

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique  
Université Abderrahmane Mira  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

## Mémoire de fin de cycle

---

---

En vue de l'obtention du diplôme de Master II  
Microbiologie Moléculaire et Médicale

---

---

### Thème

Etude de la sensibilité aux C3G des bacilles  
à Gram négatif isolés à partir d'eau de  
source (W. Béjaia)

Présenté par

*M<sup>lle</sup> BENOUARET Hakima*

*M<sup>lle</sup> RAMDANI Meriem*

Membre du jury :

Président : M<sup>me</sup> K. MOUICI

MCB

Promoteur : A. TOUATI

MCA

Co-promotrice: M<sup>lle</sup> R.TAFOUKT

Doctorante

Examineur I: M<sup>lle</sup> B. YANAT

MAA

Examineur II: M<sup>me</sup> K. BELHADI

MAB

Promotion 2012/2013

## *Remerciements*

*Nous souhaitons remercier en premier lieu notre directeur de mémoire, docteur A.TOUATI, et notre Co-promotrice, Mlle R. TAFOUKI, Doctorante en microbiologie, à l'université de Bejaia. De nous avoir encadré.*

*Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury, de nous avoir honoré en acceptant d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements les plus sincères sont adressés à l'équipe de Mr TOUATI, ainsi qu'à toutes les personnes qui nous ont aidé dans les prélèvements.*

*Un grand merci à toutes les personnes qui nous ont aidés de prêt ou de loin à bien mener ce travail.*



# Dédicaces

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu. Vous avez comblé ma vie de tendresse d'affection et de compréhension.*

*Mes chères sœurs : Rebiha, Lila, Lydia*

*Mes frères : Mahrez, Hanni*

*Mes grands-parents, mes oncles et mes tantes, Toute la famille*

*Mes cousins surtout : Fawzi, Salima, Souhila et Madjid.*

*Mes meilleures amies : mon cher binôme Meriem, Kahina, Amel, Assia, Malika, Bania, Faten, Amina.*

*Tous ceux qui me sont chères*

*Tous ceux qui m'aiment*

*Toute la promotion MMM (2013)*

*Hakima*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur, mes parents, qui ont toujours cru en moi, encouragé. Je ne pourrais jamais vous récompenser pour les grands sacrifices que vous avez faits et continuez de faire pour moi.*

*A mes sœurs : Souad, Kahina, Ryma, Nawel*

*A mon seul et unique frère : Toufik*

*A mes nièces et neveux : Islam, Oussama, Aya et Farah*

*A mes grands-parents, mes oncles et mes tantes.*

*A mes cousins / cousines surtout : Sara, Katia, Nadira.*

*A toute ma famille*

*A mon binôme et amie : Hakima Et sa famille.*

*A mes chères amies : Kahina, Amel, Malika, Bania, Faten, Assia, Ibtissem.*

*A tous mes amis*

*A tous ceux que j'aime et m'aiment*

*Et a toute la promotion MMM (2013)*

*Meriem*

**µg** : Microgramme

**ADH**: Arginine dihydrolase

**AMC**: Amoxiciline –Acide clavulanique

**AMY**: Amylase

**ARA**: Arabinose

**AT**: Aztréoname

**ATB** : Antibiotiques

**BLSE** :  $\beta$ -Lactamine à Spectre Etendu

**C2G** : Céphalosporine de 2<sup>ème</sup> Génération

**C3G** : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> Génération

**CAZ**: Céftazidime

**CIT**: Citrate de Simmons

**CLSI**: Clinical and laboratory Standards Institute

**CMI**: Concentration Minimal Inhibitrice

**COT**: Co-trimoxazole

**CTR**: Ceftiaxone

**CTX-M**: Céfotaximase-Munich

**CX**: Cefoxitine

**DD-test**: Double Disque test

**E.P.T** : Eau peptonnée tamponné

**GC**: Giolitti Cantoni

**GEL**: Gelatinase

**GLU**: Glucose

**I** : Intermédiaire

**IND**: Indole

**Lac**: Lactose

**Man**: Mannitol

**MH**: Mueller-Hinton

**Mob**: Mobilité

**NA** : Acide Nalidixique

**Nit** : Nitrate

**ODC** : Ornithine décarboxylase

## *Liste des abréviations*

---

**ONPG** : Ortho-nitrophényle- $\beta$ -galactoside

**R** : Résistante

**RHA** : Rhamnose

**RIF** : Rifampycine

**RM** : Rouge de méthyle

**RV** : Rapapport-vassiliadis

**S** : Sensible

**SAC** : Saccharose

**SOR**: Sorbitol

**STEP**: Station d'Épuration

**TDA** : Tryptophane désaminase

**TEM**: Temmory

**TOB** : Tobramicine

**TR**: Triméthoprime

**UFC** : Unité Formant une Colonie

**UFC/ml** : Unité Formant Colonie/Millilitre

**URE**: Urée

**VP**: Voges Proskauer

## Liste des Figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure N°1</b> : Schémas représentant les flux de bactéries résistantes et des antibiotiques entre les différents environnements et des zones d'utilisation..... | 2  |
| <b>Figure N°2</b> : Nombre des souches isolées de chaque source.....  | 13 |
| <b>Figure N°3</b> : Taux de résistance des souches Gram négative aux $\beta$ -lactamines.....   | 17 |
| <b>Figure N°4</b> : Taux de résistance des souches Gram négative aux autres antibiotiques .....   | 19 |
| <b>Figure N°5</b> : Image de DD-test des 4 souches présentant une BLSE.....   | 20 |
| <b>Figure N°6</b> : Image de DD-test de la souche LA1 sur MH et sur MH+cloxacilline .....   | 21 |
| <b>Figure N°7</b> : Image de CMI pour la souche L4.....   | 22 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau I</b> : les analyses bactériologiques des eaux.....   | 7  |
| <b>Tableau II</b> : Liste des antibiotiques testés.....  | 10 |
| <b>Tableau III</b> : Volume utilisé pour la réalisation de la gamme d'antibiotiques.....   | 11 |
| <b>Tableau IV</b> : Lieu, date des prélèvements et nombre de souches isolées à partir de différente source d'eau.....  | 12 |
| <b>Tableau V</b> : les différentes souches à Gram négatif isolées.....   | 14 |
| <b>Tableau VI</b> : Résultat de sensibilité des souches à Gram négatif aux bêta-lactamines ...   | 16 |
| <b>Tableau VII</b> : Résultat de la sensibilité des souches à Gram négatif aux antibiotiques autre que les bêta-lactamines.....                                  | 18 |
| <b>Tableau VIII</b> : Comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton et Mueller Hinton additionnée à la cloxacilline..... | 21 |
| <b>Tableau IX</b> : Concentration inhibitrice de l'antibiotiques CAZ testés sur les souches résistantes .....  | 22 |

## *Annexe III*

|   |  |
|---|--|
| <b>Tableau I</b> : Résultats de l'identification par la galerie biochimique (API 20E) |  |
|---|--|

# Table de matières

|   |    |
|---|----|
| Liste des abréviations  |    |
| Liste des figures   |    |
| Liste des tableaux  |    |
| Introduction.....   | 1  |
| Matériel et méthodes  |    |
| I. Prélèvement .....  | 6  |
| I.1. Prélèvement en l'absence de robinet .....                          | 6  |
| I.2. Prélèvement au robinet .....                                       | 6  |
| I.3. Conditionnement et transport des échantillons.....                 | 6  |
| II. Protocole de recherche de germes.....                               | 7  |
| III. Isolement et purification .....                                    | 8  |
| IV. Identification des souches.....                                     | 8  |
| V. Etude de la sensibilité aux souches aux antibiotiques .....          | 9  |
| VI. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....     | 10 |
| VI.1. DD-test.....  | 10 |
| VI.2. DD-test sur gélose a la cloxacilline .....                        | 10 |
| VII. Détermination des CMI en milieu solide (CLSI, 2011) .....          | 11 |
| Résultat  |    |
| I. Souches bactériennes.....  | 12 |
| II. Sensibilité des souches aux antibiotiques .....                     | 15 |
| II.1. Sensibilité des souches aux $\beta$ -lactamines.....              | 15 |
| II.2. Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques.....  | 17 |
| III. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) .....    | 19 |
| III.1. DD-test .....  | 19 |
| III.2. DD-test sur gélose Muller Hinton dditionnée de cloxacilline..... | 20 |
| IV. Determination des CMI.....  | 22 |
| Discussion.....   | 23 |

Conclusion .....26

Références bibliographiques

Annexes



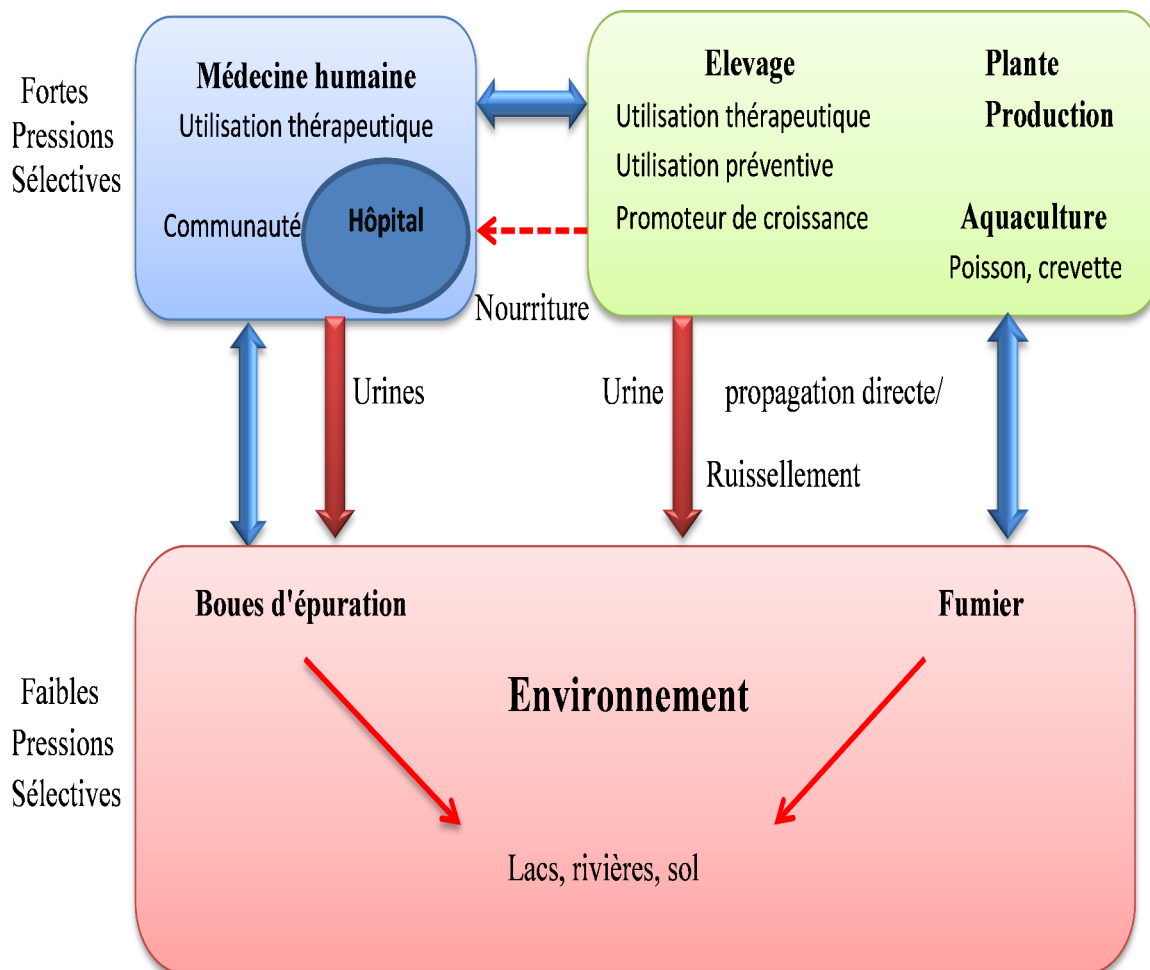
# **Introduction**

Les antibiotiques ont d'abord été largement utilisés pour lutter contre les infections bactériennes au cours de la seconde guerre mondiale. Depuis lors, l'utilisation des antibiotiques a augmenté de façon constante (McKeon et *al.*, 1995). Au cours des cinquante dernières années, l'utilisation des antibiotiques a constamment augmentée. En plus de la large utilisation pour le traitement de maladies humaines, les antibiotiques sont communément utilisés dans la médecine vétérinaire. Ils ont également été utilisés pendant des années à des concentrations sub-thérapeutiques comme promoteurs de croissance dans l'élevage (Servais et *al.*, 2009). Ou dans les piscicultures et dans le traitement des plantes (Martinez, 2009).

