

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

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Microbiologie*



## *Mémoire*

*en vue de l'obtention du diplôme de*

## *Master*

*Option : Microbiologie Fondamentale*

## *Thème*

*Etude de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds  
des bactéries  
isolées de milieux naturels*

Présenté par

M<sup>lle</sup> SEMAOUNE Zoubida

M<sup>lle</sup> SEMAOUNE Souad

Soutenu le : 25 juin 2023

Membres de jury :

Mme IDRES .N

Mr TOUATI .A

Mme TAFOUKT.R

MCB

Professeur

MCB

Présidente

Examineur

Promotrice

2022/2023



# *Remerciements*

*Louange à Allah, le tout puissant et miséricordieux qui nous a prodigué le courage et la force afin de mener à terme notre travail*

*Nous remercions :*

*Notre chère promotrice, Mme **TAFOUKT Rima**, pour nous avoir encadrées, Orientées, et encouragé, en nous laissant une grande liberté en toute confiance pour mener à bien ce travail.*

*Nous remercions les membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous remerciments s'adressent aussi à Mme **RAHMANI.D** et à L'équipe du laboratoire de Microbiologie de l'université (Enseignants, doctorants, ingénieurs et étudiants) pour leur soutien et pour le matériel mis à notre disposition*

# Dédicace



*Je dédie ce modeste travail :*

*Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde et qui ont sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études, ma douce et précieuse ma chère mère*

***Daouia** et mon cher père **Messaoud***

*A mon futur mari **Omar** pour son soutien dans ma vie et son encouragement lors de la rédaction de ce mémoire*

*A ma grand sœur **Sihem** et son mari **Salim***

*A ma très chère sœur **Sabrina**, et son mari **Aboubaker** et leur adorables fils **Yasser Yanis** et **Loudjain***

*A mon chère frère **Moussa** et sa femme **Dania** et leur cher petit fils **Chihab***

*A ma chère sœur **Sara** et petit ange **Laya***

*A mes chères sœurs : **Feriel**, **Souad**, **Malak***

*A ma tante **Djemaa** et son mari **Omar** et leur enfants : **Issam**, **Lamia**, **Abdessamed***

*A ma grand mere qui nous quitte*

*A mes amis depuis lycée **Sabrina** et **warda** et toute leur famille.*

*A toute La promotion de Microbiologie Fondamentale en particulier **Celina***



*Zoubida*

# Dédicace



*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma mère , et mon père pour lesquels je souhaite une longue et heureuses vie pleine de bonheur, pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites qui ont d'un pas à pas marché ma vie pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements.*

*A mon futur mari **Lamri** pour son soutien dans ma vie et son encouragement lors de la rédaction de ce mémoire*

*A ma grand sœur **Sihem** et son mari **Salim***

*A ma très chère sœur **Sabrina**, et son mari **Aboubaker** et leur adorables fils **Yasser Yanis** et **Loudjain***

*A mon chère frère **Moussa** et sa femme **Dania** et leur cher petit fils **Chihab***

*A ma chère sœur **Sara** et petit ange **Laya***

*A mes chères sœurs : **Feriel**, **Zoubida**, **Malak***

*A ma tante **Djemaa** et son mari **Omar** et ses enfants : **Issam**, **Lamia**, **Abdessamed***

*A mes unique amies **Warda** et **Sabrina** et leurs famille*

*A toute La promotion de Microbiologie Fondamentale en particulier **Celina** et **Nadjet***



*Souad*

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| <b>Introduction .....</b> | <b>1</b> |
|---------------------------|----------|

## **Matériel et Méthodes**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I.Cadre de l'étude et prélèvement .....</b>                         | <b>6</b>  |
| I.1.site de prélèvement .....  | 6         |
| I.1.1.Barrage Ighil Emda kherrata .....                                | 6         |
| I.1.2.Oued adioun kherrata .....                                       | 6         |
| I.2.Prélèvement .....  | 7         |
| <b>II.Recherche des bacilles à Gram negative résistants .....</b>      | <b>7</b>  |
| II.1.Enrichissement .....  | 7         |
| II.2.Isolement et purification.....                                    | 7         |
| II.3.Identification des souches .....                                  | 8         |
| <b>III.Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques .....</b> | <b>10</b> |
| <b>IV.Etude des phénotypes de résistance probable .....</b>            | <b>11</b> |
| IV.1.B-lactamase à spectre étendu (BLSE) .....                         | 11        |
| IV.2.Carbapénémases .....  | 12        |
| <b>V.Etude de la sensibilité aux métaux lourds .....</b>               | <b>13</b> |

## **Résultats et Discussion**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I.Isolement des souches .....</b>                               | <b>15</b> |
| <b>II.Identification des souches .....</b>                         | <b>16</b> |
| <b>III.Sensibilité des souches isolées aux antibiotiques .....</b> | <b>18</b> |
| <b>IV.Recherche des phénotypes de résistance probable.....</b>     | <b>20</b> |
| IV.1.BLSE.....   | 20        |

|   |           |
|---|-----------|
| IV.2.Carbapénémase.....   | 20        |
| <b>V.Détermination des concentration minimale inhibitrice ( CMI )des métaux lourds.....</b> | <b>21</b> |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>Conclusion .....</b> | <b>25</b> |
|-------------------------|-----------|

**Résumer**

**Références bibliographiques**

**Liste des annexes**

## **Liste des tableaux**

**Tableau I :** Sites de prélèvement

**Tableau II :** Aspect des colonies sur gélose chromagarorientation

**Tableau III :** Tests biochimiques classiques

**Tableau IV :** Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

**Tableau V :** Interprétation de l'antibiogramme

**Tableau VI :** Préparation des boîtes à des concentrations graduelles en sulfate de zinc

**Tableau VII :** Préparation des boîtes à des concentrations graduelles en sulfate de cadmium et sulfate de cuivre

**Tableau VIII :** Préparation des souches isolées par site prélèvement

**Tableau IX :** Résultats des tests biochimiques

**Tableau X :** Résultats d'antibiogramme des souches testés

**Tableau XI :** Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds

## **Listes des figures**

**Figure N°1 :** Visualisation de barrage d'Ighil Emda (Wilaya de Bejaia ) sur image satellitaire Alsat-2A (ASAL)

**Figure N°2 :** Disposition des disques d'antibiotiques utilisé lors du D-D test

**Figure N°3 :** Test CIM (Van Zwaluwet all 2015)

**Figure N° 4 :** Photo qui montre l'aspect des colonies sur le milieu Mac conkey

**Figure N°5 :** Photo des souches repiquées sur le milieu chromagar

**Figure N°6 :** Répartition des souche isolées par espece

**Figure N°7 :** Photo qui montre les résultats du test CIM

**Figure N° 8 :** Photo qui montre les résultats du test CIM du métaux lourds



## Liste des abréviations

CAZ : Céfotaxime

ATM : Aztréonam

AMC : Amoxicilline / acide clavulanique

ERT/ETP : Ertapénème

FOX : Céfoxitine

MRP : Méropénème

IMI : Imipénème

CS : Colistine

BLSE :  $\beta$ -lactamase spectre étendu

MH: Muller hinton

I: Intermédiaire

S: Sensible

R:Resistant

TDA:tryptophane désaminase

CMI : concentration minimal inhibitrice



*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).

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 *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 antibiotiques appartenant à plusieurs classes, telles que les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les quinolones, sont utilisées dans le traitement des infections causées par des entérobactéries. Les entérobactéries ont su développer différents mécanismes de résistance limitant l'activité des antibiotiques (Rupée et al,2015).

Parmi ces mécanismes de résistance aux antibiotiques: 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). -Le contournement cible : les stratégies de contournement de la 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). -La 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).

les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus largement prescrits et utilisés en thérapeutique. Chez les bactéries à Gram négatif - y compris les entérobactéries, une famille qui comprend de nombreuses espèces cliniquement pertinentes - la production de  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent l'anneau  $\beta$ -lactame, inactivant ainsi l'antibiotique, est la cause prédominante de la résistance aux  $\beta$ -lactamines (De Angelis et al., 2020). Ces enzymes sont regroupées en quatre classes (A, B, C et D) sur la base des séquences d'acides aminés. À l'exception des métalloenzymes de la classe B, communément appelées métallo- $\beta$ -lactamases

(MBL), les  $\beta$ -lactamases des classes A, C ou D appartiennent à la famille des hydrolases réactives à la serine (Bush et Jacoby, 2010)

Il existe près de 4900  $\beta$ -lactamases, ce nombre continue d'augmenter considérablement, probablement en raison de l'accès au séquençage génétique. Parmi ces enzymes, les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases suscitent le plus grand intérêt clinique (De Angelis et al., 2020).

