

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie  
Spécialité/Option: Santé, Eau, Environnement : Microbiologie de l'environnement  
Département: Écologie et Génie de l'Environnement

### Thème

## Étude de la métallo-résistance des bactéries isolées des eaux de surface de la région de Guelma

Présenté par :

- Bencheikh Souad
- Boumaaza Khadidja

Devant la commission composée de :

Pr. Houhamdi M.	Président	Université de Guelma
Dr. Benhalima L.	Encadreur	Université de Guelma
Mme Amri S.	Examinatrice	Université de Guelma
Mme Bedioui S.	Membre	Université de Guelma
Dr. Gueroui Y.	Membre	Université de Guelma
Dr. Torche A.	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH, le Tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nos sincères remerciements vont à Monsieur Houhamdi M. pour avoir accepté de présider la commission de soutenance*

*Nous remercions également Madame Amri S. pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de la commission : Monsieur Gueroui Y., Madame Bediou S. et Madame Torche A.*

*Beaucoup de reconnaissance et de gratitude à notre enseignante et promotrice Madame Benhalima L., sans sa précieuse orientation nous n'aurons jamais pu accomplir ce travail. Nous la remercions pour sa disponibilité à tout moment, sa gentillesse, son soutien, son esprit communicatif performant ainsi que pour les fructueuses discussions scientifiques que nous avons eues tout au long de ce travail et surtout pour ses qualités humaines. Merci pour tout, avec notre plus profond respect.*

*Nos vifs remerciements s'adressent particulièrement à M<sup>elle</sup> Houda (technicienne du laboratoire de microbiologie à l'université de Guelma), merci pour ta sympathie, ton aide et tes services.*

*Nos sincères remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques, de la bibliothèque et de l'administration ; à tous les étudiants de Master II, en particulier nos amies qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail « L'union fait la force ; La foi fait l'union »*

*Nos plus profonds remerciements vont à tonton Hassan Boumaza pour sa patience et sa disponibilité, grâce à lui nous avons pu faire les prélèvements afin de réaliser ce travail.*

*Enfin nous tenons à remercier très chaleureusement nos familles en particulier nos parents pour leur amour et leur soutien constant qui ont contribué à la réussite de ce travail, aussi bien dans les bons moments que dans ceux de doutes et d'impatience. C'est à eux que nous dédions ce modeste travail.*

*Khadija et Souad*

# Résumés

---

## Résumé

Notre étude a porté en premier lieu sur l'isolement et identification des bactéries peuplant les eaux de surface de la région de Guelma. En second lieu, nous avons étudié la résistance des bactéries isolées à deux métaux lourds : le cuivre et le cadmium en déterminant les concentrations critiques de ces derniers.

L'échantillonnage a été réalisé au niveau de 4 stations choisies selon leur proximité de diverses sources de pollution (agriculturale, industrielle).

Vingt sept souches bactériennes ont été identifiées: 9 entérobactéries, 9 bacilles à Gram positif, 5 cocci à Gram positif et 4 bacilles à Gram négatif non entérobactéries. Ces bactéries sont rattachées à quatre classes : *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* et *Flavobacteria*.

L'étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds a révélé que 92.59 % des bactéries testées sont résistantes au cuivre, par contre, 22.22 % sont résistantes au cadmium. Nous avons constaté que les cocci à Gram positif sont les plus résistantes au cuivre. En revanche, ce sont les entérobactéries qui sont les plus résistantes au cadmium. Une souche tolérante au cadmium (*Bacillus pasteurii*) a été également détectée.

Les résultats obtenus confirment que les eaux de surface de la région de Guelma contiennent des bactéries résistantes aux métaux ce qui peut constituer un risque pour la santé environnementale et publique.

**Mots-clés :** Eau de surface, Bactéries aquatiques, Métallo-résistance.

---

## Abstract

Our study was, first of all, about the isolation and identification of bacteria populating the surface waters of the region of Guelma. Second of all, we studied the resistance of these same bacteria to two heavy metals: copper and cadmium by determining their critical concentrations.

The sampling was realized at the level of four different stations chosen according to their proximity to different sources of pollution (agricultural, industrial).

Twenty seven bacterial strains were identified: 9 enterobacteria, 9 Gram-positive bacillus, 5 Gram positive cocci, and 4 Gram négative non-enterobacteria bacillus. These bacteria are related to four groupes: *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria*, and *flavobacteria*.

The study of the heavy metals resistance revealed that 92.59% of the tested bacteria are resistant to copper, while 22.22% are resistant to cadmium. We found that the Gram positive cocci are the most resistant to copper, while enterobacteria are the most resistant to cadmium. A cadmium tolerant strain (*Bacillus pasteurii*) was also found.

The results obtained confirm that the surface waters of the region of Guelma contain resistant bacteria to metals which can be a risk to environmental and public health.

**Key words:** Surface waters, Aquatic bacteria, Heavy metals resistance.

## ملخص

ركزت دراستنا أولاً على عزل البكتيريا الموجودة في المياه السطحية لمنطقة قالمة وتعريفها. ثانياً، قمنا بدراسة مقاومة البكتيريا معزولة لاثنين من المعادن الثقيلة: النحاس والكادميوم عن طريق تحديد التراكيز الحاسمة لهذه الكائنات الدقيقة. تم اخذ العينات من أربع محطات تم اختيارها وفقاً لقربها من مصادر مختلفة من التلوث (الزراعية والصناعية)، مما مكّننا من تعريف سبعة وعشرين سلالة بكتيرية:

9 entérobactéries, 9 bacilles à Gram positif, 5 cocci à Gram positif, 4 bacilles à Gram négatif non entérobactéries. تنتمي هذه البكتيريا إلى أربعة أقسام :

*Gammaproteobacteria, Bacilli, Actinobacteria, Flavobacteria.*

أظهرت دراسة مقاومة البكتيريا للمعادن الثقيلة أن: 92.59% من البكتيريا المختبرة مقاومة للنحاس و 22.22% فقط مقاومة للكادميوم. استنتجنا كذلك أن cocci à Gram positif هي الأكثر مقاومة للنحاس، بينما entérobactérie هي الأكثر مقاومة للكادميوم. كما تمكنا أيضاً من عزل سلالة بكتيرية مقاومة للكادميوم من نوع *Bacillus pasteurii*.

تؤكد النتائج المتحصل عليها أن المياه السطحية لمنطقة قالمة تحتوي على بكتيريا مقاومة للمعادن و التي من الممكن أن تشكل خطراً على البيئة والصحة العامة.

**الكلمات الدالة:** مياه سطحية، البكتيريا المائية، مقاومة معادن.

<b>Résumé en français</b>	
<b>Résumé en anglais</b>	
<b>Résumé en arabe</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des planches</b>	
<b>Liste des schémas</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction</b>	1
 <i><b>Première partie : Étude bibliographique</b></i> 	
<b>Chapitre I : Pollution des eaux de surface par les métaux lourds</b>	
1. Généralité sur les eaux de surface	3
2. Pollution des eaux de surface par les métaux lourds	3
2.1. Métaux lourds	3
2.2. Origine de la pollution métallique	4
3. Conséquences de la pollution des eaux par les métaux lourds	7
 <b>Chapitre II : Résistance bactérienne aux métaux lourds</b>	
1. Interaction bactéries – métaux lourds	10
2. Métallo-résistance bactérienne	11
2.1. Mécanismes de résistance	11
2.1.1. Séquestration	12
2.1.2. Imperméabilité membranaire	13
2.1.3. Détoxification enzymatique	13
2.1.4. Transport actif du métal hors de la cellule	13
2.1.5. Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires	16
2.1.6. Autres systèmes	16
2.2. Facteurs influençant la métallo-résistance bactérienne	17
2.2.1. Facteurs biotiques	17
2.2.2. Facteurs abiotiques	17
 <i><b>Deuxième partie : Étude expérimentale</b></i> 	
<b>Chapitre III : Matériel et Méthodes</b>	
I. Description de la région d'étude	19
I.1. Réseau hydrographique de la wilaya de Guelma	19
I.2. Pollution des eaux de surface de la région de Guelma	20
I.3. Sites d'échantillonnage	22
II. Méthode d'étude de la métallo-résistance bactérienne	24
II.1. Echantillonnage et technique de prélèvement	24
II.2. Paramètres physico-chimiques	25
II.3. Isolement et identification des souches bactériennes	25
II.3.1. Bactéries à Gram négatif	25
II.3.1.1. Entérobactéries	27
II.3.1.2. Bacilles à Gram négatif non entérobactéries	36
II.3.2. Bactéries à Gram positif	38

II.4. Détermination de la résistance aux métaux lourds	44
II.4.1. Métaux lourds testés	44
II.4.2. Bactéries étudiées	44
II.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	44
II.4.3.1. Préparation des solutions mères et des solutions filles	45
II.4.3.2. Préparation de l'inoculum	45
II.4.3.3. Lecture de la CMI	45
II.4.4. Détermination de la Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)	46
II.4.5. Détermination du rapport CMB/CMI	46
 <b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b> 	
I. Résultats	47
I.1. Caractéristiques physicochimiques	47
I.1.1. Température de l'eau	47
I.1.2. Potentiel d'hydrogène	47
I.1.3. Oxygène dissous	48
I.1.4. Potentiel Redox	49
I.1.5. Salinité	49
I.1.6. Conductivité électrique	50
I.2. Identification des bactéries aquicoles	50
I.2.1. Bacilles à Gram négatif	50
I.2.1.1. Entérobactéries	50
I.2.1.2. Autres bacilles à Gram négatif	57
I.2.2. Bacilles à Gram positif	59
I.2.3. Cocci à Gram positif	63
I.3. Métallo-résistance bactérienne	69
I.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	69
I.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	77
I.3.3. Détermination du rapport CMB/CMI	78
II. Discussion	80
II.1. Paramètres physicochimiques	80
II.2. Identification des bactéries aquicoles	81
II.3. Métallo-résistance bactérienne	83
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>86</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>87</b>
<b>Annexes</b>	<b>97</b>



## Liste des figures

Figure	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Chaîne trophique contaminée par les métaux lourds (Sirven, 2006).	08
<b>Figure 2</b>	Structure schématiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds (Monchy, 2007)	14
<b>Figure 3</b>	Représentation schématique d'un complexe de type RND (Nies, 2003)	15
<b>Figure 4</b>	Carte du réseau hydrographique de Guelma (Bechiri, 2011)	20
<b>Figure 5</b>	Localisation de quatre stations de prélèvement (Guettaf, 2015)	22
<b>Figure 6</b>	Multi-paramètres modèle <i>Multi 1970i</i> .	25
<b>Figure 7</b>	Variation spatiale de la température des eaux de surface de la région de Guelma.	47
<b>Figure 8</b>	Variation spatiale du pH des eaux de surface de la région de Guelma.	48
<b>Figure 9</b>	Variation spatiale de l'oxygène dissous des eaux de surface de la région de Guelma.	48
<b>Figure 10</b>	Variation spatiale du potentiel redox des eaux de surface de la région de Guelma.	49
<b>Figure 11</b>	Variation spatiale de la salinité des eaux de surface de la région de Guelma.	49
<b>Figure 12</b>	Variation spatiale de la conductivité électrique des eaux de surface de la région de Guelma.	50
<b>Figure 13</b>	Distribution des CMI du cuivre pour toutes les bactéries isolées à partir des quatre stations de prélèvement.	69
<b>Figure 14</b>	Distribution des CMI du cadmium pour toutes les bactéries isolées à partir des quatre stations de prélèvement.	70
<b>Figure 15</b>	Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des entérobactéries étudiées	71
<b>Figure 16</b>	Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bacilles à Gram négatif non entérobactéries étudiées.	72
<b>Figure 17</b>	Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bacilles à Gram positif étudiés.	72
<b>Figure 18</b>	Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des cocci à Gram positif étudiées.	74
<b>Figure 19</b>	Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis de tous les groupes bactériens étudiés.	74

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Caractéristiques des quatre stations d'échantillonnage.	26
<b>Tableau 2</b>	Paramètres physico-chimiques mesurés <i>in Situ</i> .	29
<b>Tableau 3</b>	Aspects culturels des entérobactéries sur les milieux de culture sélectifs	33
<b>Tableau 4</b>	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries.	37
<b>Tableau 5</b>	Aspects macroscopiques et microscopiques des entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	56
<b>Tableau 6</b>	Enzymes respiratoires des entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	57
<b>Tableau 7</b>	Tests biochimiques classiques de certaines entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	57
<b>Tableau 8</b>	Profil biochimique sur l'API 20 E de certaines entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma	58
<b>Tableau 9</b>	Entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	59
<b>Tableau 10</b>	Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	62
<b>Tableau 11</b>	Enzymes respiratoires des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	63
<b>Tableau 12</b>	Profil biochimique des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	64
<b>Tableau 13</b>	Aspects macroscopiques et microscopiques des bacilles à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	65
<b>Tableau 14</b>	Enzymes respiratoires des bacilles à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	66
<b>Tableau 15</b>	Tests biochimiques classiques des bacilles à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	66

<b>Tableau 16</b>	<b>Bacilles à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.</b>	<b>67</b>
<b>Tableau 17</b>	Aspects macroscopiques et microscopiques des cocci isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	69
<b>Tableau 18</b>	Enzymes respiratoires des cocci à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	69
<b>Tableau 19</b>	Tests biochimiques classiques de certains Cocci à Gram positif isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	70
<b>Tableau 20</b>	Identification biochimique de la souche <i>Staphylococcus xylosus</i> (C4) par la galerie API Staph.	70
<b>Tableau 21</b>	Identification biochimique des souches C1 et C5 par la galerie API 20 Strep.	71
<b>Tableau 22</b>	Répartition spatiale des bactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	73
<b>Tableau 23</b>	Valeurs des CMB du cuivre et du cadmium ( $\mu\text{g/ml}$ ) vis-à-vis des souches bactériennes étudiées.	82
<b>Tableau 24</b>	Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cuivre.	83
<b>Tableau 25</b>	Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cadmium.	84
<b>Tableau 26</b>	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> )	98
<b>Tableau 27</b>	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> )	99
<b>Tableau 28</b>	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	100
<b>Tableau 29</b>	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API Strep (source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a> ).	101