L'utilisation intensive des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de microorganismes résistants. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages, transposons, intégrons...). Ces résistances peuvent conduire à une diminution du nombre d'options thérapeutiques (Kempf, et Zeitouni, 2012). La persistance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes sont devenues une menace émergente pour la santé publique (Gao et *al.*; 2012). Elle diminue notre capacité à prévenir et contrôler les maladies infectieuses (Jiang et *al.*, 2013).

La plupart des antibiotiques ne sont que partiellement métabolisés par l'homme et les animaux après leurs administrations. Ces derniers sont excrétés dans l'urine et les fèces, et évacués dans les différents compartiments de l'environnement, atteignant les usines de traitement des eaux usées urbaines (STEP) (Zuccato et *al.*, 2010), qui sont considérés comme le facteur le plus important pour l'évolution et la sélection de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes (Gao et *al.*, 2012 ; Martinez, 2009). Les STEPs sont considérées comme les principaux facteurs ayant contribué à la propagation des antibiotiques dans l'environnement. Les antibiotiques utilisés dans l'élevage peuvent aussi être dispersés dans les champs à travers le fumier et peuvent atteindre le sol, tandis que ceux qui sont utilisés dans l'aquaculture peuvent s'accumuler dans le sol ou les sédiments, contribuant ainsi à leur contamination (figure N°1). Cette charge d'antibiotiques dispersée dans l'environnement pourrait avoir d'importantes conséquences pour les écosystèmes et la santé humaine, elle peut contribuer à l'augmentation de la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques. Une exposition continue aux antibiotiques peut augmenter la sélection de souches bactériennes résistantes dans l'environnement (Zuccato et *al.*, 2010).

Cependant, l'utilisation des antibiotiques par l'homme n'est probablement pas la seule pression sélective pour la résistance aux antibiotiques dans les communautés microbiennes naturelles. En effet, la plupart des antibiotiques sont produits par des souches de champignons et de bactéries présentes naturellement dans l'environnement, y compris le sol. La plupart des souches productrices d'antibiotiques portent des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques qu'ils produisent. Les antibiotiques produits dans l'environnement peuvent exercer une pression de sélection sur les organismes voisins (Allen et al. ; 2010). Le Sol, l'un des plus importants et diversifiés habitats microbiens sur la terre, est de plus en plus reconnu comme un vaste réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (Forsberg, 2012)



**Figure N°1 :** Schéma représentant les flux de bactéries résistantes (en bleu) et des antibiotiques (rouge) entre les différents environnements et des zones d'utilisation (Andersson et Hughes, 2012).

L'utilisation excessive d'antibiotiques a conduit à un problème mondial de contamination par les antibiotiques dans le milieu aquatique. Une préoccupation majeure associée à cette dernière est le développement et la propagation de la résistance aux antibiotiques. Diverses bactéries porteuses de gènes de résistance à ces molécules, ainsi que ses résidus, sont constamment rejetés dans l'environnement aquatique par des voies telles que les rejets d'eaux usées municipales et des eaux usées de la production animale (Jiang *et al.*, 2013). En outre, ces antimicrobiens favorisent la dissémination des gènes de résistance par échange horizontal de gènes portés par les plasmides et les événements de recombinaison tels que la transposition et de l'intégration. En effet, Alouache *et al.* (2011) rapportent la première description de la résistance aux antibiotiques dans l'eau de mer sur les plages de l'Algérie, montrant un niveau important de résistance aux antibiotiques, en particulier les  $\beta$ -lactamines, détectée principalement chez les bactéries saprophytes de l'environnement. Cette résistance aux antibiotiques semble dépendante du niveau des apports anthropiques, qui affectent aussi la structure et la composition des populations bactériennes. Des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu transmissible de typ CTX-M-15 ont été détectés chez *E. coli*, ce qui peut signifier que la contamination de l'environnement par des bactéries résistantes peut entraîner la propagation des gènes de résistance (Alouache *et al.*, 2011).

Bien que les concentrations de résidus d'antibiotiques dans le milieu aquatique soient souvent bien inférieures à la concentration minimale inhibitrice pour les microorganismes, ils peuvent imposer une pression de sélection sur les communautés microbiennes et induire une résistance, ainsi la résistance des bactéries non pathogènes pourrait être transférée aux bactéries pathogènes (Zheng *et al.*, 2011). En 2011, la propagation des bactéries blaNDM-1-positifs dans un contexte environnemental dans New Delhi a été rapportée. Effectivement Isozumi *et al.* (2012) ont montré la présence du gène blaNDM-1 chez *K. pneumoniae* dans la rivière Nguu Kim, au Vietnam. Les isolats obtenus étaient également positifs pour 2 autres  $\beta$ -lactamases, blaTEM-1 et blaCTX-M-3. Ainsi la surveillance des échantillons cliniques et environnementaux au Vietnam et l'établissement d'une stratégie pour prévenir la propagation de blaNDM-1 sont nécessaires d'urgence (Isozumi *et al.*, 2012).

Une vie microbienne existe dans toutes les eaux souterraines, aussi profondes et bien protégées qu'elles soient. Les eaux minérales naturelles et les eaux de source ne sont donc pas stériles, mais sont exemptes de microorganismes pathogènes. La directive européenne précise qu'« à l'émergence, la teneur totale en microorganismes «revivifiables» d'une eau minérale

naturelle doit être conforme à son «microbisme» normal et témoigner d'une protection efficace de la source contre toute contamination. L'analyse microbiologique des eaux minérales naturelles a toujours révélé, la présence de quelques bactéries cultivables « autochtones ». La présence de cette flore normale dans une eau conditionnée constitue donc la garantie de son caractère naturel ; elle n'a pas été désinfectée ; les traceurs d'une éventuelle contamination n'ont pas été masqués. Il a été montré que ces bactéries étaient considérées comme des composants inertes pour un organisme ingérant, tel que celui de l'homme. Ces bactéries ne sont pas pathogènes, comme l'ont montré plusieurs essais sur animaux axéniques. En revanche, il est bien évident que tout microorganisme pathogène doit être absent d'une eau minérale naturelle ou d'une eau de source, et que cette absence ne peut provenir d'un traitement de désinfection de l'eau, strictement interdit (Blignyet Hartemann, 2005).

L'eau souterraine peut également être contaminée par des bactéries, des virus, des produits chimiques et d'autres contaminants (Coleman et al. ; 2013). La contamination de cette dernière constitue une préoccupation croissante et relativement mal comprise comparé à d'autres ressources en eau douce. Ces eaux fournissent la source vivace la plus fiable de l'eau douce sur Terre, elles constituent dans de nombreuses parties du monde la plus importante source d'eau potable (Lapworth et al., 2012).

L'eau constitue un moyen de diffusion des organismes résistants aux antibiotiques entre les populations humaines et animales, comme l'eau potable est produite à partir des eaux de surface, et la voie par laquelle les gènes de résistance sont introduits dans les écosystèmes bactériens naturels. Dans de tels systèmes, les bactéries non pathogènes pourraient servir de réservoir de gènes de résistance (Baquero et al.,2008). Les eaux souterraines non traitées, utilisées pour la consommation pourraient être une source de la propagation et le transfert de souches résistantes aux antibiotiques (Messiet al.,2005). Ces bactéries pourraient représenter un réservoir de déterminants de la résistance ainsi que d'un moyen pour la propagation et l'évolution des gènes de résistance (Mckeenet al., 1995). Il a été démontré que certains microorganismes tels que *Pseudomonas*, possèdent une capacité prononcée pour l'acquisition et la diffusion des gènes de résistance. Les souches appartenant à ce genre, le plus représenté dans l'eau minérale, sont en effet fréquemment résistantes à plusieurs agents antimicrobiens, avec des profils de sensibilité similaires à celles des souches cliniques (Messi et al. 2005).

Les écosystèmes hydriques et les sols semblent constituer donc des réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques, bien que les incidences pour la santé humaine soient encore inconnues. Tout cela soulève des questions pour la santé humaine et la stabilité de

l'écosystème (Zuccato et *al.* ; 2010). Effectivement Kummerer (2004) rapporte la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux souterraines, des *E. coli* résistants aux antibiotiques ont été trouvés avec un taux étonnamment élevé dans les eaux souterraines en milieu rural. Les auteurs ne spéculent pas beaucoup sur l'origine de cette résistance, mais le ruissellement de fumier dans les fermes ou les fuites de fosses septiques sont des possibilités claires pour l'entrée de bactéries résistantes dans les eaux souterraines (Kummer, 2004).

En Algérie peu d'études ont été effectuées sur la contamination des eaux de sources par les bactéries résistantes aux antibiotiques, il est donc important d'étudier la contamination des eaux de source par des bactéries résistantes. Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Recherche et isolement de bactéries à Gram négatifs et à Gram positifs à partir de l'eau de source.
- Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques.
- Détermination phénotypique des mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices.

# **Matériel et Méthodes**

### **I. Prélèvement**

Nous avons effectué 22 prélèvements d'eau de source de différentes régions de la wilaya de Bejaia, durant une période de trois mois allant de février à Mai 2013.

#### **I.1.Prélèvement en l'absence de robinet**

Il s'agit des prélèvements à effectuer directement dans la masse d'eau, par exemple les retenus d'eau superficielle (eau de source).il faut préalablement :

- Se désinfecter les mains à l'alcool
- Désinfecter la canne à prélèvement ou le porte-flacon à immersion ainsi que sa chaînette ;
- Pour l'échantillon bactériologique, utiliser un flacon à enveloppe de protection stérile (Delarras et Trèbaol , 2003) .

#### **I.2.Prélèvement au robinet**

Le robinet doit être en bon état et utilisé régulièrement. Il doit pouvoir être manœuvré aisément et réglable à petit débit en évitant un flux dispersé. Le prélèvement doit se faire en effectuant rigoureusement et dans l'ordre les opérations suivantes :

- Stérilisation du robinet, un flambage de 20 secondes par un coton imbibé d'alcool. Ouvrir le robinet et laisser couler l'eau environ 3 à 5 minutes.
- Remplissage en présentant le flacon légèrement incliné sans avoir manipulé le robinet après purge. Le bouchon doit être maintenu en main sans contact avec la face interne (Delarras et Trèbaol , 2003).

#### **I. 3. Conditionnement et transport des échantillons**

Si la durée de transport dépasse 1 heure et si la température extérieure est supérieure à 10°C, les prélèvements doivent être placés dans une enceinte réfrigérée. Les flacons doivent être maintenus à une température comprise entre 2 et 5°C dans un conteneur approprié. L'analyse bactériologique doit débiter 8 heures au plus tard après le prélèvement (Delarras, et Trèbaol, 2003).



