

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
Filière : Sciences Biologiques
Option : Microbiologie Appliquée au Diagnostic

Réf :

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

**Recherche des Bactéries à Gram négatifs résistants aux
antibiotiques et aux métaux lourds dans les écosystèmes agricoles
en Algérie**

Présenté par :

MAMMASSE Farah

Kilia BENIDIR

Soutenu le : 29/06/2024

Devant le jury composé de :

Mr BARACHE N	MCA	Président
M ^{me} ZENATI K	MCA	Encadreur
Mr ADJEBLI A	MCB	Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

*Nous tenons à remercier tout d'abord notre **Dieu**, le tout puissant de nous avoir donné la bonne santé, la patience, la force et la volonté pendant toutes ces années d'étude et pour réaliser ce travail.*

*Nous adressons notre vive gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreur **M^{me} ZENATI Karima**, qui a bien voulu prendre en charge ce travail. Nous lui exprimons chaleureusement notre reconnaissance pour sa gentillesse, son aide et ces précieux conseils.*

*Nous exprimons nos remerciements aux membres du jury, **Mr BARACHE N** et **Mr ADJEBLI A** d'avoir accepté de présider et d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin à réaliser ce travail en particulier Melle **MOUTFAOUI Raouya**.*

*Et à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie, plus précisément à **Madame Rahmani D**, pour sa gentillesse et sa bienveillance.*

Farah et Kilia

Dédicaces

*On dédie ce mémoire à notre famille et à nos proches, pour leur soutien infailible et leur amour inconditionnel tout au long de cette aventure académique. On leur témoigne notre gratitude éternelle pour leur précieuse présence et leur encouragement constant. Merci de nous avoir accompagnés dans cette aventure et d'avoir cru en nous. A nos amis **Sana, Sara, Nesrine, Celina.***

Farah et Kilia

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction1

Matériel et Méthodes

I.	Cadre et objectifs d'étude	6
II.	Méthodes de prélèvement.....	6
	II.1.Prélèvements du sol et du fumier.....	6
	II.2.Prélèvements de l'eau d'irrigation	7
III.	Criblage de bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes	8
IV.	Criblage de bacilles à Gram négatif résistants à la colistine	8
V.	Identification des souches.....	8
VI.	Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	9
VII.	Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	10
VIII.	Evaluation de la sensibilité des souches <i>vis-à-vis</i> des métaux lourds	10

Résultats

I.	Répartition des prélèvements.....	12
II.	Criblage de bacilles à Gram négatifs résistants aux carbapénèmes.....	12
III.	Criblage de bacilles à Gram négatifs résistants à la colistine.....	12
IV.	Répartition des souches isolées par origines de prélèvement.....	13
V.	Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	14
VI.	Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	16
VII.	Evaluation de la sensibilité des souches <i>vis-à-vis</i> des métaux lourds	18

Discussion..... 23

Conclusion.....28

Références bibliographiques 30

Annexes

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

AMC: Amoxicilline-Clavulanate

BGN : Bacille à Gram Négatif

BLSE : β -Lactamases à Spectre Elargi (ou Etendu)

CAZ : Céftazidime

CIM: Cabapénèmes Inactivation Méthode

CT : Colistine

CTX: Céfotaxime

EMB : Éosine Méthylène Bleu

EPT : Eau Peptoné Tamponé

EUCAST: European Comity on Antibiotic Susceptibility Testing

LBJMR : Lucie Bardet Jean-Marc Rolain

Mcr: Mobile Colistine Resistance

MDR: Multi-résistance Bactérienne aux Antibiotiques

MTL: Mairi-Touati-Lavigne

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ARG : Gènes anti-Résistants

Liste des tableaux

Tableau I	Répartition des échantillons par localités et par origines	6
Tableau II	Antibiotiques testés <i>vis-à-vis</i> des souches d'entérobactéries	9
Tableau III	Niveaux de résistance de la souche <i>E. coli</i> K12 <i>vis-à-vis</i> des métaux lourds testés	10
Tableau IV	Sensibilité des souches entérobactéries isolées sur Carba-MTL aux antibiotiques	15
Tableau V	Sensibilité des souches entérobactéries isolées sur gélose à la colistine aux antibiotiques	19
Tableau VI	Détermination des CMI et des phénotypes de résistance aux métaux lourds chez les souches résistantes aux carbapénèmes	21
Tableau VII	Détermination des CMI et des phénotypes de résistance aux métaux lourds chez les souches résistante à la colistine	25

Liste des tableaux Annexes

Annexe 1	Tableau I: Répartition des échantillons de sol par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine
	Tableau II: Répartition des échantillons de fumier par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine
	Tableau III: Répartition des échantillons d'eau par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine
Annexe 2	Tableau I : Résultats des tests d'identification

Liste des figures

Figure 01	Site de prélèvement	7
Figure 02	Aspects des colonies sur différents milieux de culture	12
Figure 03	Aspect des colonies sur gélose BCP	13
Figure 04	Répartition des souches isolées sur milieux carbaMTL et gélose à la colistine par origines de prélèvement	14
Figure 05	Résultat d'un test de synergie négatif	16

Introduction

Introduction

À l'échelle mondiale, l'agriculture est mise au défi de produire durablement des aliments suffisants, sûrs et sains pour la population mondiale croissante (**Yadav et al. 2020**). Les systèmes agricoles et l'adaptation de l'agriculture aux changements climatiques doivent être abordés pour une agriculture efficiente à l'avenir (**Bencheikh et al. 2017**) afin de satisfaire les besoins du développement humain, social et économique des individus (**Kahina, 2023**).

Les fruits et légumes sont une composante importante de l'alimentation humaine en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé et de leur valeur nutritionnelle. Une alimentation propre et saine, exempte d'agents pathogènes et de produits chimiques agricoles est devenue l'une des principales préoccupations et exigences des consommateurs (**Hölzel et al., 2018 ; Sudsiri et al., 2023**). Ainsi, le terme "agriculture biologique" fait référence à des méthodes agricoles visant à limiter l'impact environnemental en utilisant des substances et des processus naturels, y compris des engrais organiques et une indépendance prédominante aux produits chimiques pour la prévention et le contrôle des ravageurs (**Jiménez-Belenguer et al., 2023**).

Généralement, ces légumes et fruits portent naturellement une communauté microbienne non pathogène, mais ils peuvent être contaminés par des agents pathogènes à la fois avant et après la récolte (**Araújo et al., 2017**). Les fruits et légumes peuvent être contaminés par diverses sources telles que le sol, les engrais d'origine animale, l'intrusion du bétail dans les champs et l'utilisation d'eau insalubre pour l'irrigation, ainsi que par la contamination croisée lors des différentes étapes de la production et de la distribution (**Mir et al., 2018 ; Chelaghma et al., 2021 ; Rahman et al., 2022**). Ces bactéries présentes peuvent être transmises tout au long de la chaîne alimentaire, de la production primaire jusqu'au consommateur final (**Jiménez-Belenguer et al., 2023**). Les cas de pathologies alimentaires liés à la consommation de certains aliments comme les tomates, les poivrons verts, les artichauts, etc., mettent en évidence le risque de transmission de microorganismes d'intérêt médicale et de bactéries résistantes aux antibiotiques (**Islam et al., 2004 ; OMS, 2012 ; Rahman et al., 2021**). Dans les épidémies associées principalement à *K. pneumoniae* ont été rapportés lors de la consommation de fruits frais (pastèque, fraise ... etc) (**Elshafiee et al., 2022**).

La pénurie d'eau à l'échelle mondiale, aggravée par le changement climatique, a entraîné une augmentation de l'utilisation des eaux usées récupérées pour l'irrigation

agricole, réduisant ainsi la demande en eau douce (**Hong et al., 2013 ; Qiu et al., 2023**). Ces eaux usées proviennent de diverses sources telles que l'industrie, les ménages, les municipalités et les hôpitaux, chacune ayant une composition unique (**Nyinbor et al., 2019**). L'amendement des sols avec des engrais organique est une pratique courante visant à améliorer le rendement et la qualité des cultures. Cependant, ces pratiques peuvent favoriser l'émergence et la propagation de bactéries multirésistantes aux agents antimicrobiens et de gènes de résistance dans le sol, nappes phréatiques, les cultures et même atteindre la chaîne alimentaire (**Jauregi et al., 2021 ; Kasimanickam et al., 2021 ; Chelaghma et al., 2021 ; Brienza et al., 2022**).

Un chevauchement des profils de gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries isolées des tissus de la laitue et celles isolées du sol indique que les résistomes des végétaux et de leur environnement sont interconnectés, confirmant ainsi la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques des sols aux légumes (**Chelaghma et al., 2021**). De plus, plusieurs études ont signalé des épidémies d'origine alimentaire liées à la consommation de légumes, de légumes-feuilles et de fruits frais irrigués avec des eaux usées, mettant en lumière l'importance du type de pratique d'irrigation dans la contamination des sols et des récoltes (**Adegoke et al., 2018 ; Yigrem et al., 2021**). Des clones identiques d'*E. coli* ont été isolés à la fois des légumes et de l'eau utilisée pour leur irrigation, suggérant une contamination croisée dans plusieurs exploitations familiales au Portugal (**Araújo et al., 2017**). Le risque de transmission est particulièrement élevé chez des légumes à feuilles considérés comme des "points chauds" hébergent des de bactéries résistantes aux antibiotiques, de gènes de résistance et d'éléments génétiques mobiles (**Yigrem et al., 2021**).

La résistance aux antibiotiques est en effet une menace majeure pour la santé mondiale, la sécurité alimentaire et l'environnement au 21ème siècle. L'augmentation rapide de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif, en particulier chez les entérobactéries, limite les options de traitement des infections causées par ces dernières (**CDC, 2019 ; OMS, 2021 ; Jiménez-Belenguer et al., 2023**). La prévalence croissante des bacilles à Gram négatif producteurs de BLSE résistantes aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénèmes est une préoccupation mondiale, car ces antibiotiques sont souvent des options thérapeutiques de dernier recours (**OMS, 2021**).