Les BLSE hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines à spectre étroit et l'aztréonam. En revanche, les BLSE ne peuvent pas dégrader efficacement les céphamycines, les carbapénèmes et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. En revanche, les BLSE ne peuvent pas dégrader efficacement les céphamycines, les carbapénèmes et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. La majorité des BLSE appartiennent aux familles SHV, TEM et CTX-M; plus rarement, elles sont dérivées des enzymes BES, GES-1, VEB et PER (Drawz et Bonomo, 2010).

Ces dernières années, la prescription des carbapénèmes est devenue de plus en plus fréquente dans le cas d'infection documentée à bactérie productrice de BLSE, mais également en traitement probabiliste en cas d'infections nosocomiales sévères. Cependant, comme pour toutes les  $\beta$ -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont apparues. Cette résistance résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des  $\beta$ -lactamases (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014). Le premier associe la production à haut niveau d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou bien d'une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE) à une diminution de la perméabilité membranaire de la souche bactérienne. Le second mécanisme est directement lié à l'expression de  $\beta$ -lactamases particulières hydrolysant de manière très significative les carbapénèmes, ces enzymes étant de ce fait appelées "carbapénémases" (Poirel et al, 2013).

Les antibiotiques sont administrés en grande quantité à l'Homme et aux animaux pour traiter un grand nombre d'infections. 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).

Les stations d'épuration 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*, des 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).

La résistance aux antibiotiques est limitée aux environnements cliniques. Cependant, plusieurs études ont démontré la dissémination d'organismes résistants dans l'environnement, en particulier dans l'eau. En effet, l'eau est l'un des habitats microbiens les plus importants de notre planète et il a été prouvé que les gènes de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés dans différents écosystèmes aquatiques. L'eau peut jouer alors un rôle crucial dans la propagation de la résistance aux antibiotiques entre l'environnement naturel, l'Homme et les animaux.

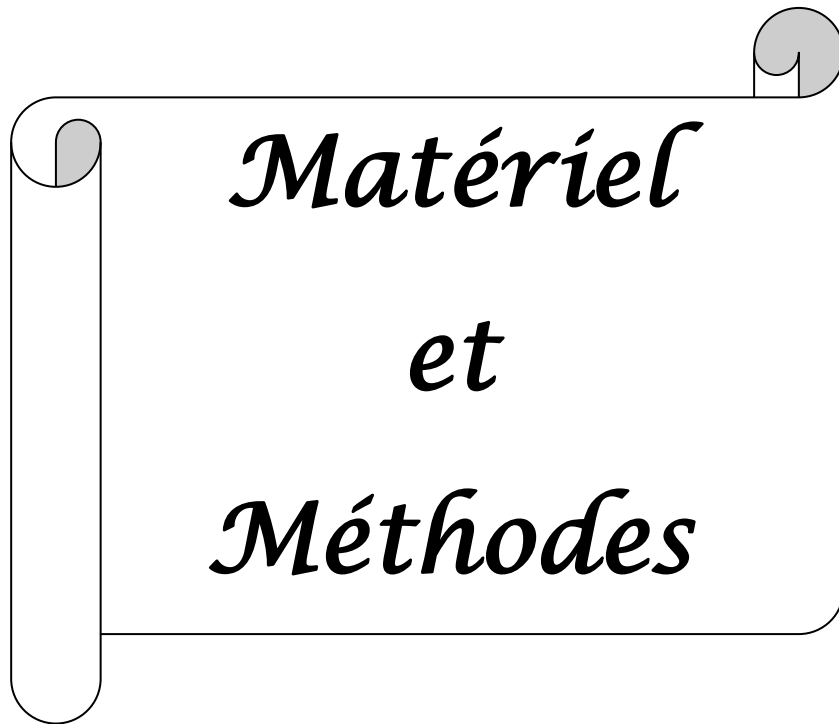
Les métaux lourds sont présents partout dans notre environnement : dans l'eau, l'air, les aliments, les métaux lourds qui entrent dans l'environnement aquatique proviennent de sources naturelles et de sources anthropogènes. Leur entrée peut être le résultat soit de déversements effectués directement dans les écosystèmes marins et dans les eaux douces, soit d'un cheminement indirect comme dans le cas des décharges sèches et humides et du ruissellement agricole. Parmi les importantes sources naturelles, citons l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts. La contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses mais sporadiques dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma (Zoller, 1984). Les principales sources de mercure

atmosphérique, par exemple, proviennent du dégazage des terres et des océans (GESAMP, 1988).

Une cellule peut développer des systèmes de résistance aux métaux dans le but de protéger les composants cellulaires sensibles. La limitation d'accès métallique ou en modifiant les composants cellulaires diminue leur sensibilité aux métaux. Plusieurs facteurs déterminent la mesure de la résistance dans un micro-organisme : le type et le nombre de mécanismes pour l'absorption des métaux, le rôle de chaque métal joue dans le métabolisme normal et la présence de gènes localisés sur des plasmides, des chromosomes ou des transposons qui contrôlent la résistance aux métaux. La résistance naturelle peut prendre la forme de mutations dans des composants cellulaires qui empêchent l'interaction avec des métaux ou des modifications dans la composition de la membrane cellulaire (Bruins et al., 2000). La résistance aux métaux lourds peut être probablement due à l'extrusion de l'espèce en métal, de la bioaccumulation, de la transformation, de la production des protéines obligatoires à faible poids moléculaire, etc. La survie des micro-organismes dans l'environnement pollué dépend des propriétés biochimiques, structurales, physiologiques intrinsèques et/ou de l'adaptation génétique comprenant les changements morphologiques des cellules (Tewari et al, 2013).

Actuellement, en Algérie, des études ont rapporté la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement (Tafoukt et al.,2017, Tafoukt et al.,2018, Mairi et al., 2019). Mais peu d'études rapportent la résistance des bactéries aux métaux lourds. C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer la contamination du barrage Ighil Emda et oued Adjioun par des bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques et aux métaux lourds et la caractérisation des phénotypes de résistance des différentes souches isolées à partir de ce bassin qui est en relation directe et indirecte avec la vie humaine dans la Daira de kherrata wilaya de Bejaia. Afin de développer ces aspects nous avons adoptés la méthodologie suivante:

- ✓ Prélèvement des échantillons d'eau et des sédiments à partir de ces deux endroits.
- ✓ Isolement des bactéries à Gram négatif à partir d'eau de surface et des sédiments.
- ✓ Identification des souches par les tests biochimique classique.
- ✓ Etude des phénotypes de résistance aux antibiotiques.
- ✓ Etude de la sensibilité des souches aux métaux lourds.



*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*

## **I. Cadre de l'étude et prélèvement**

Les bactéries résistantes aux antibiotiques ont été retrouvées dans différentes niches écologiques dans le monde, dont l'environnement hydrique. Dans cette étude, nous souhaitons rechercher la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques et aux métaux lourds dans l'eau du barrage Ighil Emda de kherrata et l'eau de l'Oued de Adjouin kherrata.

Notre étude s'est déroulée durant la période allant du 2 Mai au 8 Juin 2023, au niveau du laboratoire de Microbiologie 2 de l'université A Mira de Bejaia.

### **I.1. Sites de prélèvements**

#### **I.1.1. Barrage Ighil Emda kherrata**

Le barrage d'Ighil Emda est construit par l'entreprise française Campenon Bernard, se situe à deux kilomètres au Sud de la ville de Kherrata et à 60 km du chef lieu de la wilaya de Béjaïa en Algérie. Il a une capacité de 160 millions de mètres cube d'eaux destinés à l'alimentation de l'usine hydro électrique de Darguina et à l'irrigation ( ASAL).



**Figure N°1:** Visualisation des barrages d'Ighil Emda (Wilaya de Bejaia) sur image satellitaire Alsat-2A ( ASAL).

#### **I.1.2. Oued Adjouin kherrata**

L'oued a une longueur de 10 km, il se jette dans le barrage Ighil Emda. Il est situé dans la route nationale numéro 32A à Adjouin commune de Draâ El-Kaïd, Daira de Kherrata wilaya de Béjaïa , qui relie Kharrata et Bouandas.