## II. Protocole de recherche de germes

Les analyses bactériologiques des eaux effectuées dans notre travail sont résumées dans le tableau ci-dessous (Delarras, et Trèbaol, 2003) :

**Tableau I** : les analyses bactériologiques des eaux.

| Recherche                         | Milieu utilisé                             | Protocole de la manipulation  | Durée et température d'incubation                 | lecture   |
|-----------------------------------|--|---|---|---|
| <b>Coliforme totaux</b>           | BCPL double concentré (50ml)               | Flacon BCPL double concentré (50ml) + 1µg/ml de la CAZ + cloche de durham additionné de 50ml d'eau à analyser   | 24-48H à 37°C                                     | Les flacons présentant un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune sont considérés comme étant positifs. |
| <b>Streptocoques Fécaux</b>       | Rothe double concentré (50ml)              | Flacon Rothe (50ml) + 50ml de l'eau à analyser  | 24-48H à 37°C                                     | Les flacons présentant un trouble bactérien sont considérés comme pouvant contenir des streptocoques du groupe D            |
| <b>Staphylocoques</b>             | Giolitti Cantonii (3tubes contenant 15ml)  | À partir des dilutions décimales retenues ( $10^{-1}$ à $10^{-3}$ ), porter aseptiquement 1ml par dilution et l'ajouter par suite dans un tube contenant 15ml de GC | 24-48H à 37°C                                     | Les tubes présentant un trouble sont considérés comme positifs.   |
| <b>Salmonelles</b>                | un pré-enrichissement sur bouillon E.P.T   | Flacon contenant 100ml de l'E.P.T additionné de 1µg/ml de la CAZ + 100ml d'eau à analyser   | 24-48H à 37°C                                     | Les flacons présentant un trouble sont considérés comme positifs  |
|                                   | Un enrichissement sur rappaport-vasiliadis | A partir de Flacon positifs, porter 0,1 ml aseptiquement et l'ajouter par suite dans un tube contenant 10ml de bouillon rappaport-vasiliadis                        | 24-72H à 42°C                                     | Les tubes présentant un trouble (éclaircissement du bouillon) seront considérés comme positifs.                             |
| <b>Autre bacille gram négatif</b> | Bouillon nutritif (50ml)                   | Ensemencer 50ml de bouillon nutritif additionnée à 1µg/ml de ceftazidime (CAZ) avec 50ml d'eau à analyser (deux flacons)  | un flacon à 37°C et l'autre à 44°C pendant 24-48H | Les flacons présentant un trouble sont considérés comme positifs  |

### III. Isolement et purification

À partir des bouillons considérés comme positifs, on ensemence des gélosessélectives contenant 2µg/ml de céftazidime et/ou de cefotaxime selon les germes recherchés, deux boîtes pour chaque bouillon.

- ❖ Recherche des coliformes : à partir du bouillon BCPL positif ensemencer sur milieu Mac Conkey (FLUKA®), incubé à 37°C pendant 24-48H.
- ❖ Recherche des streptocoques fécaux : à partir du bouillon Roth ensemencer sur milieu B.E.A, incubé à 37°C pendant 24-48H.
- ❖ Recherche des salmonelles : à partir du bouillon Rappaport-Vasiliadis, ensemencer sur milieu Hektoen (CONDA PRONADISA®). Incuber à 37°C pendant 24-48H.
- ❖ Recherche des staphylocoques : à partir du milieu Giolitti Cantonii, ensemencer sur milieu Chapman (CONDA PRONADISA®). Incuber à 37°C pendant 24-48H.
- ❖ Recherche des *Pseudomonas* : à partir du bouillon nutritif à 37°C, ensemencer sur milieu Ceftrimide (FLUKA®). Incuber à 42°C pendant 24-48H.
- ❖ Recherche de *Acinetobacter baumannii* : à partir du bouillon nutritif à 44°C, ensemencer sur milieu Mac Conkey (FLUKA®). Incuber à 44°C.

Après incubation, les colonies ont fait l'objet d'une purification par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

### IV. Identification des souches

Elle est basée sur les caractères cultureux (taille, couleur, aspect), coloration de Gram et les tests biochimiques.

#### ❖ Les tests biochimiques utilisés sont :

- Utilisation des sucres (sur TSI)
- Etude du type fermentaire milieu glucosé (Clark et lubs)
- Recherche d'urease et du tryptophane désaminase TDA (milieu urée indole)
- Recherche de la nitrate réductase (bouillon nitraté)
- Utilisation du citrate (milieu citrate de Simmons)
- Utilisation du mannitol et mobilité (milieu mannitol/mobilité)
- Production d'indole sur milieu eau peptonée exempte d'indole.

### ❖ Galerie API20E

L'identification des souches Gram négatif a été confirmée par l'emploi d'une galerie API20E (Bio-Mérieux®).

A partir d'une culture jeune sur milieu gélosé, une suspension bactérienne est préparée en dissociant 1 colonie dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension est introduite dans chaque tube à l'aide d'une micropipette, la pointe à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles. Les tubes et cupules des tests GEL, VP, CIT sont remplis, pour les autres tests uniquement les tubes sont remplis. Les tests ADH, LDC, ODC, URE et H<sub>2</sub>S, leurs cupules sont remplies avec de l'huile de vaseline stérile pour créer l'anaérobiose. Incuber à 37°C pendant 24H.

Dans le cas où 3 tests ou plus sont positifs, on note les résultats de toutes les réactions spontanées, puis on révèle les tests nécessitant l'addition de réactifs (TDA, VP, indole et nitrate réductase), dans le cas contraire où moins de 3 tests sont positifs, on remet à l'étuve et on fait la lecture après 48H.

### V. Etude de la sensibilité de souches aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des souches identifiées a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller-Hinton, selon les recommandations de 'Clinical and Laboratory Standards Institute '(CLSI, 2011).

- A. Inoculum :** A partir d'une culture pure de 18 H sur milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne, en dissociant 2 à 3 colonies dans 5ml d'eau physiologique, équivalente au standard McFarland 0,5 (~ 10<sup>8</sup> UFC/ml).
- B. Ensemencement :** par écouvillonnage, bien essoré l'écouvillon, ensemercer toute la surface du milieu gélosé Mueller-Hinton (4mm d'épaisseur) en stries serrées (successivement 3 orientation décalées de 60°). Incubation à 37°C pendant 24h.
- C. Lecture :** on mesure à l'aide d'un pied à coulisse les différents diamètres des zones d'inhibition. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) a été faite selon les critères définis par 'Clinical and Laboratory Standards Institute '(CLSI, 2011).

Les antibiotiques testés (HEMEDIA®) sont résumé dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II:** liste des antibiotiques testés.

| Antibiotiques            | Abréviations | Charges<br>( $\mu\text{g}$ ) | Diamètres critiques |            | Familles         |
|--------------------------|--------------|------------------------------|---------------------|------------|------------------|
|                          |              |                              | Sensibles           | Résistants |                  |
| Cefoxitine               | CX           | 30                           | $\geq 22$           | $< 15$     | C2G              |
| Ceftriaxone              | CTR          | 30                           | $\geq 26$           | $< 23$     | C3G              |
| Ceftazidime              | CAZ          | 30                           | $\geq 21$           | $< 19$     | C3G              |
| Amoxicilline-clavulanate | AMC          | 30                           | $\geq 23$           | $< 16$     | Aminopénicilline |
| Aztréonam                | AT           | 30                           | $\geq 20$           | $< 15$     | Monobactam       |
| Acide nalidixique        | NA           | 30                           | $\geq 18$           | $< 16$     | Quinolones       |
| Tobramycine              | TOB          | 30                           | $\geq 18$           | $< 16$     | Aminosides       |
| Rifampicine              | RIF          | 5                            | $\geq 19$           | $< 14$     | Rifamycines      |
| Trimethoprim             | TRT          | 25                           | $\geq 16$           | $< 12$     | Sulfamides       |
| Co-tremoxasole           | COT          | 25                           | $\geq 16$           | $< 10$     | sulfamides       |

### VI. Recherche des $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

La recherche des BLSE concerne les souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération : ceftriaxone (CTR) et / ou ceftazidime (CAZ).

#### VI.1. DD-test

La production de  $\beta$ -Lactamase a été détectée par le test de synergie double disque (DD-test) et a été réalisée en plaçant des disques de ceftazidime, ceftriaxone et d'aztréonam (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline / acide clavulanique. L'augmentation de la zone d'inhibition entre les disques de ceftriaxone, ceftazidime ou aztréonam et l'amoxicilline/acide clavulanique indique la présence de BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

#### VI.2. DD-test sur gélose a la cloxacilline

Les souches qui ne présentent pas une image de synergie et qui sont résistantes au CX et aux C3G, un DD-test a été réalisé sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) afin de vérifier la production d'une céphalosporinase.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline, permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE. Une différence  $\geq 6$  mm entre les diamètres des zones autour des disques, indique une hyperproduction de céphalosporinase (David, 2008).

### VII. Détermination des CMI en milieu solide

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée vis-à-vis de la ceftazidime.

- Une solution mère d'antibiotiques est préparée à une concentration de 2mg/ml dans l'eau distillée stérile. Des volumes bien définis de cette solution mère sont prélevés et ajoutés à un volume d'une gélose Mueller Hinton en surfusion afin d'avoir des concentrations croissantes à raison de deux comme le montre le tableau ci-dessous :

**Tableau III** : volume utilisé pour la réalisation de la gamme d'antibiotiques.

| Concentration finale en ATB ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 4    | 8    | 16   | 32   | 64   |
|--|------|------|------|------|------|
| Volume de la solution d'ATB (ml)                 | 0.2  | 0.4  | 0.8  | 1.6  | 3.2  |
| Volume de Mueller Hinton (ml)                    | 99.8 | 99.6 | 99.2 | 98.4 | 96.8 |

- Après homogénéisation, le milieu est coulé sur boîte, puis séché 30 minutes à l'étuve à 37°C.
- A partir d'une suspension bactérienne préparée en dissociant cinq colonies dans 5ml d'eau physiologique stérile, on dilue à  $10^{-2}$ . On ensemence par spot 10  $\mu\text{l}$  de la dilution préparée. Incubation 24h à 37°C.
- La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance. La présence d'une à trois colonies ou d'un fin film n'est pas pris en considération.

# Résultats

Les échantillons d'eau ont été collectés de 22 sources d'eau, des différents endroits de la willaya de Bejaia durant la période allant de Février à Mai 2013. Notre étude s'est déroulée au laboratoire d'écologie microbienne à l'université d'Abderrahmane MIRA de Bejaia.

### I. souches bactériennes

Les lieux, dates des prélèvements ainsi que le nombre de souches isolées dans chaque source, sont résumés dans le tableau III.