Les gènes *bla*-TEM, *bla*-SHV et, en particulier, les gènes *bla*-CTX-M font partie des gènes de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) les plus couramment rapportés. En 2020, la

sélection de mutants résistants par la surexpression de l'AmpC chromosomique par l'acquisition de BLSE ou d'AmpC plasmidique a limité l'utilisation des céphalosporines de troisième génération pour le traitement des infections bactériennes sévères à Gram négatif. Cependant, chez les entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes est médiée par plusieurs mécanismes, dont le plus alarmant étant la production de carbapénémases de type *bla*-KPC, *bla*-NDM, *bla*-VIM et *bla*-OXA-48 (Elshafiee et al., 2022).

Les carbapénèmes sont les molécules de choix pour le traitement des infections causées par des bactéries pathogènes productrices de BLSE et d'AmpC. Ces enzymes sont prédominants parmi les souches de la famille des Enterobacterales et ont été associés à des phénotypes de multirésistances responsables d'infections sévères et mortelles ainsi qu'à des épidémies liées aux hôpitaux et aux communautés. Toutefois, la production de carbapénémases a encore réduit les options thérapeutiques disponibles pour le traitement de infections causées par des pathogènes d'intérêt clinique appartenant à la famille des Enterobacterales, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Owusu et al., 2023).

Depuis plusieurs années, la colistine est considérée comme la dernière ligne de défense contre les infections causées par des Gram négatifs multirésistants dont les entérobactéries productrices de BLSE et de carbapénémases. Elle est largement utilisée dans la production animale à des fins prophylactiques et thérapeutiques, ainsi que pour stimuler la croissance. Cependant, avec la découverte récente d'une résistance à la colistine médiée par des plasmides codant le gène *mcr-1*. Cependant l'épandage de fumier provenant de la production animale peut accroître l'abondance et la diversité des déterminants de la résistance aux antibiotiques (Rhouma et al., 2016 ; Anyanwu et al., 2020 ; Touati et al., 2020 ; Chelaghma et al., 2021).

Les métaux lourds peuvent être des polluants environnementaux pour les sols agricoles, affectant la santé des plantes et leur productivité. Certains métaux comme le Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Mg et le Ca sont essentiels à la croissance des plantes. Toutefois, certains peuvent être toxiques (Cadmium, Plomb). Les activités humaines telles que l'utilisation de pesticides, d'engrais chimiques et le rejet d'eaux usées contribuent à l'augmentation des concentrations de métaux lourds dans les sols agricoles et dans les ressources en eau (Kharazi et al., 2021 ; Rashid et al., 2023). 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 presque à 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).

La contamination de l'environnement par des agents antimicrobiens, tels que les antibiotiques et les métaux lourds, par des bactéries multirésistantes et les gènes de résistance, constituent une menace sérieuse pour la santé humaine et l'évolution des écosystèmes naturels (l'abus de l'usage des antibiotiques en agriculture végétale et l'épandage de fumier provenant de l'élevage sur les champs agricoles sont parmi les principales sources de contamination). Toutefois, les hôpitaux et l'élevage reste les principales sources de transmission de bactéries résistantes et des gènes de résistance aux différents agents antimicrobiens retrouvées chez les végétaux (Verraes et al., 2013 ; Bonardi et Pitino, 2019).

En Algérie, plusieurs études ont été menées sur la recherche des bactéries résistantes aux antibiotique liées à la contamination des fruits et des légumes. Bellil et collaborateurs (2024), ont rapporté la contamination des pastèques par des souches de *Salmonella* sp. Résistantes à l'acide nalidixique, à l'ofloxacine et à la ciprofloxacine. De plus, des bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmases (*bla*-OXA-48 et *bla*-VIM-4) (Touati et al., 2017 ; Chelaghma et al., 2022) et de BLSE (*bla*-CTX-M) (Mesbah-Zekar, 2017) associé à la contamination des fruits et des légumes ont été également rapportés.

À la ferme, pendant les opérations de pré-récolte, de récolte et de post-récolte ainsi que pendant les chaînes de transport et de transformation, les légumes et les fruits frais peuvent être contaminés par des bactéries multirésistantes aux agents antimicrobiens (Jiménez-Belenguer et al., 2023). Cependant, très peu d'étude ont rapporté le rôle de l'environnement agricole (sol, eau, fumier) comme réservoir de gènes de résistances aux agents antimicrobiens. Toutefois, des souches productrices de carbapénèmases ont été rapportées dans les eaux de rivière (Tafoukt et al., 2017) et des effluents hospitaliers (Yousfi et al., 2019). Également, des isolats d'*Escherichia coli* hébergants les gènes *mcr*-1 et *mcr*-3 ont été isolées à partir de l'eau d'irrigation, du sol agricole et du fumier (Touati et al., 2020 ; Chelaghema et al., 2020).

L'objectif de ce travail consiste à évaluer les différentes sources impliqués dans la bio-contamination des fruits et légumes avant récolte , tout en cherchant à isoler et à identifier des bactéries à Gram négatif résistantes au carbpenème , à la colistine et au métaux lourds à partir des sols , du fumier et des eaux d'irrigation destinés à la production agricole de cultures maraichères de 4 wilayas(Béjaia, Boumerdas, Jijel et Bouira).

Matériel et Méthodes

I. Cadre et objectifs de l'étude

Cette étude s'est déroulée au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université de A/Mira de Bejaia durant la période allant du mois de Mars au mois de Mai 2024. Durant cette étude, 56 prélèvements ont été effectués au niveau de huit (08) fermes de production maraîchères situées dans la région de Bejaia, Boumerdes, Jijel et Bouira. Les prélèvements ont été effectués sur des sols plantés de légumes et de fruits, sur les eaux utilisées pour l'irrigation et sur le fumier qui a servi à la fertilisation des sols (Annexe1). Le tableau ci-dessous représente la répartition des échantillons par localités et par origines de prélèvement.

Tableau I : Répartition des échantillons par localités et par origines

Wilaya	Localisation de la ferme	Sol	Eau d'irrigation		Types de production	Type de culture
				Fumier		
Bejaia	Aokas	8	1	1	Courgette, épinards, Piments, Tomates	Sous-serre
	Tichy	5	1	1	Haricots, Tomate, Piment, Laitue	Sous-serre
	Semanoun	2	2	4	Tomate, Laitue	Plein champ
	Boukhiam	4	1	1	Fèves, Laitue, Petit-pois, Tomates	Plein champ
	Merdj-Ouamane	1	1	0	Chou-fleur	Plein champ
Bouira	Lekhdaria	9	4	0	Oignons, Petit-pois, Artichaut	Sous-serre
Jijel	Tahir	5	2	0	Fraise, Tomate, Oignon, Haricots	Sous-serre
Boumerdes	Kaddara	1	1	1	Oignon	Sous-serre

II. Méthodes de prélèvement

II.1. Prélèvement du sol et du fumier : Les échantillons de sol ont été prélevés près des racines des plantes à une profondeur de 10 cm (figure 01). Chaque échantillon de sol a été collecté de chaque légume sélectionné à raison de 1Kg à l'aide d'une pelle. De même, un prélèvement du fumier entreposé pour l'épandage a été réalisé. Les prélèvements ont été mis dans des sacs stériles étiquetés.



Culture de laitue



Culture de courgette

Figure 01 : Site de prélèvement

II.2. Prélèvement de l'eau d'irrigation : L'eau utilisée pour l'irrigation des légumes et des fruits au niveau de chaque ferme a été prélevée à raison de 1L dans des flacons stériles. Ces derniers ont été étiquetés puis acheminés au laboratoire pour être analysée.

III. Criblage des souches de bacilles à Gram négatifs résistants aux carbapénèmes

III.1. Préparation des cultures

Un enrichissement a été réalisé pour les échantillons de sol et de fumier en ajoutant 25g de chaque échantillon à 50ml du milieu eau peptonée tamponnée (EPT). Après agitation, les milieux d'enrichissements ont été incubés à 37°C pendant 24h.

Les échantillons d'eaux ont été filtrés à l'aide d'un système de filtration contenant une membrane en nitrate de cellulose stérile de 0.22µm de diamètre. Une fois, la filtration terminée, le filtre a été récupéré et introduit dans un flacon contenant 4ml d'EPT puis incubé à 37 °C pendant 24h.

III.2. Sélection de souches résistantes à l'ertapénème sur milieu CarbaMTL Broth

A partir des bouillons d'enrichissement positifs, 50µl ont été prélevés et ajoutés à 1ml du bouillon CarbaMTL (Mairi, Touati, Lavigne) puis incubés à 37°C /24h. Ce milieu contient 0.5 µg/ml d'ertapénème, 250 µg/ml de cloxacilline et 64 µg/ml de vancomycine et permet la sélection des bacilles à Gram négatifs producteurs de carbapénémases. Il permet également

d'inhiber les souches productrices de céphalosporinases et des bactéries à Gram positives (Mairi et al., 2019).

III. 3. Isolement et purification des souches

Les bouillons MTL positifs ont été ensemencés sur des boîtes contenant de la gélose Mac Conkey ou EMB (éosine au bleu de méthylène). Après incubation à 37°C /24h, les boîtes ont été examinées selon les caractères cultureux des souches obtenus (forme, couleur, aspect, l'odeur). Le repiquage a été effectué pour chaque type de colonies successivement sur la même gélose jusqu'à obtention d'une culture pure.