## Liste des planches

Planche	Titre	Page
<b>Planche 1</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique d' <i>Escherichia coli</i> (E1) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.	54
<b>Planche 2</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Citrobacter freundii</i> (E2) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.	55
<b>Planche 3</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Citrobacter freundii</i> (E3) et(c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.	55
<b>Planche 4</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Raoutella ornithinolytica</i> (E4) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.	55
<b>Planche 5</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Shigella</i> spp. (E5) Et (c) ses caractères biochimiques obtenus par galerie classique.	56
<b>Planche 6</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Shigella</i> spp.(E6) et (c) ces caractères biochimiques obtenus par galerie classique.	56
<b>Planche 7</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Salmonella typhimurium</i> (E7) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.	56
<b>Planche 8</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique du <i>Bacillus carotarum</i> (B1) et (c) ses caractères biochimiques obtenus par galerie classique.	62
<b>Planche 9</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique d' <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (B7) et (c) ses caractères biochimiques obtenus par la galerie classique.	63
<b>Planche 10</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (B8) et (c)ses caractère biochimique obtenus par la galerie classique.	63
<b>Planche 11</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de <i>Staphylococcus xylosus</i> (C4) et(c) ses caractères biochimiques sur l'API Staph.	67
<b>Planche 12</b>	(a) Aspect macroscopique et (b) microscopique d' <i>Enterococcus faecium</i> (C5) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20 Strep.	67
<b>Planche 13</b>	Détermination de CMI du cuivre vis-à-vis de la souche de référence et de certaines souches bactériennes isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	75
<b>Planche 14</b>	Détermination de CMI du cadmium vis-à-vis de la souche de référence et de certaines souches bactériennes isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.	76

---

## Liste des schémas

Schéma	Titre	Page
Schéma 1	Isolement des entérobactéries pathogènes.	28
Schéma 2	Isolement et identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries	37
Schéma 3	Isolement et identification des bacilles à Gram positifs.	40
Schéma 4	Isolement et identification des cocci à Gram positifs.	42

---

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATP**: Adénosine TriPhosphate

**BCF**: Facteur de Bioconcentration

**CDF**: Cation Diffusion Facilitator

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice

**GPS UTM**: Global Positioning System Transverse Universelle de Mercator

**MFP**: Membrane Fusion Protein

**MFS**: Major Facilitator Superfamily

**MT**: métallothionéines

**NreB**: nitrogen regulation

**OmpF** : Outer Membrane Protein F precursor

**OMF**: Outer Membrane Factor

**OMPc** : Outer Membrane Protein c precursor

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**pH** : potentiel hydrogène

**PPM** : partie par million

**RND**: Resistance-Nodulation-Cell Division

**RND-HAE**: Resistance-Nodulation-Cell Division Hydrophobic and Amphiphilic compounds  
Export

**RND-HME**: Resistance-Nodulation-Cell Division (Heavy Metal Efflux)

**SmtA**: S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase

**STEP** : Station d'épuration d'eaux usées

# Introduction



L'eau n'est pas qu'une ressource destinée à la consommation humaine, elle est la composante essentielle de tous les organismes vivants et de tous les écosystèmes. Elle coule dans les paysages et constitue des milieux de vie riches à forte valeur patrimoniale (Sigg *et al.*, 2001). Les réserves disponibles d'eaux naturelles sont constituées des eaux souterraines (infiltration, nappes), des eaux de surface stagnantes (lacs, retenues de barrages) ou en écoulement (rivières, fleuves) et des eaux de mer (Malleviale et Chambole, 1990).

A cause de leurs utilisations multiples, les ressources en eau sont fortement dégradées, des pollutions ponctuelles et diffuses ont conduit à une modification des caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et une répercussion très forte sur la biodiversité aquatique (Malmqvist et Rundle, 2002 ; Sweeney *et al.*, 2004). De nouvelles niches écologiques sont apparues suite au rejet dans l'environnement de déchets industriels toxiques constitués souvent d'un mélange de métaux lourds, de composés organiques et d'hydrocarbures (Monchy, 2007).

Une exposition des microorganismes à des concentrations toxiques en contaminants métalliques, sous leur forme bio-disponible, favorise d'une part, la croissance des bactéries portant des gènes spécifiques de résistances ou détriment des bactéries sensibles et d'autre part, le transfert de gènes de résistance au sein des communautés bactériennes (Gadd, 1992).

L'Algérie a connu ces dernières décennies une forte croissance démographique, une urbanisation massive et un développement des activités industrielles qui ont généré une pollution importante des ressources en eau (Bouziani, 2000).

La région de Guelma, comme la plupart des villes algériennes endure des conséquences de la pollution hydrique. Elle est devenue après l'indépendance un pôle industriel ce qui a causé un exode rural important. De nouvelles constructions ont été créées en un temps très court et au mépris des règles élémentaires d'hygiène pour la population (Djabri, 2001). Actuellement, différents polluants (effluents domestiques, agricoles et industriels) affectent à la fois les ressources hydriques saisonnières et permanentes de bassin versant de la moyenne Seybouse (Guettaf, 2015).

La pollution par les métaux lourds, composés stables, hautement persistants et qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques, entraîne de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (Croteau *et al.*, 2005 ; Deforest *et al.*, 2007). Les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette pollution (Gilleret *et al.*, 1998). Du fait que les bactéries jouent un rôle clé dans l'environnement, les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes et par conséquent leur pérennité.

Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaborées plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (Silver, 1996) ce qui leur permet de résister à certaines concentrations de métaux lourds.

Barcina *et al.* (1997) et Arana *et al.* (1997) ont montré que les bactéries porteuses de plasmides survivent mieux que les bactéries démunies en raison des multiples propriétés véhiculées par ces éléments génétiques. La possibilité du transfert de leur caractères de résistance dans l'environnement extérieur a inquiété la communauté scientifique, à cause des risques écologiques et sanitaires, et a enclenché la recherche expérimentale sur ces sujets (Endo *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent aucune recherche n'avait entreprise au niveau des eaux de surface de la région de Guelma, or, nous devrions considérer comme possible, le fait que la pollution du milieu notamment par les métaux puisse sélectionner des bactéries métallo-résistantes capables de survivre et de jouer un rôle dans la recolonisation de tels environnements.

Pour cela nous nous sommes fixés trois objectifs majeurs :

- Recherche et identification du maximum des souches bactériennes présentes dans les eaux de surface de la région de Guelma;
- Détermination des concentrations critiques des deux métaux lourds (cuivre et cadmium) afin de différencier entre bactéries sensibles et résistantes à ces derniers.
- Vérification des activités antibactériennes observées avec le cuivre et le cadmium

La première partie de ce document présentera une synthèse bibliographique sur les eaux de surface et leur pollution par les métaux lourds et sur la métallo-résistance bactérienne. Puis, dans une seconde partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés avant d'exposer les résultats de notre travail.

**Première partie :**  
**Étude**  
**bibliographique**

**Chapitre I :**  
**Pollution des eaux**  
**de surface par les**  
**métaux lourds**

## 1. Généralité sur les eaux de surface

Les eaux de surface sont tous les eaux qui circulent ou qui sont stockées à la surface des continents. Ces eaux sont naturellement alimentées par les précipitations et perdues par l'évaporation et l'infiltration souterraine dans le sol. Elles peuvent se trouver stocker en réserves naturelles (lacs) ou artificielles (retenus de barrages) (Lundberg, 1995).

Le fonctionnement physique et biologique des eaux de surface est contrôlé par des contraintes environnementales variées conduisant à une grande variabilité spatiale et temporelle. Ils présentent une hydrologie particulière marquée par une forte inertie, caractérisée par une sensibilité plus accrue aux variations naturelles (variation saisonnière, événements climatiques intenses...). Cette inertie a de fortes conséquences sur les paramètres physico-chimiques, microbiologiques et biologiques (Lundberg, 1995).

Actuellement, les eaux de surface sont confrontées à plusieurs sources de pollutions : retombées atmosphériques, produits toxiques, métaux lourds, engrais, pesticides, effluents domestiques et industriels... Ces différents polluants conduisent à une dégradation physique, chimique ou biologique de la qualité de l'eau, et par conséquent une perturbation des conditions de vie et un déséquilibre du milieu aquatique (Lundberg, 1995).

Dans la présente étude nous nous intéressant par la pollution métallique.

## 2. Pollution des eaux de surface par les métaux lourds

### 2.1. Métaux lourds

Les éléments de la table périodique peuvent être classés, en fonction de certaines caractéristiques physiques et chimiques, en métaux et non métaux, à l'exception d'un petit nombre qualifié de métalloïdes (Gadd, 1992 ; Nies, 1999).

Les métaux lourds englobent tout élément métallique naturel dont la masse volumique dépasse  $5\text{g/cm}^3$  et présentant un caractère toxique pour la santé et l'environnement (Garret, 2000).

Ils sont généralement définis sur la base de ces propriétés physico-chimiques. En science du sol, il est convenu de parler "d'éléments trace métalliques" qui désignent des composés minérales présents à très faible concentration (Roundhill, 2004).

En toxicologie, ils peuvent être définis comme des métaux à caractère cumulatif (souvent dans les tissus biologiques) ayant essentiellement des effets très néfastes sur les organismes vivants. En nutrition et en agronomie, ils peuvent même être assimilés à des oligo-éléments indispensables à certains organismes, en particulier par leur action catalytique au niveau du métabolisme (Dams *et al.*, 2011).

Les métaux lourds les plus souvent considérés comme toxiques pour l'homme sont : le plomb, le mercure, l'arsenic et le cadmium. D'autres comme le cuivre, le zinc, le chrome, pourtant nécessaires à l'organisme en petites quantités, peuvent devenir toxiques à doses plus importantes (Ledin, 2000).

Dans les sciences environnementales, les métaux lourds associés aux notions de pollution et de toxicité sont généralement : l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb), l'étain (Sn), le zinc (Zn) (Boucheseiche *et al.*, 2002).

## **2.2. Origine de la pollution métallique**

Les métaux lourds sont redistribués naturellement dans l'environnement par les processus géologiques et les cycles biologiques ; les roches et les minerais de la croûte terrestre constituent la principale source naturelle (Boust *et al.*, 1999).

A ces apports naturels se sont ajoutés les métaux émis à la suite des activités humaines : exploitation des gisements et utilisation des métaux dans de nombreux secteurs d'activité (métallurgie, fonderie, incinération des déchets, combustion des matériaux fossiles et des carburants, épandage de produits phytosanitaires et de fertilisants en agriculture) (Boust *et al.*, 1999).

Les métaux sont présents dans la colonne d'eau et les eaux interstitielles sous forme d'ions libres, de complexes inorganiques et organiques dissous, ou sont liés aux particules en suspension (Boust *et al.*, 1999). Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux lourds sont la dilution, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption. Certains processus chimiques peuvent néanmoins intervenir également. C'est ainsi que la spéciation selon les diverses formes solubles est régie par les constantes d'instabilité des différents complexes, et par les propriétés physico-chimiques de l'eau (pH, ions dissous, et température) (Settle *et Paterson*, 1980).

Vu la grande hétérogénéité de l'origine et du devenir des polluants métalliques en milieu aquatique, nous nous limitons à décrire ceux liés au cuivre et au cadmium.

- **Cuivre :**

C'est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Métal de couleur rougeâtre, il possède une haute conductivité thermique et électrique à température ambiante (Hurlbut et Klein, 1982).

Le cuivre est présent naturellement dans la croûte terrestre et dans les océans, les lacs, les rivières sous différentes formes et concentrations. C'est un des rares métaux existant à l'état natif, cependant il est majoritairement présent sous la forme de minerais (Szymanowski, 1993). L'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est instable dans l'eau sauf en présence d'un ligand stabilisateur comme les sulfures, les cyanures ou les fluorures. L'ion  $\text{Cu}^{2+}$  forme de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux, tels les chlorures ou l'ammonium, ou avec des ligands organiques (Dameron et Howe, 1998).

Les sources anthropiques de cuivre dans l'environnement sont liées à la production, à l'utilisation ou à l'élimination du cuivre métal (plus ou moins pur, affiné ou raffiné) et/ou des composés du cuivre et/ou des alliages du cuivre (Dameron et Howe, 1998).

Les apports du cuivre anthropique ont principalement pour origine (Dameron et Howe, 1998) :

- Les activités industrielles qui émettent majoritairement dans les eaux et les sols.
- Les activités agricoles (les épandages des fumiers et lisiers de bovins, porcins et de volailles car l'alimentation de ces derniers est complétée en cuivre ; les traitements phytosanitaires des cultures des vignes et des arbres; l'utilisation d'engrais minéraux ; l'épandage de composts et des boues issues des STEP) qui émettent principalement vers les sols.

Une des sources d'émission dans l'environnement des composés du cuivre est leur présence dans les insecticides, molluscicides destinés aux filets de pêche et coques de bateaux, bactéricides, herbicides et fongicides (oxyde cuivreux et cuivrique, acétate de cuivre et sulfate de cuivre), dans la bouillie bordelaise (sulfate de cuivre avec de

l'hydroxyde de calcium) et dans la bouillie bourguignonne (sulfate de cuivre avec du carbonate de sodium).

La majorité du cuivre rejeté dans l'eau est sous forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber à la matière organique, au fer hydraté, aux oxydes de manganèse ou aux argiles. Généralement, le cuivre migre en profondeur dans des conditions particulières de drainage ou en milieu très acide et risque donc de contaminer l'eau souterraine (Dameron et Howe, 1998).

- **Cadmium :**

C'est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48 (Mahan, 1987). Le cadmium fut découvert en 1808 par Magnus Martin Pontin, mais c'est en 1817 que l'allemand Friedrich Stromeyer le prépara pour la première fois (Mahan, 1987). Le nom de Cadmium vient du latin *cadmia*, « calamine », ancien nom donné au carbonate de zinc, le cadmium était extrait de ce minerai aux environs de la ville de Thèbes (Grèce) (Wright et Welbourn, 2002)

Le cadmium est un métal blanc argent, légèrement bleuté, appartenant à la famille des métaux de transition, possède 8 isotopes naturels stables de masse atomique 106. Ses propriétés chimiques présentent beaucoup de similitudes avec celles du zinc. Il possède une résistance à la corrosion dans diverses atmosphères et plus particulièrement en milieu marin et s'utilise comme moyen de protection contre les neutrons thermiques (Garin et Simon, 2004)

Le cadmium est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Ces principales formes cristallines sont le greenockite et l'hawleyite (CdS), l'otavite (CdCO<sub>3</sub>), le montéponite (CdO) et la cadmosérite (CdSe). L'enrichissement en cadmium des sols et des systèmes aquatiques résulte de l'altération des matériaux de la croûte terrestre et des retombés atmosphériques (Garin et Simon, 2004).