## **I.2. Prélèvement**

Nous avons opté pour cinq sites de prélèvements. Le choix de ces sites a été dicté par l'origine des activités anthropiques et l'accessibilité des sites (Tableau I). Les échantillons d'eaux et de sédiments ont été collectés le 07/05/2023.

Les échantillons d'eau ont été effectués dans des flacons en verre d'une capacité de 250 ml préalablement stérilisés. Concernant les échantillons de sédiments, ils ont été effectués dans des boîtes stériles. L'ouverture et la fermeture des flacons et des boîtes se fait à l'intérieur de l'eau pour éviter toute contamination. Les échantillons sont transportés dans une glacière au laboratoire.

**Tableau I:** Sites de prélèvement

| <b>Sites</b> | <b>lieu</b> | <b>Activité</b>              |
|--------------|-------------|------------------------------|
| Site 1       | oued adjoun | Aucune activité              |
| Sites 2      | Barrage     | Fort habitations à proximité |
| Sites 3      | Barrage     | Agriculture familial         |
| Sites 4      | Barrage     | élevage                      |
| Sites 5      | Barrage     | Aucune activité              |

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

### **II.1. Enrichissement**

Nous avonsensemencé 50ml d'eau à analyser de chaque échantillon dans 100 ml de bouillon nutritif. 10 g de sédiment de chaque échantillon sontensemencés dans 50ml de bouillon nutritif. Les flacons sont incubés pendant 18 à 24 h à 37°C.

### **II.2. Isolement et purification**

A partir des bouillons d'enrichissements positifs (un flacon présentant un trouble) et à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous avonsensemencé des boîtes de Petri, contenant de la gélose Mac Conkey, additionnées d'imipénème à une concentration finale de 1µg/ml. Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après 24 h d'incubation, les colonies ont fait l'objet de repiquages successifs sur le même milieu d'isolement.

### **II.3. Identification des souches**

Elle est basée sur les caractères cultureux (couleur, taille, aspect des colonies) sur la gélose Mac conkey et la couleur des colonies sur la gélose Chromagar (tableau II).

**Tableau II:** aspect des colonies sur gélose chromagar orientation

| <b>Microorganism</b>            | <b>Couleur des colonies</b>     |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>KES</i>                      | Bleu métallique                 |
| <i>Citrobacter</i>              | Bleu métallique avec halo rouge |
| <i>E. coli.</i>                 | rose foncé à rougeâtre          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Translucide, crème à bleu       |
| <i>Proteus mirabilis.</i>       | Halo brun                       |
| <i>Acinetobacter baumannii.</i> | blanc-jaunâtre.                 |
| <i>Enterococcus</i>             | Bleu turquoise                  |

Des tests biochimiques classiques ont été réalisés afin de compléter l'identification des souches (Tableau III)

**Tableau III:** Tests biochimiques classiques réalisés

| <b>Tests</b>   | <b>principe</b>   | <b>Lecture</b>   |
|--|---|--|
| <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<br>Ensemencement à partir d'une suspension bactérienne de la pente par stries sérés 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 de Simmons.</b> | Ensemencement par stries sérés de la pente. Incubation à 37°C/24h à 7 jours.  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Un virage au bleu indique un test positif.</li> </ul>   |
| <b>Utilisation de mannitol comme seul source de carbone sur milieu mannitol mobilité.</b>  | Une pique centrale.<br>Incubation à 37°C/24h.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virage du culot au jaune : Fermentation de mannitol</li> <li>Apparition de bulles d'air : Production de gaz.</li> </ul>   |
| <b>Production d'indole sur milieu eaux peptonée exempte d'indole.</b>                      | Ensemencement du milieu.<br>Incubation à 37°C et 44°C /24h.   | Addition du réactif de Kovacs, l'apparition d'un anneau rouge (+).   |
| <b>Recherche d'uréase et TDA.</b>  | Ensemencement du milieu liquide avec quelques gouttes de la suspension bactérienne.<br>Incubation à 37°C/24h.   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Changement de couleur au rose indique un test positif [uréase (+)].</li> <li>• Addition du réactif de TDA, (+) Virage au marron : TDA (+).</li> </ul>   |

### III. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

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 18 H sur un milieu d'isolement, on prépare une suspension bactérienne, en dissociant 3 à 5 colonies dans 5 ml d'eau physiologique, équivalente au standard Mac Farland 0,5 (~ 10<sup>8</sup> UFC/ml), (CA .SFM. 2013).

#### ✓ Ensemencement

Après une dilution à 10<sup>-1</sup> de l'inoculum préparé, on a ensemencé par écouvillonnage toute la surface du milieu gélosé Muller Hinton en stries serrées, en réalisant 3 orientations successive, on finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Le dépôt des disques d'antibiotiques se fait à l'aide d'une pince stérile (tableau IV). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 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 sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (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)

**Tableau IV:** Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

| Antibiotiques                          | Symboles | Charges (µg) | Familles          |
|--|----------|--------------|-------------------|
| <b>Amoxicilline+acide clavulanique</b> | AMC      | 30           | Aminopenicillines |
| <b>Céftazidime</b>                     | CAZ      | 30           | C3G               |
| <b>Aztréonam</b>                       | ATM      | 30           | Monobactam        |
| <b>Ertapénème</b>                      | ERT/ETP  | 10           | Carbapénèmes      |
| <b>Céfoxitine</b>                      | FOX      | 30           | C2G               |
| <b>Méropénème</b>                      | MRP      | 10           | Carbapénèmes      |
| <b>Imipénème</b>                       | IMI      | 10           | Carbapénèmes      |
| <b>Colistine</b>                       | CS       | 30           | Polymyxine        |

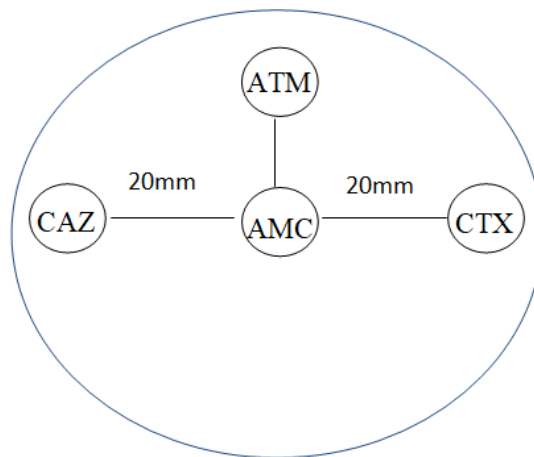
Tableau V: Interprétation de l'antibiogramme

| Diametre de zone d'inhibition | Interprétation    |
|-------------------------------|-------------------|
| < 20 mm                       | Résistant (R)     |
| 20 – 25                       | Intermédiaire (I) |
| > 25 mm                       | Sensible (S)      |

#### IV. Etude des phénotypes de résistance probables

##### IV.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, céfépime et d'Aztréonam à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'AMC (Amoxicilline + acide clavulanique) (Figure N°2). La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disques de ;céfépime, céftazidime, céfotaxime et AMC (Jarlier et al 1988).



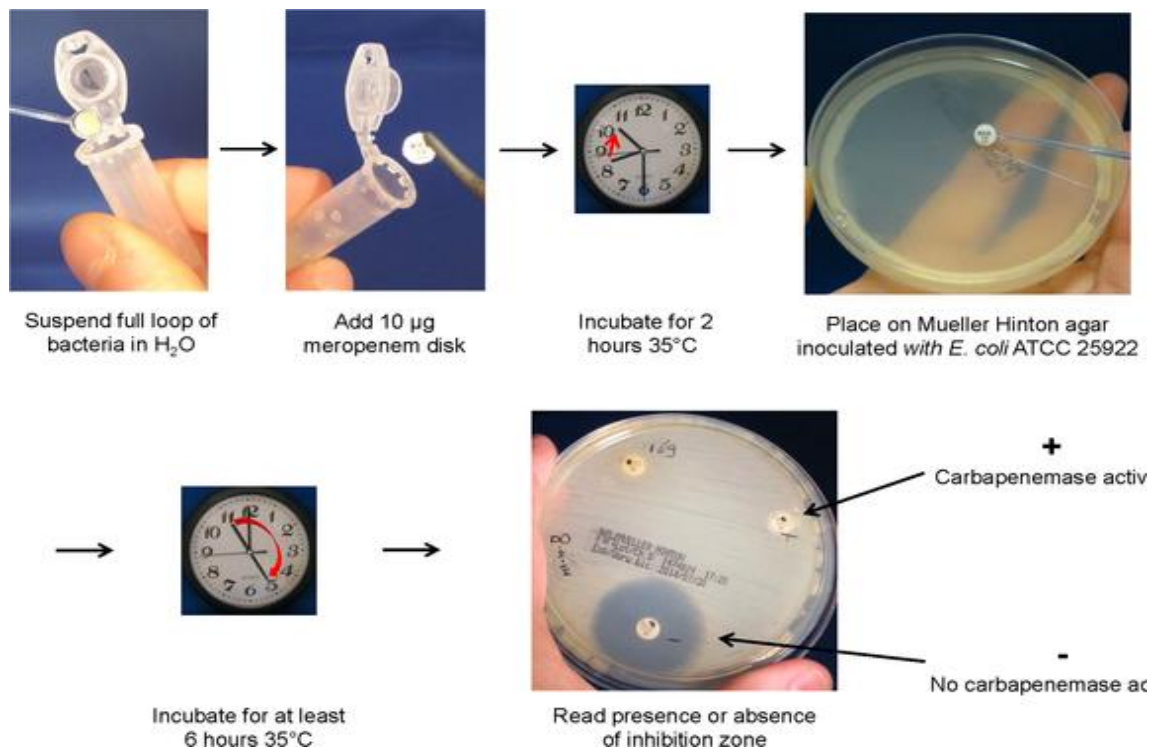
(Figure N°2): Disposition des disques d'antibiotique utilisés lors du D-D test.

