement du milieu. Incubation à 37°C et 44°C /24h.	Addition du réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge (+).
<b>Etude du type fermentaire sur milieu Clark et Lubs.</b>	Ensemencement du milieu gélosé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne. Incubation à 37°/24h.	On divise le contenu du tube en deux <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajout des réactifs VPI puis VP II dans le premier tube Virage au rouge : VP(+)</li> <li>• Ajout de rouge de méthyle (RM) Coloration rouge : RM (+).</li> </ul>
<b>Recherche d'uréase et TDA.</b>	Ensemencement du milieu liquide avec quelques gouttes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Changement de couleur au rose</li> </ul>

	de la suspension bactérienne. Incubation à 37°/24h.	indique un test positif [uréase (+)]. • Addition du réactif de TDA, (+) Virage au marron : TDA (+).
--	--	--

## IV. Sensibilité des souches aux antibiotiques

### IV.1. Antibiogramme

La sensibilité des souches identifiées aux antibiotiques est mise en évidence par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton, selon les recommandations de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CASFM\_EUCAST\_2021).

#### ✓ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18h à 24h sur milieu d'isolement, on prélève 2 à 3 colonies bien isolées qu'on dissocie dans 5ml d'eau physiologique, puis on homogénéise bien la suspension bactérienne.

#### ✓ Ensemencement

L'ensemencement est fait par la méthode d'écouvillonnage, on trempe l'écouvillon dans la suspension bactérienne, on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu gélosé Muller Hinton, de haut en bas, en stries serrées. On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui - même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Ensuite on dépose les disques d'antibiotiques et on incube les boîtes à 37 °C pendant 24h.

#### ✓ Lecture

On mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) a été faite selon les critères définis par la société française de microbiologie et European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CASFM\_EUCAST\_2021 et CASFM\_2013). Les antibiotiques testés ainsi que leurs charges sont présentés dans le (tableau III)

**Tableau III:** Liste des antibiotiques testés.

Antibiotiques	Symboles	Charges (ug)	familles
<b>Amoxicilline+acide clavulanique</b>	AMC	30	Aminopinicillines
<b>Céftazidime</b>	CAZ	30	C3G
<b>Céfotaxime</b>	CTX	30	C3G
<b>Céfoxitine</b>	FOX	30	C2G
<b>Colistine sulfate</b>	CS	30	polymyxines
<b>Aztréonam</b>	ATM	30	Monobactame
<b>Ertapéném</b>	ETP	10	Carbapénèmes
<b>Méropéném</b>	MRP	30	Carbapénèmes

#### IV.2. Concentration minimale inhibitrice à la colistine

Selon les critères définis par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CASFM\_EUCAST\_2021), qui décrit comment déterminer les CMI des antibiotiques par micro-dilution dans un bouillon. Les expériences sont réalisées à l'aide de microplaque à 96 puits. La méthode est basée sur la préparation de solution de travail des antibiotiques pour un volume total de 100  $\mu$ L dans la cupule, c'est-à-dire, 50  $\mu$ L de bouillon Muller Hinton et 50  $\mu$ L de suspension bactérienne (MOREL., 2017).

##### ✓ Préparation des solutions d'antibiotiques

Nous avons commencé par diluée les solutions d'antibiotiques au dixième en transférant 1 ml d'antibiotique à une concentration initiale 50 mg/mL dans 9 ml d'eau distillée stérile.

##### ✓ Préparation des suspensions bactériennes

Nous avons prélevé 3 colonies pures qu'on dissocie dans 5 ml d'eau physiologie, puis nous réalisons une dilution au dixième en transférant 1 ml de la suspension préalablement préparée dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

Au final, dans chaque puits, on met 50  $\mu$ L de la suspension bactérienne diluée plus un volume de l'antibiotique dilué nécessaire pour chaque concentration, puis on complète avec le



bouillon Muller Hinton pour avoir un volume final de 100  $\mu\text{L}$ , plus un puits pour le témoin en posent 50  $\mu\text{L}$  de suspension et 50  $\mu\text{L}$  de bouillon Muller Hinton. (Tableau V)

**Tableau V** : tableau des volumes nécessaires de BMH pour chaque concentration en ATB.

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume d'ATB ( $\mu\text{L}$ )	Volume de BMH ( $\mu\text{L}$ )	Volume de la suspension ( $\mu\text{L}$ )
2	4	46	50
4	8	42	50
8	16	34	50
16	32	18	50

- ✓ Incubation des plaques de micro-dilution et lecture

Pour éviter le dessèchement, les deux plaques sont empilées les unes sur les autres. Puis celles-ci sont incubées entre 34 et 37°C pendant 18 / 24 h.

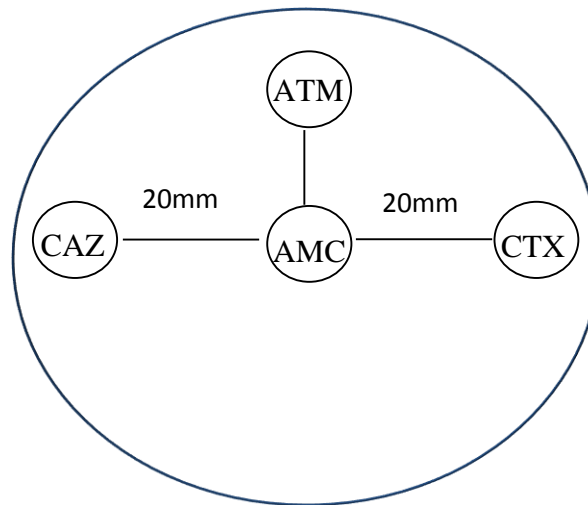
Pour la lecture, il est important de vérifier le trouble du témoin de croissance négatif auquel on comparera les autres cupules pour définir la CMI, la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible.

## **V. Détection des phénotypes de résistance**

### **V.1. $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)**

La production d'une  $\beta$ - lactamase à spectre étendu (BLSE) est détectée par l'épreuve de synergie qui consiste à placer des disques de céfotaxime, céftazidime et d'Aztréonam à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'AMC (Amoxicilline + acide clavulanique). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disque de céftazidime , Aztréonam, céfotaxime et AMC (Jarlier et al 1988).

La figure ci - dessous montre la position des disques d'antibiotique utilisés lors du D-D test.