IV. Criblage de souches de bacilles à Gram négatifs résistants à la colistine

A partir des bouillons d'enrichissement, une gélose BCP additionnée de 0.4µg/ml de colistine et de 64µg/ml de vancomycine a été ensemencée. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les colonies de couleur jaunes ont fait l'objet d'un repiquage successif sur le même milieu jusqu'à obtention d'une culture pure (Bardet et al., 2017).

V. Identification des souches résistantes

L'identification bactérienne a été réalisée en premier lieu par un criblage sur gélose Chromagar TM orientation. Ce milieu contient des substrats chromogènes permettant la coloration de la colonie suite à une dégradation par une enzyme bactérienne spécifique et la libération du chromophore. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, les groupes bactériens ont été reconnus en fonction de la différence de couleur.

L'identification des espèces a été réalisée uniquement pour celles appartenant à la famille des *Enterobacteriaceas* comme suit ;

1. Les colonies de couleur bleu métallique appartenant au groupe KES (*Klebsiella-Enterobacter-Serratia*) ont été distinguées sur la base de la présence de l'uréase, production d'indole.
2. Les colonies de couleur rose suspectées d'être *E. coli* ont été confirmées par le repiquage sur gélose EMB pour l'observation du reflet vert métallique et de la recherche de la production d'indole à 44°C.

VI. Etude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

La sensibilité des souches *vis-à-vis* des β -lactamines a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing et du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (EUCAST CA-SFM, 2023).

À partir d'une culture bactérienne de 24h, on réalise une suspension bactérienne en dissociant 4 à 5 colonies dans 4 ml d'eau physiologique stérile pour un inoculum d'environ 0.5 Mac Ferland ($\approx 10^8$ cellules/ml). Les boîtes Muller Hinton ont étéensemencées avec les souches à tester par écouvillonnage et des disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'une pince stérile.

Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 24h à 37°C. Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés et l'interprétation en bactérie Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) a été effectuée selon les critères définis par l'EUCAST (2023) et le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Tableau II) (CA-SFM, 2013 ; EUCAST CA-SFM, 2023).

Tableau II : Antibiotiques testés *vis-à-vis* des souches d'entérobactéries

Antibiotiques	Abréviation	Charge en μg	Marque	Diamètres critiques selon (EUCAST CA-SFM, 2023) et (CA-SFM, 2013)	
				S \geq	<R
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	30	Bioanalyse	19	19
Céfotaxime	CTX	30	Bioanalyse	20	17
Céftazidime	CAZ	30	Bioscan	22	19
Méropénème	MEM	10	Bioanalyse	22	16
Imipénème	IMP	10	OXOID	22	19
Céfoxitine	CX	30	Bioanalyse	18	18

VII. Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Le test de synergie consiste à placer des disques de Céfotaxime et Céfotazidime à une distance de 20 mm centre à centre d'un disque Amoxicilline-acide clavulanique. Le test est considéré comme positif lorsqu'une image synergie est observée entre les disques de Céfotaxime et/ou céftazidime, aztréonam et le disque d'amoxicilline-acide clavulanique, ce qui donne souvent une zone de forme caractéristique appelée "bouchon de champagne" (Jarlier et al., 1988).

VIII. Evaluation de la sensibilité des souches vis-à-vis des métaux lourds

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 4 métaux lourds à savoir le cuivre (Cu^{+2}), le cadmium (Cd^{+2}), le plomb (Pb^{+2}) et zinc (Zn^{+2}) ont été déterminées pour chaque souche isolée. Des géloses Mueller Hinton ont été additionnées de concentrations en sels de métaux allant de 100, 200, 400 800 $\mu\text{g/mL}$ pour le Cu^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} et de 800, 1600, 2400 et 3200 $\mu\text{g/mL}$ pour le Pb^{+2} .

Une suspension bactérienne a été préparée à une densité de (10^8 UFC/ml) dans de l'eau physiologique. 10 μl de chaque suspension bactérienne ont été ensemencés en spot et à raison de trois répétitions sur chacune des concentrations. Après incubation à $37^\circ\text{C}/24\text{h}$, la présence ou l'absence d'une croissance a été notée pour chaque souches et pour chaque concentration. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice est déterminée par la plus faible concentration inhibant la croissance des souches visible à l'œil nu (Işık et Akkan, 2021).

La résistance des bactéries aux métaux lourds a été déterminée en comparant les valeurs des CMIs obtenues à celles de la souche standard *E. coli* K12 (Tableau III). Si la souche étudiée peut se développer dans un environnement avec une concentration supérieur à la CMI de la souche d'*E. coli* K12, elle est considérée comme résistante (Işık et Akkan, 2021).

Tableau III : Niveaux de résistance de la souche *E. coli* K12 vis-à-vis des métaux lourds testés (Işık et Akkan, 2021)

Métaux lourds	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Cuivre	100
Cadmium	200
Plomb	1600
Zinc	100

Résultats

I. Répartition des prélèvements

Durant cette étude, 56 échantillons provenant de 08 fermes de production maraîchères dont 35 échantillons de sol (annexe 1, Tableau I), 08 échantillons de fumier (annexe 1, Tableau II) et 13 échantillons d'eau d'irrigation (annexe 1, Tableau III).

II. Criblage des souches de bacilles à Gram négatifs résistants aux carbapénèmes

L'enrichissement sur bouillon eau peptonée tamponnée a été positif pour tous les échantillons, parmi lesquels 37 ont été positifs sur milieu cabaMTL. À partir des échantillons positifs obtenus sur bouillon carbaMTL, un total de 13 souches appartenant à la famille des *Enterobacteracea* ont été isolées et purifiées.

Deux groupes bactériens ont été identifiés en se basant sur les caractéristiques biochimiques et les différents aspects des souches d'entérobactéries sur les différents milieux utilisés (figure 02).

L'identification des souches d'*E. coli* dont les colonies ont été de couleur rose sur gélose chromagar a été confirmée par la présence d'éclat métallique sur gélose EMB et la production d'indole à 44°C. Les souches appartenant au groupe K-E-S pour « *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* », 8 souches ont été des *Enterobacters* sp. 02 souches des *K. oxytoca* et une souche de *K. pneumoniae* (Annexe 2).

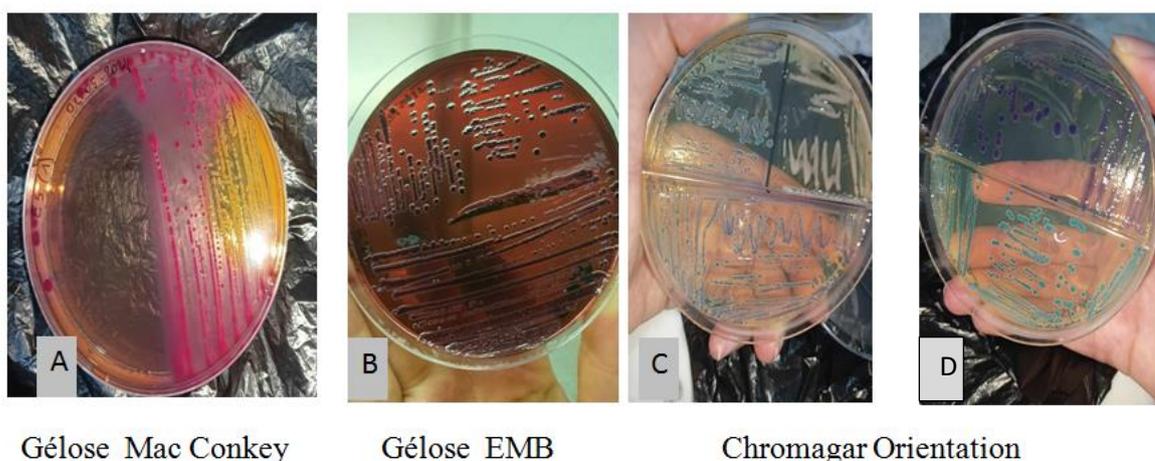


Figure 02 : Aspects des colonies sur différents milieux de culture

III. Criblage des souches de bacilles à Gram négatifs résistantes à la colistine

L'isolement des cultures sur bouillon eau peptonée tamponnée positif sur gélose BCP additionnée de 0.4µg/ml de colistine a permis l'isolement de 24 souches de bacilles à Gram négatif.

Un criblage des souches isolées sur gélose chromagar orientation a permis l'éliminer les souches présentant une résistance intrinsèque à la colistine et de sélectionner uniquement les souches d'entérobactéries (figure 03). L'identification sur la base des caractéristiques biochimiques des souches ainsi sélectionnées a permis de mettre en évidence 02 souche de *K. oxytoca* et 22 souches d'*Enterobacter sp.* (Annexe 2).

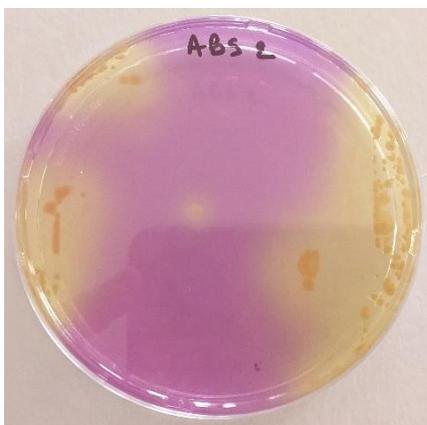


Figure 03 : Aspect des colonies sur gélose BCP

IV. Répartition des souches isolées par origines de prélèvement

D'après la figure ci-dessous, on remarque que les souches résistantes aux carbapénèmes ont été isolées principalement à partir de l'eau d'irrigation à l'exception d'une seule souche isolée à partir d'un sol irrigué par l'eau de rivière à Semaoun (BejS21). Par contre, les souches résistantes à la colistine ont été isolées principalement des échantillons de sol.

L'eau utilisée pour l'irrigation des cultures est principalement une eau de puits ou de fourrage situé à l'intérieur des fermes. Toutefois, certains fermiers n'hésitent pas à utiliser l'eau de rivières comme dans le cas de la ferme 3 à Semaoun wilaya de Bejaia, à Lakhdaria wilaya de Bouira et à Tahir wilaya de Jijel."