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

## IV. Carbapénémases

Le test de CIM (carbapénème inactivation méthode) est un test phénotypique, qui a été développé pour détecter la production des carbapénémases chez les bactéries à Gram négatif. Ce test est considéré comme positif lorsqu'il y a absence de zone d'inhibition autour de disque de Méropénème. Il a été effectué comme décrit par Van Zwaluw et al ., 2015.

- Préparer les suspensions dans des tubes Eppendorf contenant 500µl d'eau physiologique stérile (souches bactériennes à tester, témoin positif : KPC ou NDM, témoin négatif : *E.coli* ATCC25922).
- Par la suite, immerger un disque de méropénème (10µg, Bio-rad) dans chaque suspension et incubé les tubes Eppendorf pendant au moins 2 h / 37 ° C.
- Après incubation, retirer le disque de la suspension et le déposer à la surface d'une boîte de gélose MH ensemencée avec la souche *E.coli* sensible à tous les antibiotiques (*E.coli* ATCC 25922). Incuber les boîtes à 37 ° C/24h (Figure N°3).



**Figure N°3:** Test CIM (Van Zwaluw et al ., 2015).

Le test CIM a été réalisé chez les souches ayant montré une résistance un antibiotiques carbapénème testé (Imipénème(IMI) e/ou Ertapénème (ERT)).

## V. Etude de la sensibilité des souches aux métaux lourds

La sensibilité aux métaux lourds a été réalisée par la méthode de dilution en milieu solide. Les métaux utilisés sont sous forme de sels hydrosolubles. Des solutions initiales de sels de métaux lourds ont été préparées à une concentration finale de 100 mM/mL.

Les métaux lourds utilisés ainsi que leurs concentrations et le volume de l'eau distillée et quantité de poudre Muller Hinton utilisés pour la préparation de milieu sont montrés dans les tableaux suivants :

**Tableau VI:** Préparation des boîtes à des concentrations graduelles en ZnSO<sub>4</sub>

|                   |       |     |       |     |       |     |
|-------------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| [ C ] SM(g/ml)    | 5     | 10  | 15    | 20  | 25    | 30  |
| V [ SM ] (ml)     | 7.5   | 15  | 22.5  | 30  | 37.5  | 45  |
| V eau distile(ml) | 142.5 | 135 | 127.5 | 120 | 112.5 | 105 |
| Quantite MH(g)    | 5.5   | 5.5 | 5.5   | 5.5 | 5.5   | 5.5 |

**Tableau VII:** Préparation des boîtes à des concentrations graduelles en 3CdSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>

|                    |     |     |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| [ C ] SM(g/ml)     | 2   | 4   | 6   | 8   | 10  |
| V [ SM ] (ml)      | 3   | 6   | 9   | 12  | 15  |
| V eau distile (ml) | 147 | 144 | 141 | 138 | 135 |
| Quantite MH(g)     | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 |

Le milieu ainsi préparé a été reparti dans des flacons puis autoclavé à 120°C/20min. Après homogénéisation, une série de boîtes de Petri a été coulée pour chaque concentration puis séchée.

Une suspension bactérienne préparée dans les mêmes conditions que pour l'antibiogramme a été utilisée pour ensemer en spot et à raison de 10µl les différents milieux. Ainsi, trois répétitions ont été réalisées pour chacune des concentrations. Un témoin ne contenant que la gélose Mueller Hinton a été ensemené avec les mêmes suspensions bactériennes.

Après incubation à 37°C/24h, la présence ou l'absence d'une croissance a été notée pour chaque souche et pour chaque concentration en sels de métaux. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice correspondant pour chaque métal est déterminée par la plus faible concentration inhibant la croissance des souches étudiées (Deshpande et al., 1993).



*Résultats*  
*Et*  
*Discussion*



## 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 du 2 Mai au 8 Juin 2023. Les échantillons d'eau et de sédiment ont été collectés. Au total 10 échantillons ont été prélevés. La recherche de Bactérie Gram négatif (BGN) résistantes aux antibiotiques a permis d'isoler 25 souches (Tableau VII), incluant 21 souches appartenant à la famille des entérobactéries et 4 souches de *Pseudomonas*, isolées à partir des sédiments.

**Tableau VIII:** Répartition des souches isolées par site prélèvement

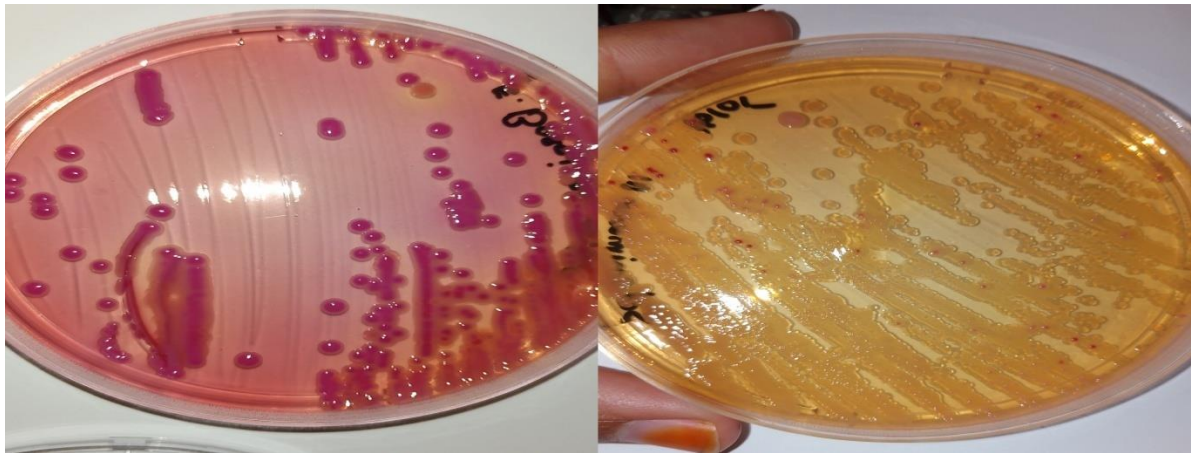
| N° de souche | Site de prélèvement |
|--------------|---------------------|
| 1            | Site 3 (Eau)        |
| 2            | Site 2 (Sédiment)   |
| 3            |                     |
| 4            |                     |
| 5            | Site 2 (Eau)        |
| 6            |                     |
| 7            | Site 5 (Sédiment)   |
| 8            | Site 5 (Eau)        |
| 9            |                     |
| 10           | Site 4 (Eau)        |
| 11           | Site 4 (Sédiment)   |
| 12           |                     |
| 13           |                     |
| 14           | Site 3 (Sédiment)   |
| 15           |                     |
| 16           | Site 1 (Eau)        |
| 17           |                     |
| 18           | Site 3 (Eau)        |
| 19           | Site 4 (Eau)        |
| 20           | Site 1 (Eau)        |
| 21           |                     |
| 22           |                     |
| 23           | Site 1 (Sédiment)   |
| 24           |                     |
| 25           |                     |

Le premier objectif de cette étude est d'évaluer la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans une eau de surface où il y'a peu d'activités humaines, ce qui a influencé le choix du barrage Ighil Emda de kherrata. En effet, l'eau de surface constitue un moyen de dissémination d'organismes résistants aux antibiotiques parmi les populations humaines et animales, car l'eau potable est produite à partir d'eau de surface (Boquero et al.,2008).