**Figure n°1:** Disposition des disques d'antibiotique utilisés lors du D-D test.

Amoxicilline-acide clavulanique (AMC) ; Céfotaxime (CTX) ;Céftazidime (CAZ) ; Aztréonam (ATM).

## V.2. Carbapénèmase

### V.2.1. Test de Hodge modifié

- ✓ à partir d'une souche d'*Escherichia coli* ATCC on a préparé une suspension bactérienne en dissociant 2 à 3 colonies dans 3 ml de l'eau physiologique.
- ✓ Sur une gélose Muller Hinton ensemercer par écouvillonnage cette souche de référence.
- ✓ Déposer un disque de méropénème au centre de gélose Muller Hinton préalablement ensemençée.
- ✓ Ensemercer par stries les souches à tester, la souche témoin positif et la souche témoin négatif.
- ✓ Incuber à 37 degrés pendant 18h à 24 h.

## VI.2 Test CIM

La production d'une carbapénémase est recherchée par le Test CIM modifié (Carbapenem Inactivation Method). Ce test permet de détecter la production de carbapénémases même à faible activité (exemple OXA-48).

Cette méthode consiste à suspendre une anse de culture bactérienne (*E. coli* ATCC 25922), sensible à tous les antibiotiques, utilisée comme témoin négatif, une souche productrice d'une carbapénémase utilisée comme témoin positif et une souche à tester dans des Eppendorfs stériles contenant 500µl d'eau physiologique stérile. Par la suite, un disque de méropénème de 10µg est introduit dans la suspension. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 3 h. Après incubation, les disques sont retirés à l'aide d'une anse de platine et déposés sur une boîte de gélose MH (Muller Hinton) préalablementensemencée par une souche d'*E. coli* (ATCC 25922) (ensemencement par écouvillonnage). L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h (figure 2).

La lecture se fait par comparaison des zones d'inhibition des souches testées et des témoins utilisés. L'absence d'une zone d'inhibition autour du disque de méropénème du témoin positif (ou présence d'une zone avec un diamètre < 20 mm) indique la présence probable d'une carbapénémase et la présence d'une zone d'inhibition avec un diamètre  $\geq$  20 mm indique l'absence d'une carbapénémase (Van der Zwaluw et al., 2015).

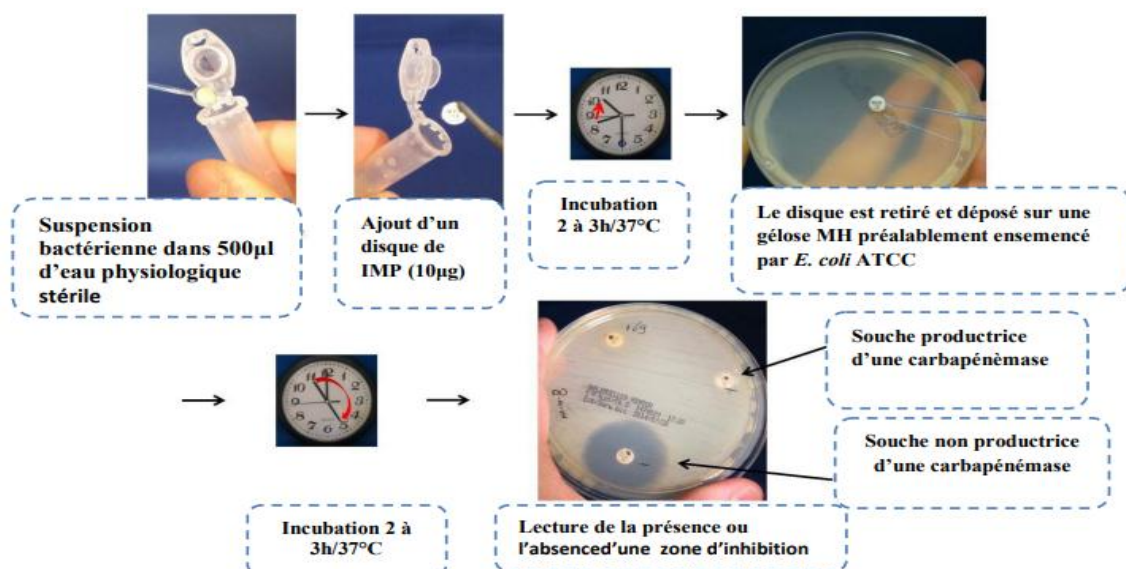


Figure 2 : Test CIM

# Résultats

## I. Isolement des souches.

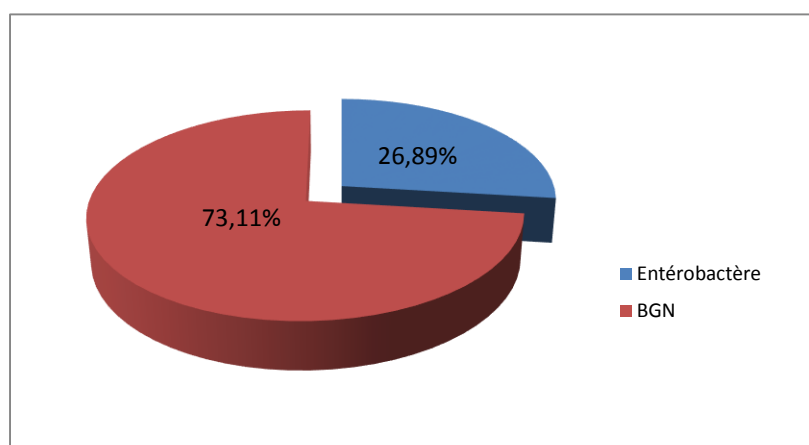
Notre travail s'est déroulé au niveau du laboratoire de microbiologie 2 à l'université A. Mira de Bejaïa, pendant une période allant de 10 Mai à 10 Juin 2022. Les échantillons d'eau ont été collectés dans 4 stations d'épuration (wilaya de Bejaïa). Au total 20 prélèvements ont été effectués en quatre sorties. La recherche de Bactérie Gram négatif (BGN) résistants aux antibiotiques a permis d'isoler 119 souches.