La dispersion du cadmium dans les systèmes aquatiques est liée aussi aux nombreuses activités industrielles et à l'épandage d'engrais phosphatés faisant intervenir cet élément atmosphériques (Garin et Simon, 2004).

Les principaux domaines d'utilisation du cadmium sont la galvanoplastie (ajout d'un revêtement de cadmium sur divers métaux), les accumulateurs alcalins, les alliages, et dans



une moindre mesure, l'industrie nucléaire (des barres de commandes composées d'argent, d'indium et de cadmium, présentant de fortes capacités à absorber les neutrons sont introduites au centre du réacteur pour contrôler et entretenir la réaction nucléaire) (EDF, 1995).

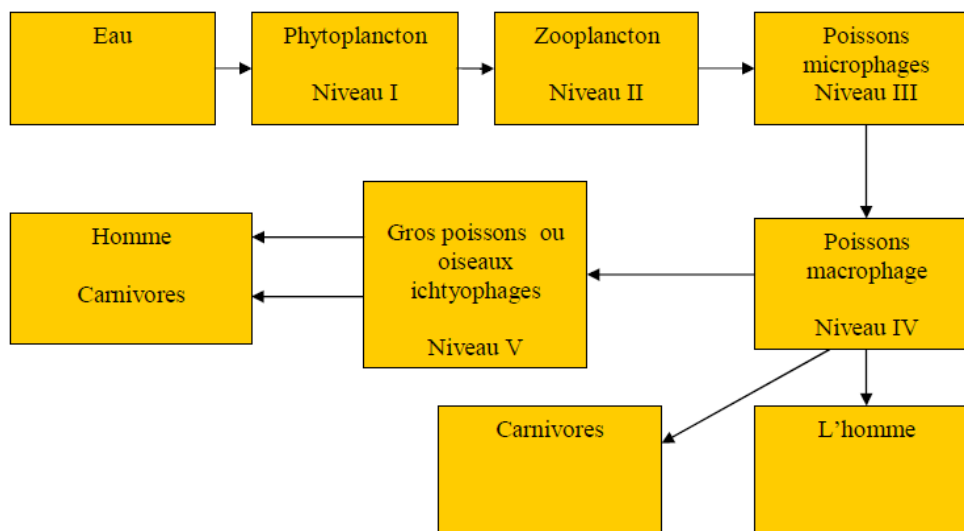
Le cadmium ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Dans ce sens, l'activité humaine peut en changer la répartition, la complexation chimique et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (Tricot, 1999).

Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus (Garin et Simon, 2004).

### **3. Conséquences de la pollution des eaux par les métaux lourds**

A de faibles concentrations, beaucoup de métaux lourds (dont Cd et Cu) sont toxiques pour les organismes vivants dont les premiers sont les microorganismes. Ils ont divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence, l'inhibition des activités enzymatiques, l'altération de la structure de l'ADN la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes et la réduction de la diversité microbienne (Satchanska *et al.*, 2005 ; Nweke *et al.*, 2007 ; Rathnayake *et al.*, 2009).

Les effets observés à différents niveaux trophiques supérieurs (Figure 1) se manifestent notamment par un retard du développement des embryons, des malformations et une moins bonne croissance des adultes chez les poissons, les mollusques et les crustacés. En outre, tout au long de la chaîne alimentaire certains se concentrent dans les organismes vivants. Ils peuvent ainsi atteindre des taux très élevés dans certaines espèces consommées par l'homme, comme les poissons. Cette " bioaccumulation " explique leur très forte toxicité (Sirven, 2006).



**Figure 1 :** Chaîne trophique contaminée par les métaux lourds (Sirven, 2006).

Le cuivre est un métal essentiel, toxique à faible et à forte dose. Sa toxicité pour les microorganismes a été démontrée par Joachim *et al.* (2009), qui a constaté qu'une concentration de 25 µg/L a conduit à une diminution en abondance de plusieurs taxons de diatomées (*Cocconeis* ssp., *Gomphonema* sp.), de macrophytes (*Lemna minor*, *Nasturtium officinale*), de champignons aquatiques (*Clavariopsis aquatica*), de zooplancton (*Mytilinia* sp., *Trichocerca* sp.) et de macro invertébrés (*Lymnaea* sp., *Gammarus pulex*). De même, les relations entre producteurs primaires, consommateurs et détritivores semblent également perturbées à partir de la même concentration.

Les effets à court terme sur les mollusques, insectes, poissons, oiseaux d'eau et divers animaux venant s'abreuver seraient également désastreux ; L'absorption de cuivre est possible par toutes les voies mais elle s'effectue de manière prépondérante par voie orale et absorption gastro-intestinale (Mc Ardle, 1995). L'exposition chronique tient compte de l'inhalation ainsi que de l'absorption par voie cutanée et de la possible déglutition de particules (Dave et Xiu, 1991).

Le cuivre est également bio-accumulable, Xiarong *et al.* (1997) rapportent une valeur de facteur de bioconcentration (BCF) de 13 pour la carpe *Cyprinus carpio*. Wepener *et al.* (2000) ont mesuré des BCF sur 10 espèces de poissons différents dans plusieurs rivières, ils rapportent 18 valeurs de 20 à 950.

Au sein des milieux aquatiques, le cadmium est considéré comme un des métaux les plus toxiques et représente un risque pour les organismes aquatiques. L'impact du cadmium sur les organismes dépend tout d'abord de la forme chimique sous laquelle il se trouve. Il peut exister sous forme d'ion libre, de complexes organiques ou inorganiques, ou sous des formes insolubles, hydroxyle ou sulfure. La chimie du cadmium soluble dans l'eau est affectée par de nombreux paramètres tels que le pH ou la salinité (Garin et Simon, 2004).

En plus de la spéciation et bien sûr de la dose et du temps d'exposition au cadmium, d'autres facteurs peuvent affecter la réponse des organismes, et c'est en particulier le cas de l'activité respiratoire qui est fortement dépendante des facteurs environnementaux. Plusieurs études chez les bivalves ont en effet montré qu'en présence de métal ces organismes filtreurs peuvent adapter leur réponse physiologique et modifier leur ventilation ou le temps d'ouverture de leurs valves (Carginale *et al.*, 2002).

La toxicité du cadmium s'exerce aussi à l'échelle infra-individuelle, au niveau cellulaire. Les effets de ce métal sont multiples et complexes et les dommages intracellulaires générés concernent tous les types de biomolécules : dénaturation de certaines protéines, peroxydation lipidique, cassures de l'ADN, répression ou au contraire surexpression de nombreux gènes (Liao *et al.*, 2002).

La présence des métaux lourds dans nos écosystèmes aquatiques et leur impact sur la santé humaine pourraient être tout d'abord perçus comme un problème de santé individuel qui proviendrait de la sensibilité accrue de certaines personnes. Cependant, l'aggravation, depuis des années, des pathologies (organiques, neurologiques et physiques) qui sont connues pour avoir un lien avec la pollution de l'eau d'un côté, couplée avec des connaissances scientifiques et médicales de plus en plus pointues de l'autre, ont amené les Etats membres du Conseil de l'Europe à reconnaître les métaux lourds comme un grave problème de santé publique (Gérard, 2011).

Actuellement, la problématique la plus discutée est la sélection des bactéries métallo-résistantes dans les écosystèmes aquatiques. Cette propriété est avantageuse de côté écologique (bio-remédiation) mais le problème général de ces bactéries c'est qu'elles persistent dans l'eau, les environnements naturels seraient donc des réservoirs favorisant le phénomène de la métallo-résistance et la diffusion des bactéries et l'échange de leurs gènes de résistance entre espèces différentes (Berg *et al.*, 2005; Akinbowale *et al.*, 2007).

**Chapitre II :**  
**Résistance**  
**bactérienne aux**  
**métaux lourds**

## 1. Interaction bactéries – métaux lourds

La nature des interactions bactéries-métaux lourds dépend du rôle biologique du métal dans la cellule. Certains métaux lourds (Ni, CO, Zn, Fe) sont des cofacteurs indispensables de certaines protéines pour leur stabilisation ou leur conformation mais deviennent toxiques à haute concentration (Beveridge, 1989).

Certains métaux sont essentiels pour les microorganismes et participent au fonctionnement des cellules. Dans certaines réactions catalytiques indispensables pour le fonctionnement de l'organisme, des métallo-enzymes ont besoin d'un ion métallique comme atome central. De plus, afin de générer de l'énergie, de nombreux microorganismes dépendent des composés métalliques comme donneurs d'électrons pour le métabolisme, le chimiotropisme et comme accepteurs d'électron pendant la respiration anaérobie (Ledin, 2000).

Il est courant de trouver des métaux à la surface des bactéries. En effet les ions métalliques sont un composant important des parois bactériennes ; Il a été démontré que les ions divalents étaient fortement présents dans les parois de deux bactéries (*Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*) (Ledin, 2000).

Les ions métalliques peuvent également affecter l'organisation des phospholipides et des lipopolysaccharides à l'extérieur de la membrane et peuvent même affecter les forces de liaisons entre les différentes parties de la membrane (Desaunay, 2011).

Malgré la présence d'ions toxiques, certaines bactéries sont capables de survivre dans des milieux pollués. Cette capacité peut être le résultat de mécanismes induits ou intrinsèques aux individus (Gadd, 1992).

Gadd (1992) a défini la tolérance chez les bactéries comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques des organismes. En parallèle, il a décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement.

La grande variété des métaux lourds et de leurs effets biologiques nécessite chez la bactérie une régulation fine pour le maintien (homéostasie) et le contrôle de leur concentration intracellulaire. Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques, ou l'entrée de métaux en quantité toxique (Nies, 1999).

Les ions métalliques lourds entrent dans la cellule par deux types de voie (Chang, 1997; Haferburg et Kothe, 2007) :

- a. Voie empruntée par une large gamme de substrats. C'est une voie rapide, indépendante du métal, fait intervenir des porcines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers de la membrane bactérienne.
- b. Voie plus lente et a une haute spécificité du substrat, elle utilise souvent des transporteurs qui nécessitent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, ce qui revient plus coûteux à la cellule en cas de besoin ou de privation de nourriture.

Les métaux qui n'ont pas de fonction biologique sont généralement tolérés à faibles concentrations, alors que les métaux essentiels sont acceptés à plus forte concentration (Bruins *et al.*, 2000).

La concentration et la spéciation du métal déterminent si celui-ci est utile ou nocif à la cellule. Le contrôle des concentrations internes, ou homéostasie, s'avère donc nécessaire. C'est pourquoi les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger de la toxicité des métaux (Sigg *et al.*, 2001).

L'une des bactéries la plus résistante aux métaux lourds est *Cupriavidus metallidurans* CH34, elle a été caractérisée comme résistante au zinc (Zn), cadmium (Cd), cobalt (Co), et nickel (Ni) (Desaunay, 2011).

## 2. Métallo-résistance bactérienne

### 2.1. Mécanismes de résistance

Les microorganismes doivent développer des mécanismes de résistance contre balançant l'effet des haute consommations en métaux lourds toute en assurant le maintien du rôle biologique des ions essentiels (Desaunay, 2001).

Il existe une grande diversité de mécanismes de résistance aux ions métalliques, liée à leur valence, taille, indice de solubilité, potentiel redox et la forme sur laquelle il se trouve dans l'environnement (Desaunay, 2001).

Des mécanismes de résistance aux métaux lourds tels que la bio minéralisation, la séquestration ou la conversion enzymatique diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont liés à la présence des gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, ceux-ci portent la détermination de la résistance qui assurent l'extrusion des métaux (Desaunay, 2001).

### 2.1.1. Séquestration

La séquestration du métal dans un compartiment de la cellule ou sur la surface externe de la membrane est un mécanisme efficace mis en place par les bactéries pour résister aux métaux lourds. Cette séquestration peut agir comme première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leurs effets toxiques (Trepreau, 2006).

La séquestration intracellulaire repose sur la production de protéines qui chélatent les excès d'ions métalliques pour d'une part, stocker ces ions et pour d'autre part, protéger les composants essentiels des cellules de leur toxicité potentielle (Lee *et al.*, 1993).

L'exemple le mieux caractérisé est la production de métallothionéines (MT) en réponse à un excès du zinc dans la cellule. De nombreuses MT ont été caractérisées chez les eucaryotes, mais ces protéines sont rares chez les bactéries et, elle se trouve principalement chez les souches de cyanobactéries et de *Pseudomonas* où elles lient et séquestrent le zinc intracellulaire. Ce sont de petites protéines très riches en résidus cystéine capables de coordonner un grand nombre d'ions. Par exemple, il a été montré que la MT SmtA, présente dans le genre *Synechococcus*, pouvait coordonner jusqu'à quatre atomes de zinc dans une seule poche contenant des résidus histidine et cystéine (Robinson *et al.*, 2001).

Des homologues de cette protéine existent chez d'autres organismes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas putida*, qui peuvent également lier de nombreux ions zinc (Trepreau, 2006).

La séquestration extracellulaire est surtout répandue chez les levures et les champignons mais quelques exemples sont également recensés chez les bactéries. Ainsi, les couches exopolysaccharidiques de *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ou encore *Arthrobacter viscosus* sont capables de chélater certains métaux comme le cadmium, les empêchant de pénétrer dans le cytoplasme et augmentant ainsi significativement la résistance des bactéries à ces ions (Scott et Palmer, 1988).

### 2.1.2. Imperméabilité membranaire

Les bactéries limitent l'entrée des métaux en modifiant la production des porines. Ainsi, il a été montré par des études protéomiques portant sur *E. coli*, qu'un stress par les ions cadmium provoquait, chez cette bactérie, une diminution de la synthèse de la porine OmpF (Faber *et al.*, 1993). Cette protéine étant supposée jouer un rôle dans l'entrée des métaux, la baisse de sa production aura, de ce fait, un impact sur l'accumulation intracellulaire des ions métalliques (Trepreau, 2006).

### 2.1.3. Détoxification enzymatique

La conversion enzymatique consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule. Cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou réduction comme pour le mercure, ou encore après réaction avec un produit du métabolisme énergétique de la cellule (comme la réduction du sélénium par les produits soufrés tel que les thiosulfates ou les sulfites) (Silver et Phung, 1996).