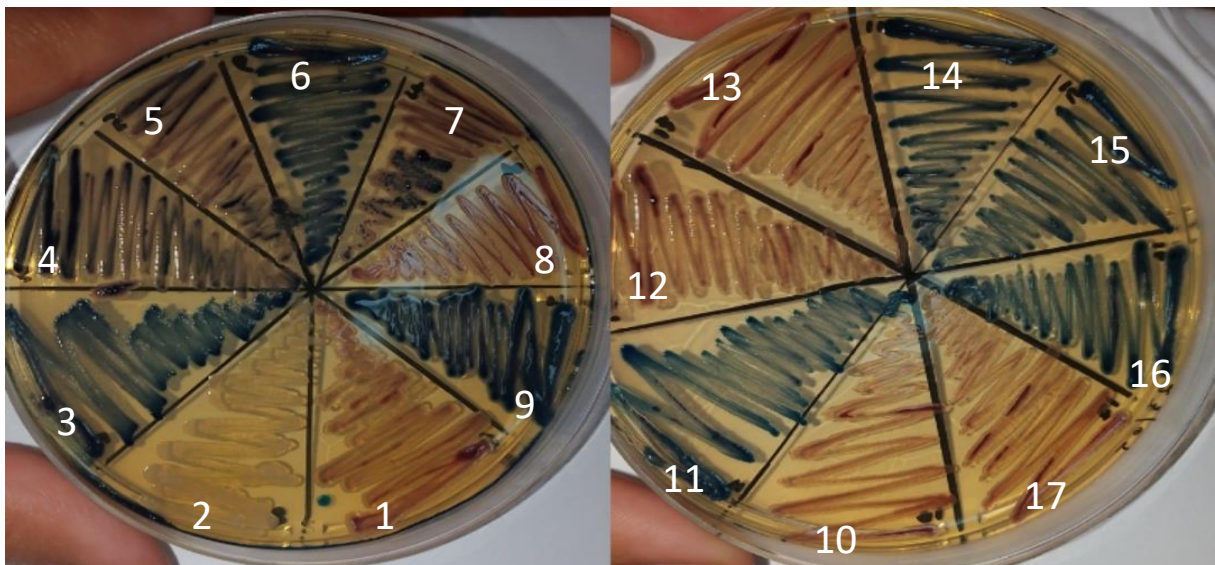
Plusieurs études ont rapportés la présence de bactéries résistantes dans l'eau de surface, exemples, en Allemagne (Schwartz et al., 2003), en chine (Tao et al., 2010), au Canada (coleman et al.), en Guinée ( Machado et al.,2014) et en afrique du sud (Ebomah et Okoh, 2020).En Algérie peu d'études ont rapporté la présence de bactéries résistantes ( Habi et Daba,2009 ; Djouadi et al.,2017 ; Tafoukt et al., 2017).

## II. Identification des souches

L'identification des souches a été réalisée en utilisant le milieu Mac conkey (Figure N°4) et le milieu Chromagar et des tests biochimiques (Tableau III) afin de séparer les souches ayant la même couleur sur le milieu chromagar (Figure N°5).



**Figure N° 4 :** Photo qui montre l'aspect des colonies sur le milieu Mac conkey

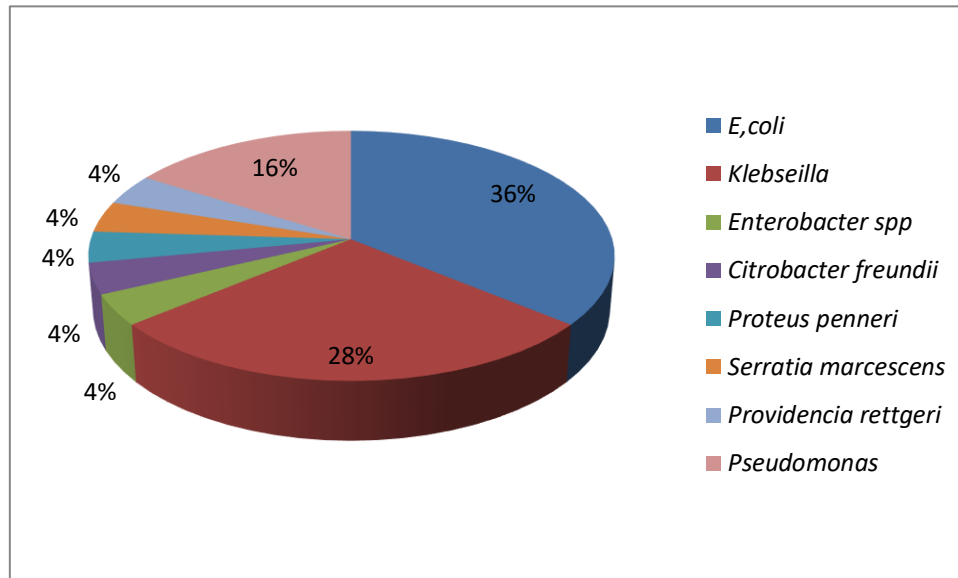


**Figure N° 5 :** Photo des souches repiquées sur le milieu Chromagar

**Tableau XI : Résultats des tests biochimiques**

| Tests<br>N° de<br>souche | Uréase<br>à 37 °C | Indole à<br>44°C | TDA | Indole à<br>37 °C | Citrate<br>de<br>simmons | Mannitol | Mobilité | Espèce                       |
|--------------------------|-------------------|------------------|-----|-------------------|--------------------------|----------|----------|------------------------------|
| 1                        | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 2                        | (+)               | (-)              | (+) | (-)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Providencia rettgeri</i>  |
| 3                        | (+)               | /                | (-) | (-)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla pneumoniae</i> |
| 4                        | (+)               | /                | (-) | (-)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla spp</i>        |
| 5                        | (-)               | /                | (-) | (-)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Citrobacter freundii</i>  |
| 6                        | (+)               | /                | (-) | (-)               | (+)                      | (+)      | (+)      | <i>Klebseilla pneumoniae</i> |
| 7                        | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 8                        | (+)               | (-)              | (+) | (-)               | /                        | /        | /        | <i>Proteus sp</i>            |
| 9                        | (+)               | /                | (-) | (-)               | (-)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla pneumoniae</i> |
| 10                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 11                       | (+)               | /                | (-) | (+)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla oxytoca</i>    |
| 12                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 13                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 14                       | (+)               | /                | (-) | (+)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla oxytoca</i>    |
| 15                       | (-)               | /                | (-) | (-)               | (+)                      | (+)      | (+)      | <i>Enterobacter spp</i>      |
| 16                       | (+)               | /                | (-) | (+)               | (+)                      | (+)      | (-)      | <i>Klebseilla oxytoca</i>    |
| 17                       | (-)               | (-)              | (-) | (-)               | /                        | /        | /        | <i>Serratia marcescens</i>   |
| 18                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 19                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 20                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |
| 21                       | (-)               | (+)              | (-) | (+)               | /                        | /        | /        | <i>Escherichia coli</i>      |

D'après la figure ci-dessous, parmi souches isolés, *E.coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 36 %, suivi des espèces appartenant au genre *Klebseilla* avec un taux de 28%. Ces espèces, appartiennent au groupe des coliformes fécaux. *E. coli* est utilisée couramment comme indicateur de contamination fécale. la présence de souches *d'E. coli* résistantes en milieu aquatique témoigne de la présence de pathogènes d'origine fécale antibiorésistants (Servais et Passerat, 2009).



**Figure N°5:** Répartition des souches isolées par espèce.

### III. Sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

Les 21 souches d'entérobactéries isolées à partir de différents échantillons ont été testées vis-à-vis de 8 antibiotiques. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IX

Toutes les souches isolées présentent une résistance à la colistine. Les mécanismes de résistance à cet antibiotique 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-1* et ses variants (Choi et al., 2015). Ces dernières années, des études ont rapporté la résistance à la colistine dans l'environnement. le gène *mcr1* a été détecté dans les eaux d'irrigation et les eaux de mer en Afrique (Drali et al., 2018, Touati et al., 2020).