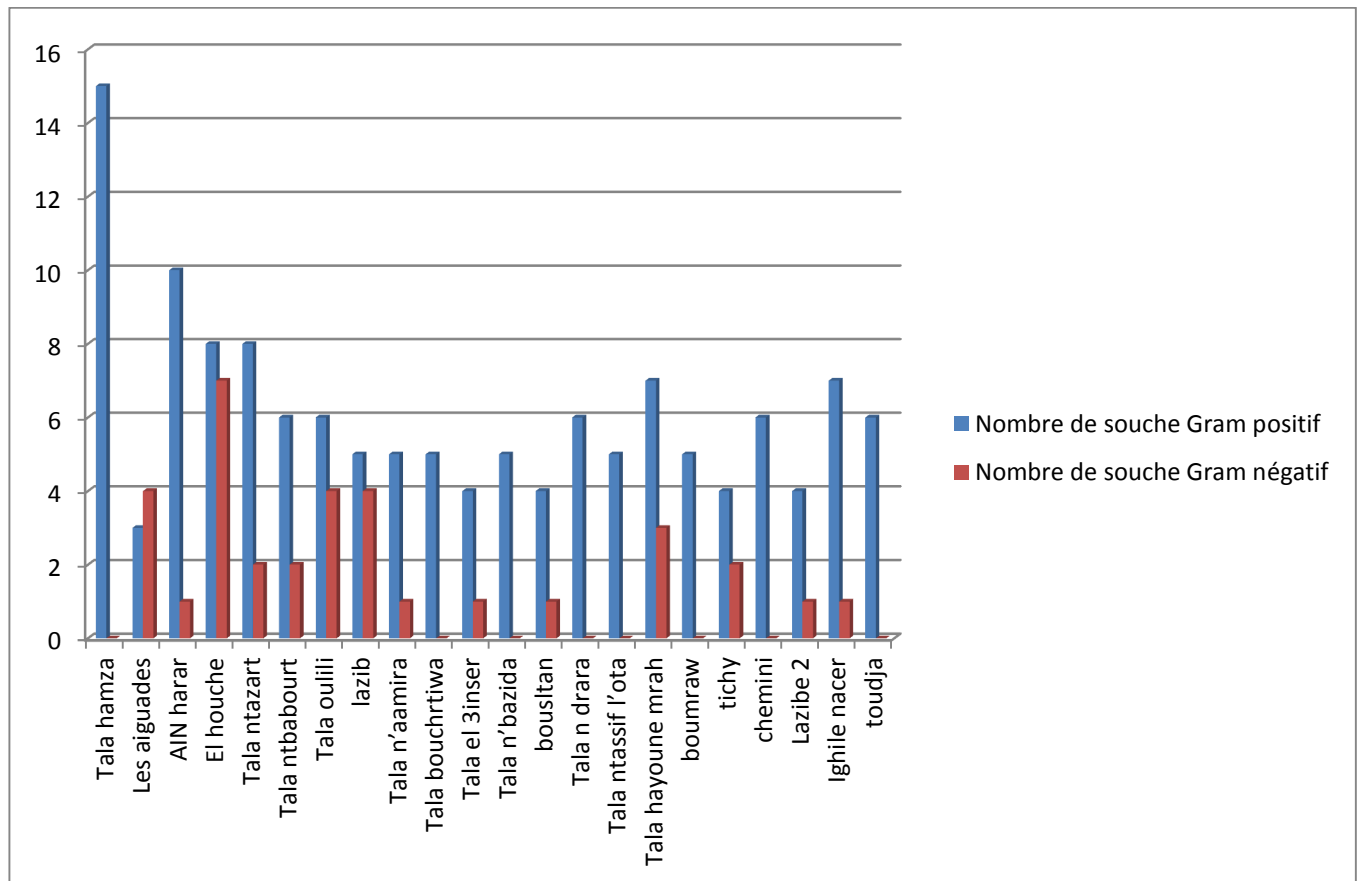
**Tableau IV** : lieu, date des prélèvements et nombre de souches isolées à partir de différente source d'eau.

| Lieu           | Source              | Dates des prélèvements | Nombre de souche |
|----------------|---------------------|------------------------|------------------|
| Tala hamza     | Ighil ouberouak     | 16/02/2013             | 15               |
|                | Boultane            | 08/03/2013             | 5                |
| Souk el tenine | Tala n'aamira       | 08/03/2013             | 6                |
|                | Tala bouchertiwa    |                        | 5                |
|                | Tala el 3inser      |                        | 5                |
|                | Tala N'bazida       |                        | 5                |
|                | Tala ndrara         | 09/03/2013             | 6                |
|                | Tala ntassift l'ota | 11/03/2013             | 5                |
|                | Tala hayoune Mrah   |                        | 10               |
| Akbou          | Laazib              | 02/03/2013             | 9                |
|                | Tala laazibe 2      | 23/03/2013             | 5                |
|                | Ighilenacer         |                        | 8                |
| kherrata       | Tala ntababout      | 02/03/2013             | 8                |
|                | Tala oulili         |                        | 10               |
| Berbacha       | Tala el houche      | 02/03/2013             | 15               |
|                | Tala ntazarth       |                        | 10               |
|                | boumraw             | 17/03/2013             | 5                |
| Tichy          | Tichy               | 17/03/2013             | 6                |
| Toudja         | El ainser           | 23/03/2013             | 6                |
| Sidi Aiche     | Chemini             | 18/03/2013             | 6                |
| Sidi Ahmed     | Ain el harar        | 17/02/2013             | 11               |
| Aiguades       | Aiguades            | 17/02/2013             | 7                |
|                |                     |                        | 168              |

Il est à noter que les souches isolées à partir de la même boîte d'isolement et ayant un même antibiotype considérées comme étant la même souche.

L'identification des souches isolées sur la base des caractères culturaux et à l'aide de la coloration de Gram a permis de caractériser 168 souches, dont 134 souches sont des Gram positif et 34 souches comme étant des Gram négatif, dont 11 souches appartiennent à la famille des entérobactéries (Tableau V).

Le diagramme ci-dessus montre le nombre des souches Gram négatif et Gram positif isolées dans chaque source d'eau analysée.



**Figure N°2 :** Nombre des souches isolées de chaque source



**Tableau V** : les différentes souches à Gram négatif isolées

| Famille des souches          | La souche                        | Code des souches                             | Lieu de prélèvement                      |
|------------------------------|----------------------------------|--|--|
| <i>Entérobactriaceae</i>     | <i>Escherichia coli</i>          | TN 1<br>Tab 1<br>L2, L3, L4                  | TalaNtazarth<br>TalaNtebabourt<br>Laazib |
|                              | <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | TH 1   | Tala El Houche                           |
|                              | <i>Serratia sp.</i>              | TN 2   | TalaNtazarth                             |
|                              | <i>Enterobacter sakazakii</i>    | T Oul 1                                      | Tala Oulili                              |
|                              | <i>Enterobacter agglomerans1</i> | T Ain 1                                      | Tala El Ainsar                           |
|                              | <i>Citrobacter freundii</i>      | L1<br>LA 1                                   | Laazib<br>Laazib 2                       |
| <i>Moraxellaceae</i>         | <i>Acinetobacter sp.</i>         | Aig 1(S25)<br>Bou1 1<br>TH 10                | Aiguades<br>Boultane<br>Tala El Houche   |
| <i>Pseudomonadaceae</i>      | <i>Pseudomonas sp.</i>           | Aig4 (S46)<br>T Oul 2, T Oul 3<br>Ti 1, Ti 2 | Aiguades<br>Tala Oulili<br>Tichy         |
|                              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | TH 5, TH 6, TH 7,<br>TH 9                    | Tala El Houche                           |
| <i>Aeromonadaceae</i>        | <i>Aeromonas sp.</i>             | Tab 2  | Tala Ntebabourt                          |
| Autre Bacille à Gram négatif | Autre bacille à Gram négatif     | Aig 2 (S26), Aig 3 (S40)                     | Aiguades                                 |
|                              |                                  | AH 1   | Ain al harar                             |
|                              |                                  | T Aami 1                                     | Tala n'Aamira                            |
|                              |                                  | T Hay 1, T Hay 2, T Hay 3                    | Tala Hayoune Mrah                        |
|                              |                                  | TH 2   | Tala El Houche                           |
|                              |                                  | IN 1   | Ighil Nacer                              |
|                              |                                  | T Oul 4                                      | Tala Oulili                              |

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent la présence des 4 grandes familles des bacilles à Gram négatif dont la plus fréquente est celle des *Enterobactériaceae* avec un nombre de 11 souches : 5 *Escherichia coli*, 2 souches de *Citrobacter freundii*, 1 souche de *Enterobacter agglomerans1*, 1 souche de *Enterobacter sakazakii*, 1 souche de *Klebsiella pneumoniae*, 1 souche de *Serratia sp.*

Les autres souches font partie des Bacilles à Gram négatif non fermentaires telle que : des *Pseudomonas* (*Pseudomonadaceae*) avec un nombre de 9 souches, *Acinetobacter* (*Moraxellaceae*) avec un nombre de 3 et une souche d'*Aeromonas sp* (*Aeromonadaceae*).

### **II. Sensibilité des souches à Gram négatif isolées aux antibiotiques**

Les 34 souches à Gram négatif isolées à partir de différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 10 antibiotiques de différentes familles. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux VI et VII.

#### **II.1. Sensibilité des souches à Gram négatif aux $\beta$ -lactamines**

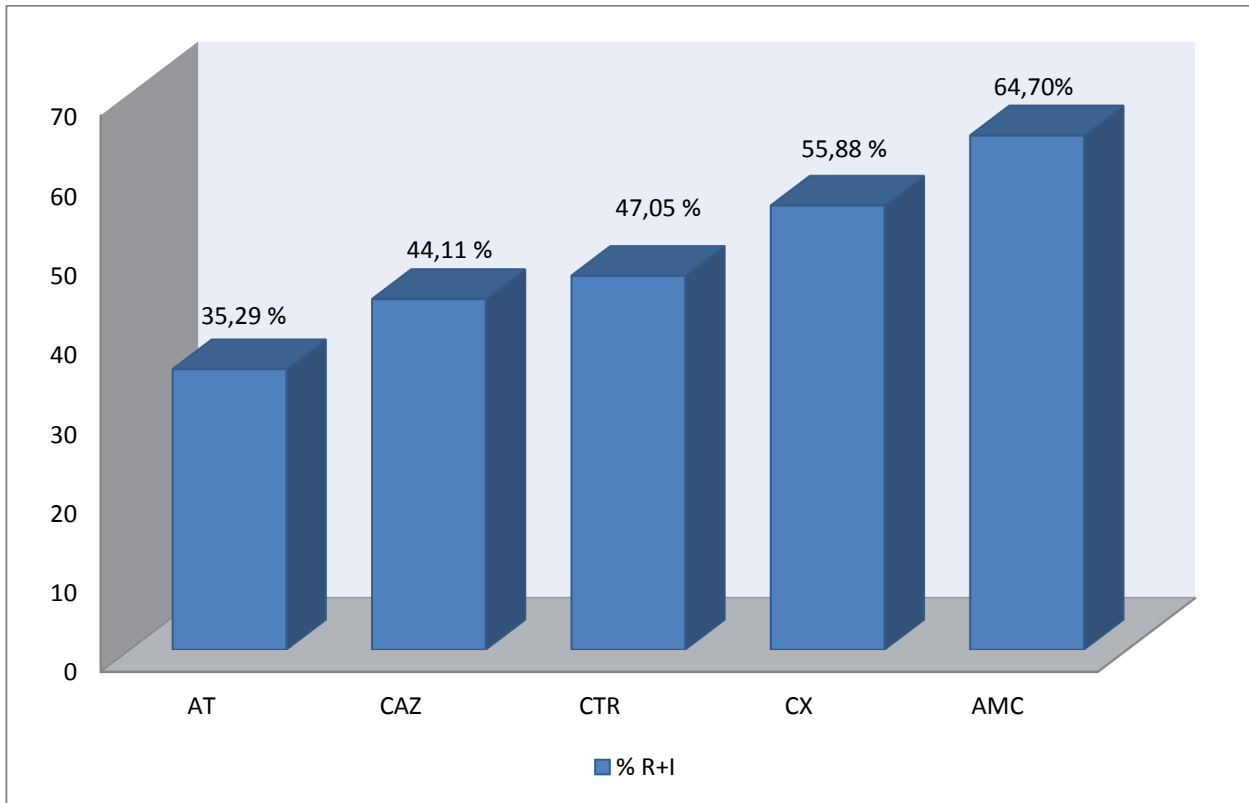
L'ensemble des souches isolées de différents prélèvements ont été testées vis-à-vis de 5  $\beta$ -lactamines à savoir : céftazidime et céftriaxone (céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération), aztréonam (monobactame), céfoxitine (céphalosporine de 2<sup>ème</sup> génération) et Amoxicilline-clavulanate (amino-pénicilline), les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VI ci-après.