### 2.1.4. Transport actif du métal hors de la cellule

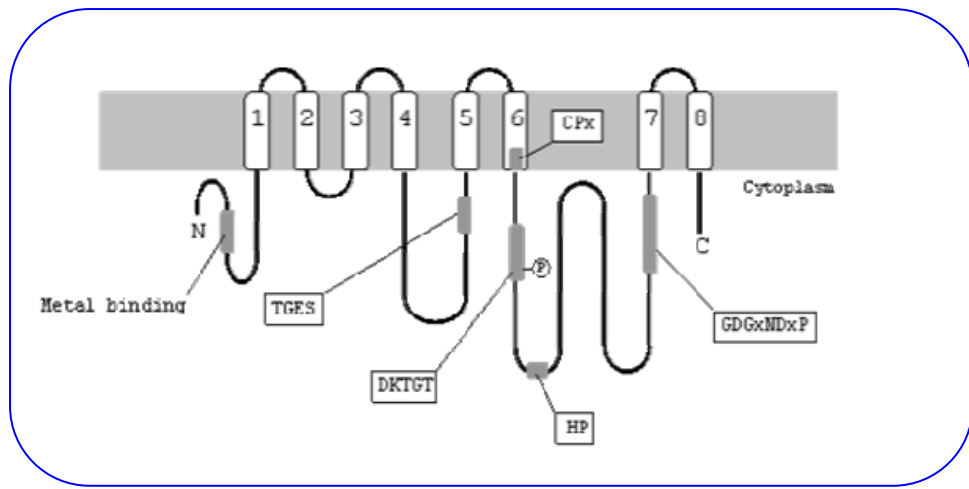
Chez les bactéries la résistance aux métaux lourds nécessite le plus souvent un système d'efflux qui est un transport actif capable d'expulser les métaux à l'extérieur de la cellule. Trois catégories de ce système peuvent être retrouvées en fonction de l'énergie et des protéines impliquées (Nies, 2003).

- **ATP ase de types P** : ces protéines se retrouvent chez tous les organismes vivants. Ce sont des acteurs majeurs dans la résistance aux cations divalents en assurant leur extensions de la cellule grâce à l'hydrolyse de l'ATP, ces enzymes génèrent un gradient d'ion au travers de la membrane interne, les ATPase de type P sont séparés en 2 sous-groupes P1- A et P1-B (Banci *et al.*, 2001). Les membres de la sous famille P1-A sont généralement impliqués dans le transport du potassium  $K^{+1}$  bien qu'il existe des exemples d'ATPases de type P1-A impliquées dans le transport d'ions lourds (Saier *et al.*, 1994). Ces ATPase nécessitent un site de fixation du métal et une séquence qui joue le rôle d'un canal permettant le passage de l'ion (Figure 2) (Monchy, 2007).



Les ATPase de la sous famille P1-B contrôlent la concentration cytoplasmique d'une grande variété de métaux. Cette sous famille se divise en deux classes principales :

- Première classe comportent les protéines de types Cod A de *Staphylococcus aureus* impliqués dans l'extrusion des ions cadmium.
- Deuxième classe inclut les ATP ases qui transportent les ions cuivres et en argent. La protéine ZHT A d'*Escherichia coli* est impliquée dans l'efflux des ions du zinc A (Monchy, 2007).

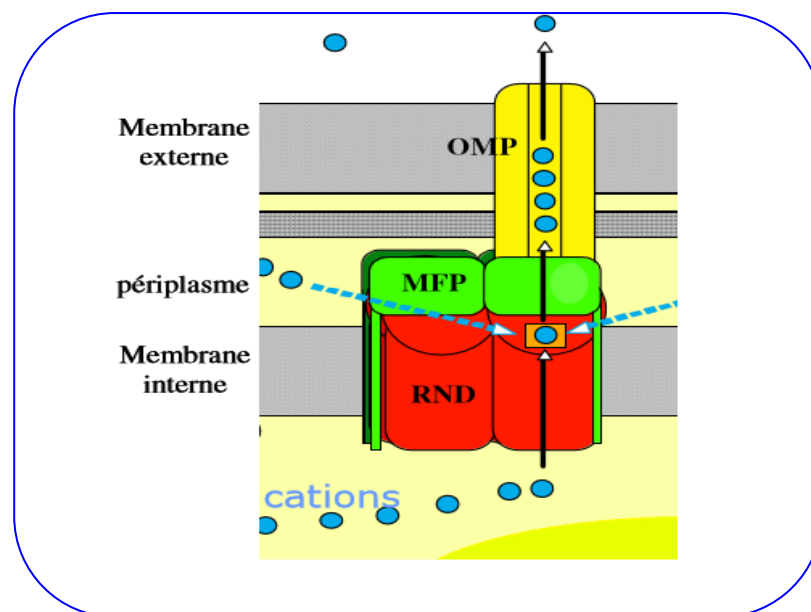


**Figure 2 :** Structure schématique des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds. Le site phosphatase (TGES), le site de phosphorylation (DKTGT) et le site de fixation de l'ATP (GDGXNDXP) sont communs à toutes les ATPases de type P1. Les sites CPX, HP et les sites de fixation au métal (poly-His, CXXC) sont spécifiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds (Monchy, 2007).

- **Transporteurs RND (Résistance-Nodulation Cell-Division) :** Les transporteurs bactériens impliqués dans la résistance, la nodulation et la division cellulaire constituent la base de la superfamille des systèmes RND (Dong et Mergeay, 1994; Saier et al., 1994). Ce type de transporteur intervient dans la résistance aux métaux lourds, le transport de molécules organiques, la nodulation, chez *Rhizobium*, ou la division cellulaire chez *Escherichia coli* (Tsenget al., 1999). Au sein des systèmes RND ont trouvé les systèmes RND-HAE (Hydrophobic and Amphiphilic compounds Export) et RND-HME (Heavy Metal Efflux) (Nies, 2003).

Le système RND est de type antiport cation-proton. Le flux de cations est équilibré par un flux stœchiométrique de protons en sens opposé. Ce système à trois composants est constitué d'une protéine de membrane externe (de la famille OMF: Outer Membrane Factor), d'une protéine transpériplasmique (de la famille MFP: Membrane Fusion Protein) qui couple les deux protéines membranaires et principalement d'une pompe localisée dans la membrane interne (de la famille RND). L'ensemble des trois protéines forme un canal par lequel les ions sont extrudés à l'extérieur de la cellule sans nécessiter d'apport énergétique (Figure 3) (Nies, 2003).

L'efflux à travers la membrane externe fait en outre parfois intervenir des porines (OmpC). L'expression des systèmes RND est souvent régulée par un système senseur/régulateur (dit à deux composants). Lorsque le senseur lie un ion métallique pour lequel il a une affinité suffisante, il change de conformation, et peut phosphoryler le régulateur afin de l'activer. Le régulateur active la transcription des gènes de l'opéron qui codent pour les trois composants du système d'extrusion (Dielset *al.*, 1995).



**Figure 3 :** Représentation schématique d'un complexe de type RND. Celui-ci est composé d'une protéine de la famille des RND (en rouge) qui fonctionne comme une pompe insérée dans la membrane interne, reliée par une protéine périplasmique de la famille des MFP (en vert) à une protéine insérée dans la membrane externe appartenant à la famille des OMF (en jaune) ; Les cations efflux par ce transporteur chimioosmotique peuvent être pris en charge au niveau du périplasma ou du cytoplasme (Nies, 2003).

- **Protéine de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitateur) :** La famille des CDF est constituée de système composé d'une seule protéine, elle forme un canal emprunté par les ions pour sortir de la cellule de manière passive, par simple diffusion .Ces systèmes existant chez les procaryotes et les eucaryotes (Paulsen et Saier, 1997).

### 2.1.5. Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires

Comme dans les cas de résistances aux antibiotiques, certains micro-organismes s'adaptent à la présence de quantités toxiques de métaux en atténuant la sensibilité de certains composants cellulaires. De la même manière, des mutations ponctuelles vont diminuer la sensibilité des cibles sans altérer leur fonction biologique. Un tel mécanisme d'adaptation a été identifié chez *E. coli*. Il a été montré que, lorsqu'il y a une exposition des cellules ponctuellement à de grandes quantités d'ions  $Cd^{2+}$ , elles présentaient un taux important de dommages sur l'ADN. Cependant, après plusieurs sous-cultures successives dans ces mêmes conditions, moins de dégâts étaient observés. Les auteurs suggèrent que les mécanismes de réparation de l'ADN seraient plus efficaces chez les cellules adaptées, et ainsi leur ADN serait moins sensible aux ions  $Cd^{2+}$  (Mitra et Bernstein, 1978).

### 2.1.6. Autres systèmes

Les bactéries possèdent bien souvent des systèmes de résistance uniques pour certains ions (cuivre, cadmium, cobalt, nickel...) dont les principaux :

- Système *pco/cop* (péri-plasmique): les gènes *pcoABCDRSE* et *copABCDRS* sont impliqués dans le transport du cuivre péri-plasmique. Ce sont des gènes qui lient le cuivre pour le détoxifier et le transporter (Brown *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995).
- Système d'efflux par les protéines MFS (Major Facilitator Superfamily): Ces protéines forment une vaste famille de transporteurs membranaires que l'on retrouve chez les bactéries, les archées et les eucaryotes (Saier *et al.*, 1999). Ces protéines sont impliquées dans le transport de substrats variés tels que les sucres, les intermédiaires du cycle de Krebs, les antibiotiques, etc... La protéine NreB, dont la synthèse est inductible par Ni(II) de *C. metallidurans* 31A (anciennement *Alcaligenes*, *Achromobacter xylosoxidans*) est le premier exemple décrit de protéine MFS transportant des métaux. En présence de nickel, le gène *nreB* est induit et gouverne l'efflux de l'ion métallique conférant la résistance à la bactérie (Grass *et al.*, 2001).

## 2.2. Facteurs influençant la métallo-résistance bactérienne

### 2.2.1. Facteurs biotiques

La résistance aux métaux lourds dans un environnement donné dépend des types microbiens, des genres et des espèces testées. [Bachich et Stotzsky \(1977\)](#) remarquèrent, en général, que les actinomycètes sont plus tolérantes au cadmium que les eubactéries, les eubactéries à Gram négatif sont-elles mêmes plus tolérantes que les eubactéries à Gram positif.

De même, la résistance au cadmium chez les actinomycètes, les bactéries à Gram positif et à Gram négatif varie en fonction des genres et des espèces. Par ailleurs, certaines communautés bactériennes tolèrent plus que d'autres les environnements contaminés par les métaux lourds. Ainsi les bactéries à Gram négatif sont plus répandues que les bactéries à Gram positif dans les sols contaminés par les métaux lourds ([Pennanen et al., 1996](#)).

### 2.2.2. Facteurs abiotiques

- **Température**

La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui déterminent la croissance et la survie des microorganismes. [Nedwell \(1999\)](#) a suggéré qu'aux basses températures, les membranes des cellules bactériennes deviennent plus rigides, lequel surtout influence le transport actif d'éléments nutritifs à travers la membrane. La perméabilité de la membrane pourrait affecter aussi la vitesse d'absorption des métaux lourds par les cellules, affectant ainsi la toxicité des métaux.

[Hossain et al. \(2006\)](#) ont cultivé *E. coli* à différentes températures (20, 30, 40, et 50 °C) pendant 60 h en présence de 600 ppm de Pb. Ces auteurs remarquèrent que la croissance est maximale à 40 °C.

Les souches *Staphylococcus aureus* porteuses du plasmide pénicillinase ont montré une croissance prononcée en présence du mercure à 37 °C comparativement aux souches non porteuses de plasmide pénicillinase. Alors qu'à 4 °C, un déclin graduel de la croissance est observé pour les souches *Staphylococcus aureus* porteuses ou non de plasmide ([Kondo et al., 1974](#)).

- **Potentiel d'Hydrogène**

Selon [Sigeo \(2005\)](#), les ions hydrogène influencent la toxicité des métaux lourds, soit en affectant leur état chimique dans l'eau ou par compétition avec les métaux essentiels pour les sites sur les membranes biologiques. La croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de cadmium semble plus prononcée à pH 7 qu'à pH 8. [Hart et Scaife \(1977\)](#) ont suggéré que l'élimination du cadmium du milieu de culture et sa précipitation simultanée à l'intérieur de la cellule pourrait être un processus dépendant du pH.

- **NaCl**

[Gupta et al. \(1998\)](#) ont étudié l'effet du NaCl sur la croissance de deux souches d'*E. Coli*, sensible et résistante à l'argent. Ils observèrent que 40 g/l de NaCl, sans addition de Ag<sup>+</sup>, réduit la croissance de la souche résistante, alors que celle de la souche sensible n'est pas affectée. En absence de NaCl et en présence de Ag<sup>+</sup>, la souche sensible croît jusqu'à 100 µM, tandis que la souche résistante croît jusqu'à 600 µM. En présence de NaCl et de Ag<sup>+</sup>, la souche sensible croît jusqu'à 50 µM de Ag<sup>+</sup> à 10 g/l de NaCl, mais aucune croissance n'est observée à 50 µM de Ag<sup>+</sup> et aux concentrations élevées de NaCl (20, 30, 40, 50 et 60 g/l). Concernant la souche résistante, la croissance est à peine affectée à 600 µM d'Ag<sup>+</sup> et à 10 g/l de NaCl ; alors qu'à 20 g/l de NaCl, la croissance est nulle à 50 µM d'Ag<sup>+</sup>.

- **Nutriments**

L'état nutritionnel d'un organisme peut influencer sa sensibilité aux métaux et par conséquent sa croissance. Les métaux pris par le système du transport énergie-dépendant peuvent s'accumuler plus rapidement quand les concentrations des sources d'énergie sont élevées ([Brynhildsen et al., 1988](#)).

[Mariano-da-Silva et al. \(2009\)](#) ont testé l'effet de certains constituants du milieu extrait de levure glucosé (YED) sur la toxicité du cadmium chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces auteurs ont noté qu'il existe une forte corrélation entre l'effet du cadmium et la dilution du milieu de croissance. La culture *S. cerevisiae* dans le milieu non dilué, en présence de la totalité de l'extrait de levure (1%), 0,05 mM de Cd<sup>2+</sup> affectent significativement la croissance et une dilution du milieu au ½ (0,5 % extrait de levure) ou au ¼ (0,25 % extrait de levure) provoque une inhibition totale de la croissance. De même la diminution du contenu en glucose du milieu réduit la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* au cadmium.

**Deuxième partie :**  
**Étude**  
**expérimentale**

# **Chapitre III :**

# **Matériel et**

# **Méthodes**

Durant notre étude, les travaux expérimentaux ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de Département de Biologie à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma.