Tableau X : Résultats d'antibiogramme des souches testées

| N° de souche | Espèce                       | Sensibilité aux antibiotiques |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |                              | IMI                           | ATM      | CAZ      | AUG      | MRP      | FOX      | ETP      | CS       |
| 1            | <i>Escherichia coli</i>      | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 18                            | 35       | 28       | 15       | 27       | 25       | 2        | 14       |
| 2            | <i>Providencia rettgeri</i>  | <b>I</b>                      | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 25                            | 16       | 11       | 17       | 25       | 0        | 18       | 14       |
| 3            | <i>Klebseilla pneumoniae</i> | <b>S</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 28                            | 44       | 31       | 12       | 32       | 32       | 3        | 1.4      |
| 4            | <i>Klebseilla spp</i>        | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 2                             | 4        | 3        | 15       | 28       | 3        | 24       | 14       |
| 5            | <i>Citrobacter freundii</i>  | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 18                            | 36       | 29       | 18       | 25       | 23       | 19       | 13       |
| 6            | <i>Klebseilla pneumoniae</i> | <b>S</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 28                            | 44       | 3        | 14       | 32       | 28       | 33       | 14       |
| 7            | <i>Escherichia coli</i>      | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 17                            | 35       | 28       | 15       | 24       | 3        | 21       | 14       |
| 8            | <i>Proteus penneri</i>       | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 17                            | 34       | 28       | 18       | 21       | 3        | 0        | 14       |
| 9            | <i>Klebseilla pneumoniae</i> | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 24                            | 33       | 29       | 16       | 3        | 25       | 32       | 13       |
| 10           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 24                            | 36       | 3        | 16       | 27       | 3        | 25       | 14       |
| 11           | <i>Klebseilla oxytoca</i>    | <b>S</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 28                            | 34       | 31       | 15       | 27       | 27       | 23       | 14       |
| 12           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 18                            | 35       | 27       | 14       | 23       | 3        | 0        | 14       |
| 13           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>R</b>                      | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 16                            | 32       | 25       | 12       | 22       | 3        | 15       | 14       |
| 14           | <i>Klebseilla oxytoca</i>    | <b>S</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 28                            | 35       | 31       | 12       | 33       | 28       | 32       | 15       |
| 15           | <i>Enterobacter spp</i>      | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 25                            | 35       | 32       | 14       | 3        | 3        | 32       | 15       |
| 16           | <i>Klebseilla oxytoca</i>    | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 24                            | 32       | 27       | 15       | 3        | 23       | 3        | 13       |
| 17           | <i>Serratia marcescens</i>   | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>I</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 22                            | 34       | 25       | 16       | 25       | 25       | 24       | 14       |
| 18           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>I</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 25                            | 3        | 27       | 18       | 29       | 25       | 3        | 13       |
| 19           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>S</b>                      | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 29                            | 35       | 32       | 14       | 31       | 3        | 32       | 15       |
| 20           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>I</b>                      | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 23                            | 13       | 15       | 12       | 29       | 2        | 27       | 13       |
| 21           | <i>Escherichia coli</i>      | <b>S</b>                      | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> |
|              |                              | 26                            | 19       | 28       | 14       | 24       | 28       | 28       | 14       |

Les résultats de sensibilité aux antibiotiques ont montré que toutes les souches sont résistantes à l'AMC. Une étude réalisée par Servais et Passerat (2009) sur la résistance aux antibiotiques des bactéries fécales isolées de la rivière de la Seine, a montré un taux plus faible de 16 % pour l'AMC, comparé au résultat obtenu dans notre étude.

Uniquement 4/21 souches présentent une résistance à la céftazidime. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Servais et Passerat, où moins de 2% des souches isolées étaient à la CAZ et au CTX.

15/21 souches présentent une résistance à au moins un antibiotique parmi les carbapénèmes testés. Cela peut s'expliquer par le fait que le milieu d'isolement avait été additionné d'imipénème. Des souches résistantes aux carbapénèmes, isolées de l'eau de l'environnement, ont été rapportées dans plusieurs études dans le monde (Potron et al., en 2011 au Maroc; Isozumi et al., au Vietnam; Zarfel et al., en 2017 en Autriche; Tafoukt et al., en 2017, Mairi et al., en 2019 en Algérie).

## **IV. Recherche des phénotypes de résistance probables**

### **IV.1. BLSE**

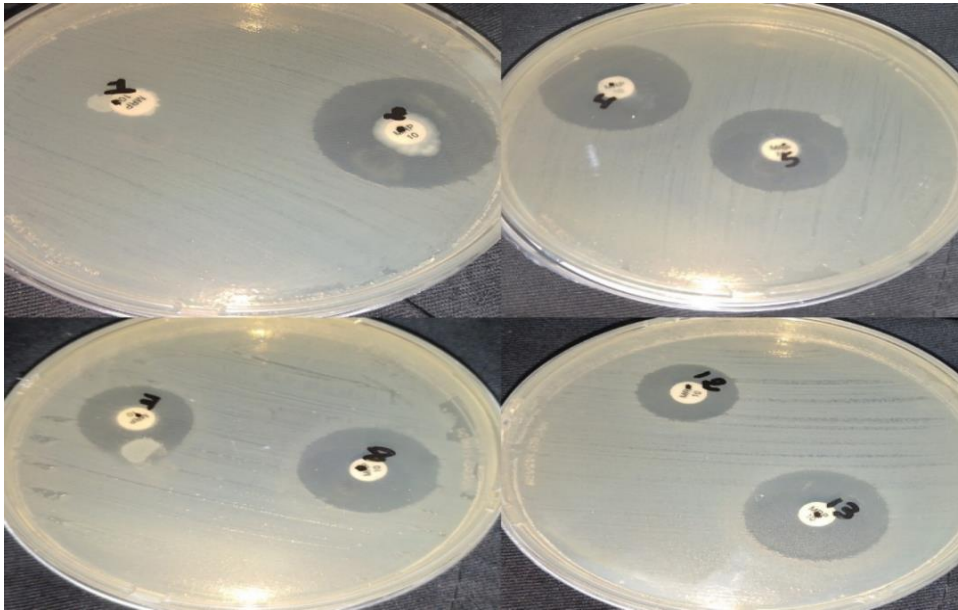
Durant cette étude aucune image de synergie n'a été détectée. Les souches isolées ne sont donc probablement pas productrices d'une BLSE. Cela peut être expliqué par le fait que la sélection des souches avait été réalisée sur la gélose MacConkey additionnée d'imipénème.

Beaucoup d'auteurs ont rapportés la production de BLSE par des souches isolées de l'eau de surface. Des souches de *E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M-1,-3,-15,-14 et 32 ont été isolées d'eau de rivière au Portugal (Tacao et al., 2012). Zurfluh et ses collaborateurs ont rapporté en 2013, la production d'enzyme de type CTX-M, TEM et SHV par des souches isolées d'eaux de surface en Suisse.

### **IV.2. carbapénémases**

Le test CIM modifié a été effectué sur 8 souches résistantes à méropénème (souches 1,2,4,5,7,8,12,13), seule la souche 1 "*Escherichia coli*" a présenté un résultat positif (Figure N°6) (pas de zone d'inhibition), cette souche est probablement productrice d'une carbapénémase. La résistance à une carbapénémase n'implique pas automatiquement la

présence d'une carbapénémase; même si, des tests supplémentaires doivent être entrepris pour identifier le mécanisme de résistance.



**Figure N°6 :** photo qui montre les résultats du test CIM

Des études antérieures ont rapporté des bactéries résistantes aux carbapénèmes isolées de l'eau de l'environnement, par production de carbapénémases. NDM-1 chez une souche de *K. pneumonia* (Isozumi et al.,2012), IMP-2 chez une souche d'*Enterobacter asburiae* (Aubron et al.,2005) et une souche de *Enterobacter cloacae* (Zurfluh et al.,2013). En Algérie, les études de Tafoukt et al.,2017 et Mairi et al., 2019 ont rapporté la présence d'OXA48 et ses variants produits par des souches d'entérobactéries isolées de l'eau l'environnement.

## **V. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des métaux lourds**

Les résultats de la croissance des 21 souches en présence de 3 métaux lourds sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XI :** Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds.

| N° de souche<br>Métal lourd en µg/ml | 1                 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |   |   |
|--------------------------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|
|                                      | ZnSO <sub>4</sub> | 5 | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
| 10                                   |                   | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
| 15                                   |                   | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
| 20                                   |                   | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
| 25                                   |                   | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
| 30                                   |                   | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
| 3CdSO <sub>4</sub>                   | 2                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 4                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 6                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 8                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 10                | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
| CuSO <sub>4</sub>                    | 2                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 4                 | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | + | + |
|                                      | 6                 | - | - | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
|                                      | 8                 | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |
|                                      | 10                | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | - | - |

+ : croissance ; - : absence de croissance.