**Tableau V:** Nombre de souches isolées par site de prélèvement.

Lieu de Prélèvement	Date de Prélèvement	Nombre de souches
Sidi Ali Labhar	09/05/2022	25
Bougie Plage	18/05/2022	36
Aokas	22/05/2022	15
Souk el Tenine	30/05/2022	43

## II. Identification des souches

La figure ci-dessous montre que parmi les 119 souches de bacille à Gram négatif isolées, 32 d'entre elles appartiennent à la famille des entérobactéries, soit un taux de 26,89% des souches isolées, tandis que (73,11%) c'est-à-dire 87 souches appartiennent à d'autre bacille à Gram négatif.



**Figure n°03 :** Répartition des bacilles à Gram négatif.

### II.1 Répartition des souches par antibiotique de sélection

La figure ci-dessous nous fait part du nombre de souches isolées dans chaque station vis-à-vis des deux antibiotiques utilisés pour la sélection (colistine, imipénème et vancomycine).

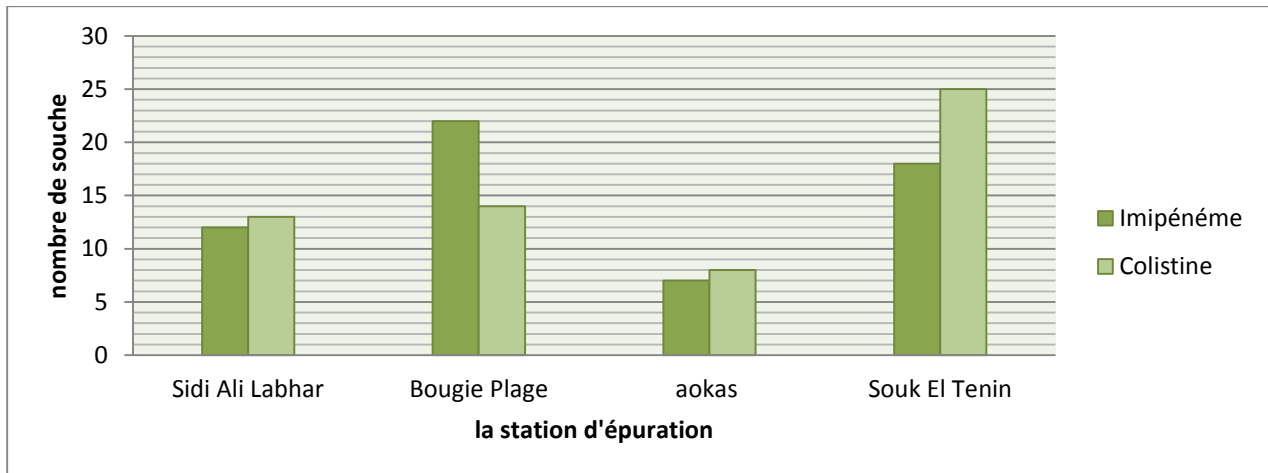


Figure n°04 : Nombre des souches isolées par antibiotique pour chaque station d'épuration

### II.2. Distribution des souches par station d'épuration et par site de prélèvement

La figure ci-dessous indique le nombre de souches de chaque station vis-à-vis de leur origine de prélèvement.

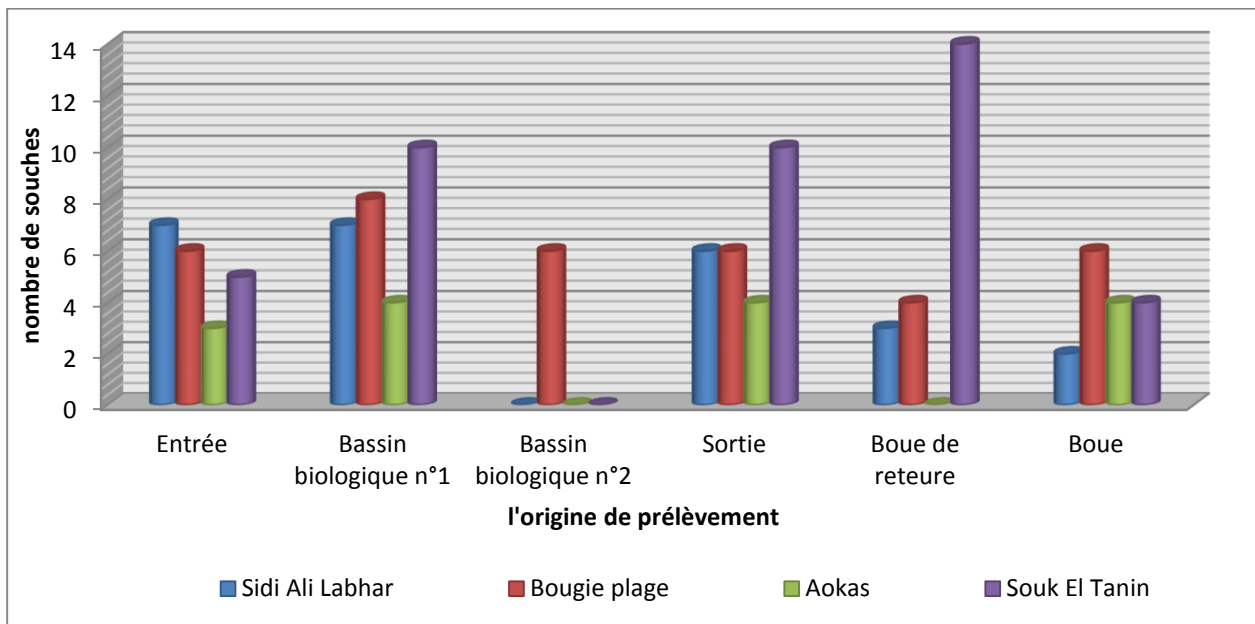


Figure n°5 : Distribution des souches par station d'épuration et par site de prélèvement

### II.3 Répartition des souches par espèces

D'après la figure n ° 06 ci - dessous, parmi les 26,89% des entérobactéries isolés, *E.coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 44 %, suivi de *Klepseilla Pneumoniae* et *Proteus* avec 19% pour chacune, de *Citrobacter* et *Shigella* avec des taux de 9 % et 6 % respectivement, et enfin un taux de 3 % est noté vis- à-vis des *Salmonella*.