## **I. Description de la région d'étude**

### **I.1. Réseau hydrographique de la wilaya de Guelma**

La wilaya de Guelma se situe au Nord-est de l'Algérie, elle est limitrophe aux Wilayas d'Annaba au Nord, El Taref au Nord-est, Souk Ahras à l'Est, Oum El-Bouaghi au Sud, Constantine à l'Ouest et Skikda au Nord-ouest (Debieche, 2002). Elle constitue, du point de vue géographique, un point de rencontre voire un carrefour entre les pôles industriels du Nord (Annaba et Skikda) et les centres d'échanges au Sud (Oum El Bouaghi et Tébessa). Elle occupe une position médiane entre le Nord du pays, les Hauts plateaux et le Sud. La wilaya de Guelma s'étend sur une superficie de 3 686,84 Km<sup>2</sup> (Debieche, 2002).

Le territoire de la wilaya se caractérise par un climat méditerranéen subhumide, assez favorable à l'agriculture et l'élevage au centre et au Nord et semi-aride vers le Sud. Ce climat est doux et pluvieux en hiver et chaud en été. La température qui varie de 4° C en hiver à 35,4°C en été, est en moyenne de 17,3°C (Debieche, 2002).

Elle dispose d'une richesse hydrique superficielle considérable, à laquelle une attention particulière doit être réservée. L'oued Seybouse, qui se trouve alimenté par un important réseau hydrographique, est l'un des cours d'eau les plus importants de cette région (Debieche, 2002).

La région d'étude fait partie du grand bassin versant de l'Oued Seybouse qui s'étend entre le confluent Cheref, Bouhamdane à Medjez Ammar au Nord-Ouest et le seuil hydrogéologique de Nador au Sud-est (Gaud, 1988).

Le bassin de l'oued Seybouse (Figure 4) qui couvre une superficie de 6745 km<sup>2</sup>, est alimentée par deux zones montagneuses (Guettaf, 2015) :

- les Monts de la Medjerdah, avec le djebel Ras El Alia qui culmine à 1317 m, et le djebel Zaoura (1292 m), ils constituent une zone commune de partage des eaux et donnent naissance à trois artères hydrographiques: l'oued Cherf formé par la rencontre de l'oued Tiffech-Lahmimime et l'oued Crab, l'oued Zouamel dans le bassin amont de la Medjerdahet l'oued R'biba pour l'oued Mellah.
- Une seconde zone montagneuse est constituée par le djebel Sidi Reghiss et la chaîne des Sellaoua. L'oued Settara de direction Sud-ouest Nord-est est issu de la rencontre de



deux oueds. Le premier issu de la rencontre des oueds Dhimine et Mebdoua et le second des oueds Ain Babouch et Ousseh. Tous ces cours d'eau sont alimentés à partir de cours d'eau secondaires assez denses issus du Djebel Sidi Reghiss et de la chaîne des Sellaoua.

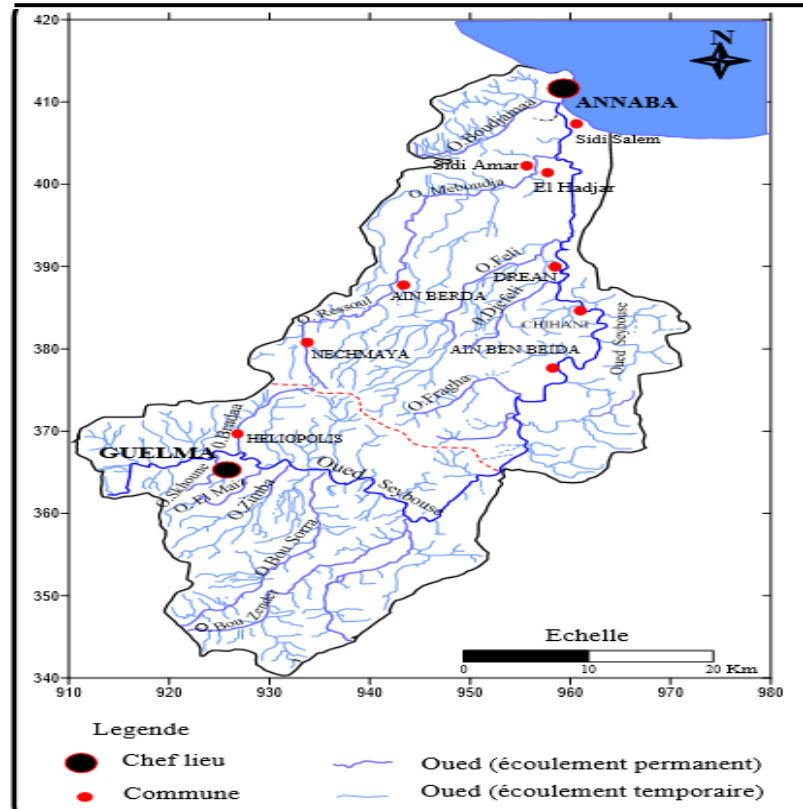


Figure 4 : Carte du réseau hydrographique de Guelma (Bechiri, 2011).

## I.2. Pollution des eaux de surface de la région de Guelma

La gestion très insuffisante de l'assainissement et l'absence de traitement dans la zone d'étude ont aggravé la pollution du milieu, et particulièrement les ressources en eau. Les eaux usées domestiques et industrielles sont rejetées à l'état brut dans le milieu naturel et occasionnent des pollutions de plus en plus dangereuses pour les ressources en eau donc pour la santé humaine (Bechiri, 2011).

Les principaux types et origines de pollution dans la zone d'étude sont les suivants :

- **Pollution urbaines et domestique**

La pollution urbaine constitue une source de pollution importante, en effet toutes les agglomérations situées le long du cours d'eau déversent leurs eaux usées dans l'oued Seybouse ou ses affluents sans traitement préalable sauf pour la ville de Guelma où il y a une station d'épuration mise en service. Dans le cas d'assainissement, collectif ou individuel défectueux ou un contact hydraulique avec les nappes, les substances indésirables contenues dans les eaux ménagères (matières organiques, solvants, détergents micro-organismes, antibiotiques...), peuvent atteindre la nappe (Bechiri, 2011).

Les trois décharges publiques à savoir celles situées respectivement au Nord de Guelaât Bou Sbâa, à l'Est de d'Héliopolis et au Nord de la ville de Guelma du côté de Djebel Hallouf, contribuent eux aussi à la pollution par leur lixiviât. Notons que d'autres décharges sauvages existent également dans notre zone d'étude (Bechiri, 2011).

- **Pollution d'origine agricole**

Les activités agricoles pratiquées dans la région d'étude sont principalement des élevages intensifs des bovins (étables, fermes pilotes) et volailles (poulaillers), avec la culture de divers produits alimentaires (blé, orge, avoine...). Ces pratiques actuelles influencent fortement le régime et la qualité des eaux. L'utilisation massive des engrais et des pesticides dans notre zone d'étude contribuent à la dégradation des eaux de surface et souterraine. Le transfert des engrais et pesticides vers la nappe se fait soit par infiltration sur l'ensemble de la surface cultivée, soit par rejet dans les puits perdus et gouffres (Bechiri, 2011).

- **Pollution industrielle**

L'essor industriel qu'a connu la région de Guelma a donné naissance à beaucoup de petites et grandes industries, les rejets de ces derniers sont constitués d'eaux usées et de déchets solides et se font en général dans les oueds sans traitement préalable (Guettaf, 2015).

Les stations de lavage et de carburants au nombre de 33 et les unités industrielles (Raffinage de l'huile d'olive, Production de carrelage, Production de tomate conserve, Moulins...) déversent également leurs déchets dans les affluents de l'oued Seybouse (Oued Skhoune, Oued Maiz, Oued Zimba, Oued Boussora et Oued Meboudja). Ces rejets peuvent occasionner

des modifications aux eaux de surface et souterraine et compromettent la santé de l'homme (Bechiri, 2011).

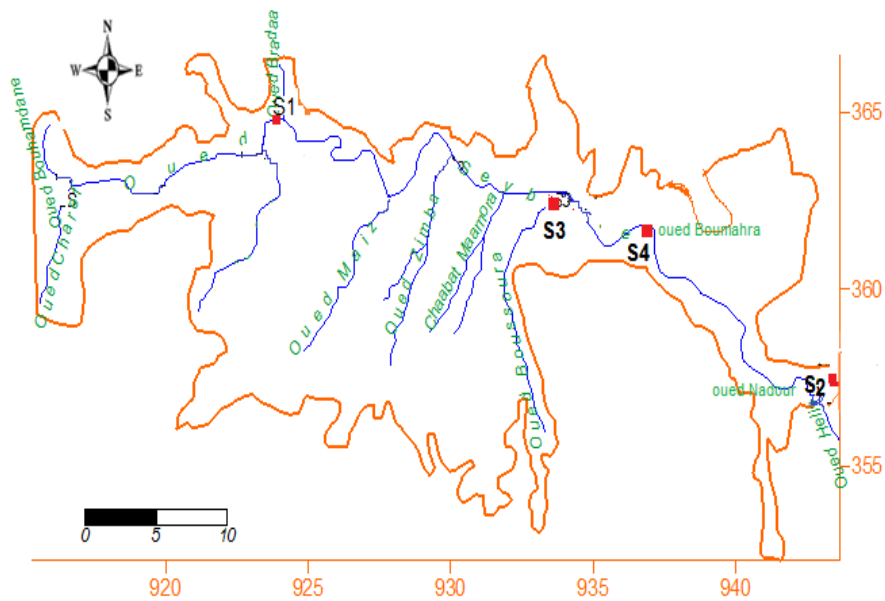
### I.3. Sites d'échantillonnage

Quatre stations de prélèvement ont été choisies localisées au niveau de 4 oueds (Figure 5): Oued Bradaa (S1), Oued Seybouse à Nhadour(S2), Oued Boussora (S3) et Oued Seybouse – plaine de Boumahra (S4).

Le choix des stations d'échantillonnage a été dicté par leurs implantations accessibles pour les prélèvements et leurs pollutions organiques et métalliques (Guettaf, 2015).





Les caractéristiques des quatre stations sont représentées dans le tableau 1.

Les principaux caractères des stations ont été déterminés suite à des sorties sur terrain et des données de la direction de l'environnement de Guelma ; leur positionnement a été effectué à l'aide d'un GPS UTM (Transverse Universelle de Mercator).



**Figure 5:** Localisation de quatre stations de prélèvement (Guettaf, 2015).

**Tableau 1:** Caractéristiques des quatre stations d'échantillonnage.

Station de Prélèvement	Coordonnées	Caractéristiques	Vue générale des stations de prélèvement (prises en 2017 par Benchikh et Boumaaza)
Aval de l'affluent d'Oued Bradaa (S1)	36.29376 N 7.26483 E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau courante</li> <li>- Fond riche en feuilles, branches et en matière organique en décomposition.</li> <li>- Présence de grandes étendues de terres agricoles et des agglomérations.</li> </ul>	
Oued Seybouse à Nadhor (S2)	36.25017 N 7.37485 E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau courante</li> <li>- Fond riche en boue et en argile</li> <li>- Récepteur de l'effluent industriel issu de l'usine de production de tomate conserve.</li> <li>- Présence d'aménagement urbain à proximité de l'oued</li> </ul>	
Aval de l'affluent d'Oued Boussora (S3)	36.28113 N 7.32064 E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau courante</li> <li>- Fond riche en débris des végétaux et humus</li> <li>- Présence de grandes surfaces de champs cultivés.</li> <li>- élevage intensif dans la région.</li> </ul>	
Oued Seybouse-plaine de Boumahra (S4)	36.27427 N 7.31498 E	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eau courante</li> <li>- Fond riche en boue et en argile</li> <li>- Présence d'usine de transformation de marbre</li> <li>- Exploitation des terres agricoles.</li> <li>- Récepteur des polluants des habitations.</li> </ul>	

## II. Méthode d'étude de la métallo-résistance bactérienne

### II.1. Echantillonnage et technique de prélèvement

Pour une bonne évaluation de la qualité des eaux des oueds étudiés, il serait intéressant de se faire une idée sur la qualité physico-chimique de ses eaux.

Les campagnes d'échantillonnage ont été réalisées durant la période hivernale. L'eau destinée aux analyses physicochimiques a été prélevée dans des flacons en plastique de 1.5 litre ; quant à celle destinée aux analyses bactériologiques, elle a été prélevée dans des flacons de 250 ml, en verre stériles ; la stérilisation a été réalisée dans un four Pasteur à 170 °C pendant 2 heure (Rodier *et al.*, 2005).

Les eaux destinées aux analyses bactériologiques ont été prélevées dans des conditions d'asepsie rigoureuses ; le flacon est débouché et immergé complètement en position verticale renversé en le tenant par le fond, retourné jusqu'à ce que l'ouverture soit légèrement plus haute que le fond et dirigé dans le sens contraire du courant (Guiraud, 2003). Les échantillons d'eau ont été prélevés en pleine eau c'est à dire 1 à 2 m du bord et 30 à 50 cm du fond (Rodier *et al.*, 2005).

Les échantillons prélevés sont clairement identifiés. Chaque flacon a porté une étiquette indiquant : le numéro du point de prélèvement, date et heure, et les conditions météorologiques (pluies, vents...) ; puis tous les prélèvements sont transportés dans une glacière dont la température est comprise entre 4 à 6 °C (Rodier *et al.*, 2005).

L'échantillonnage a été effectué entre 8 et 10 heures et les analyses ont été débutées dans un délai maximal qui n'a pas dépassé 2 heures après le recueil de l'échantillon.

## II.2. Paramètres physico-chimiques

Six paramètres physico-chimiques (Tableau 2): Température ( $T^{\circ}$ ), pH, oxygène dissous (DO), potentiel Redox (Eh), salinité (Sal), conductivité électrique (Cond), sont mesurés *in situ* (vu les variations rapides de ces paramètres dans le temps), à l'aide d'un appareil Multi-paramètres de terrain modèle *Multi 1970i*. L'utilisation de cet appareil consiste à faire plonger la sonde appropriée dans l'eau, après étalonnage, puis attendre quelques secondes avant de lire le résultat de la mesure, après stabilisation de l'affichage de ce dernier sur l'écran.



**Figure 6 :** Multi-paramètres modèle *Multi 1970i*.

## II.3. Isolement et identification des souches bactériennes

La composition des milieux de culture, réactifs et colorants utilisés est rapportée en annexe I.

### II.3.1. Bactéries à Gram négatif

Dans la présente étude nous nous intéressons des bactéries fermentaires : entérobactéries, et des bactéries qui n'appartiennent pas aux entérobactéries: *Pseudomonas* et apparentés, *Aeromonas*...