Les résultats montrent que les souches se développent en présence de faibles concentrations de métal ZnSO<sub>4</sub> : 5 et 10 µg/ml.

En présence du métal 3CdSO<sub>4</sub>: toutes les souches ont poussé aux différentes concentrations du métal.

Pour le métal CuSO<sub>4</sub>: toutes les souches se développent jusqu'à la concentration 4 µg/ml, à l'exception des souches 3 et 13 qui ont poussé jusqu'à la concentration 6 µg/ml.

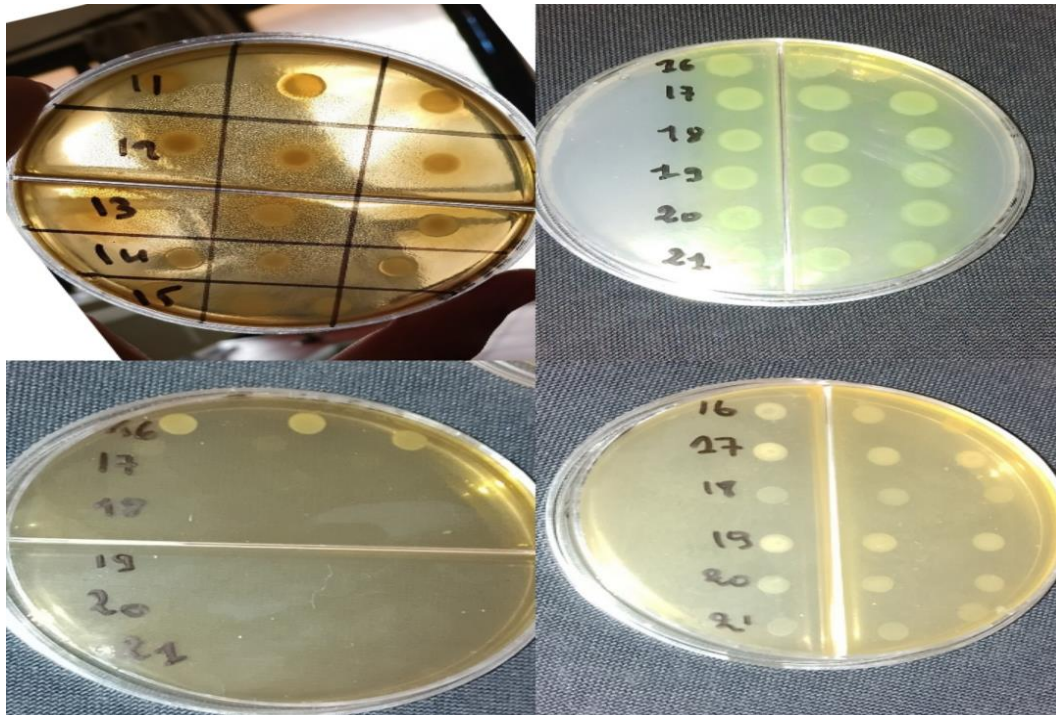
Ces résultats indiquent que :

-La CMI du sulfate de cuivre pour toutes les souches est de 6 µg/ml sauf les souches 3 et 13 est de 8 µg/ml.

-Pour le métal Cadmium : l'inhibition de croissance est observée sur toutes les souches.

-La CMI de sulfate de zinc est de 15 µg/ml pour toute les souches (Figure N°7).

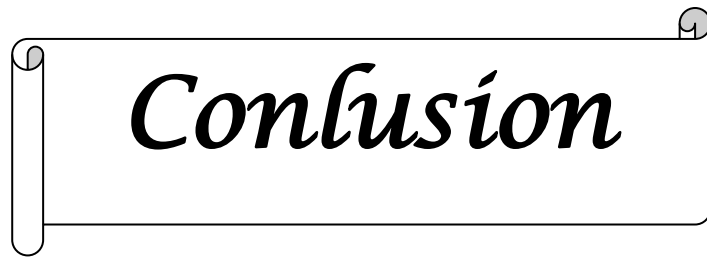




**Figure N°7** :Photo qui montre les résultats du test CIM des métaux lourds

La toxicité des métaux constitue une pression de sélection pour la communauté bactérienne. Cependant, grâce à leurs capacités d'adaptation infinies, les bactéries ont développé des systèmes de résistance à presque tous les métaux toxiques, ce qui leur permet de survivre et de proliférer de manière sélective dans un environnement toxique et chargé en métaux lourds (Vats et al.,2022).

Les métaux étant omniprésents et exerçant une pression de sélection durable sur les microbes, une corrélation positive entre la présence de métaux et les gènes de résistance aux antibiotiques a été décrite dans plusieurs milieux de l'environnement, par exemple dans les sols agricoles, les zones affectées par l'exploitation minière, les systèmes d'aquaculture, les élevages de porcs, les fermes laitières et le microbiote intestinal de divers autres animaux (Vats et al.,2022).



*Confusion*

Au cours de cette étude, nous avons étudié la résistance aux antibiotiques, recherché les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ainsi et déterminé les CMI aux métaux lourds des entérobactéries isolées à partir du barrage et de l'oued de kherrata wilaya de Bejaia.

25 souches de bacilles à Gram négatif ont été isolées, parmi lesquelles 21 souches sont identifiées comme étant des entérobactéries, réparties comme suit : 9 souches de *E coli*, 7 souches de *Klebsiella spp*, une souche de *Enterobacter spp*, de *Citrobacter freundii*, de *Proteus penneri*, de *Serratia marcescens* et une souche de *Providencia rettgeri*. Tandis que les 4 souches restantes, elles ont été identifiées comme étant des *Pseudomonas*.

Les résultats du DD-test montrent qu'il n'y a pas de souches productrices de BLSE. Parmi les 21 souches d'entérobactéries isolées, 8 souches sont résistantes à l'IMP et l'ETP.

L'étude de l'impact de 3 métaux lourds sur la croissance des 21 souches a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré la présence de différents niveaux de tolérance chez les souches étudiés vis-à-vis de ces métaux. La plus forte résistance est observée dans le cas du cadmium, en effet, toutes les souches ont résisté aux différentes concentrations.

Dans ce travail, on a rapporté la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques et aux métaux lourds dans l'eau de surface où il y'a peu d'activités anthropiques. L'antibiorésistance est un problème de santé publique mais aussi environnemental, il ne réside pas uniquement dans sa diffusion mais également dans la sélection des bactéries résistantes qui ne serait pas seulement le fait des antibiotiques mais aussi des désinfectants, des métaux lourds et des produits biocides. Ce qui démontre l'importance des études environnementales pour mieux comprendre l'évolution de la résistance aux antibiotiques afin de prévenir leur dissémination.

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 et de métaux lourds dans l'eau;
- De faire les prélèvements à une fréquence mensuelle dans l'année, afin de connaître l'impact de la pluviométrie sur la présence de bactéries résistantes;
- De caractériser les gènes de résistance par les méthodes de biologie moléculaire.

# Résumé

Le barrage et l'oued peut être une source de propagation et de transfert de la résistance bactérienne dans l'environnement hydrique.

L'analyse des eaux et de sédiments de barrage et de l'oued est effectuée pour la recherche des entérobactéries résistantes. L'identification des souches est basée sur les tests biochimique et milieu Mac conkey.

La résistance de ces souches aux carbapénèmes est réalisée par la méthode de l'antibiogramme.

La sensibilité des entérobactéries aux BLSE est réalisée par la méthode de CMI ,et l'effet de métaux lourds (zinc cadmium et cuivre)

Sur les deux prélèvements effectués, 25 souches à Gram négatif sont isolées, 21 souches appartiennent aux entérobactéries et 4 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

20, 7, 5, 3, 1, 1, 0 souches sont résistantes respectivement à AMC, IMI et ERT, ATM, CAZ, FOX , MRP.

Le profil de résistance des souches isolées vis-à-vis des différentes classes d'antibiotique testées,a révélé que les souches de [E.coli](#) sont probablement productrices de BLSE.