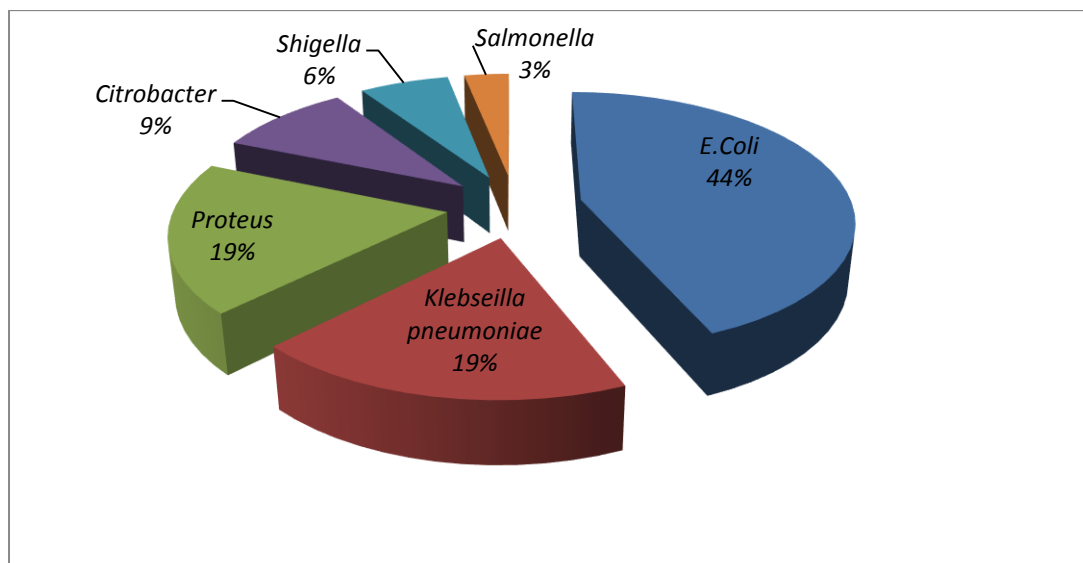
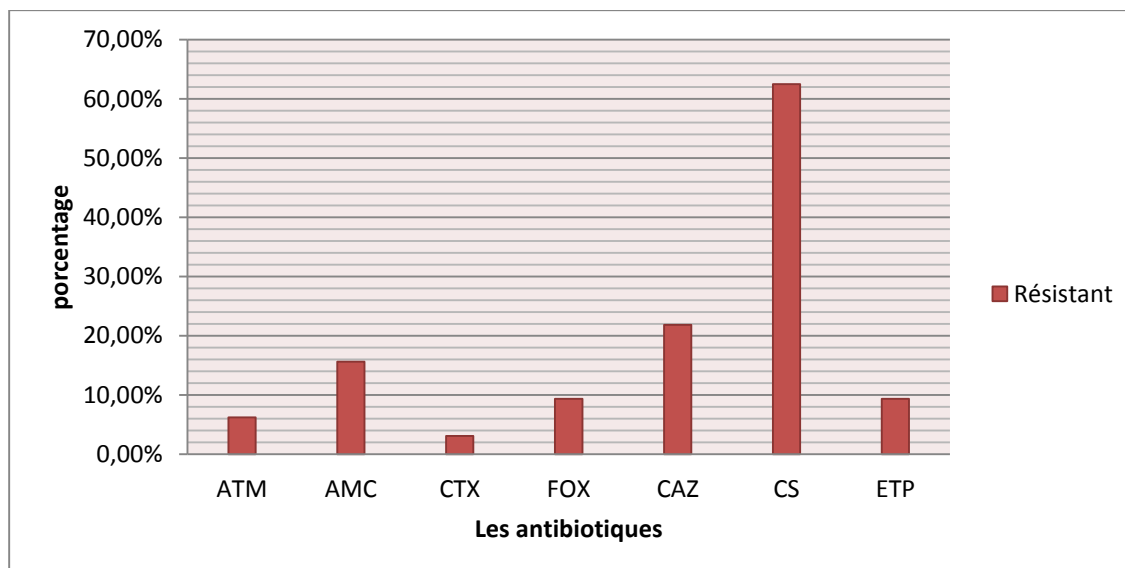


Figure n°6 : Répartition des souches isolées par espèces.

### III. Résultats de la sensibilité aux antibiotiques.

#### III.1. Antibiogramme standard

L'ensembles des 32 souches isolées des différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 7 antibiotiques à savoir : AMC, FOX ( C2G ) , CAZ , CTX ( C3G ) , CS , ATM (Aztréonam ) et enfin l'értapénème (ETP) ou bien méropénème ( Annexe I). La figure n ° 07 ci - dessous nous fait part des taux de résistance des souches à Gram négatif isolées vis - à - vis des 7 antibiotiques testés.



**Figure n°7 :** Taux de résistance des souches d’entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines

Les résultats montrent des taux de résistance modérés aux  $\beta$  - lactamines : 21.78% des souches sont résistantes à la céftazidime (CAZ), 15.62 % à l'amoxicilline - clavulanate (AMC), 9.37% à l'ertapénem (ETP) et à la céfoxitine (FOX), 6.25 % à l'aztréonam (ATM) et 3.12 % à la céfotaxime (CTX). La résistance à la colistine est la plus élevée avec un taux de 62.50%.

### III.2. Concentration minimale inhibitrice de la colistine

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Aucun trouble n’est observé dans les puits de la souche témoin négatif à différentes concentrations.
- Dans les puits où la concentration d’antibiotique est à [16] un très faible trouble est observé.

La CMI des souches testées est donc de 32 $\mu$ g/mL



## IV. Phénotypes de résistance probables

### IV.1 Recherche de BLSE

Le DD-test montre la présence d'une image de synergie pour 10 souches ; elles sont donc probablement productrices d'une BLSE.

Parmi les dix souches productrices de BLSE : on note qu'il s'agit de deux souches correspondants à d'*Escherichia coli*, deux souches à *Citrobacter*, deux souches à *klebseilla Pneumoniae*, deux souches à *Proteus*, une souche à *Shigilla*, et une souche de *Salmonella*.

La figure n°8 : représente l'image de synergie (BLSE+) et une image (BLSE-).



Souche BLSE+ (*E. coli*)

Souche BLSE- (*E. coli*)

**Figure n°08** : Photo de souches BLSE+ et BLSE-

### IV.2 Recherche de carbapénémases

#### IV.2.1. Résultat du test Hodge

Sur les 3 souches d'entérobactérie testées on ne note aucune image de distorsion, cela nous indique qu'elles ne sont probablement pas productrices d'une carbapénémase.