Nombre de
souches isolées

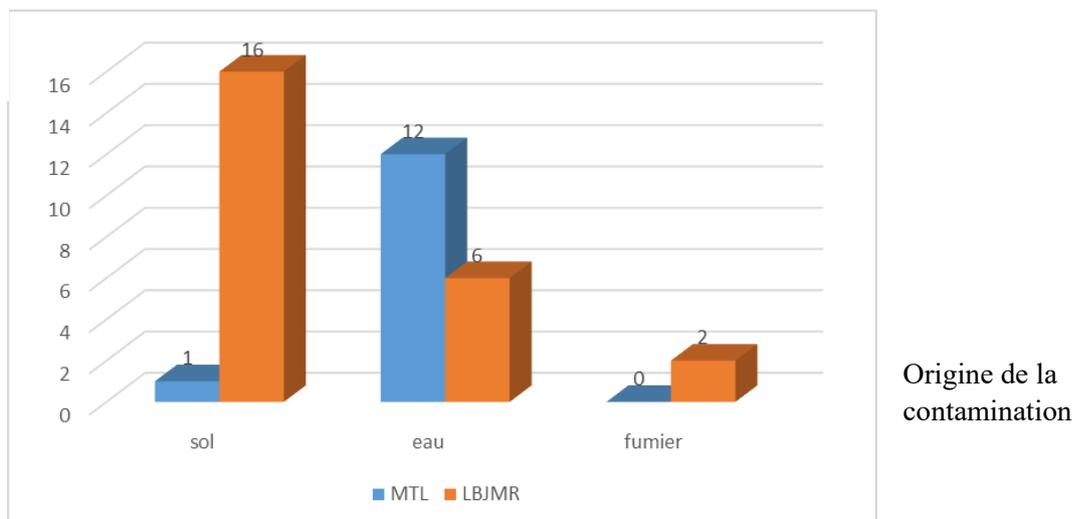


Figure 04 : Répartition des souches isolées sur milieux carbaMTL et gélose à la colistine par origines de prélèvement

V. Etude de la sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

VI.1. Etude de la sensibilité des souches isolées sur bouillon Carba-MTL

La sensibilité des souches d'entérobactérie a été testée par la méthode de l'antibiogramme standard sur gélose Mueller Hinton. Toutes les souches ont montré une résistance aux carbapénèmes testés (méro-pénèm/imipénème). Toutefois, presque toutes ces souches préservent leurs sensibilités *vis-à-vis* des céphalosporines de 3^{ème} génération (Tableau IV). Toutes les souches ont présenté une résistance à l'amoxicilline. Une souche de *K. oxytoca* (E5(3)) et les 02 souches d'*E. coli* étaient résistantes à la céfoxitine.

Tableau IV : Sensibilité des souches Entérobactéries isolées sur Carba-MTL aux antibiotiques

Code	Espèce	Origines	Région	Ferme	Types de production	Résistance aux ATB								Test de synergie
						AMC	CX	CTX/CAZ	MEM/IMI					
E2(1)	<i>E.coli</i>	Eau	Lakhdaria / Bouira	Ferme 01*	Chou-fleur	6	R	14	R	26	S	6	R	-
E3(1)	<i>Enterobacter sp.</i>		Lakhdaria/ Bouira	Ferme 02*	Petit pois	6	R	6	R	24	S	18	R	-
E3(2)	<i>Enterobacter</i>		Lakhdaria / Bouira	Ferme 01*	Chou-fleur	6	R	6	R	26	S	16	R	-
E4(1)	<i>E.coli</i>		Lakhdaria / Bouira	Ferme 01*	Chou-fleur	20	S	20	S	32	S	18	R	-
E4(3)1	<i>Enterobacter</i>		Lakhdaria / Bouira	Ferme 01*	Chou-fleur	6	R	6	R	20	S	6	R	-
E4(3)	<i>Enterobacter</i>		Lakhdaria / Bouira	Ferme 01*	Chou-fleur	6	R	6	R	20	S	6	R	-
E5(1)	<i>Enterobacter</i>		Aokas / Bejaia	Passerelle 01	Courgettes	14	R	18	S	28	S	14	R	-
E5(3)	<i>K. oxytoca</i>		Aokas / Bejaia	Passerelle 02	Piment	14	R	18	S	30	S	16	R	+
E5(4)	<i>K. oxytoca</i>		Aokas / Bejaia	Passerelle 03	Tomate	6	R	6	R	30	S	12	R	-
E5 (KP)	<i>K.pneumoniae</i>		Aokas / Bejaia	Passerelle 04	Epinard	26	S	20	S	30	S	16	R	+
E6 (1)	<i>Enterobacter</i>	Merdj Ouamane / Bejaia	Ferme 04	Chou-fleur	6	R	6	R	20	S	6	R	-	
BejS21	<i>Enterobacter</i>	Sol	Semaoun	Ferme 3*	Laitue	6	R	6	R	6	R	8	R	-
JE2	<i>Enterobacter</i>	Eau	Tahir / Jijel	Ferme 02*	Fraises	6	R	6	R	26	S	14	R	-

* : l'eau utilisée pour l'irrigation est une eau de rivière

VI.2. Etude de la sensibilité des souches isolées sur gélose à la colistine aux antibiotiques

D'après le tableau ci-dessous, on remarque que presque toutes ces souches préservent leurs sensibilités *vis-à-vis* des céphalosporines de 3ème génération. Toutes les souches ont présenté une résistance à l'amoxicilline. La souche de *K. oxytoca* (LBABS7) présente une résistance plasmidique acquise à la céfoxitine comparé à celle les souches *Enterobacter* sp.

VI. Recherche de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Le test de synergie réalisé sur les souches d'entérobactéries isolées dans cette étude était uniquement positif chez une souche de *K. pneumoniae* E5(KP) et une souche de *K. oxytoca* E5(3) isolées de l'eau d'irrigation utilisée dans la même exploitation dans la région d' Aoukas. Cette eau provient d'un fourrage situé à l'intérieur de l'exploitation, utilisé pour l'irrigation des cultures (piment et d'épinard).

Chez les souches d'*Enterobacter* sp. Naturellement résistantes à la céfoxitine, l'absence d'une image de synergie ne signifie pas nécessairement l'absence de production de BLSE (voir figure ci-dessous). Cependant, il est recommandé de réaliser un autre test de synergie en présence de 250 μ g/ml de cloxacilline pour inhiber la céphalosporinase

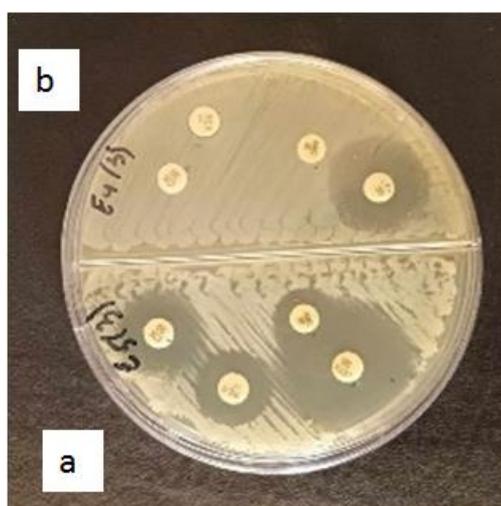


Figure 05 : Résultat d'un test de synergie négatif (b) chez une souche d'*Enterobacter* sp (E4(3)) et d'un test positif (a) chez la souche *K. oxytoca* (E5(3))

Tableau V : Sensibilité des souches Entérobactéries isolées sur gélose à la colistine

Code	Espèce	Origine	Région	Ferme	Types de production	Résistance aux ATB						Test de synergie
						AMC	R	CX	R	CTX/CAZ	R	
LB E4(2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Lakhdaria	Ferme 01*	Chou-fleur	10	R	12	R	8	R	-
LB E2(2)	<i>Enterobacter sp.</i>		Lakhdaria	Ferme 02*	Petit pois	6	R	6	R	22	S	-
LB E2(3)	<i>Enterobacter sp.</i>		Lakhdaria	Ferme 01*	Chou-fleur	8	R	14	R	38	S	-
LB LKS6	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Lakhdaria	Ferme 03	Artichaut	6	R	36	S	14	R	-
LB BejS4	<i>Enterobacter sp.</i>		Boukhiamia	Ferme 01	Laitue	6	R	12	R	30	S	-
LB BejS5	<i>Enterobacter sp.</i>		Boukhiamia	Passerelle 01	Fèves	ND						-
LB E10	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Boukhiamia	Passerelle 02	Tomate/Laitue	6	R	6	R	14	R	-
LB BejS3	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Boukhiamia	Passerelle 03	Tomate	6	R	36	S	36	S	-
LB BejS6	<i>Enterobacter sp.</i>		Boukhiamia	Passerelle 04	Petit pois	6	R	20	S	22	S	-
LB ABS2	<i>Enterobacter sp.</i>		Aokas	Ferme 04	Courgettes	12	R	10	R	24	S	-
LB ABS3 (2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Aokas	Ferme 01	Epinard	ND						-
LB E5(1)	<i>Enterobacter sp.</i>		Aokas	Ferme 02	Piment/ Tomate/ Laitue	ND						-
LB ABS5(2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Aokas	Ferme 02	Piment	6	R	6	R	22	S	-
LB BMS1	<i>Enterobacter sp.</i>		Kaddara	Ferme 01	Oignon	8	R	14	R	16	R	-
LB BejS1	<i>Enterobacter sp.</i>		Semaoun	Site 01	Oignon	6	R	8	R	28	S	-
LB BejS2	<i>Enterobacter sp.</i>		Semaoun	Site 01	Laitue	ND						-
LB E8(A)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Semaoun	Site 01	Oignon /Laitue	6	R	10	R	20	S	-
LB BejF1	<i>Enterobacter sp.</i>	Fumier	Semaoun	Site 01	Laitue	6	R	6	R	20	S	-
LB BejF3	<i>K. oxytoca</i>		Semaoun	Site 02	Tomate	ND						-
LB BBS1	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	N=°7/ Bejaia	Ferme 01	Tomate	12	R	20	S	36	S	-
LB BBS2	<i>Enterobacter sp.</i>		N=°7/ Bejaia	Ferme 02	Piment	6	R	18	S	24	S	-
LB MOS1	<i>Enterobacter sp.</i>		Merdj Ouamane	Ferme 01	Chou-fleur	6	R	14	R	36	S	-
LB SJ4	<i>Enterobacter sp.</i>		Tahir	Ferme 01*	Fraises	6	R	10	R	32	S	-
LB ABS7	<i>K. oxytoca</i>		Aokas	Ferme 13	Epinard	6	R	14	R	20	S	-

IV. Etude de la sensibilité des souches aux métaux lourds

La sensibilité des souches d'entérobactéries *vis-à-vis* du cuivre, zinc, du plomb et du cadmium est représentée dans les tableaux ci-dessous.