Les espèces bactériennes identifiées ont été plus sensibles aux concentrations excessives du cuivre et du zinc par apport au cadmium, cette sensibilité se manifeste par la méthode de CMI. Ce dernier a permis de démontrer qu'il n y a pas des espèces bactériennes qui ont un effet de tolérance vis-à-vis de cadmium, toutefois aucune espèce n'a présenté un effet de tolérance vis-à-vis de cuivre et de zinc.

Notre étude montre que le barrage et l'oued sont des réservoirs de bactéries résistantes aux antibiotiques, Cela peut constituer une menace pour l'environnement mais aussi pour la santé humaine.

## **Anglais :**

The dam and the Valley can be a source of propagation and transfer of bacterial resistance in the water environment.

The analysis of the waters and sediments of the dam and the wadi is carried out for the research for resistant enterobacteria. The identification of the strains is based on biochemical and Mac conkey medium tests.

The resistance of these strains to carbapenems is carried out by the method from the antibiogram.

The sensitivity of enterobacteria to ESBL is carried out by the MIC method ,and the effect of heavy metals (zinc cadmium and copper) Of the two samples taken, 25 Gram-negative strains were isolated, 21 strains belong to enterobacteria and 4 strains belong to other types of Gram-negative bacilli.

The sensitivity of these strains to  $\beta$ -lactams revealed that all isolated enterobacteria are resistant to CS

20, 7, 5, 3, 1, 1, 0 strains are respectively resistant to AMC, IMI and ERT, ATM, CAZ, FOX, MRP.

The resistance profile of the isolated strains vis-à-vis the different classes of antibiotic tested, revealed that the strains of E.coli are probably producers of ESBL.

The bacterial species identified were more sensitive to excessive concentrations of copper and zinc by adding cadmium, this sensitivity manifests itself by the MIC method. The latter made it possible to demonstrate that there are no bacterial species that have a tolerance effect vis-à-vis cadmium, however no species showed a tolerance effect vis-à-vis copper and zinc.

Our study shows that the dam and the wadi are reservoirs of antibiotic-resistant bacteria, which can pose a threat to the environment but also to health of human.

**A**

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

**B**

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

Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 969–976.

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.

Bruins M.R., Kapil S. et Oehme F.W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol 45, 198-207.

Baquero F, Martinez JL and Canto R. (2008).Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*.19: 260–265.

Belouni R, Benslimani A, 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**

(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.

Colman BL., Louie M., Salvadori MI and al. Contamination of canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant E. coli. *Water reserch*.47 :3026-3036

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

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.*

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).

Deshpande L. M., Kapadnis B. P. and Chopade B. A. (1993). Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to  $\beta$ -lactamase production. *BioMetas.* 6 : 55-59.

Drali, R.; Berrazeg, M.; Zidouni, L.L.; Hamitouche, F.; Abbas, A.A.; Deriet, A.; Mouffok, F. (2018). Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *Sci. Total Environ. APMIS.* 125, 822–825.

Sarah M. Drawz, Robert A. Bonomo, Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors *Clinical Microbiology Review.* 2010, 23(1):160-201

## 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.

Giulia De Angelis 1,2,†, Paola Del Giacomo 2,†, Brunella Posteraro 1,3, Maurizio Sanguinetti 1,2 and Mario Tumbarello 2,4,\* molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae

## I

Rie Isozumi, Kumiko Yoshimatsu, Tetsu Yamashiro, Futoshi Hasebe, Binh Minh Nguyen, Tuan Cuong Ngo, Shumpei P. Yasuda, Takaaki Koma, Kenta Shimizu, and Jiro Arikawa, *Emerg Infect Dis.* 2012 Aug; 18(8): 1383–1385.

## J

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G and Philippon A. (1988). Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev infection diseases.* 10, P867-878.

## K

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.

## L

Laurence DR 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.

## M

Assia Mairi, Alix Pantel, Farès Ousalem, Albert Sotto, Abdelaziz Touati, Jean-Philippe Lavigne  
*Author Notes Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 74, Issue 7, July 2019, Pages 1848–1855,

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

A. Machado <sup>a b</sup>, A.A. Bordalo « Ecotoxicology and Environmental Safety; Prevalence of antibiotic resistance in bacteria isolated from drinking well water available in Guinea-Bissau (West Africa) », Volume 106, August 2014, Pages 188-194

## P

Poirel L, Potron A and Nordmann P. (2012). OXA-48 comme carbapénémase: La menace fantôme. *Journal Antimicrobial Chemother.* 67 : 1597-1606.

## R

Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015; 5:61

## S

Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A. and Top E.M. (2007). Genomics of IncP 1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev.* 31: 449–477.

Pierre Servais, Julien Passerat «Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France) » *Science of The Total Environment* , Volume 408, Issue 2, 20 December 2009, Pages 365-372

Thomas Schwartz, Wolfgang Kohlen, Bernd Jansen, Ursula Obst *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 43, Issue 3, April 2003, Pages 325–335,



**T**

Ran Tao <sup>a</sup>, Guang-Guo Ying <sup>a</sup>, Hao-Chang Su <sup>a</sup>, Hong-Wei Zhou <sup>b</sup>, Jatinder P.S. Sidhu <sup>c</sup> « Environmental Pollution Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China » Volume 158, Issue 6, June 2010, Pages 2101-2109

Tafoukt, R. ; Taouati, A. ; Leangapichart, T. ; Bakour, S. ; Relain, J.M. Characterisation of OXA-48-Like producing Escherichia coli from river water in Algeria. Journal of water research. 2017. Doi 10.1016/j.waters.2017.04.073.

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.

Ternent L, Dyson RJ, Krachler AN and Jabbari 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.

Tewari S., Ramteke P.W., Tripathi M., Kumar S. et Garg S.K. (2013). Plasmid mediated transfer of antibiotic resistance and heavy metal tolerance in thermotolerant water borne coliforms. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(2), 130- 136.

**W**

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

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

**Z**

Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, GN., Bootsma, HJ., de Neeling, A.J ., Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One, (2015); vol.10, n°0123690.

Gernot Zarfel, Michaela Lipp, Elena Gürtl, Bettina Folli, Rita Baumert, Clemens Kittinger. Troubled water under the bridge: Screening of River Mur water reveals dominance of CTX-M harboring Escherichia coli and for the first time an environmental VIM-1 producer in Austria Science of The Total Environment Volumes 593–594, 1 September 2017, Pages 399-405

Katrin Zurfluh, Herbert Hächler, Magdalena Nüesch-Inderbinen, Roger Stephan ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Volume 79 Issue 9 3021 - 3026

## **Annexe N°I : Composition des différents milieux de cultures utilisés (pour 1 litre d'eau distillée)**

### **Bouillon nutritif**

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Extrait de viande..... | 5g. |
| Nacl.....              | 5g. |
| pH final : 7,2 ± 0,2   |     |

### **Eau physiologique**

|              |     |
|--------------|-----|
| Nacl.....    | 9g. |
| pH final : 7 |     |

### **Muller-Hinton**

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Déshydraté.....             | 3g.    |
| Hydrolysate de caséine..... | 17,5g. |
| Amidon.....                 | 1,5g.  |
| Agar.....                   | 10g.   |
| pH final : 7,4 ± 0.2        |        |

### **Urée-Indole**

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| L-Tryptophane.....            | 3g.      |
| Phosphate dipotassique.....   | 1g.      |
| Phosphate monopotassique..... | 1g.      |
| Chlorure de sodium.....       | 5g.      |
| Urée.....                     | 20g.     |
| Rouge de phénol.....          | 2,5g. pH |
| final : 7,4 ± 0.2             |          |

### **Milieu de Citrate de Simmons :**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Phosphate d'ammonium .....   | 1g.    |
| Phosphate bipotassique ..... | 1g.    |
| Chlorure de sodium .....     | 5g.    |
| Citrate de sodium.....       | 5g.    |
| Sulfate de magnésium .....   | 0,20g. |
| Bleu de Bromothymol .....    | 0,08g. |
| Agar.....                    | 1g.    |
| pH finale : ± 6.9            |        |

### **Gélose Mannitol mobilité :**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Extrait de viande.....           | 3g.    |
| Peptone .....                    | 15g.   |
| Mannitol.....                    | 10g.   |
| Nitrate de potassium(KNO3) ..... | 10g.   |
| Rouge de phénol .....            | 0,05g. |

Agar.....4g.  
pH : ± 7.8

### **Annexe N°II Composition des réactifs**

#### **Réactif de Kovacs**

Alcool amylique.....5g.  
Paradiméthylamino-benzaldéhyde.....75g. HCl  
pur.....25ml.