### VI. Résultat de test CIM

Parmi les 3 souches testées, aucune ne présente un test CIM positif, cela confirme le résultat obtenu avec le test Hodge modifié et que la résistance de ces souches aux carbapénèmes est non enzymatique.

## **Discussion**

D'après les résultats obtenus, parmi les 119 souches de bacilles à Gram négatif qui ont été isolées à partir d'eaux usées, 26.89 % sont des souches d'entérobactéries résistantes aux antibiotiques. *E.Coli* et de loin le germe le plus fréquemment isolé avec un taux de 44%, suivi de *Klebsiella pneumoniae* avec un taux de 19%.

La résistance aux antibiotiques des souches à Gram négatif vis-à-vis de la famille des  $\beta$ -lactamines a révélé que : 21.87% des souches sont résistantes à CAZ, 15.62% des souches sont résistantes à AMC, 9.37% des souches sont résistantes à ETP et FOX ,6.25 %, 3.12% des souches sont résistantes à ATM, CTX respectivement. Nos résultats ne sont pas similaires à ceux rapportés par Picão et ses collaborateurs en 2013, qui ont trouvés des taux de résistance de 20,5%, 16,2%,55%, 55%, 60,7% pour IMP, MER, CTX, CAZ et CX respectivement (Picão et al., 2013).

Durant ce travail, parmi les 32 souches d'entérobactérie 14 sont des *E. coli* et elles sont résistantes à la colistine avec un taux de 50%, la résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines testées à savoir : la CAZ, AMC et ATM est de 21.42% (3/14), 14.28% (2/14), 7.14% (1/14) respectivement. Toutes les souches sont sensibles aux ETP, FOX et CTX. Ces résultats obtenus dans notre étude sont très faibles comparés aux 214 souches d'*Escherichia coli*, dont 42 % sont résistantes aux  $\beta$ -lactamines lors d'une étude réalisée par Servais et Passerat (2009), avec un taux de 16 % pour l'AMC et  $\leq 2$  % pour la CAZ et CTX. Le principal mécanisme de la résistance aux à cette famille d'antibiotique est la synthèse de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu qui sont souvent sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Maurin et al., 1995). Dans notre étude, 1/14 des souches d'*E.coli* est probablement productrice de BLSE.

Nous avons isolé six souches de *Klebsiella pneumoniae*, deux d'entre elles sont résistantes aux  $\beta$ -lactamines. Environ 20 % des résistances plasmidiques à l'amoxicilline acide clavulanique chez cette espèce sont causées par la  $\beta$  lactamase SHV1 produite par cette bactérie (Bradford., 2001). Comme y'a la capacité d'hydrolyser à la fois les monobactames et les céphalosporines à large spectre par les mutants TEM et SHV (Avril et al ., 2000).

Parmi les 32 entérobactéries, on a isolé trois souches appartenant au genre *Citrobacter*. 66.66% sont probablement productrices de BLSE, ce taux obtenu est plus élevé que celui obtenu par Korzeniewska et ses collaborateurs en 2013 qui ont isolés 45 souches de *Citrobacter* et 25.3% d'entre elles sont productrices de BLSE. *Citrobacter sp* produit naturellement une B-lactamase chromosomique de classe C (AmpC) inductible, ce qui la rend résistante à la fois à l'amoxicilline et à la céfoxitine (sougaoff et trytram., 2003).

Dans notre étude, une seule souche de *Salmonella* a été isolée. Ce résultat n'est pas similaire à celui trouvé par Mehrabian et ses collaborateurs lors d'une étude sur les *Salmonelles* dans les eaux superficielles et où ils ont isolé 44 souches de *salmonella* isolées à partir de 30 échantillons.

Durant notre étude, une image de synergie a été observée lors du DD-test réalisé sur la souche de *Shigella* isolée, elle est donc probablement productrice d'une BLSE. La cause la plus fréquente de la résistance de *Shigella* au C3G est un excès de B-lactamase de type AmpC (Paterson ., 2006).

Parmi les 32 souches testées, 10 sont probablement productrices de BLSE. La synthèse d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre (BLSE) et d'une enzyme ampC, confère une résistance à plusieurs antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Blaak et al ., 2013).

Les résultats du test CIM est négatif pour les 3 souches testées, elles ne sont donc probablement pas productrices de carbapénémases. La résistance à une carbapénème n'implique pas automatiquement la présence d'une carbapénémase; même si, des tests supplémentaires doivent être entrepris pour identifier le mécanisme de résistance.

Les CMI à la colistine sont supérieures à 16 $\mu$ g/mL. Les mécanismes de résistance à la colistine peuvent correspondre soit à des mutations chromosomiques des gènes impliqués dans la modification de la charge du LPS soit à un mécanisme d'origine plasmidique par production d'une phosphoéthanolamine transférase codée par le gène *mcr-I*(Choi et al., 2015).

## **Conclusion**

La résistance aux antibiotiques constitue une grave menace pour la santé publique et la présence d'organismes résistants dans les eaux environnementales est une préoccupation mondiale croissante. Une étude plus approfondie est justifiée compte tenu de la possibilité que cette résistance se propage via les STEP à des micro-organismes indigènes ou à d'autres espèces pathogènes.

L'assainissement urbain et l'industrie pharmaceutique seraient les principaux lieux de déversement d'antibiotiques mais aussi de bactéries résistantes. Grâce au procédé d'épuration biologique utilisé dans les stations d'épuration, les bactéries pathogènes et résistantes sont étroitement en contact les unes avec les autres ainsi qu'avec d'autres microorganismes. En conséquence, l'échange de gènes se produit notamment avec la floculation des particules dans les différents bassins d'une station d'épuration. Étant donné que les eaux usées contiennent également des antibiotiques et d'autres polluants, les installations d'épuration offrent des environnements favorables à la survie d'organismes résistants aux bactéries.

Au cours de cette étude, qui s'est déroulée au laboratoire de Microbiologie à l'université A.Mira de Bejaia. Nous avons étudié la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif isolées des stations d'épuration. Sur les 29 prélèvements effectués, 119 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolés, parmi lesquelles 26.89% sont identifiés comme étant des entérobactéries. Le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis des différentes classes d'antibiotique testées, a révélé des taux de résistance élevés. 31.25% des souches sont probablement productrices de BLSE.