Ces bactéries sont distribuées largement dans la nature y compris les milieux aquatiques dont certaines peuvent être des pathogènes responsables de pathologies humaines et/ou animales (Rodier *et al.*, 2005).

**Tableau 2:** Paramètres physico-chimiques mesurés *in situ*.

Paramètre	Description/Importance	Unité	Référence
Température	La température détermine un grand nombre de processus biologiques et chimiques qui se déroulent dans l'eau. Elle joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, la conductivité électrique, l'oxygène dissous, le pH, etc.	°C	<a href="#">Rodier et al. (2005).</a>
pH	C'est la mesure de l'activité des ions contenus dans Une eau : $\text{pH} = - [\log \text{H}^+]$ . Il joue un rôle primordial à la fois dans les propriétés physico-chimiques, les processus biologique et l'efficacité de certains traitements.	-	<a href="#">Des Jardins (1990).</a>
Oxygène Dissous	Un composé essentiel de l'eau : il conditionne la vie des microorganismes aquatiques, il permet de fournir des informations concernant la dégradation de substances organiques (réactions biochimiques), la mobilisation potentielle de certains métaux, etc.	mg/l	<a href="#">Thierrinet al, (2001).</a>
Redox	La mesure du potentiel redox permet de caractériser le milieu et de suivre, en particulier pendant les périodes de faible oxygénation, son évolution. Le potentiel redox est fonction de l'équilibre entre les formes réduites et les formes oxydées des composés chimiques présents.	mV	<a href="#">FILMED (2010).</a>
Salinité	La salinité détermine en grande partie les processus biologiques, mais également les processus chimiques dans l'eau. Les peuplements floristiques et faunistiques dépendent de la salinité et surtout des variations absolues au cours de l'année.	PSU	<a href="#">FILMED (2010).</a>
Conductivité	La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau Se trouvent sous forme d'ions chargés d'électrons. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sel dissous dans l'eau.	$\mu\text{S}/\text{cm}$	<a href="#">Saadali (2007).</a>

### II.3.1.1. Entérobactéries

- **Isolement (Schéma 1)**

- **Pré-Enrichissement**

Cette étape a été réalisée spécifiquement pour la recherche des salmonelles et des shigelles.

Le pré-enrichissement s'effectue sur le milieu d'eau peptonée tamponnée D/C réparti à raison de 100 ml par flacon. Ce dernier sera doncensemencé à l'aide de 100 ml d'eau à analyser, puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures (Larpent, 1997).

- **Enrichissement**

A partir du milieu de pré-enrichissement, ensemencer un bouillon au Sélénite-Cystéine avec un volume d'échantillon correspond au 1/10 du volume du bouillon (Exemple : ensemencer 1 ml d'eau dans 10 ml du bouillon Sélénite). L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h (Larpent, 1997).

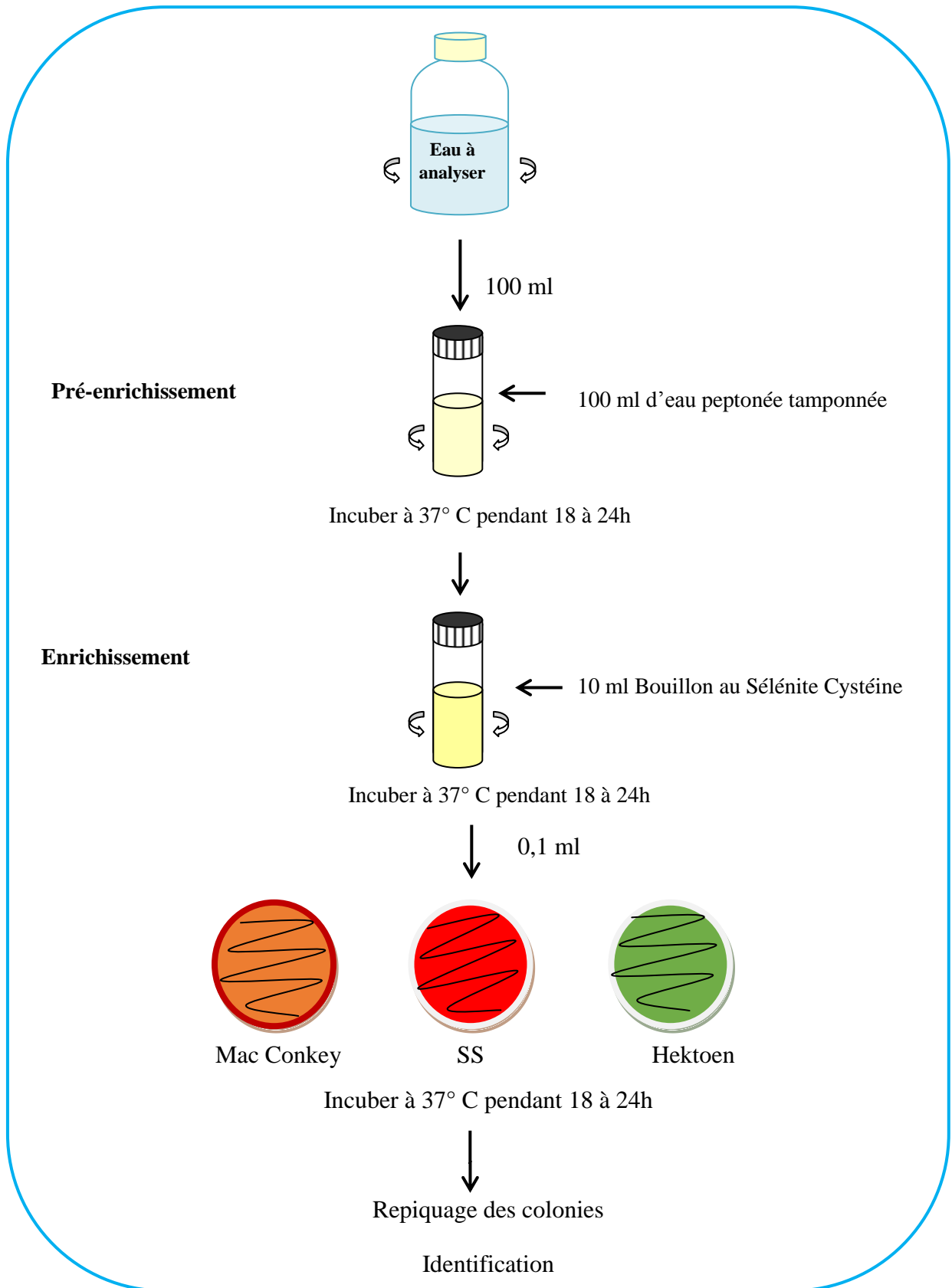
- **Isolement sélectif**

Trois milieux de culture ont été utilisés :

- La gélose Mac Conkey : milieu sélectif pour les entérobactéries en général, elle permet l'élimination de la flore secondaire grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore Gram positive) et les sels biliaries (sélection des entérobactéries) (Larpent, 1997).
- La gélose Hektoen : c'est le milieu de choix pour l'isolement des entérobactéries pathogènes. Ce milieu permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (Larpent, 1997).
- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) : c'est le milieu sélectif des salmonelles et des shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaries et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus* (Larpent, 1997).

Les géloses : SS, Hektoen et Mac Conkey sont ensemencés avec 0.1 ml de culture prélevée en milieu d'enrichissement. Toutes les boites sont incubées à 37° C pendant 18 à 24 h (Larpent, 1997).





**Schéma 1** : Isolement des entérobactéries pathogènes.

- **Identification**
  - **Examen macroscopique**

À l'œil nu, nous pouvons distinguer les caractéristiques d'une colonie : la forme du relief, la taille, la couleur, l'aspect (collant, filamenteux...), l'odeur, la transparence, et l'allure des contours (Guiraud, 2003). L'aspect des colonies suspectes des entérobactéries sur chaque milieu de culture utilisé est représenté dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Aspects cultureux des entérobactéries sur les milieux de culture sélectifs (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005).

Milieu d'isolement	Aspects des colonies	Bactéries suspectes
<b>Mac Conkey</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grandes, rouges.</li> <li>- Incolores, transparentes.</li> <li>- Grandes, roses, visqueuses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Escherichia coli</i>.</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i> et autres.</li> <li>- <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>.</li> </ul>
<b>Hektoen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jaunes Saumons sans centre noir.</li> <li>- jaunes saumon à centre noir.</li> <li>- vertes ou bleuâtres sans centre noir.</li> <li>- vertes bleuâtres à centre noir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coliformes, <i>Serratia</i>, <i>Arizona</i>, <i>Levinea</i>, <i>Yersinia</i>.</li> <li>- <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Proteus vulgaris</i></li> <li>- <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i> à H<sub>2</sub>S (-), <i>Providentia</i>, <i>Proteus morganii</i>, <i>Proteus rettgeri</i>.</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.</li> </ul>
<b>SS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- colonies rouges.</li> <li>- colonies rouges à centre noir.</li> <li>- colonies incolores transparentes.</li> <li>- colonies incolores à centre noir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, autres coliformes (<i>E.coli</i>).</li> <li>- <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Arizona</i>.</li> <li>- <i>Salmonella</i> H<sub>2</sub>S (-), <i>Shigella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Alkalescens</i>, <i>Enterobacter hafniae</i>, <i>Proteus morganii</i></li> <li>- <i>Salmonella</i> H<sub>2</sub>S (+), <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>.</li> </ul>

- **Examen microscopique**
  - **Etat frais**

L'examen microscopique à l'état frais permet d'apprécier à la fois la forme, le mode de regroupement et la mobilité des bactéries isolées (Prescott *et al.*, 1999).

#### Technique

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine une fraction de la colonie sur milieu gélosé.

- Effectuer une suspension homogène dans la goutte d'eau physiologique en incorporant l'inoculum.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulle d'air.

L'observation s'effectue à faible luminosité à l'objectif X10 puis X40

(Guiraud, 2003).

#### ▪ Coloration de Gram

Cette coloration aide à déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Elle nous permet aussi de connaître la morphologie et le mode de regroupement de bactérie (Degrement, 1998).

### Technique

La coloration de Gram ou coloration différentielle s'effectue de la manière suivante :

- Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen.
- Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite lavé rapidement par l'eau courante.
- Mordançage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau.
- Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes.
- Recoloration : soumettre le frottis durant trente secondes à une courte coloration par la fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre .
- Examiner le frottis, à immersion à l'objectif  $\times 100$ .

**Lecture :** Les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatif sont bien colorées en rose (Prescott *et al.*, 1999).

○ **Recherche des enzymes respiratoires**

▪ **Oxydase**

**Principe :** Ce test à la base de l'identification des bactéries Gram « - », permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène diamine (Delarras, 2003).

**Technique**

- Déposer un disque pré-imprégné par le Réactif N diméthyl-paraphénylène diamine (disque oxydase) sur une lame propre.
- Imbiber le disque d'une goutte d'eau distillée stérile.
- Déposer au-dessus une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Etaler la colonie sur le disque.
- Attendre 3 à 5 secondes (Delarras, 2003).

**Lecture**

- Si la colonie prend une teinte rose, violette. La bactérie possède une oxydase : le test est positif.
- Si la colonie reste incolore, la bactérie ne possède pas d'oxydase, le test est négatif (Delarras, 2003).

▪ **Catalase**

**Principe :** Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' $H_2O_2$  et le dégrade selon la Réaction suivante :



- Remarque : Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positif (Delarras, 2003).

**Technique**

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes,
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien,
- Surveiller l'apparition d'un dégagement d'oxygène sous forme de bulles gazeuses (Delarras, 2003).

### Lecture

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses: le test catalase est positif.
- Pas de dégagement de bulles gazeuses: le test catalase est négatif (Delarras, 2003).

#### ▪ Nitrate réductase

**Principe :** Certaines bactéries peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons, c'est la respiration nitrate. La Nitrate Réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites suivant la réaction suivante (Delarras, 2003) :



### Technique

- Ensemencer un bouillon nitraté (1% de  $\text{KNO}_3$ ) avec de la suspension bactérienne à étudier.
- Incuber à  $37^\circ\text{C}$  pendant 48h.
- La mise en évidence de l'apparition des nitrites par l'addition de 3 gouttes d'acide parasulfanilique (NIT I) puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine (NIT II) (Delarras, 2003).

### Lecture

Elle est immédiate.

- Si le milieu devient rouge, c'est-à-dire présence de nitrites et donc la bactérie possède la nitrate réductase : le test est positif
- Si le milieu reste inchangé, il faut ajouter la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates :
  - Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possède pas cette enzyme. Le test est négatif.
  - Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Le test est positif (Delarras, 2003).

○ **Identification biochimique**

L'identification des différentes bactéries isolées a été réalisée grâce à la galerie biochimique classique pour certaines souches, et par la galerie biochimique miniaturisée API 20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) pour d'autres souches.

▪ **Galerie biochimique classique**

Les tests biochimiques qui ont été effectués dans notre étude sont résumés dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries.

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
<b>Fermentation des sucres avec ou sans gaz</b> + <b>Production d'H<sub>2</sub>S.</b>	-Utilisation du glucose, saccharose et lactose. -production d'H <sub>2</sub> S. -production de Gaz	Ensemencement de la pente du milieu TSI par stries et le culot par simple piqure. Après 24H à 37°C, la pente jaune= fermentation du lactose/saccharose ; culot jaune = fermentation du glucose ; noircissement= H <sub>2</sub> S+, bulles gazeuses= production du gaz.	<a href="#">Delarras (2003)</a>
<b>RM</b>	Mise en évidence de la voie des fermentations acides mixtes.	- Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. - Incuber à 37°C pendant -Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. -La lecture est immédiate : Milieu rouge : RM (+) .Milieu jaune : RM(-).	<a href="#">Guiraud (2003)</a>
<b>VP (voges Proskauer)</b>	Production de l'acétoïne.	-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h. Après culture : -Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VPII : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu rouge : VP(+)</li> <li>• Milieu jaune : VP(-)</li> </ul>	<a href="#">Delarras (2003)</a>
<b>Citrate de Simmons</b>	utilisation du citrate comme seule source de carbone.	-Ensemencer la pente du milieu Citrate de Simmons est par une strie longitudinale. -Incuber 24 heures à 37°C. -Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : résultat positive, la bactérie utilise le citrate.	<a href="#">Delarras, (2003)</a>

**Tableau 4 (suite):**

<p><b>Urée Indole TDA</b></p>	<p>-Uréase -Formation d'indole -Tryptophane désaminase</p>	<p>-Faire une suspension en milieu Urée-indole. - Incuber à 37° C pendant 24h. -Uréase (+) : Apparition de couleur rose - Indole(+) : Après l'ajout du réactif de Kowacs, apparition d'un anneau rouge à la surface. -TDA (+) : Après l'ajout du réactif TDA, apparition d'un précipité brun foncé.</p>	<p>Delarras (2003).</p>
<p><b>Mannitol Mobilité</b></p>	<p>-Fermentation du Mannitol  -Mobilité</p>	<p>-Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit -Incuber à 37° C pendant 24 h - Mannitol (+): Apparition de couleur jaune. -La mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).</p>	<p>Guiraud (2003)</p>
<p><b>ONPG</b> (ortho-nitrophényl- β-galactopyranoside)</p>	<p>Présence de β-galactosidase qui a la capacité d'hydrolyser la liaison osidique de β-galactoside donnant le galactose et le glucose.</p>	<p>Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. -Ajouter avec une pince flambée et refroidie un disque d'ONPG. -Incuber à 37°C Pendant 30 min. - ONPG (+) : milieu de couleur jaune. - ONPG (-) : milieu sans couleur.</p>	<p>Delarras (2003)</p>

- **Galerie biochimique miniaturisé API 20E**

La galerie API 20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (voir annexe II).

**Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

### Préparation de l'inoculum

- Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile (5 ml), avec une seule colonie bien isolée prélevée sur un milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

### Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

**Lecture :** Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- Test VP : VPI + VPII, attendre 10 min, une couleur rose-rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : Réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- Test IND : Réactif IND, attendre 2 min, une couleur rouge indique une réaction positive.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe II). Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. Un nombre à 7 chiffres est obtenu qui sert de code d'identification. La réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive. L'identification est réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification *apiweb*<sup>TM</sup> ; enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres (source : <http://www.biomerieux.com>).



### II.3.1.2. Bacilles à Gram négatif non entérobactéries

- **Isolement (Schéma 2)**

L'isolement des bacilles à Gram négatif qui n'appartiennent pas aux entérobactéries a été réalisé, sur les géloses : cétrimide, gélose nutritive (GN) et GN à pH = 8 (Delarras, 2003).

- La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-tri méthylammonium) ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif). L'incubation se fait à 37° C pendant 24 heures (Guiraud, 2003).
- La gélose nutritive est un milieu non-sélectif utilisé pour l'isolement des bactéries non exigeantes comme elle est utilisé pour la purification des souches bactériennes (Guiraud, 2003).
- La GN à pH alcalin est utilisé pour l'isolement des bactéries alcalophiles (*Pseudomonas, Vibrio...*) (Guiraud, 2003).

- **Identification**

- **Aspect macroscopique**

Sur la gélose au cétrimide, les colonies de *Pseudomonas* apparaissent souvent de grandes tailles (1-3mm), lisses et bombées, elles sont souvent pigmentées en bleu ou en bleu-vert du fait de la production des pigments, les autres genres voisins se présentent le plus souvent sous forme de colonies blanchâtres moyennes, à contour régulier (Guiraud, 2003).

Sur la gélose nutritive et /ou GN à pH alcalin, les colonies sont blanchâtres (pigmentées en bleu-vert pour *Pseudomonas*), rondes, bombées, lisses, et régulières (Richard *et al.*, 1995).

- **Aspect microscopique**

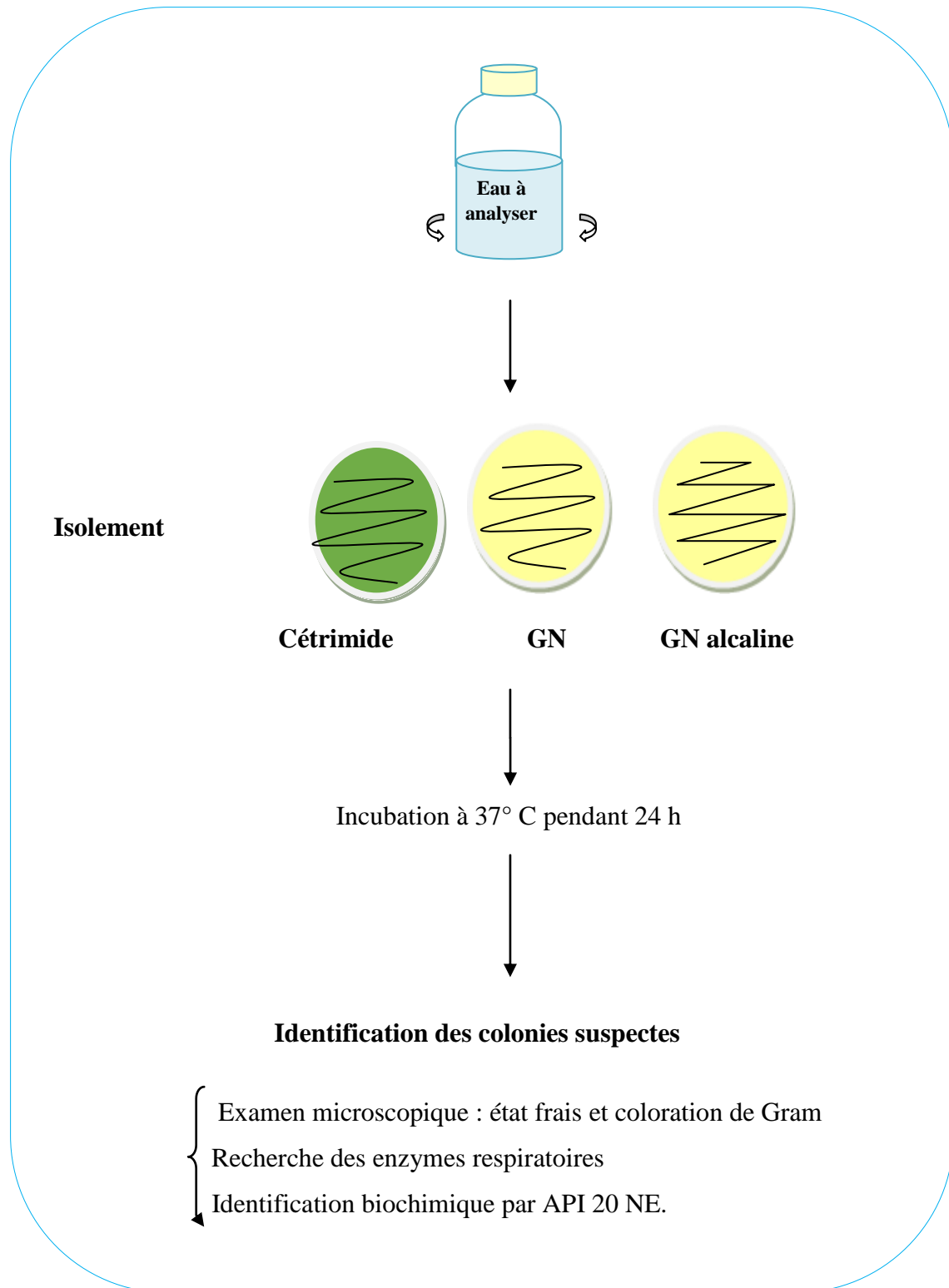
Nous avons effectué un état frais et une coloration de Gram (se reporter au § 3.1.1)

- **Recherche des enzymes respiratoires**

Se reporter au § 3.1.1

- **Identification biochimique**

L'identification biochimique a été réalisée par la galerie API 20 NE.



**Schéma 2:** Isolement et identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries

▪ **Galerie biochimique miniaturisé API 20 NE**

API 20 NE (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation (source :<http://www.biomerieux.com>).

La préparation de la galerie et de l'inoculum est la même que la galerie API 20E (§ 3.1.1).

**Inoculation de la galerie**

- Remplir uniquement les tubes des tests NO<sub>3</sub> à PNPG,
- Créer une anaérobiose (par l'huile de paraffine) dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

**Lecture**

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- Test NO<sub>3</sub>: NIT I + NIT II.
- Test TRP : Réactif JAMES (ou Kovacs).

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (voir annexe II).

L'identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification *apiweb*<sup>TM</sup> ; enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres,

(source :<http://www.biomerieux.com>).

**II.3.2. Bactéries à Gram positif**

**a. Bacilles**

Les bacilles à Gram positive peuvent constituer jusqu'à 20% de la flore hétérotrophe totale en milieu aquatique (Vedrenne, 2008).

Nous nous intéressons de ces bactéries parce qu'elles sont à l'origine de plusieurs infections opportunistes (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus sphaericus*...) (Vedrenne, 2008).

- **Isolement (Schéma 03)**

L'isolement des bacilles à Gram positif a été réalisé, sur les milieux : gélose nutritive (GN) et GN à pH = 8 (Delarras, 2003).

- **Identification**

- **Aspect macroscopique**

Colonies rugueuse de 3 à 4 mm de diamètre, blanchâtres à contour irrégulier sur GN (Delarras, 2003).

- **Aspect microscopique**

Nous avons effectué un état frais et une coloration de Gram (se reporter au § 3.1.1)

- **Recherche des enzymes respiratoires**

Se reporter au § 3.1.1

- **Identification biochimique**

L'identification biochimique a été réalisée par la galerie biochimique classique décrite avec les entérobactéries (§ 3.1.1).

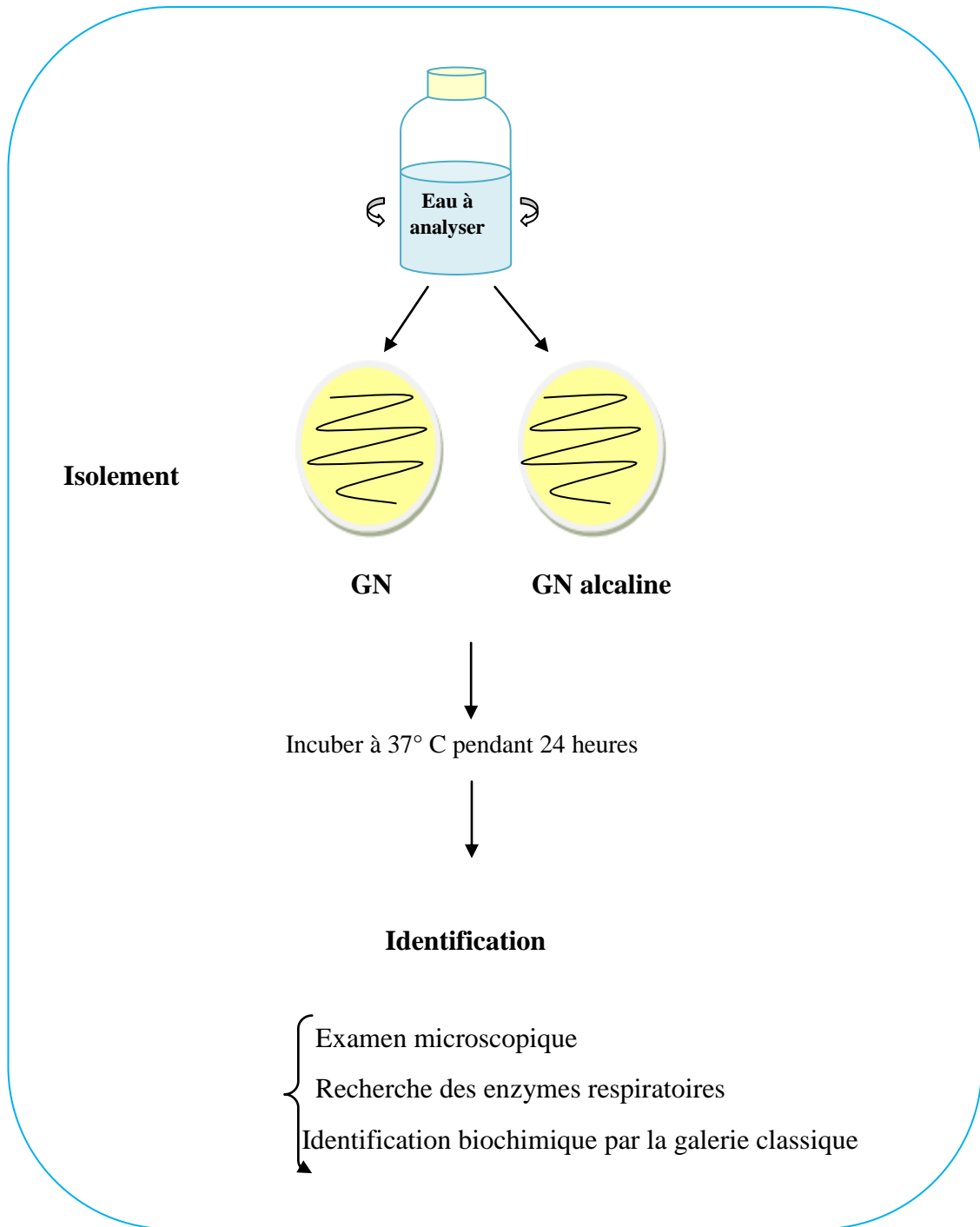
### **b. Cocci**

Parmi les cocci à Gram positif, nous nous intéressons de staphylocoques puisque ce sont des bactéries ubiquitaires, pyogènes, responsables de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses (Rodier *et al.*, 2005).

- **Isolement (Schéma 4)**

L'isolement des cocci à Gram positif a été réalisé, sur les milieux : Chapman (pour les staphylocoques), et la gélose nutritive (pour d'autres cocci) (Delarras, 2003).

La gélose Chapman est un milieu sélectif des staphylocoques, elle contient un inhibiteur, forte concentration en chlorure de sodium (75 g.L<sup>-1</sup>) (Rodier *et al.*, 2005).



**Schéma 3:** Isolement et identification des bacilles à Gram positifs.

- **Identification**

- **Aspect macroscopique**

Sur la gélose Chapman, les colonies pigmentées en jaunes et entourées d'une auréole jaune : forte suspicion de *Staphylococcus aureus*. Les autres espèces de staphylocoques donnent généralement des colonies plus petites, rosées et n'entraîne pas de virage du milieu (Guiraud, 2003).

Sur la gélose nutritive, les colonies apparaissent blanchâtres, petites, lisses, bombées et à contour régulier (Guiraud, 2003).