La plupart des souches testées sont au moins résistantes à un antibiotique de cette famille.

**Tableau VI : Résultat de sensibilité des souches à Gram négatif aux bêta-lactamines.**

| Code de la souche | CAZ   |   | AMC   |   | CTR   |   | AT    |   | CX    |   | Synergie |
|-------------------|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|----------|
|                   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |          |
| Aig 1             | 22    | S | 12    | R | 24    | S | 24    | S | 6     | R | -        |
| Aig 4             | 28    | S | 14    | I | 34    | S | 32    | S | 6     | R | -        |
| Aig 2             | 23    | S | 6     | R | 26    | S | 28    | S | 18    | I | -        |
| AH 1              | 28    | S | 6     | R | 32    | S | 28    | S | 22    | S | -        |
| Aig 3             | 25    | S | 6     | R | 25    | I | 30    | S | 22    | S | -        |
| TH1               | 6     | R | 12    | R | 20    | I | 8     | R | 18    | S | -        |
| TH2               | 24    | S | 10    | R | 32    | S | 26    | S | 22    | S | -        |
| TH5               | 26    | S | 6     | R | 24    | I | 30    | S | 6     | R | -        |
| TH6               | 24    | S | 6     | R | 26    | S | 28    | S | 6     | R | -        |
| TH7               | 25    | S | 6     | R | 23    | I | 26    | S | 6     | R | -        |
| TH9               | 24    | S | 6     | R | 22    | R | 26    | S | 6     | R | -        |
| TH10              | 18    | S | 20    | I | 22    | S | 24    | S | 12    | R | -        |
| Tab1              | 28    | S | 22    | S | 32    | S | 30    | S | 22    | S | -        |
| Tab2              | 6     | R | 34    | S | 20    | R | 6     | R | 24    | S | +        |
| TN1               | 30    | S | 22    | S | 40    | S | 32    | S | 28    | S | -        |
| TN2               | 8     | R | 32    | S | 30    | S | 19    | I | 40    | S | -        |
| T Oul1            | 12,17 | R | 6     | R | 7,79  | R | 16,42 | R | 6     | R | -        |
| T Oul2            | 25    | S | 9     | R | 28    | S | 28    | S | 6     | R | -        |
| T Oul3            | 21    | S | 10    | R | 28    | S | 28    | S | 6     | R | -        |
| T Oul4            | 28    | S | 6     | R | 32    | S | 32    | S | 32    | S | -        |
| T Ain 1           | 6     | R | 32,43 | S | 22,67 | I | 6     | R | 22    | S | +        |
| Bousl 1           | 18,19 | S | 21,7  | I | 20,27 | I | 23,14 | S | 10,85 | R | -        |
| T Aami 1          | 6     | R | 34,06 | S | 25,04 | I | 8,66  | R | 17,77 | I | -        |
| L1                | 21,26 | S | 20,86 | S | 22,84 | I | 26,33 | S | 18,84 | S | +        |
| L2                | 28    | S | 20    | I | 32    | S | 29    | S | 25    | S | -        |
| L3                | 16    | R | 9     | R | 24    | S | 21    | S | 18    | S | -        |
| L4                | 16,48 | R | 12,9  | R | 24,04 | S | 20,9  | S | 15,37 | I | +        |
| THay 1            | 6     | R | 31,44 | S | 24,49 | I | 11,01 | R | 19,96 | I | -        |
| THay 2            | 19,37 | I | 21,74 | I | 19,71 | R | 23,51 | S | 9,88  | R | -        |
| THay 3            | 10,62 | R | 34,3  | S | 27,7  | S | 14,96 | R | 25,5  | S | -        |
| LA1               | 8,72  | R | 8,65  | R | 16,74 | R | 13,5  | R | 6     | R | -        |
| Ti1               | 8     | R | 36    | S | 24    | S | 6     | R | 25    | S | -        |
| Ti2               | 6     | R | 30    | S | 20    | I | 6     | R | 13    | R | -        |
| IN1               | 6     | R | 32,44 | S | 21,56 | R | 6     | R | 17,83 | I | -        |

La figure N°3 ci-dessous nous permet d'observer que la majorité des souches à Gram négatif isolées sont résistantes à l'AMC avec un taux de 64,70% (22/34), les taux de résistance enregistrés vis-à-vis de la CX, CAZ, CTR et l'aztréonam sont de 55,88% (19/34), 44,11% (15/34), 47,05% (16/34), 35,29% (12/34) respectivement.



**Figure N°3 :** Taux de résistance des souches Gram négativeaux  $\beta$ -lactamines

**Légende :** CAZ (Céftazidime), AMC (Amoxicilline-clavulanate), CTR (Céftriaxone), AT (Aztréonam), CX (Céfoxitine), R (Résistantes), I (Intermédiaire)

### II.2. Sensibilité des souches aux autres familles d'antibiotiques

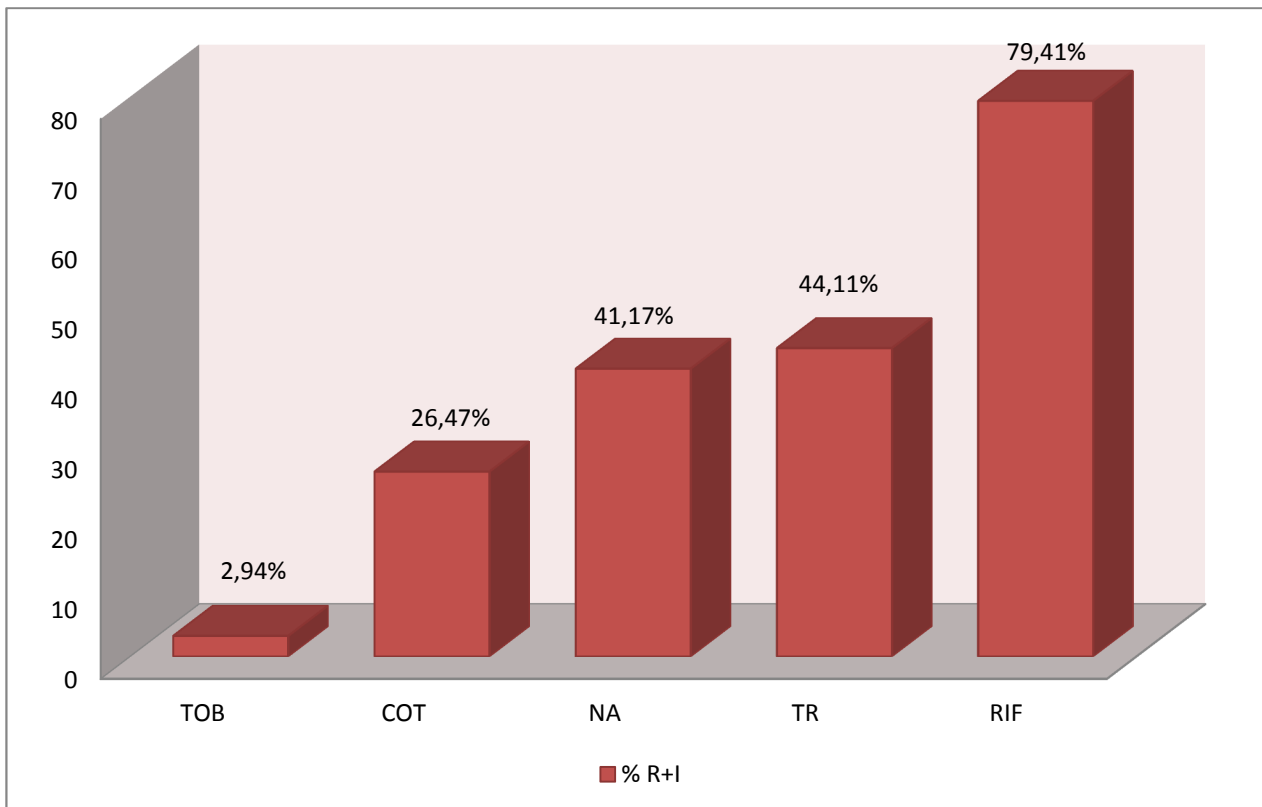
L'ensemble des souches à Gram négatif isolées ont été testées vis-à-vis de 5 antibiotiques autre que les  $\beta$ -lactamines : l'acide nalidixique (Quinolones), Tobramycine (Aminosides), Rifampicine (Rifamycines), Cotrimoxazole et triméthoprime (Sulfamides).

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les 34 souches vis-à-vis de ces antibiotiques sont donnés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VII** : Résultat de la sensibilité des souches à Gram négatif aux antibiotiques autre que les béta-lactamines.

| Code de la souche | COT | NA | TR | TOB | RIF | espèce                          |
|-------------------|-----|----|----|-----|-----|---------------------------------|
| Aig 1             | I   | S  | R  | S   | I   | <i>Acinetobacter sp.</i>        |
| Aig 4             | S   | S  | R  | S   | S   | <i>Pseudomonas sp.</i>          |
| Aig 2             | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Autre BGN</i>                |
| AH 1              | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Autre BGN</i>                |
| Aig 3             | S   | S  | S  | S   | I   | <i>Autre BGN</i>                |
| TH1               | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    |
| TH2               | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Autre BGN</i>                |
| TH5               | R   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| TH6               | I   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| TH7               | R   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| TH9               | R   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| TH10              | S   | S  | I  | S   | I   | <i>Acinetobacter sp.</i>        |
| Tab1              | S   | S  | S  | S   | R   | <i>E.coli</i>                   |
| Tab2              | S   | I  | S  | S   | S   | <i>Aeromonas sp.</i>            |
| TN1               | S   | S  | S  | S   | R   | <i>E.coli</i>                   |
| TN2               | S   | S  | S  | S   | S   | <i>Serrati sp.</i>              |
| T Oul1            | S   | S  | R  | S   | R   | <i>Enterobacter sakasaki</i>    |
| T Oul2            | R   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas sp.</i>          |
| T Oul3            | R   | R  | R  | S   | R   | <i>Pseudomonas sp.</i>          |
| T Oul4            | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Autre BGN</i>                |
| T Ain 1           | S   | I  | S  | S   | S   | <i>Enterobacter agglomerans</i> |
| Bousl 1           | S   | S  | S  | S   | I   | <i>Acinetobacter sp.</i>        |
| T Aami 1          | S   | R  | R  | S   | S   | <i>Autre BGN</i>                |
| L1                | S   | S  | R  | S   | I   | <i>Citrobacter freundii</i>     |
| L2                | S   | S  | R  | S   | R   | <i>E.coli</i>                   |
| L3                | R   | R  | R  | S   | R   | <i>E.coli</i>                   |
| L4                | R   | R  | S  | S   | R   | <i>E.coli</i>                   |
| THay 1            | S   | R  | S  | S   | I   | <i>Autre BGN</i>                |
| THay 2            | S   | S  | I  | S   | I   | <i>Autre BGN</i>                |
| THay 3            | S   | R  | S  | I   | S   | <i>Autre BGN</i>                |
| LA1               | S   | S  | S  | S   | R   | <i>Citrobacter freundii</i>     |
| Ti1               | S   | I  | S  | S   | S   | <i>Pseudomonas sp.</i>          |
| Ti 2              | S   | S  | S  | S   | I   | <i>Pseudomonas sp.</i>          |
| IN 1              | S   | S  | S  | S   | I   | <i>Autre BGN</i>                |

La figure N°4 ci-dessous résume le taux de résistance des 34 souches aux antibiotiques autres que la bêta-lactamines. Elle indique que la majorité des souches isolées sont résistantes à la rifampicine avec un taux de 79,41% (27/34), et des taux élevés de 44,11% (15/34), 41,17% (14/34) sont observés respectivement vis-à-vis la Triméthoprime et l'acide nalidixique, et un taux de résistance 26,47% (9/34) est observé vis-à-vis du co-tremoxasole. La Tobramycine reste plus active sur ces souches isolées avec un taux de résistance de 2,94% (1/34).