Enfin ce travail reste préliminaire et en vue d'enrichir ses résultats plusieurs perspectives sont envisageables, il serait intéressant :

- D'évaluer la présence des antibiotiques dans les stations d'épuration
- De faire la caractérisation des autres souches de BGN
- De caractériser les gènes de résistance par les méthodes de biologie moléculaire.

## **Références bibliographiques**

## A

Allen HK, Donato J, Wang H, Cloud - Hansen KA, Davies J et Handelsman J. (2010). Call of wild : antibiotic resistance genes in natural environments. *Microbiology*. 8 : 251-259

Arlet *Eur Spine J*. 1999;8:329. doi: 10.1007/s005860050182. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H. (2000). Bactériologie clinique. Caractères généraux de *Staphylococcus aureus*. Ed. Ellipses paris. P 7-28.

## B

Belouni R, Benslimani A, Ramdani, Bouguessa N and Seghir M. (2009). Manuel de Microbiologie. 2ème Ed. OPU, Alger. P 91.

Blaak H, van Hoek A, H.A.M, Veenman C, Van, Leeuwen AED, Lynch G, Ves, Overbeek W et Roda Husman AM. (2014). Extended spectrum  $\beta$  - lactamase- and constitutively AmpC - producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment . *International Journal of Food Microbiology*. 168-169, 8-16.

Borjesson, S., O. Dienues, P. Å. Jarnheimer, B. Olsen, A. Matussek et P. E. Lindgren. 2009. "Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides,  $\beta$ -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR." *International Journal of Environmental Health Research* 19 (3): 219-230.

Bradford P.A.(2001). Extended-spectrum bêta-lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important résistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 14 : 933-951.

Bush k. (1999). Bêta-lactamase of increasing clinical importance. *Curr Pharm Des*. 5:839-845.

Z. Baba Ahmed-Kazi Tani , G. Arlet Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie, *Pathologie Biologie* 62 (2014) 169–178



## C

EUCAST

(CA-SFM). (2013). comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

(CA-SFM). (2021). comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Charretier Y , Diene SM , Baud D , et al . Colistin Heteroresistance and Involvement of the PmrAB Regulatory System in *Acinetobacter baumannii* . *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 ; 62 (9) : e00788-18. doi : 10.1128 / AAC.00788-18.

Choi MJ et Ko KS. (2015). Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains. *Antimicrob Agents Chemother*;59:6763—73

## D

Danner M.-C., Robertson A., Behrends V. et Reiss J. Antibiotic Pollution in Surface Fresh Waters: Occurrence and Effects. *Sci. Of the total Environ.* 2019 ; 664 :793–804.

De Sousa Oliveira, K., de Lima, LA, Cobacho, NB, Dias, SC et Franco, OL (2016). « Chapter 2 - Mechanisms of antibacterial resistance: shedding light on these obscure processes? » dans *Antibiotic Resistance* , eds K. Kon et M. Rai (Academic Press).

Di Marcantonio C., Chiavola A., Dossi S., Cecchini G., Leoni S., Frugis A., Spizzirri M. et Boni MR. (2020). Occurrence, seasonal variations and removal of organic micropollutants in 76 wastewater treatment plants. *Safety processes. Environ. Prot.* ; 141 : 61–72.

Diaz, L., Tran, TT, Munita, JM, Miller, WR, Rincon, S., Carvajal, LP, et al. (2014). Whole genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with various MICs of daptomycin. *Antimicrobien. Agents Chemother.*

Drieux Rouzet L et Jarlier V. (2014). Bactéries multirésistantes dans l'eau : modèles des entérobactéries productrices de bêta - lactamase à spectre étendu. *Revue francophone des laboratoires* N ° 460.

## G

Guardabassi L, Dalsgaard A, Raffatellu M et Olsen JE. (2000). Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter* spp. observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid - medicated feed. *Aquaculture*. 188 (3-4) 205-218.

Gülmez, D., Woodford, N., Palepou, M.-F. I., Mushtaq, S., Metan, G., Yakupogullari, Y., ... Livermore, D. M. (2008). *Carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 523–526

## H

Hocquet D, Muller A et Bertrand X. (2016). What happens in the hospital doesn't stay in the hospital: antibiotic-resistant bacteria in hospital sewage systems. *J Hosp Infect.* .

## K

EiliY. Klein , ThomasP. VanBoeckel, Elena,M. Martinez, , Suraj Pant, Sumanth Gandra, Simon A. Levin , Herman Goossens, and Ramanan Laxminarayan 115 (15) E3463-E3470, Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015

Knight GM, Budd EL, Whitney L, Thornley A, Al-Ghusein H, Planche T et Lindsay JA. (2012). Change in dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones associated with the hospital over time. *J Antimicrob Chemother.*

Kümmerer, K. 2004. "Resistance in the environment." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (2): 311-320.

## M

Munita, JM et Arias, CA (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol spectr* 4(2), 1–37.

Mitra S, Basu S, Rath S et Sahu SK. (2020). Colistin resistance in Gram - negative ocular infections: prevalence , clinical outcome and antibiotic susceptibility patterns , *Int Ophthalmol* ,: 40 ( 5 ) : 1307-1317 .

Mesli E et Merad B (2014), étude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez les *Acinetobacter baumannii*, thèse de doctorat : Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Mauarín M, Musso D, Charrel R, Perez R, N'Guyen A, Dumon H et De Mico P. (1995).  
Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacilles à Gram négatif aérobies).  
*Médecine et Maladies infectieuses*. 25, P 508-514.

## O

Overturf, Gary D. MD, Carbapenemases A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. *The Pediatric Infectious Disease Journal*: January 2010 - Volume 29 - Issue 1 - p 68-70.

## P

Paterson MD. (2006). Resistance in Gram - negative bacteria : *enterobacteriaceae*. *The American Journal of medicine*. 119 (6A) : S20 –S28.

Picão RC, Juliana PC, Eloíza HC, Adriana GN, Fernanda VB, Diego MA, Luiz J , Ana CG. (2013). The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76 80–85

## R

Rodriguez Villalobos H , Struelens MJ. (2006). Résistance bactérienne par  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur . *Réanimation* . 15 ( 3 ) : 205-213 . doi : 10.1016 / j.reaurg 2006.03.006

## S

Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A. and Top E.M. (2007). Genomics of IncP1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev*. 31: 449–477.