IV.1. Etude de la sensibilité des souches résistantes aux carbapénèmes *vis-à-vis* des métaux lourds

Les souches résistantes aux carbapénèmes ont montrés des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variables allant pour le zinc et le cuivre de 800 à >800 µg/mL. La CMI des souches *vis-à-vis* du plomb varie de 3200 à >3200 µg/mL. Pour le cadmium 04 souches ont montrées une CMI de 400 µg/mL, 8 souches ont une CMI de 800µg/mL et une souche présente une CMI > 800µg/mL (Tableau VI). La figure ci-dessous illustre un exemple de la sensibilité des souches d'entérobactéries au cuivre, au zinc, au cadmium et au plomb.

Tableau VI: Détermination des CMI et des phénotypes de résistance aux métaux lourds chez les souches résistantes aux carbapénèmes

Code	Espèces	Origines	Types de production	CMI Zn	Phénotype	CMI pb	Phénotype	CMI Cu	Phénotype	CMI Cd	Phénotype
E2(1)	<i>E.coli</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	>3200	R	>800	R	800	R
E3(1)	<i>Enterobacter</i>	Eau	Petit pois	800	R	3200	R	>800	R	800	R
E3(2)	<i>Enterobacter</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
E4(1)	<i>E.coli</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
E4(3)1	<i>Enterobacter</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
E4(3)	<i>Enterobacter</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	>3200	R	>800	R	800	R
E5(1)	<i>Enterobacter</i>	Eau	Courgette	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
E5(3)	<i>K .oxytoca</i>	Eau	Piment	>800	R	>3200	R	>800	R	800	R
E5 (4)	<i>K .oxytoca</i>	Eau	Tomate	>800	R	3200	R	>800	R	400	R
E5 KP	<i>K . pneumoniae</i>	Eau	Epinard	>800	R	3200	R	>800	R	400	R
E6(1)	<i>Enterobacter</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	3200	R	>800	R	400	R
Bej S21	<i>Enterobacter</i>	Sol	Laitue	>800	R	>3200	R	>800	R	800	R
JE2	<i>Enterobacter</i>	Eau	Fraise	800	R	3200	R	>800	R	400	R

IV.2. Etude de la sensibilité des souches résistantes à la colistine *vis-à-vis* des métaux lourds

D'après le tableau ci-dessous, on remarque que les souches ont montré des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieur à 800µg/mL pour zinc et le cuivre. La CMI des souches *vis-à-vis* du plomb varie de 1600 à >3200µg/mL, par contre elles varient de 200 à > 800 µg/mL *vis-à-vis* du cadmium.

On remarque également que toutes ces souches sont résistantes à tous les métaux lourds testés à l'exception de la souche *d'Enterobacter* sp. LBSJ4 qui montre une sensibilité *vis-à-vis* du plomb (tableau VII).

Tableau VII : Détermination des CMI et des phénotypes de résistance et aux métaux lourds chez les souches résistantes à la colistine

Code	Espèce	Origines	Types production	CMI Zn	Phénotype	CMI Pb	Phénotype	CMI Cu	Phénotype	CMI Cd	Phénotype
LB E4 (2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	>3200	R	>800	R	>800	R
LB E2 (2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Petit pois	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
LB E2 (3)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Chou-fleur	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
LB LKS6	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Artichaut	>800	R	2400	R	>800	R	800	R
LB LKS8	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Oignon	>800	R	2400	R	>800	R	800	R
LB Bej S4	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Laitue	>800	R	>3200	R	>800	R	>800	R
LB Bej S5	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Fèves	>800	R	>3200	R	>800	R	>800	R
LB E10	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Tomate /laitue	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
LB Bej S3	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Epinard	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
LB Bej S6	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Petit pois	>800	R	3200	R	>800	R	200	R
LB ABS2	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Courgette	>800	R	3200	R	>800	R	400	R
LB ABS3	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Epinard	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
LB E5 (1)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Tomate /laitue/piment	>800	R	2400	R	>800	R	>800	R
LB ABS5 (2)	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Piment	>800	R	2400	R	>800	R	>800	R
LB BMS1	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Oignon	>800	R	3200	R	>800	R	400	R
LB Bej S1	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Oignon	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
LB Bej S2	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Laitue	>800	R	3200	R	>800	R	800	R
LB E8 (A)	<i>Enterobacter sp.</i>	Eau	Laitue / oignon	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
LB Bej F1	<i>Enterobacter sp.</i>	Fumier	laitue	>800	R	2400	R	>800	R	800	R
LB Bej F3	<i>K oxytoca</i>	Fumier	Tomate	>800	R	2400	R	>800	R	800	R
BBS1	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Tomate	>800	R	3200	R	>800	R	>800	R
BBS2	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Piment	>800	R	2400	R	>800	R	800	R
LB MOS 1	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Chou-fleur	>800	R	>3200	R	>800	R	800	R

Résultats

LB SJ4	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Fraise	>800	R	1600	S	>800	R	400	R
LBABS7	<i>Enterobacter sp.</i>	Sol	Epinard	>800	R	2400	R	>800	R	400	R

Discussion

Les fruits et légumes peuvent être exposés à des contaminations microbiennes en raison de leur culture en plein champ. Les intrants agricoles tels que l'eau d'irrigation, le sol et le fumier peuvent introduire des microorganismes avant la récolte (**Han et al., 2018 ; Ferelli et Micallef, 2019 ; Alegdeleye et al., 2023**). Les eaux d'irrigation et les sols agricoles sont les principaux réservoirs et voies de transmission des pathogènes humains au stade précédant la récolte en raison de la capacité de ces pathogènes à survivre longtemps au sein de ces deux niches agraires. (**Iwu et al., 2019**).

Durant cette étude, 37 souches d'entérobactéries ont été isolées et identifiées, dont 17 souches ont été isolées des sols cultivés, 18 souches de l'eau d'irrigation et 2 souches à partir du fumier. L'espèce *Enterobacter* sp. est la plus dominante (30 souches), suivie de 5 souches de *Klebsiella* (4 souches *K. oxytoca* et une souche *K. pneumoniae*) et enfin 2 souches d'*E. coli*. Ces souches ont pour habitat les intestins des humains, des animaux et sont largement distribuées dans la nature (plantes, sol et eau usée) (**Iwu et al., 2019**). Elles ont été classées en première ligne des agents pathogènes pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques est une priorité (**OMS, 2017**).

L'étude de la sensibilité des souches a révélé que les 13 souches d'entérobactéries isolées sur boillon Carba-MTL étaient résistantes aux carbapénèmes et les 22 souches isolées sur gélose BCP étaient résistantes à 0.4µg/ml de colistine, avec des taux de prévalence respectifs de 23,21% et 39,28%. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par **Hamga et Hammar (2023)**, qui ont observé une sensibilité totale des souches d'entérobactéries aux carbapénèmes, à l'exception d'une seule souche d'*E. coli* isolée de l'eau d'irrigation à Boumerdes. Plusieurs travaux ont rapportés des niveaux élevés de contamination des sols cultivés et de l'eau d'irrigation par des souches de *Klebsiella* sp. portant les gènes *bla*-NDM-1 et *bla*-KPC, dont certaines co-hébergent ces deux gènes simultanément, est également préoccupante (**Eboma et al., 2020**).

Toutes les souches résistantes aux carbapénèmes ont été isolées principalement à partir de l'eau d'irrigation et celles résistantes à la colistine ont été isolées des échantillons de sol. Plusieurs études ont confirmé le lien direct entre l'usage de l'eau d'irrigation contaminée par des souches d'entérobactéries et principalement *E. coli* résistantes à différentes familles d'antibiotiques sur les fruits et légumes frais (**Araújo et al., 2017 ; Gekenidis et al., 2018**). Effectivement, le même constat a été observé lors de cette étude par la caractérisation d'une souche de *K. pneumoniae* E5(KP) et une souche de *K. oxytoca* E5(3) dans l'eau utilisée pour

l'irrigation de 2 parcelles (épinard et piment) différentes dans la même ferme. **Araújo** et ces collaborateurs (2017) ont identifié des clones identiques d'*E. coli* retrouvés à la fois sur les légumes et de l'eau utilisée pour leur irrigation, suggérant ainsi une contamination croisée dans plusieurs exploitations familiales au Portugal (**Araújo et al., 2017**).