**Figure N°4 :** Taux de résistance des souches Gram négative aux autres antibiotiques

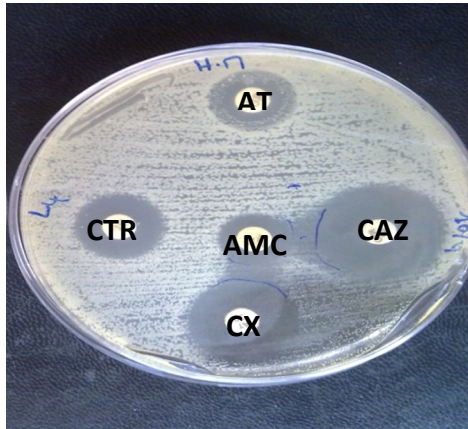
**Légende:** COT (Co-tremoxasole), NA (Acide nalidixique), TR (Triméthoprime), TOB (Tobramycine), RIF (Rifampicine), R(Résistant), I (Intermédiaire)

### III. Recherche des $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)

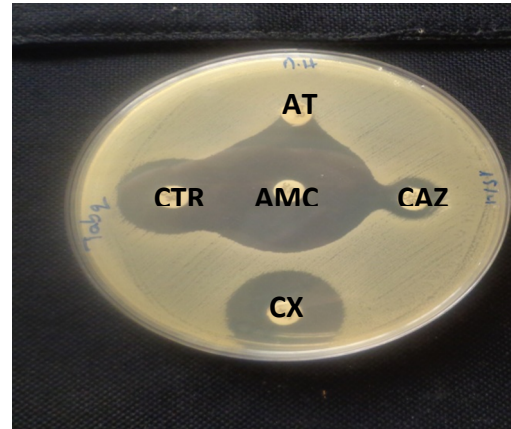
#### III.1. DD-test

Les 34 souches ont été testées pour la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu en utilisant la méthode du double disque. Les diamètres des zones d'inhibitions observées sont résumés dans le tableau VII.

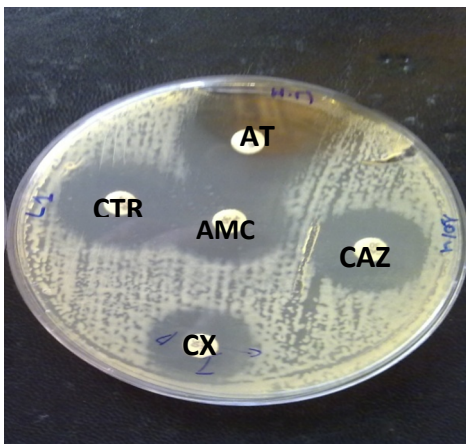
Le DD-test a permis d'observer une image de synergie pour 4 souches (L1, L4, Tab 2, T Ain 1). La figure N°5 montre les images de synergie pour les souches *E.coli* (L4), *Aeromonas sp* (Tab 2), *Citrobacterfreundii* (L1), *Enterobacter agglomerans1*(T Ain 1)



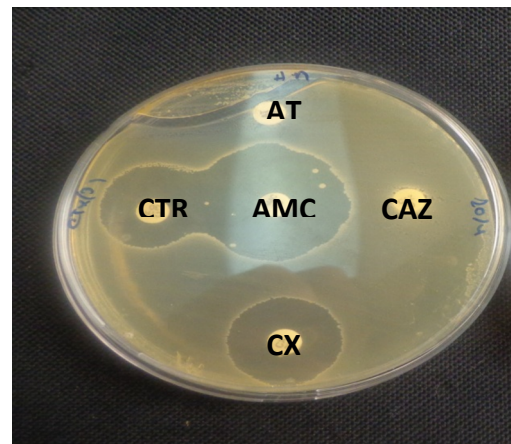
DD-test de la souche L4 (*E.coli*)



DD-test de la souche Tab2 (*Aeromonas sp*)



DD-test de la souche L1 (*Citrobacter freundii*)



DD-test de la souche Tain 1 (*Enterobacter agglomerans1*)

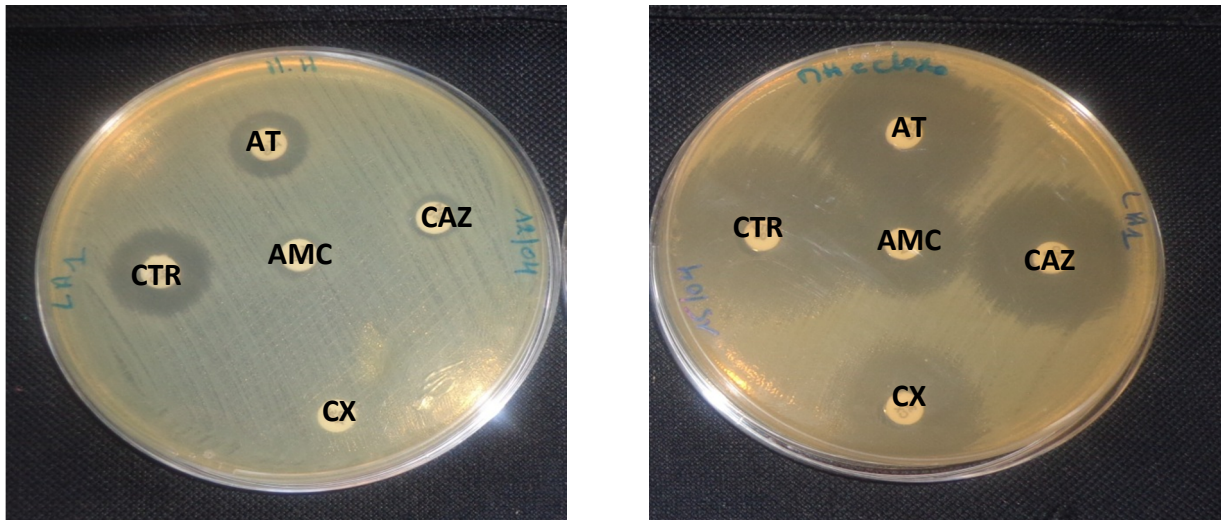
**Figure N°5 :** Résultats de l'image de synergie des 4 souches présentant une BLSE

### III.2. DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

Un DD-test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline est effectué pour les souches d'*Acinetobacter sp* (Bous11) et *Citrobacter freundii* (LA1).



La figure (6) ci-dessous nous permet d'observer la différence de diamètre des zones d'inhibition sur la gélose Mueller Hinton pour la souche *Citrobacter freundii* (LA1). Les résultats des différences de diamètres sont mentionnés dans le tableau VIII.



DD-test sur MH de la souche LA1

DD-test sur MH+cloxacilline de la souche LA1

**Figure N°6** : DD-test de la souche LA1 sur MH et sur MH+cloxacilline.

**Tableau VIII** : comparaison entre les diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton et Mueller Hinton additionnée à la cloxacilline.

| Code   |                | CAZ   | AMC   | CTR   | AT   | CX | Enzymes                        |
|--------|----------------|-------|-------|-------|------|----|--------------------------------|
| Bousl1 | Ø sur MH       | 19    | 26    | 20    | 23   | 8  | Autre mécanisme de résistance  |
|        | Ø sur MH+cloxa | 21    | 32    | 22    | 25   | 15 |                                |
|        | ≠ (mm)         | 2     | 6     | 2     | 2    | 7  |                                |
| LA1    | Ø sur MH       | 8,72  | 8,65  | 16,74 | 13,5 | 6  | Céphalosporinase hyperproduite |
|        | Ø sur MH+cloxa | 28    | 22    | 30    | 32   | 25 |                                |
|        | ≠ (mm)         | 19,28 | 13,35 | 13,26 | 18,5 | 19 |                                |

**Légende** : MH : Mueller Hinton, Ø : Diamètre de la zone d'inhibition, MH+cloxa : Mueller Hinton additionnée à la cloxacilline, ≠ : différence entre les diamètres

Le tableau (VIII) ci-dessus indique une forte augmentation de la zone d'inhibition de plus de 6mm autour des antibiotiques pour la souche *Citrobacter freundii* ce qui s'explique par une



hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ainsi une faible augmentation de la zone d'inhibition pour la souche d'*Acinetobacter sp.*

### IV. Détermination des CMI

Toutes les souches présentant un profil de résistance à la CAZ et/ou CTR ont été testées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la Céfotazidime.

Les résultats de CMI sont donnés dans le tableau suivant :

**Tableau IX:** Concentration inhibitrice de l'antibiotiques CAZ testés sur les souches résistantes.

| Code et la souche                      | CMI (CAZ) | Code et la souche                            | CMI (CAZ) |
|--|-----------|--|-----------|
| TH 1 ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )  | <4        | Bousl 1 ( <i>Acinetobacter sp</i> )          | 8         |
| TH 9 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | <4        | Tab 2 ( <i>Aeromonas sp</i> )                | >64       |
| TH 10 ( <i>Acinetobacter sp</i> )      | >4        | T Hay 1 (autre bacille à Gram négatif)       | 32        |
| Aig 3 (autre bacille à Gram négatif)   | 32        | T Hay 2 (autre bacille à Gram négatif)       | 8         |
| L1 ( <i>Citrobacter freundii</i> )     | 4         | T Hay 3 (autre bacille à Gram négatif)       | <4        |
| L3 ( <i>Escherichia coli</i> )         | 16        | T Ain 1 ( <i>Enterobacter agglomerans</i> 1) | >64       |
| L4 ( <i>Escherichia coli</i> )         | 64        | T Oul 1 ( <i>Enterobacter sakazakii</i> )    | 32        |
| LA 1 ( <i>Citrobacter freundii</i> )   | 32        | T Aami 1 (autre bacille à Gram négatif)      | 64        |
| Ti 1 ( <i>Pseudomonas sp</i> )         | <4        | TN 1 ( <i>Escherichia coli</i> )             | <4        |
| Ti 2 ( <i>Pseudomonas sp</i> )         | <4        | IN 1 (autre bacille à Gram négatif)          | <4        |

Les CMI de la céftazidime sont de niveau variable de 4 µg/ml à plus de 64 µg/ml.

La figure ci-dessous montre l'image de CMI de la souche de *Escherichia coli* qui montre la croissance de cette souche même avec une concentration élevé (64 µg/ml) à la céftazidime.



**Figure N°7 :** Image de CMI de la souche *Escherichia coli*

# **Discussion**

Durant cette étude nous nous sommes intéressés à la qualité bactériologique de 22 eaux de sources de la willaya de Bejaia.