Sefraoui I. 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 94 p. SEKHRI-ARAFI N.2010. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella*

Servais P et Passerat J. (2009). Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France).

Sougakoff W et Tyrstram D. (2003) . Résistance aux aux  $\beta$  - lactamines. Université Pierre et Marie Curie.Faculté de Medcine Pierre et Marie Curie. p78.

## T

Ternent L, Dyson RJ, Krachler AN andJabbari S. (2015). La forme physique bactérienne forme la dynamique de la population de résistant aux antibiotiques et les bactéries susceptibles dans un modèle de traitement combiné d'antibiotique et d'anti-virulence. *Journal de Biologie Théorique*. 372, 1-11

Tong, L., Eichhorn, P., Perez, S., Wang, Y., and Barcelo, D. (2011) Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Chemosphere*, 83(3), 340–348.

## V

Vila, J., Martí, S. et Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porines, pompes à efflux et multirésistance chez *Acinetobacter baumannii* . *J. Antimicrobe. Chimimère*.

## W

Wright, GD (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol*

Wright, GD (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chim. Commun.*

## Z

Zhang T, Shao MF et Ye L. (2012). 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 6 (6), 1137–1147 Y.

Zhuang, Ren H. , Geng J. , Zhang Y. , Zhang Y. , Ding L. et Xu K. (2015). Inactivation des gènes de résistance aux antibiotiques dans les eaux usées municipales par désinfection par chloration, ultraviolet et ozonation *Environ. Sci. Pollution. Rés. Int. , 22 , p. 7037 – 7044*

# **Annexes**

## Annexe 1

### Profil de sensibilité aux $\beta$ -lactamines

Code de souche	Antibiotique														Origine de prélèvement	Lieu de prélèvement
	ATM		AMC		CTX		FOX		CAZ		CS		ETP			
<b>A</b>	23	S	32	S	24	S	15	I	28	S	14	R	18	R	Entré IMP	Bouger plage
<b>B</b>	26	S	19	S	24	S	15	I	20	I	13	R	25	S	Entré S1 Colistine	Bouger plage
<b>D</b>	24	S	26	S	24	S	0	.	24	S	13	R	32	S	Sortie S2 Colistine	Bouger plage
<b>E</b>	25	S	12	R	28	S	0	.	11	R	11	R	31	S	BB S2 IMP	Aokas
<b>F</b>	12	R	0	R	0	.	25	S	10	R	12	R	26	S	Entré S1 IMP	Aokas
<b>G</b>	35	S	20	S	30	S	18	I	32	S	0	.	28	S	BB S1 Colistine	Aokas
<b>H</b>	26	S	17	R	24	S	11	R	0	.	13	R	29	S	BB S2 IMP	Sidi Ali Labhar
<b>I</b>	32	S	26	S	33	S	26	S	26	S	12	R	38	S	BdR S1 IMP	Sidi Ali Labhar
<b>g</b>	12	R	20	S	15	R	18	I	13	R	11	R	29	S	Entré S2 IMP	Sidi Ali Labhar
<b>K</b>	26	S	20	S	18	I	0	.	12	R	13	R	22	R	Sortie IMP S2	Sidi Ali Labhar
<b>L</b>	23	S	40	S	23	S	20	S	20	I	12	R	26	S	BB S2 Colistine	Souk el Tenine
<b>M</b>	32	S	19	S	29	S	20	S	23	S	12	R	33	S	BdR S3 F IMP	Souk el Tenine
<b>N</b>	32	S	23	S	30	S	19	S	21	I	13	R	31	S	BdR S7 S Colistine	Souk el Tenine
<b>O</b>	29	S	11	R	22	S	20	S	12	R	12	R	32	S	BdR S1	Souk el

															Colistine	Tenine
<b>P</b>	23	S	IS	.	30	S	30	S	24	S	12	R	30	S	BdR S7 R Colistine	Souk el Tenine
<b>Q</b>	35	S	IS	.	32	S	22	S	29	S	0	.	32	S	BdR S5 A Colistine	Souk el Tenine
<b>S</b>	21	S	IS	.	25	S	24	S	12	R	14	R	30	S	BdR S8C Colistine	Souk el Tenine
<b>T</b>	19	S	30	S	23	S	8	R	20	I	12	R	29	S	BdR S8 D Colistine	Souk el Tenine
<b>V</b>	31	S	13	R	27	S	16	S	13	R	12	R	28	S	BdR S3E IMP	Souk el Tenine
<b>W</b>	26	S	0	.	27	S	0	.	20	I	13	R	24	R	BB S5 IMP	Souk el Tenine
<b>X</b>	30	S	IS	.	30	S	21	S	24	S	13	R	30	S	Boue S3 IMP	Souk el Tenine
<b>Y</b>	/	/	0	.	23	S	0	.	20	I	/	/	28	S	BdR S4 Colistine	Souk el Tenine
<b>Z</b>	/	/	0	.	22	S	0	.	28	S	/	/	28	S	BdR S2 IMP	Souk el Tenine
<b>a</b>	/	/	0	.	23	S	0	.	23	S	/	/	28	S	BB S1 IMP	Souk el Tenine
<b>b</b>	/	/	0	.	27	S	0	.	20	I	/	/	32	S	Entré S3 IMP	Souk el Tenine
<b>d</b>	/	/	0	.	25	S	0	.	20	I	/	/	31	S	BdR IMP	Bouger plage
<b>f</b>	/	/	0	.	27	S	0	.	20	I	12	R	39	S	BB 01 S1 IMP	Bouger plage
<b>J</b>	/	/	0	.	25	S	0	.	21	I	/	/	30	S	Entré S2 IMP	Bouger plage
<b>h</b>	/	/	0	.	26	S	0	.	20	I	/	/	29	S	Entré S4 Colistine	Bouger plage
<b>l</b>	/	/	0	.	23	S	13	R	30	S	/	/	34	S	BB02 S2 IMP	Bouger plage

<b>m</b>	/	/	0	.	19	I	0	.	11	R	/	/	25	S	Boue S2 IMP	Bouger plage
<b>n</b>	/	/	0	.	29	S	0	.	12		/	/	32	S	Sortie S2 IMP	Bouger plage



## Annexe II

Tableau d'identification des souches par des tests biochimiques.