En raison de certains facteurs, notamment des défis économiques, politiques et climatiques, la plupart des propriétaires agricoles sont revenus à l'utilisation d'eaux usées brutes ou insuffisamment traitées pour l'irrigation de leurs produits agricoles (**Iwu et al., 2019**). Dans cette étude, on a constaté que l'eau utilisée pour l'irrigation des récoltes été principalement une eau de fourrage situé dans les productions. Toutefois certains agriculteurs utilisent directement l'eau de rivière, de barrage ou celles stockés dans des bassins à ciel ouvert. Toutefois, les eaux usées des fosses septiques, les déjections de la faune (reptiles et les oiseaux survolant), en particulier si le puits n'était pas couvert, pourraient également être à l'origine de la contamination. Des souches productrices de BLSE et de mcr provenant de l'eau de puits collectée sur des sites où du fumier de poulet a été épandu dans le sol pendant une longue période suggère que ce dernier est une source potentielle de contamination dans les eaux souterraines (**Anyanwu et al 2020**).

La production de BLSE a été observée uniquement chez deux souches de *K. pneumoniae*, E5(3) et E5. Chez les souches d'*Enterobacter* sp. la présence d'une AmpC naturelle masque l'apparition d'une synergie, ce qui peut expliquer le résultat négatif observé chez les 30 souches isolées. Cependant, une AmpC plasmidique acquise par des souches de *Klebsiella* sp. peut également masquer leur présence. Il est en effet préoccupant de constater la propagation croissante de bacilles à Gram négatif producteurs de BLSE dans les écosystèmes agricoles à travers le monde. La contamination des sols cultivés, du fumier ainsi que de l'eau d'irrigation dans des fermes par des souches d'entérobactéries productrices de BLSE a été rapportée en Amérique du Sud (*bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-65} et *bla*_{CTX-M-15}) (**Montero et al., 2021**), au Népal, au Canada (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} et *bla*_{SHV}) (**Subramanya et al., 2021 ; Anderson et al., 2023**) en Tunisie (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-14}) (**Ben Said et al., 2015**) et en chine (Zheng et al. 2017). Toutefois, il existe un manque d'informations sur la présence de bacilles à Gram négatif hébergeant des gènes de résistance aux carbapénèmes, à la colistine ainsi qu'aux métaux lourds dans le monde et en Algérie.

Les études de **Touati et al. (2020)** et **Chelaghma et al. (2022)** mettent en lumière le problème croissant de résistance aux antibiotiques dans l'environnement agricole. Une résistance à la colistine à médiation plasmidiques hébergeant le gène *mcr-like* a été rapportée par ces auteurs chez des isolats d'*E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Klebsiella* provenant du sol, des eaux d'irrigation et du fumier des exploitations agricoles qui alimentent le marché algérien. Des études ont rapporté la détection d'entérobactéries hébergeant le gène *mcr-1* dans les sols agricoles en Chine (**Zheng et al., 2017**) et aux Amériques du sud (**Oliveira et al., 2019**) et suggèrent que ces bactéries peuvent contaminer la production agricole, particulièrement les fruits et légumes consommés crus (**Yang et al., 2019**). **Zheng et ses collaborateurs (2017)** ont rapporté la présence de souches d'*E. coli* productrices de NDM-1, de BLSE et hébergeant le gène *mcr-1* dans le sol, mettant en évidence l'impact du fumier animal dans la transmission de la résistance à la colistine et aux bêta-lactamines.

Dans cette étude, nous avons observé que toutes les souches d'entérobactéries étaient résistantes aux quatre métaux lourds utilisés (Zn, Pb, Cd, Cu), à l'exception de la souche LB SJ4 qui s'est révélée sensible au Pb à une concentration de 1600 µg/ml. Les bactéries, grâce à leurs capacités d'adaptation infinies, 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 chargé en métaux lourds (**Vats et al., 2022 ; Semaoune et Semaoune, 2023**).

Les métaux lourds 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 compartiments de l'environnement, par exemple dans les sols agricoles, les zones affectées par l'exploitation minière, les systèmes d'aquaculture, l'élevages de porcs, les fermes laitières et le microbiote intestinal de divers autres animaux (**Vats et al., 2022 ; Semaoune et Semaoune, 2023**).

Habituellement, les produits frais sont cultivés dans des champs ouverts où ils sont constamment exposés à une contamination microbienne avant la récolte par l'eau d'irrigation contaminée, le sol agricole, le fumier brut ou mal composté et/ou les excréments déposés par les animaux domestiques ou sauvages intrus, qui traversent la ferme. L'identification des sources de contamination au stade pré-récolte est vitale car la réduction ou l'éradication de la contamination microbienne en particulier par les bactéries multirésistantes qui se produit avant la récolte est difficile à atteindre pendant ou après la phase post-récolte.

Il est effectivement préoccupant de constater que des souches résistantes aux antibiotiques peuvent être isolées à partir de l'eau d'irrigation et des sols cultivés, ce qui peut entraîner une contamination des fruits et légumes frais. Il est crucial de prendre des mesures pour prévenir la propagation de ces souches résistantes, notamment en améliorant les pratiques d'irrigation et en veillant à ce que l'eau utilisée soit correctement traitée. Il est également important de sensibiliser les agriculteurs aux risques liés à l'utilisation du fumier organique et une eau contaminée pour l'irrigation de leurs cultures.

Conclusion

Conclusion

En conclusion, cette étude met en évidence le risque de prévalence de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes aux C3G et à la colistine dans l'environnement agricole de quelques exploitations maraichère dans les wilaya de Bejaia, Boumerdes, Jijel et Bouira.

Les fruits et légumes que nous consommons crus peuvent être contaminés par des bactéries résistantes en particulier ceux provenant d'exploitation qui utilisent des eaux contaminées pour l'irrigation des cultures et de l'épandage de fumier en particulier celui de la volaille.

Les souches isolées dans cette étude ont montré également une co-résistance *vis-à-vis* des métaux lourds à savoir le zinc, le cadmium et le cuivre et le plomb. Ces résultats appuient l'hypothèse d'un lien entre l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire et le développement de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds dans l'environnement agricole, ainsi que dans notre alimentation.

Les contaminants des eaux, du sol et du fumier d'origine animale par des souches résistantes aux agents antimicrobiens pourraient être à l'origine de la propagation d'un ensemble de gènes de résistances multiples (carbapénème, colistine et métaux lourds). Leur évaluation reste donc essentielle pour prévenir et gérer les risques liés à la dissémination de l'antibiorésistance dans le concept One Health.

Par conséquent, la mise en place d'un réseau et d'une politique de surveillance systématique de l'antibiorésistance dans les eaux utilisées pour l'irrigation, les biofertilisants d'origine animale, les sols et les plantes est essentielle pour évaluer et gérer les risques associés à la diffusion des gènes de résistances dans l'environnement agricole

Des études futures devraient être menées sur un nombre plus important d'échantillons pour évaluer le risque réel pour la santé humaine et l'environnement.

Références
Bibliographiques

- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177-208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>
- Anderson, R. E. V., Chalmers, G., Murray, R., et al. (2023). Characterization of *Escherichia coli* and other Enterobacterales resistant to extended-spectrum cephalosporins isolated from dairy manure in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(2), e01869-22. <https://doi.org/10.1128/AEM.01869-22>
- Anderson, W., Baethgen, W., Capitanio, F., Ciaï, P., Cook, B. I., Da Cunha, G. R., Goddard, L., Schauburger, B., Sonder, K., Podestá, G., Van der Velde, M., & You, L. (2023). Climate variability and simultaneous breadbasket yield shocks as observed in long-term yield records. *Agricultural and Forest Meteorology*, 331, 109321. <https://doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2023.109321>
- Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., & Nwobi, O. C. (2020). Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (MCR) gene-containing isolates from the environment: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1028. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031028>
- Araujo, S., Silva, I. A. T., Tacão, M., Patinha, C., Alves, A., & Henriques, I. (2017). Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Ben Said, L., Jouini, A., Alonso, C. A., et al. (2016). Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. *Science of the Total Environment*, 550, 1103-1109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.110>
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia.
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C.A., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Berg, J., Brandt, K.K., Al-Soud, W.A., Holm, P.E., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., & Nybroe, O. (2012). Selection for Cu-tolerant bacterial communities with altered composition, but unaltered richness, via long-term Cu exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7438-7446. <https://doi.org/10.1128/AEM.01838-12>
- Bonardi, S., & Pitino, R. (2019). Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian Journal of Food Safety*, 8(2). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.7956>
- Brienza, M., Sauvêtre, A., Ait-Mouheb, N., Bru-Adan, V., Coviello, D., Lequette, K., Patureau, D., Chiron, S., & Wéry, N. (2022). Reclaimed wastewater reuse in irrigation: Role of