Des bactéries à Gram négatif ont été isolées de ces eaux de source destinées à la consommation. En effet, on a identifié 34 souches à Gram négatif résistantes à la CAZ et/ou au CTX à une concentration de 2µg/ml regroupées dans 4 grandes familles, parmi les 34 souches étudiées, 11 souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* dont *Escherichia coli* est l'espèce la plus dominante avec un nombre de 5 souches, suivi par *Citrobacter freundii* avec 2 souches, une souche de *Enterobacter agglomerans*, de *Enterobacter sakazakii*, de *Klebsiella pneumoniae*, et une souche de *Serratia sp.* respectivement. 23 souches font partie des bacilles à Gram négatif non fermentaires dont 9 souches appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae* (5 souches *Pseudomonas sp* et 4 souches *Pseudomonas aeruginosa*) et 3 souches d'*Acinetobacter sp* et une souche d'*Aeromonas sp.* Les eaux analysées durant cette étude sont également contaminées par des bactéries à Gram positif, Faria et ses collaborateurs en 2009, ont rapporté la présence de Staphylocoques dans des eaux de consommation (Faria et al., 2009).

Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Falcone-Dias, et ses collaborateurs en 2012, ils ont montré que l'eau minérale naturelle provenant d'une nappe phréatique ou d'un gisement d'eau souterraine n'est pas dépourvue de bactérie et que les micro-organismes les plus souvent trouvés dans l'eau minérale normale mis en bouteille sont les hétérotrophes aérobies appartenant principalement à l'*alpha*, *bêta* et *Gammaproteobacteria* (Falcone-Dias et al., 2012).

La sensibilité aux antibiotiques des souches à Gram négatif isolées a révélé que : 22/34 des souches sont résistantes à l'AMC, 16/34 souches sont résistantes au CTR, 12/34 sont résistantes à l'AT et 19/34 des souches sont résistantes à la Céfoxitine, 15/34 souches sont résistantes à la CAZ, 9/34 souches sont résistantes à la COT et 14/34 souches sont résistantes à NA, 15/34 souches sont résistante au TR, 1/34, 27/34 souches sont résistantes à la TOB et RIF respectivement. Les contaminations des eaux de source par des bactéries résistantes aux antibiotiques sont très peu étudiées.

Coleman et ses collaborateurs ont rapporté la contamination des eaux de source potables canadienne par des *E.coli* résistantes aux antibiotiques (Coleman et al., 2013). Parmi les 5 souches de *Escherichia coli* isolées, 3/5 sont résistantes à au moins un

antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines (L2, L3, L4) et les souches L3 et L4 présentent une résistance vis-à-vis de 3 antibiotiques autre que les  $\beta$ -lactamines, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Coleman et *al.* en 2013, qui ont trouvé que 4,5% des échantillons d'eau de source étaient contaminés par des *E. coli*, parmi les souches isolées 10,5% étaient des *E. coli* résistants à un ou plusieurs classes d'antibiotiques dont 3,7%, sont résistants à au moins trois classes d'antibiotiques (Coleman et *al.*, 2013).

Les souches d'*E. coli* sont naturellement sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique de classe C qui est exprimée à très bas niveau (Lavigne et *al.*, 2002). La résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines repose essentiellement sur la synthèse de  $\beta$ -lactamases plasmidiques généralement sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Maurin et *al.*, 1995). L'étude faite par Jiang et ses collaborateurs en 2013 confirme la présence du gène TEM avec des concentrations allant de  $1,4 \times 10^3$  à  $2,0 \times 10^4$  copies/ml dans des échantillons d'eau de source (Jiang et *al.*, 2013). La résistance aux  $\beta$ -lactamines conférée par la synthèse de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux différentes autres classes d'antibiotiques telles que le triméthoprime, quinolones, céphamycines, aminosides et tétracyclines (Falagas et *al.*, 2009).

Dans notre étude, la souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée résiste à la plupart des antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines (4/5) testés. La  $\beta$ -lactamase SHV1 produite par *K. pneumoniae* est responsable d'environ 20% des résistances plasmidiques à l'ampicilline chez cette espèce (Bradford, 2001). Des mutants de TEM et SHV sont capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames (Avril et *al.*, 2000).

Deux souches de *Enterobacter sp.* ont été isolées des eaux de sources analysées (*Enterobacter sakazakii* et *Enterobacter agglomerans* 1). La souche de *Enterobacter sakazakii* résiste à tous les  $\beta$ -lactamines (5/5) testés, et au triméthoprime, par contre *Enterobacter agglomerans* 1 résiste à la CAZ, CTR, AT, et aussi à l'acide nalidixique, cette souche présente une image de synergie, ce qui indique que la résistance aux  $\beta$ -lactamines de cette souche est probablement due à la production d'une BLSE associée à l'hyperproduction de son AmpC. Effectivement, la résistance de *Enterobacter sp.* aux C3G est le plus souvent causée par une hyperproduction de  $\beta$ -lactamases de type AmpC (David et Paterson, 2006).

Dans cette étude nous avons isolé 9 souches appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*. Dont les 4 souches de *P. aeruginosa* sont résistantes à 3/4 des molécules de  $\beta$ -lactamine testées ainsi aux autres antibiotiques appartenant aux autres familles. La

tobramycine s'avère être la seule molécule active sur ces souches. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Vaz-Moreira et ses collaborateurs en 2012, l'ensemble des souches de *Pseudomonas* isolées dans leur étude ont un taux élevé de résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, la CAZ à une meilleure activité sur ces souches avec un taux de résistance de 18%. Un taux de 80% des souches sont résistantes à la céphalotine, 78% des souches isolées sont résistantes à la Co-trimoxazole, 36% de ces souches sont résistantes à l'acide nalidixique. La tobramycine, amikacine, gentamicine restent les plus actives sur ces souches dans cette même étude (Vaz-Moreira et al., 2012). Naturellement résistant à plusieurs aminosides dont la kanamycine par la production d'une phosphotransférase APH (3')-IIb. Et Presque toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* produisent une B-lactamase à large spectre, AmpC inducible. Les niveaux de sensibilité de cette espèce aux  $\beta$ -lactamines, aux aminosides, aux quinolones et aux sulfamides, au triméthoprime, dépendent en grande partie de la production constitutive d'une pompe dénommée MexAB-OprM et de la production inducible d'une autre pompe appelée MexXY/OprM (Mérens et al. ; 2011).

Durant notre étude nous avons isolé une seule souche de *Aeromonas sp*, cette dernière présente une résistance vis-à-vis de la CAZ, du CTR et de l'AT. Elle présente un profil de résistance différent que celui rapporté par Carvalho et ses collaborateurs en 2012 qui ont étudié la résistance aux antibiotiques des souches de *Aeromonas sp* dans les eaux. Toutes les souches isolées étaient sensibles à la ceftazidime et l'aztreonam (Carvalho et al., 2012). L'étude de la sensibilité de la souche aux autres familles d'antibiotiques, présente une résistance intermédiaire à l'acide nalidixique, et une sensibilité vis-à-vis des autres antibiotiques. Les quinolones et les fluoroquinolones sont très actifs sur les espèces d'*Aeromonas sp*. L'acquisition de la résistance aux quinolones par les bactéries Gram négatif a été principalement liée aux mutations dans les QRDRs des gènes de *gyrA* et de *parC* (Alcaide et al., 2010).

Les souches de *Aeromonas sp* (Tab 2) et *Enterobacter agglomerans* (T Ain 1) présentent une concentration minimale inhibitrice de la ceftazidime supérieure à 64  $\mu$ g/ml, cela est probablement dû à leurs productions d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendue associée à hyperproduction de céphalosporinase de classe C. La souche *E. coli* (L4), présente également une concentration minimale inhibitrice de la ceftazidime supérieure à 64  $\mu$ g/ml, cela est probablement dû à leurs productions d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendue.

# **Conclusion**

Au cours de cette présente étude qui s'est déroulée au laboratoire d'Ecologie Microbienne à l'université A. Mira de Bejaia, ou nous avons étudié la contamination de 22 sources d'eau de la wilaya de Bejaia par des bactéries résistantes, nous avons obtenu les résultats suivants :

- Sur les 22 prélèvements effectués, 168 souches sont isolées parmi lesquelles 34 souches sont identifiées comme étant des bacilles à Gram négatif, dont 11 souches d'entérobactéries, 9 du genre *Pseudomonas*, 3 *Acinetobacter*, 1 souche d'*Aeromonas*, et 10 souches appartenant à d'autres familles de bacilles Gram négatif.
- L'étude de la sensibilité des souches aux  $\beta$ -lactamines, a révélé que 22/34 des souches Gram négatif sont résistantes à l'AMC, 16/34 au CTR et 15/34 à la CAZ.
- Parmi les souches résistantes, 04 souches s'avèrent productrices de BLSE.
- La sensibilité des souches aux autres antibiotiques, était de : 9/34 souches sont résistant à la COT, 14/34 à NA, 15/34 au TR, 1/34 à TOB, et 27/34 à la RIF.
- La détermination des CMI de la céftazidime, a révélé une variabilité : 4 souches présentent une  $CMI \geq 64 \mu\text{g/ml}$ .

Les résultats de cette étude attirent une attention particulière sur le degré de contamination des eaux de source par des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, durant cette étude nous avons isolé des souches d'entérobactéries résistantes dont des *E. Coli* qui sont considérées comme des indicateurs de contamination fécale résistantes aux  $\beta$ -lactamines avec production de BLSE.

Les résultats obtenus nous confirme donc que l'eau de source peut servir de réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques et qui sert à la transmission de ces microorganismes résistants à l'homme ainsi qu'aux animaux.

Nous souhaitons que les autorités prennent conscience de la gravité de la situation, en prenant compte :

- ✓ L'aménagement des points d'eau, telles que les sources.
- ✓ La protection de la nappe phréatique par la construction d'installation d'évacuation des excréments et des ordures ménagers.
- ✓ Le contrôle et le traitement régulier des eaux de consommation.
- ✓ Ne pas négliger l'entourage de la source d'eau qui est capable d'être la cause de la présence des bactéries résistance aux antibiotiques.

Les résultats obtenus au cours de notre étude sont préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- ✓ La détermination de l'évolution de la contamination des eaux de sources dans le temps.
- ✓ L'extension de la zone d'étude et l'augmentation du nombre de prélèvements pour une meilleure prévention de la dissémination.
- ✓ L'élargissement de l'étude sur toute la flore environnementale, pour inclure les bactéries à Gram positif et la flore autochtone, afin de déterminer la place des bactéries multirésistantes parmi ces germes.
- ✓ Déterminer les mécanismes génétiques de la résistance aux antibiotiques par des techniques de biologie moléculaire qui confirmeront les phénotypes de résistance probables.



# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- Alcaide E, Blasco MD, and Esteve C.(2010).** Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*.**161**: 40-45.
- Allen H K, Donato J, Huimi Wang H, Karen A Cloud-Hansen K A, Davies J and Handelsman J. (2010).** Call of wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Microbiology*.**8**: 251-259.
- Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, and Bakour R. (2011).** Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Isolated Bacteria from Seawater of Algiers Beaches (Algeria). *Microbes Environ.* Vol. 27, No. 1, 80–86.
- Andersson DI and Hughes D (2012).** Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates*. **15**: 162– 172.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H (2000).** Bactériologie clinique. caractères généraux des *Staphylococcus aureus*. Ed.Ellipses Paris, pp7-28.
- Baquero F, Martinez JL, and Canto R. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*.**19**: 260–265.
- Bligny JC, and Hartemann P. (2005).** Les eaux minérales naturelles et les eaux de source : cadre réglementaire et technique. *C. R. Geoscience*. **337** : 279–284.
- Carvalho MJ, Martínez-Murcia A, Esteves AC, Correia A, Saavedra MJ. (2012).** Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption *International Journal of Food Microbiology*.**159**: 230–239.
- Coleman BL, Louie M, Salvadori M I, McEwen SA, Neumann N, Sibley K, Irwin RJ, Jamieson FB, Daignault D, Majury A, Braithwaite S, Crago B, and McGeer AJ. (2013).** Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water research*.**47**: 3026 -3036.
- David L and Paterson MD. (2006).** Résistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of infection control*, **34**: 20-28.