	Mobilité	Man	Cs	Gaz	NR	VP	RM	Uréase	TDA	Indole a 37°c	Indolea 44°c	H <sub>2</sub> S
<i>E.coli</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>k.pneumonia</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>proteus</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>citrobacter</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>salmonella</i>	+/-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

### Annexe III

Composition des milieux de cultures (en g/l d'eau distillés)

**Gélose Mac Conkey** pH=7, 4+/- 0,2

Peptone 20

Lactose 10

Sels biliaires 5

Rouge neutre 0, 075

Chlorure de sodium 05

Agar 12

**Gélose Mueller Hinton** pH=7,3+/- 0,1

Infusion de viande de bœuf 2

Hydrolysate de caséine 17,5

Amidon 1,5

Agar 17

**Gélose TSI** pH=7,4+/- 0,2

Extrait de viande de bœuf 03

Extrait de levure 03

Peptone trypsine (peptic digest of animal tissue) 20

Chlorure de sodium 05

Citrate ferrique 0,3

Lactose 10

Glucose 01

Saccharose	10
Thiosulfate de sodium, 5H <sub>2</sub> O	0,3
Rouge de phénol	0,024
Agar	12
<b>Milieu de Citrate de Simmons</b>	pH=6,9+/-0,2
Citrate de sodium	02
Chlorure de sodium	05
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate monoammoniaque	01
Phosphate bipotassique	01
Bleu de bromothymol	0, 08
Agar	15
<b>Mannitol mobilité</b>	pH=7,4+/-0,2
Peptone tryptique de viande	20
Agar	04
Mannitol	02
KNO <sub>3</sub>	01
Rouge de phénol à 1%	04ml
<b>Milieu Clark-Lubs</b>	pH=7+/-0,2
Peptone tryptique de viande	05
Phosphate bipotassique	05
Glucose	06
<b>Bouillon nitraté</b>	pH=7+/- 0,2

Infusion cerveau-cœur	25
Nitrate de potassium	10
<b>Milieu Urée-Indole</b>	pH=7+/- 0,2
l-tryptophane	03
Phosphate monopotassique	01
Phosphate bipotassique	01
Chlorure de sodium	05
Urée	20
Alcool à 90°	10ml
Rouge de phénol en solution à 1%	2,5ml
<b>Bouillon nutritif</b>	pH=7,5+/- 0,2
Peptone de viande	4,3
Peptone de caseine	05
Chlorure de sodium	6,4

## Annexe IV

### Réactifs utilisés

#### Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique .....	150ml
P.diméthylaminobenzaldehyde .....	10g
Acide chlorhydrique concentré .....	50ml

#### Réactif de TDA (tryptophane désaminase)

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$ .....	10ml
Eau distillée .....	20ml

#### Réactif de Voges-Proskauer (VPI)

$\alpha$ Naphthol .....	6g
Alcool éthylique à 90° .....	100ml

#### Réactif de Voges-Proskauer (VPII)

NaOH4N	
Rouge de méthyle (RM)	
Rouge de méthyle.....	0,5g
Alcool éthylique à 60° .....	100ml

#### Réactif de Griess I (NRI)

Acide parasulfanilique .....	8g
Acide acétique 5N .....	1L

#### Réactif de Griess II (NRII)

$\alpha$ Naphtylamine .....	6g
Acide acétique 5N .....	1L

## Résumé

La station d'épuration peut être une source de propagation et de transfert de la résistance bactérienne dans l'environnement hydrique. L'analyse d'eaux usées des STEP est effectuée pour la recherche des entérobactéries résistantes. L'identification des souches est basée sur la galerie biochimique classique. La sensibilité des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard. La résistance de ces souches aux carbapénèmes est déterminée par différentes méthodes phénotypiques, le test de Hodge modifié et le test aux inhibiteurs. Sur les 29 prélèvements effectués, 119 souches à Gram négatif sont isolées, 32 souches appartiennent aux entérobactéries et 87 souches appartiennent aux d'autre genre à bacilles Gram négatif. La sensibilité de ces souches aux  $\beta$ -lactamines a révélé que toutes les entérobactéries isolées sont résistantes à la CS 62.50%, 21.87%, 15.62%, 9.37%, 9.37%, 6.25%, 3.12% sont résistantes respectivement à CAZ, AMC, FOX et ERT, ATM, CTX.

Le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis des différentes classes d'antibiotique testées, a révélé des taux de résistance élevés. 31.25% souches sont probablement productrices de BLSE.

Notre étude montre que les stations d'épuration sont des réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques, Cela peut constituer une menace pour l'environnement mais aussi pour la santé humaine.

**Mots clés :** eau usée, eau épurée, station d'épuration, antibiotique, résistance, mécanisme de résistance, Entérobactéries, bactéries à Gram négatif, bactéries résistantes.

## Abstract :

The wastewater treatment plant can be a source of spread and transfer of bacterial resistance in the water environment. The analysis of wastewater from WWTPs is carried out for the search of resistant Enterobacteriaceae. The identification of the strains is based on the classical biochemical gallery. Susceptibility of enterobacteria to  $\beta$ -lactams is performed by the standard antibiogram method. The resistance of these strains to carbapenems is determined by different phenotypic methods, the modified Hodge test and the inhibitor test. Of the 29 samples taken, 119 gram-negative strains were isolated, 32 strains belonged to enterobacteria and 87 strains belonged to other gram-negative bacilli. The sensitivity of these strains to  $\beta$ -lactam revealed that all isolated enterobacteria are resistant to CS 62.50%, 21.87%, 15.62%, 9.37%, 9.37%, 6.25%, 3.12% are resistant to CAZ, AMC, FOX and ERT, ATM, CTX respectively.

The resistance profile of the isolated strains towards the different classes of antibiotics tested, revealed high resistance rates. 31.25% of the strains are probably ESBL producers.

Our study shows that sewage treatment plants are reservoirs of antibiotic resistant bacteria, which can be a threat for the environment but also for human health.

**Key words:** wastewater, purified water, treatment plant, antibiotic, resistance, resistance mechanism, Enterobacteriaceae, Gram-negative bacteria, resistant bacteria.