- biofilms in the fate of antibiotics and spread of antimicrobial resistance. *Water Research*, 221, 118830. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118830>
- Ebomah, K.E., & Okoh, A.I. (2020). Detection of carbapenem-resistance genes in *Klebsiella* species recovered from selected environmental niches in the Eastern Cape Province, South Africa. *Antibiotics*, 9(7), 425. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070425>
- Ejo, M., Garedew, L., Alebachew, Z., & Worku, W. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animal-origin food items in Gondar, Ethiopia. *BioMed Research International*, 2016, 4290506. <https://doi.org/10.1155/2016/4290506>
- Elshafiee, E.A., Kadry, M., Nader, S.M., & Ahmed, Z.S. (2022). Extended-spectrum-beta-lactamases and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from fresh produce farms in different governorates of Egypt. *Veterinary World*, 1191-1196. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1191-1196>
- Ferelli, A.M.C., & Micallef, S.A. (2019). Food safety risks and issues associated with farming and handling practices for organic certified fresh produce. In *Safety and Practice for Organic Food* (pp. 151-180). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00007-6>
- Hamga, & Hammar. (2023). Evaluation des facteurs de risques de biocontamination des fruits et légumes avant récolte des bacilles à Gram négative productrices de carbapénèmase. Université de Béjaia.
- Han, X.-M., Hu, H.-W., Chen, Q.-L., Yang, L.-Y., Li, H.-L., Zhu, Y.-G., Li, X.-Z., & Ma, Y.-B. (2018). Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. *Soil Biology and Biochemistry*, 126, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.018>
- Hölzel, C.S., Tetens, J.L., & Schwaiger, K. (2018). Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: A need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(11), 671-688. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2501>
- Hong, P.-Y., Al-Jassim, N., Ansari, M.I., & Mackie, R.I. (2013). Environmental and public health implications of water reuse: Antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and antibiotic resistance genes. *Antibiotics*, 2, 367-399. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2040367>
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of *Salmonella* Enterica serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(1), 27-35. <https://doi.org/10.1089/153531404772914437>
- Iwu, C.D., & Okoh, A.I. (2019). Preharvest transmission routes of fresh produce associated bacterial pathogens with outbreak potentials: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22), 4407. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224407>
- Jauregi, L., Epelde, L., Alkorta, I., & Garbisu, C. (2021). Antibiotic resistance in agricultural soil and crops associated to the application of cow manure-derived amendments from conventional and organic livestock farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.662372>
- Jiménez-Belenguer, A.I., Ferrús, M.A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., & Castillo, M.Á. (2023). Prevalence and characterization of beta-lactam and carbapenem-resistant bacteria isolated from organic fresh produce retailed in Eastern Spain. *Antibiotics*, 12(2), 387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>

- Kahina, C. (2023). La sécurité alimentaire en Algérie: Enjeux et défis Food security in Algeria: issues and challenges.
- Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics use in food animal production: Escalation of antimicrobial resistance: Where are we now in combating AMR? *Medical Sciences*, 9, 14. <https://doi.org/10.3390/medsci9010014>
- Kharazi, A., Leili, M., Khazaei, M., Alikhani, M.Y., & Shokoohi, R. (2021). Human health risk assessment of heavy metals in agricultural soil and food crops in Hamadan, Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100, 103890. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103890>
- Kumar, K., Gupta, S.C., Chander, Y., & Singh, A.K. (2005). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*. Academic Press.
- Mairi, A., Touati, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.P., & Boukadida, J. (2019). Répartition des *Staphylococcus aureus* toxinogènes résistants à la méthicilline et sensibles à la méthicilline provenant de différentes niches écologiques en Algérie. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 103-108.
- Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., et al. (2021). Extended-spectrum beta-lactamase producing-*Escherichia coli* isolated from irrigation waters and produce in Ecuador. *Frontiers in Microbiology*, 12, 709418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Oliveira, C.C., Lopes, E.S., Barbosa, D.R., Pimenta, R.L., Sobrinho, N.M.B.A., Coelho, S.M.O., Souza, M.M.S., & Coelho, I.S. (2019). Occurrence of the colistin resistance Mcr. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>
- Qiu, J., Shen, Z., & Xie, H. (2023). Drought impacts on hydrology and water quality under climate change. *Science of The Total Environment*, 858, 159854.
- Rashid, A., Schutte, B.J., Ulery, A., et al. (2023). Heavy metal contamination in agricultural soil: Environmental pollutants affecting crop health. *Agronomy*, 13(6), 1521.
- Rhouma, M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: What is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008>
- Stergiou-Gekenidis, M.T. (2018). Irrigation water: A source of antibiotic-resistant bacteria in the plant-based food chain. Thèse de doctorat, ETH Zurich.
- Subramanya, S.H., Bairy, I., Metok, Y., et al. (2021). Detection and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae from the gut of subsistence farmers, their livestock, and the surrounding environment in rural Nepal. *Scientific Reports*, 11(1), 2091. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81486-4>
- Sui, Q., Zhang, J., Chen, M., Wang, R., Wang, Y., & Wei, Y. (2019). Fate of microbial pollutants and evolution of antibiotic resistance in three types of soil amended with swine slurry. *Environmental Pollution*, 245, 353-362. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.031>
- Tafoukt, R., Leangapichart, T., Hadjadj, L., Bakour, S., Diene, S.M., Rolain, J.M., & Touati, A. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from...
- Tafoukt, R., Leangapichart, T., Hadjadj, L., Bakour, S., Diene, S.M., Rolain, J.M., & Touati, A. (2018). Characterisation of Bla OXA-538, a new variant of Bla OXA-48, in *Shewanella xiamenensis* isolated from river water in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 70-73. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.11.008>

- Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S.A., & Rolain, J.M. (2020). Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in Northwest Algerian farmlands. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.011>
- Vats, S., Gupta, N., & Bhargava, P. (2019). Vulnerability of soil microbiota towards natural and anthropogenic induced changes and loss of pedospheric functionality. In Siddharth, V., Neeraj, G., & Prachi, B. (Eds.), *Mycorrhizosphere and Pedogenesis* (pp. 191-205).
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., et al. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643-2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Wang, X., Lan, B., Fei, H., Wang, S., & Zhu, G. (2021). Heavy metal could drive co-selection of antibiotic resistance in terrestrial subsurface soils. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 124848. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124848>
- Zheng, B., Huang, C., Xu, H., et al. (2017). Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, MCR-1-harboring *Escherichia coli* in farming soil. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.0251>
- Zhong, Q., Cruz-Paredes, C., Zhang, S., & Rousk, J. (2021). Can heavy metal pollution induce bacterial resistance to heavy metals and antibiotics in soils from an ancient land-mine? *Journal of Hazardous Materials*, 411, 124962. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124962>

Annexes

Annexe 1

Tableau I: Répartition des échantillons de sol par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine

Code	Types de culture	Région	Ferme	Date	Colistine	MTL
BJS1	Courgette	Aokas (Bejaia)	Passerelle 01	23/03/2024	-	-
BJS2	Courgette	Aokas (Bejaia)	Ferme 04	23/03/2024	+	+
BJS3	Epinard	Aokas (Bejaia)	Ferme 01	23/03/2024	+	-
BJS4	Courgette	Aokas (Bejaia)	Passerelle 04	16/04/2024	+	+
BJS5	Piment	Aokas (Bejaia)	Ferme 02	16/04/2024	+	+
BJS6	Tomate	Aokas (Bejaia)	Passerelle 02	16/04/2024	-	-
BJS7	Epinard	Aokas (Bejaia)	Passerelle 03	16/04/2024	+	+
BJS8	Laitue	Aokas (Bejaia)	Passerelle 05	16/04/2024	+	-
BJS9	Tomate	N°=7 (Bejaia)	Ferme 01	18/04/2024	+	+
BJS10	Piment	N°=7 (Bejaia)	Ferme 01	18/04/2024	+	+
BJS11	Epinard	N°=7 (Bejaia)	Ferme 01	18/04/2024	-	+
BJS12	Haricot	N°=7 (Bejaia)	Ferme 01	18/04/2024	-	+
BJS13	Laitue	N°=7 (Bejaia)	Ferme 01	18/04/2024	+	+
BRS1	Arthichaut	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 03	16/03/2024	+	-
BRS2	Arthichaut	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 03	16/03/2024	-	-
BRS3	Chou-fleur	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 01	16/03/2024	-	-
BRS4	Petit pois	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 02	16/03/2024	-	-

BRS5	Chou-fleur	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 01	19/04/2024	-	+
BRS6	Arthichaut	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 03	19/04/2024	+	+
BRS7	Arthichaut	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 03	19/04/2024	-	+
BRS8	Petit pois	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 02	19/04/2024	-	+
BRS9	Oignon	Lakhdaria (Bouira)	Ferme 04	20/04/2024	+	+
BJ14	Chou-fleur	Merdj Ouaman (Bejaia)	Ferme 01	17/04/2024	+	+
BJ15	Oignon	Semoune1 /Bejaia	Site 01	03/05/2024	+	+
BJ16	Laitue	Semoune2 /Bejaia	Site 02	03/05/2024	+	+
BJ21	Laitue	Sameoune3/Bejaia	Site 03	20/05/2024	+	-
BJ17	Tomate	Boukhiama/Bejaia	Passerelle 03	07/05/2024	+	+
BJ18	Laitue	Boukhiama/Bejaia	Ferme 01	07/05/2024	+	+
BJ19	Fève	Boukhiama/Bejaia	Passerelle 01	07/05/2024	+	+
BJ20	Petit pois	Boukhiama/Bejaia	Passerelle 04	07/05/2024	+	+
JS1	Fraise	Tahir/Jijel	Ferme 01	28/04/2024	-	+
JS2	Tomate	Tahir/Jijel	Ferme 02	28/04/2024	-	+
JS3	Fraise	Tahir oued/Jijel	Ferme 02	13/05/2024	-	-
JS4	Oignon	Tahir oued/Jijel	Ferme 02	13/05/2024	+	-
JS5	Haricot	Tahir oued/Jijel	Ferme 02	13/05/2024	-	-
BMS1	Oignon	Kaddara/Boumerdes	Ferme 01	11/05/2024	+	-

Annexe 1

Tableau II: Répartition des échantillons de fumier par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine

Code	Région	Types de culture	Ferme	Date	MTL	Colistine
BJF1	AOKAS/BEJAIA	COURGETTE/LAITUE/PIMENT	Passerelle 01	16/04/2024	-	+
BJF2	N°7/BEJAIA	LAITUE/PIMENT/TOMATE	Ferme 01	18/04/2024	-	+
BJF3	SEMOUN 1/BEJAIA	LAITUE	Site 01	03/05/2024	-	+
BJF4	SEMOUN 1/BEJAIA	LAITUE/OIGNON	Site 01	03/05/2024	+	-
BJF5	SEMOUN 2/BEJAIA	TOMATE	Site 02	03/05/2024	-	+
BJF6	SEMOUN 2/BEJAIA	TOMATE	Site 02	03/05/2024	+	-
BJF7	BOUKHIAMA/BEJAIA	LAITUE/TOMATE	Passerelle 02	07/05/2024	+	+
BMF1	KADDARA/BOUMERDES	OIGNON	Ferme 01	11/05/2024	-	+