## Références bibliographiques

---

- Delarras C et Trébaol B. (2003).** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation, prélèvements, analyses. Ed. Tec et Doc, EMinter. Londres-Paris-New York. 48-51p.
- Falagas ME and Karageorgopoulos DE. (2009).** Extend-spectrum  $\beta$ -lactamase producing organisms. *J. Hosp. Infect.* 1-10.
- Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, and Manaia CM. (2012).** Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water research.* **46**: 612 -3622.
- Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes OC, and Manaia CM. (2009).** Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment.* **407**: 3876–3882
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, and Dantas G. (2012).** The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *SCIENCE VOL* **337** **31**.
- Gao P, Munir M, and Xagorarakis I. (2012).** Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment.* **421–422**: 173–183.
- Isozumi R, Yoshimatsu K, Yamashiro T, Hasebe F, Nguyen BM, Cuong Ngo T, Yasuda SP, Koma T, Shimizu K, and Arikawa J. (2012).** bla<sub>NDM-1</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* from Environment, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 18, No. 8, 1383-1384.
- Jarlier V, MH Nicolas, Fournier G, and Philoppon A. (1988).** Extended- broad- spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patters. *Rev infect Dis.* **10**: 867-878.
- Jiang CL, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, and Yin D. (2013).** Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of the Total Environment.* **458–460**: 267–272.
- Kempf I et Zeitouni S. (2012).** Cout biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Pathologie Biologie.* **60**: e9–e14.

## Références bibliographiques

---

**Kümmerer K. (2004).** Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) **54**: 311–320.

**Lapworth DJ, Baran N, Stuart ME, and Ward RS. (2012).** Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*. **163**: 287-303.

**Lavigne JP, Sotto A, Merle C, Jourdan J, Soussy CJ et Sirot D. (2002).** Résistance enzymatique d'*Escherechia coli* aux bêtalactamines et prévalence en clinique. *Pathologie Biologie*. **50**:388-393.

**Martinez JL, (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. **157** :2893–2902.

**Maurin M, Musso D, Charrel R, Perez R, N’Guyen A., Dumon H et De Micco P.(1995).** Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (bacille à Gram négatif aérobies). *Médecine et Maladies Infectieuses*. 25, 508-514.

**Mckeont DM, CALABRESE JP, and BISSONNETTE GK. (1995).**Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **0043-1354**: 0001.

**Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo JD, and Jeannot K. (2011).** *Pseudomonasaeruginosa* et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*.N°**435** : 42-62.

**Messi P, Guerrieri E, and Bondi M. (2005).** Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. *Science of the Total Environment* **346**: 213–219.

**Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. (2011).** Clinical and Laboratory Standards institute. M100-S21 Vol. **31** No. 1.

**Servais P and Passerat J., (2009).** Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment*. **408**: 365–372.

**Vaz-Moreira I, Nunes OC, and and Manaia CM.(2012).** Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environment*. **42**: 366–374.

## Références bibliographiques

---

**Zheng S, Qiu X, Chen B, Yu X, Liu Z, Zhong G, Li H, Chen M, Sun G, Huang H, Yu W, Freestone D. (2011).** Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: Source, distribution and bacterial resistance. *Chemosphere*.**84**: 1677–1685.

**Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, and Fanelli R. (2010).** Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*.**179**: 1042–1048.

# **Annexes**

## *Annexe I*

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

|  |                |
|--|----------------|
| <b>Gélose Mac Conkey (fluka®)</b>              | pH=7,4+/- 0,2  |
| Peptone  | 20             |
| Lactose  | 10             |
| Sels biliaires                                 | 5              |
| Rouge neutre                                   | 0,075          |
| Chlorure de sodium                             | 05             |
| Agar   | 12             |
| <b>Gélose Mueller Hinton (Condapronadisa®)</b> | )pH=7,4+/- 0,2 |
| Infusion de viande de boeuf                    | 2              |
| Hydrolysate de caséine                         | 17,5           |
| Amidon   | 1,5            |
| Agar   | 17             |
| <b>Gélose TSI</b>                              | pH=7,4+/- 0,2  |
| Extrait de viande de boeuf                     | 03             |
| Extrait de levure                              | 03             |
| 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=6,6+/-0,1   |
| 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>Gélose Cétrimide (fluka®)</b> | pH=7,2+/-0,2 |
| Sulfate de potassium             | 10           |



|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Chlorure de magnesium             | 1,4   |
| Gélatine peptone                  | 20g/l |
| Bromure d'ammoniumcetiltrimethyle | 0,3   |
| Agar                              | 15g/l |

**Gélose BEA (l'institut de pasteur)**

**Gélose Héктоen (condapronodisa)** pH=7,5+/- 0,2

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Peptone de viande           | 12     |
| Lactose                     | 12     |
| Saccharose                  | 12     |
| Chlorure de sodium          | 5      |
| Thiosulfate de sodium       | 5      |
| Extrait de levure           | 3      |
| Citrate d'ammonium ferrique | 15     |
| Sels biliaire N°3           | 9      |
| Salicine                    | 2      |
| Acide fuchsin               | 0, 1   |
| Bleu debromothymol          | 0, 064 |
| Agar                        | 14     |

**Gélose Chapman (Condapronadisa®)** pH=7,4+/- 0,2

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Chlorure de sodium             | 75    |
| D mannitol                     | 10    |
| Rouge de phénol                | 0,025 |
| Extrait de viande              | 1     |
| Peptone de caséine             | 5     |
| Peptic digest of animal tissue | 5     |
| Agar                           | 15    |

**Bouillon nutritif** pH=7,5+/- 0,2

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Peptone de viande  | 4,3 |
| Peptone de caseine | 05  |

|   |               |
|---|---------------|
| Chlorure de sodium  | 6,4           |
| <b>L'eau physiologique</b>  | pH=7+/- 0,2   |
| NaCl  | 9             |
| <b>Milieu de rappaport-vasiliadis(fluka)</b>                      | pH=5,2+/- 0,2 |
| Peptone de soja   | 4,5g/l        |
| Chlorure de sodium  | 7,2           |
| Phosphate monopotassium   | 1,26          |
| Phosphate dipotassium   | 0,18          |
| Chlorure de magnésium   | 13,58         |
| Vert de malachite   | 0,036         |
| Eau distillée   | 1000 ml       |
| <b>Milieu de BCPL(HiMEDIA®)</b>                                   | pH=7,2+/-0,2  |
| Extrait de viande de bœuf   | 3             |
| Lactose   | 10            |
| Pourpre de bromocrésolé   | 0,02          |
| Chlorure de sodium  | 5             |
| Peptic digest of animal tissue                                    | 10            |
| <b>L'eau peptone tamponnée</b>                                    | pH=7+/- 0,2   |
| Peptone   | 10            |
| NaCl  | 5             |
| Potassium dihydrogenophosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 30            |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Di sodium hydrogenophosphate     | 9             |
| <b>Giolitti contoni</b>   | pH=6,9+/- 0,2 |
| Tryptone  | 10            |
| Extrait de viande   | 5             |
| Extrait de levure   | 5             |
| Chlorure de sodium  | 5             |
| Glycine   | 20            |
| Pyruvate de sodium  | 3             |

## *Annexe II*

### 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)

$\alpha$  Naphtol.....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

### *Annexe III*

**Tableau I :** Résultats de l'identification par la galerie biochimique (API 20E, Classique)

| Code       | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |   |
|------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| ELH1       | +    | -   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | +  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |   |
| L3         | +    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -  | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | -   | + |
| L4         | +    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -  | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | - |
| LAZ1       | +    | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | +   | - |
| LAZ2       | +    | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | -   | +   | -   | - |
| BOUSL<br>1 | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | - |
| THay3      | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| IN1        | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| TN2        | +    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  | +   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | +   | -   | +   | + |
| Ti1        | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | - |
| Tab2       | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Tab3       | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| Aamir<br>1 | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| ELH10      | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | - |
| Ains1      | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | + |
| THay1      | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| THay2      | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| Ti2        | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | + |
| H9         | -    | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| L1         | +    | +   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | + |
| Oul1       | +    | +   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +  | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | + |

## Résumé

Les eaux souterraines non traitées, utilisées pour la consommation pourraient être une source de la propagation et le transfert de souches résistantes aux antibiotiques. Les analyses bactériologiques des eaux sont effectuées pour la recherche de germes. L'identification des souches est basée sur les tests biochimiques et galerie API20E. La sensibilité des souches aux antibiotiques est réalisée par l'antibiogramme standard. La production de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu est détectée par le test de synergie (DD-test). La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ceftazidime est déterminée sur milieu solide. Sur les 22 prélèvements effectués, 168 souches sont isolées, dont 34 bacilles à Gram négatif, 11 souches d'entérobactéries, 9 du genre *Pseudomonas*, 3 *Acinetobacter*, 1 souche d'*Aeromonas*, et 10 souches appartenant à d'autres familles de bacilles Gram négatif. La sensibilité de ces souches aux antibiotiques (5  $\beta$ -lactamines et 5 appartenant aux autres familles d'antibiotiques) a révélé que 64.70% des souches BGN isolées sont résistantes à l'AMC, 44.11% à la CAZ et 47.05% au CTR. 4 souches sont productrices de BLSE. Les taux de résistance aux autres antibiotiques sont les suivants : 79.47%, 44.11%, 41.17% et 26.47% vis-à-vis de la rifampicine, triméthoprim, acide nalidixique et co-trimoxazole, respectivement. La tobramycine est plus active sur ces souches avec un taux de résistance de 2.94%. Les valeurs des CMI de la céftazidime varient entre 4  $\mu\text{g/ml}$  à plus 64  $\mu\text{g/ml}$ .

**Mots clés:** Eaux de source, analyse bactériologique, bacilles à Gram négatif, antibiotiques, résistance.

## Abstract

The untreated water sources, used for consumption could be a source of the spread and transfer of antibiotic-resistant strains. Bacteriological water analysis are performed for the detection of germs. The identification of strains is based on biochemical tests and API20E gallery. The sensitivity of strains to antibiotics is carried out by standard sensitivity. The production of  $\beta$ -lactamase extended spectrum is detected by the synergy test (SD test). The minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftazidime is determined on solid medium. Of the 22 samples taken, 168 strains were isolated, including 34 Gram-negative bacilli, 11 strains of enterobacteria, 9 *Pseudomonas*, 3 *Acinetobacter*, 1 strain of *Aeromonas*, and 10 strains belonging to other families of Gram negative. The susceptibility of these strains to antibiotics (5  $\beta$ -lactams and 5 belonging to other classes of antibiotics) showed that 64.70% of BGN isolated strains were resistant to AMC, 44.11% to CAZ and 47.05% to CTR. 4 strains produced ESBLs. Percentages of resistance to other antibiotics are as follows: 79.47%, 44.11%, 41.17% and 26.47% for rifampicin, trimethoprim, nalidixic acid and co-trimoxazole, respectively. Tobramycin is more active in these strains with resistance rate of 2.94%. MICs of ceftazidime are values between 4  $\mu\text{g / ml}$  and 64  $\mu\text{g / ml}$ .

**Keywords:** waters source, bacteriological analysis, Gram-negative bacilli, antibiotics, resistance.