Tableau III: répartition des échantillons d'eau par régions et résultats du criblage sur bouillon Carba-MTL et gélose à la colistine

Code	Région	Types de cultures	Ferme	Date	MTL	Colistine
BRE1	LAKHDARIA/BOUIRA	ARTHICHAUT/CHOU-FLEUR	Ferme 01	16/03/2024	+	-
BRE2	LAKHDARIA/BOUIRA	ARTHICHAUT/CHOU-FLEUR	Ferme 01	16/03/2024	+	+
BRE3	LAKHDARIA/BOUIRA	ARTHICHAUT/CHOU-FLEUR	Ferme 02	19/04/2024	+	-
BRE4	LAKHDARIA/BOUIRA	ARTHICHAUT/CHOU-FLEUR	Ferme 03	19/04/2024	+	+
BJE1	AOKAS/BEJAIA	COURGETTE/LAITUE/PIMENT	Ferme 01	16/04/2024	+	+

BJE2	M OUAMAN/BEJAIA	CHOU-FLEUR	Ferme 01	17/04/2024	+	-
BJE3	N°7/BEJAIA	LAITUE/PIMENT/TOMATE	Ferme 01	18/04/2024	+	+
BJE4	SEMOUNE1/BEJAIA	LAITUE/OIGNON	Site 01	03/05/2024	-	+
BJE5	SEMOUNE2/BEJAIA	TOMATE	Site 02	03/05/2024	+	-
BJE6	BOUKHIAMA/BEJAIA	LAITUE/FEVE/TOMATE/P POIS	Passerelle 02	07/05/2024	-	+
JE1	TAHIR/IIJEL	FRAISE	Ferme 01	28/04/2024	+	-
BME1	KADDARA/BOUMERDES	OIGNON	Ferme 01	11/05/2024	+	-
JE2	OUED TAHIR/IIJEL	FRAISE/HARICOT/OIGNON	Ferme 02	13/05/2024	+	+

Annexe 2

Tableau I : Résultats des tests d'identification

Code	Origine	Région	Aspect sur Chromagar	Orientation du résultat	Test Uréase	Test Indole	Espèce
Souches isolées sur gélose sur CarbaMTL							
E2(1)	Eau	Lakhdaria	Colonies de couleur rose	E.coli	ND	ND	E.coli
E3(1)		Lakhdaria	Colonies bleu métallique	KES	-	+	!
E3(2)		Lakhdaria	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
E4(1)		Lakhdaria	Colonies de couleur rose	E.coli	ND	ND	E.coli
E4(3)1		Lakhdaria	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
E4(3)2		Lakhdaria	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
E5(1)		Boukhiana	Colonies bleu métallique	KES	-	-	Enterobacter
E5(3)		Boukhiana	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	+	+	K. oxytoca
E5(4)		Boukhiana	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	+	!
E5 (KP)		Boukhiana	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	+	-	K.pneumoniae
E6 (1)		M, Ouamane	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
BejS21	Sol	Bejaia	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
JE2	Eau	Tahir	Colonies de couleur bleu	KES	-	-	Enterobacter
Souches isolées sur gélose à la colistine							
LB E4(2)	Eau	Lakhdaria	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB E2(2)		Lakhdaria	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB E2(3)		Lakhdaria	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB LKS6	Sol	Lakhdaria	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB LKS8		Lakhdaria	Colonies bleu muqueuses laiteuses	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS4		Boukhiana	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS5		Boukhiana	Colonies bleu muqueuses laiteuses	KES	-	-	Enterobacter

LB E10	Eau	Boukhiana	Colonies bleu vert avec du mucuses	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS3	Sol	Boukhiana	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS6		Boukhiana	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB ABS7		Aokas	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	+	+	K. oxytoca
LB ABS3 (2)		Aokas	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB E5(1)		Eau	Aokas	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-
LB ABS5(2)	Sol	Aokas	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB ABS2		Aokas	Colonies de couleur violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB E8(A)	Eau	Semaoune 1	Colonies bleu vert muqueuses	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS1	Sol	Semaoune 1	Colonies bleu métallique avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BejS2		Semaoune 1	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BejF1	Fumier	Semaoune 1	Colonies de couleur violet avec halo laiteux	KES	+	+	K. oxytoca
LB BejF3		Semaoune 2	Colonies bleu vert avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BBS1	Sol	N=°7/ Bejaia	Colonies bleu vert muqueuses avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BBS2		N=°7/ Bejaia	Colonies bleu vert muqueuses avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter
LB BMS1		Kaddara	Colonies de couleur bleu violet	KES	-	-	Enterobacter
LB MOS1		M, Ouamane	Colonies bleu violet avec halo laiteux	KES	-	-	Enterobacter

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation du degré de bio-contamination du sol agricole, de l'eau utilisée pour l'irrigation ainsi que le fumier par des bacilles à Gram négatives résistants aux carbapénèmes, à la colistine et aux métaux lourds.

Des prélèvements de sol, d'eau d'irrigation ainsi que du fumier ont été effectués au niveau de 08 productions agricoles situées dans la wilaya de Bejaia, Bouira, Boumerdes et Jijel. Les prélèvements de sol et de fumier ont été effectués en prélevant 1Kg dans différents endroits de la parcelle. Egalement, l'eau utilisée pour l'irrigation a été prélevée à raison de 1L puis filtrés sur une membrane stérile en nitrate de cellulose. Après enrichissement, un criblage des bacilles à Gram négatives sur bouillon Carba MTL et sur gélose additionnée de colistine a été réalisé. L'identification a été réalisée par l'usage du chromagar orientation puis confirmé par l'usage des tests biochimiques. La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du EUCAST CA-SFM (2023). La production de BLSE a été déterminée par le test de synergie et le phénotype de résistance aux métaux lourds par la détermination des CMI.

Trente-sept souches d'entérobactéries ont été isolées à partir des différents compartiments de l'environnement agricole. 17 souches ont été isolées à partir du sol, 18 souches à partir de l'eau d'irrigation et 2 souches à partir du fumier. L'étude de la sensibilité de ces souches a montré que 13 souches étaient résistantes aux carbapénèmes (02 *E. coli*, 08 *Enterobacter* sp, 02 *K. oxytoca* et 01 *K. pneumonia*) et 24 souches étaient résistantes à 0.4%/ml de colistine (02 *K. oxytoca* et 22 *Enterobacter* sp). La présence d'une image de synergie a été observée uniquement chez une souche de *K. pneumonia* et une souche de *K. oxytoca* isolées à partir de l'eau de puits utilisée pour l'irrigation des cultures au sein d'une même exploitation à Aoukas. Toutes les souches ont montré une résistance à tous les métaux lourds à l'exception d'une souche *Enterobacter* sp. Résistante à la colistine isolée d'un sol de Jijel qui a été sensible à une forte concentration de plomb. Les CMI variaient de 100 à 800 mg/mL pour le cuivre, le cadmium et le zinc, et de 800 à 3 200 mg/mL.

Ces résultats soulèvent de sérieuses inquiétudes en matière de santé publique et de sécurité alimentaire, car les légumes cultivés dans ces agroécosystèmes contaminés pourraient fortement servir de réservoir à ces bactéries multirésistantes et contribuer à l'augmentation de l'émergence des épidémies d'origine alimentaire ainsi que la diffusion de l'antibiorésistance dans les environnements naturels et dans nos assiettes.

Mots clés : Agroécosystème, Carbapénème, colistine, métaux lourds, entérobactérie

Abstract

The aim of this study was to assess the degree of bio-contamination of agricultural soil, irrigation water and manure by Gram-negative bacilli resistant to carbapenems, colistin and heavy metals.

Samples of soil, irrigation water and manure were taken from 08 farms in the wilayas of Bejaia, Bouira, Boumerdes and Jijel. Soil and manure samples were taken by sampling 1kg from different parts of the plot. The water used for irrigation was also sampled at a rate of 1L, then filtered on a sterile cellulose nitrate membrane. After enrichment, Gram-negative bacilli were screened on Carba MTL broth and colistin agar. Identification was performed using chromagar orientation and confirmed by biochemical tests. Antibiotic susceptibility of strains was performed on Mueller Hinton agar according to EUCAST CA-SFM (2023) recommendations. ESBL production was determined by the synergy test, and the heavy metal resistance phenotype by MIC determination.

Thirty-seven strains of Enterobacteriaceae were isolated from different compartments of the agricultural environment. 17 strains were isolated from soil, 18 from irrigation water and 2 from manure. Susceptibility testing showed that 13 strains were resistant to carbapenems (02 *E. coli*, 08 *Enterobacter* sp, 02 *K. oxytoca* and 01 *K. pneumonia*) and 24 strains were resistant to 0.4%/ml colistin (02 *K. oxytoca* and 22 *Enterobacter* sp). Synergy was only observed in one strain of *K. pneumonia* and one strain of *K. oxytoca* isolated from well water used for crop irrigation on the same farm in Aoukas. All strains showed resistance to all heavy metals, with the exception of one colistin-resistant *Enterobacter* sp. strain isolated from soil in Jijel, which was sensitive to high concentrations of lead. MICs ranged from 100 to 800 mg/mL for copper, cadmium and zinc, and from 800 to 3,200 mg/mL for lead.

These results raise serious concerns in terms of public health and food safety, as vegetables grown in these contaminated agroecosystems could strongly serve as a reservoir for these multi-resistant bacteria, contributing to the increased emergence of food-borne epidemics and the spread of antibiotic resistance in natural environments and on our plates.

Keywords: Agroecosystem, Carbapenem, colistin, heavy metals, enterobacteria