- **Aspect microscopique**

Nous avons effectué un état frais et une coloration de Gram (se reporter au § 3.1.1)

- **Recherche des enzymes respiratoires**

Se reporter au § 3.1.1

- **Identification biochimique**

Certaines cocci à Gram positif ont été identifiées par les galeries biochimiques miniaturisées : API Staph et API 20 Strep (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

Pour d'autres souches, l'identification biochimique a été réalisée par la galerie biochimique classique décrite avec les entérobactéries (§ 3.1.1).

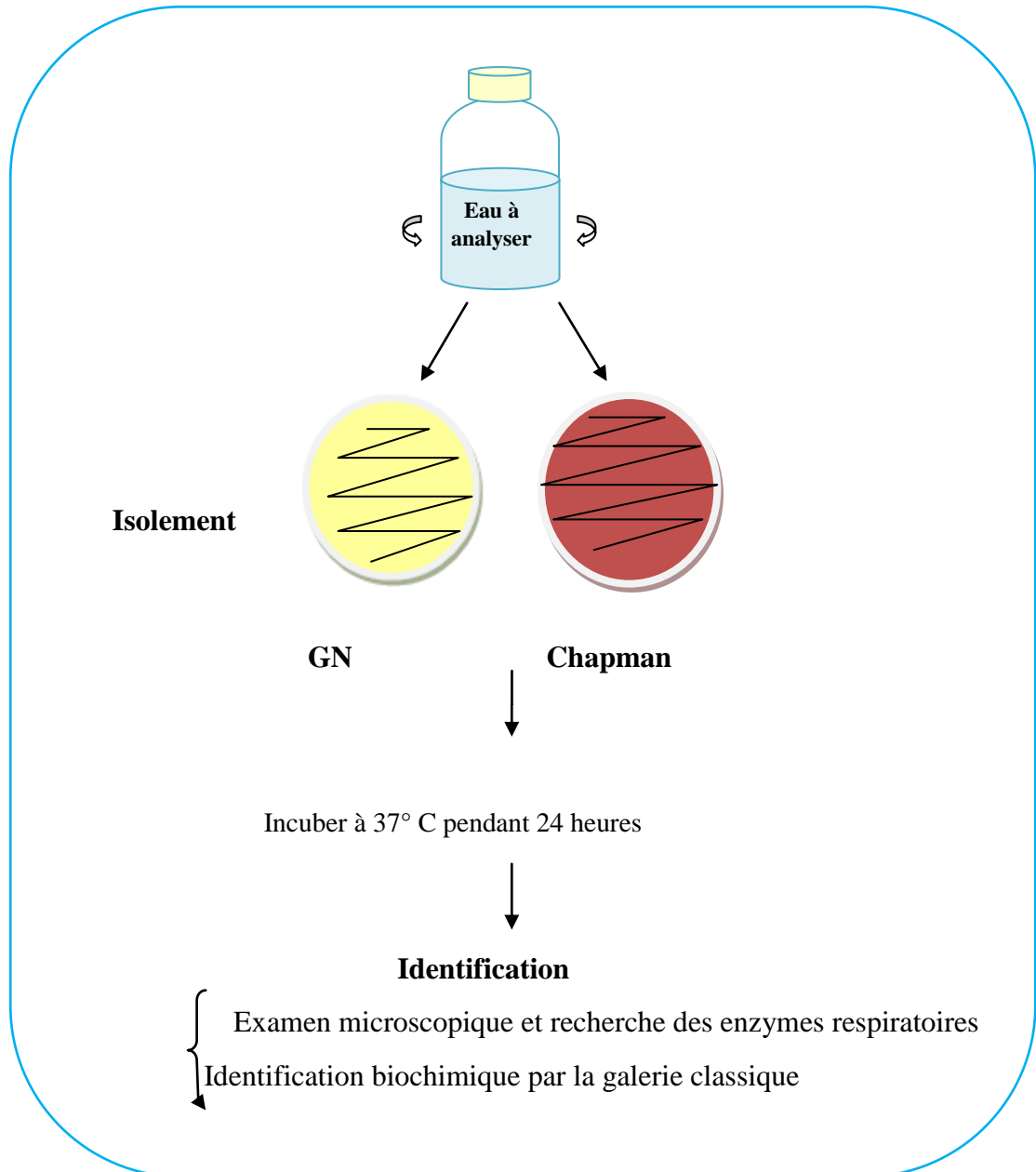
- **Galerie biochimique miniaturisé API Staph**

API Staph (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* (Murray *et al.*, 2003).

Le principe et la préparation de la galerie API Staph, ainsi que la préparation de l'inoculum sont similaires à ceux décrites pour la galerie API 20E (§ 3.1.1).

### **Inoculation de la galerie**

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette Pasteur en évitant la formation de bulles.
- Pour les caractères ADH, URE, remplir les cupules d'huile de paraffine pour
- créer une anaérobiose. Incuber 24 heures à 37°C.



**Schéma 4** : Isolement et identification des cocci à Gram positifs.

### Lecture

- La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.
- Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de lecture de la galerie miniaturisé API Staph en annexe II.

- L'identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification *apiweb*<sup>TM</sup> ; *enter* manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres (source :<http://www.biomerieux.com>).

- **Galerie biochimique miniaturisé API 20 Strep**

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques, qui représentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques et entérocoques (Murray *et al.*,2003).

Le principe et la préparation de la galerie API 20 Strep, ainsi que la préparation de l'inoculum sont similaires à ceux décrites pour la galerie API 20E (§ 3.1.1).

### **Inoculation de la galerie**

- Ouvrir une ampoule d'API suspension Medium (2ml), à l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense.
- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles :
  - Pour les tests VP à LAP : environ 100µl dans chaque cupule.
  - Pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (test RIB à GLYG).
- Ouvrir une ampoule d'API GP Medium, et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum, bien homogénéisé.
- Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH à GLYG en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C±2°C en aérobiose pendant 4h - 4h30 pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture.

### **Lecture**

Ajouter les réactifs :

- Test VP : 1goutte de VP1et VP2.
- Test HIP: 2gouttes de NIN.



- Test PYRA, GAL, GUR, GAL, PAL, LAP:1 goutte de ZYM A et ZYM B.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (Annexe II). L'identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification *apiweb*<sup>TM</sup> ; *enter* manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres, (source :<http://www.biomerieux.com>).

## II.4. Détermination de la résistance aux métaux lourds

### II.4.1. Métaux lourds testés

Dans la présente étude nous avons étudié l'effet antibactérien de deux métaux lourds : le cuivre et le cadmium.

Le cuivre testé est sous forme de cuivre sulfate pentahydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),  $\text{PM} = 249.68 \text{ g/mol}$  ; et le cadmium est obtenu à partir de cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ),  $\text{PM} = 183.31 \text{ g/mol}$ .

Le choix de ces métaux repose d'une part sur les données de la direction de l'environnement de la wilaya de Guelma et les travaux de [Guettaf \(2015\)](#) qui montrent leurs présences en concentrations importantes dans les eaux de nos sites d'échantillonnage, et d'autre part, sur leur disponibilité.

### II.4.2. Bactéries étudiées

Durant notre étude, nous avons identifié 27 souches bactériennes à partir des eaux de quatre oueds dans la région de Guelma. Ces souches ont été purifiées par des repiquages successifs et conservées jusqu'à l'étude de la métallosensibilité. La conservation des souches a été réalisée à la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive (Chapman pour les staphylocoques) inclinées en tubes à essai ([Guiraud, 2003](#)).

### II.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux a été évaluée pour toutes les souches isolées par la méthode de dilution en milieu liquide ([Lennette et al., 1985](#)). Le milieu liquide utilisé est le bouillon Muller-Hinton (MH) qui est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux agents antibactériens ([CA-SFM, 2016](#)).

#### II.4.3.1. Préparation des solutions mères et des solutions filles

Des solutions mères de  $\text{CuO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{CdCl}_2$  contenant 50 g/l ont été préparées dans de l'eau distillée, puis stérilisées par filtration sur membrane (0.2  $\mu\text{m}$ ).

Huit solutions filles sont obtenues, pour chacun des deux métaux, par dilution successive au demi de la solution mère correspondante dans des tubes d'eau distillée stérile. Après dilution des solutions mères métalliques, les concentrations de métaux se répartissent dans les solutions filles entre 12.5 et 1600 $\mu\text{g/ml}$ .

#### II.4.3.2. Préparation de l'inoculum

Les bactéries issues d'une culture de 18 heures incubée à 37°C ont été suspendues dans le bouillon Mueller Hinton à une turbidité correspondante à 0.5 Mac Farland.

Dans un tube à hémolyse, nous avons mélangé 1ml de chaque concentration du métal avec 1 ml de l'inoculum bactérien à raison de  $10^6$  bactéries/ml pour les entérobactéries et les bacilles à Gram positif et  $10^7$  pour les cocci à Gram positif et les bacilles à Gram négatif non entérobactéries (CA-SFM, 2016).

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures.

#### II.4.3.3. Lecture de la CMI

La CMI entraîne un ralentissement de la croissance de la population bactérienne tel qu'il atteint une absence de croissance, donc elle est définie comme la plus faible concentration d'un agent antibactérien donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des conditions parfaitement définis, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée (CA-SFM, 2016).

Après incubation, un examen à l'œil nu est réalisé pour chaque tube afin de déterminer la CMI qui sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible.

#### Remarque

- Les souches bactériennes sont considérées résistantes si leurs CMI sont supérieures à celle de la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 qui est utilisée comme un excellent modèle de contrôle de l'effet antibactérien des métaux lourds (Akinbowale *et al.*, 2007).
- Des témoins de croissance pour chaque souche bactérienne sont préparés également dans le bouillon MH sans métaux lourds.

#### II.4.4. Détermination de la Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

La CMB est définie comme étant la concentration minimale qui tue 99.99 % de l'inoculum de départ (CA-SFM, 2016).

La CMB a été déterminée suivant la méthode décrite par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2016):

- Préparer tout d'abord un témoin bactéricide par ensemencement en stries de 10 µl de l'inoculum de départ et ces dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ) sur la gélose nutritive. Cette suspension mère et ses dilutions correspondent respectivement à 100 %, 10 %, 1 %, 0.1 % et 0.01 % de survivants.
- A partir des tubes sans croissance visible de la détermination de la CMI, repiquer en stries sur la gélose nutritive comme précédemment décrit.
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.
- Comparer les cultures au témoin bactéricide : la CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieur ou égale à 0.01 % de survivants.

#### II.4.5. Détermination du rapport CMB/CMI

Ce rapport est utilisé pour distinguer les agents bactéricides ( $CMB/CMI \leq 2$ ) des agents bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI).

Il permet de définir également la tolérance d'une souche bactérienne à un agent bactéricide ( $CMB/CMI \geq 32$ ) (CA-SFM, 2016).

# **Chapitre IV :**

# **Résultats et**

# **discussion**

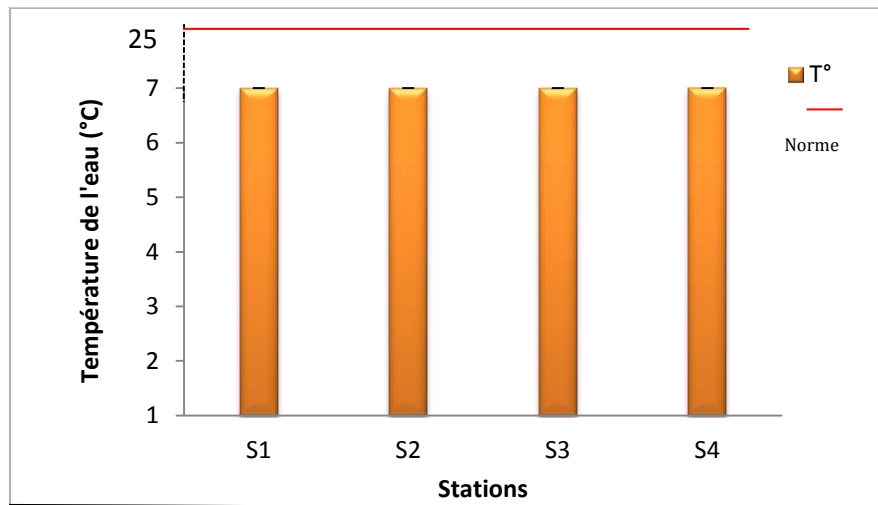
## I. Résultats

### I.1. Caractéristiques physicochimiques

#### I.1.1. Température de l'eau

La variation spatiale de la température de l'eau présente la même allure, une moyenne de 7°C est enregistrée dans les quatre stations (Figure 7).

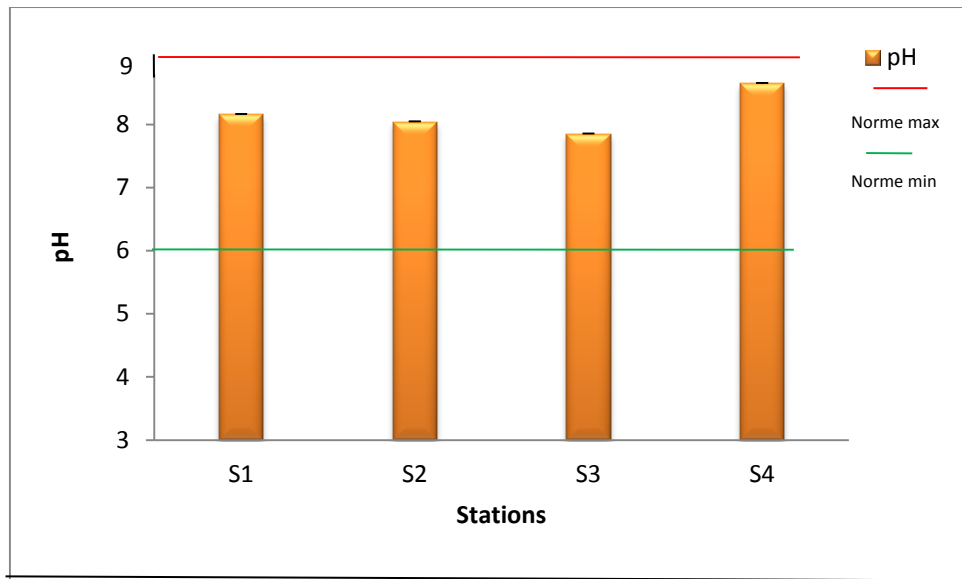
Nous remarquons que la température de l'eau des oueds étudiés ne dépasse pas la valeur limite de la température des eaux de surfaces (25°C) (J.O.R.A, 2014).



**Figure 7:** Variation spatiale de la température des eaux de surface de la région de Guelma.

#### I.1.2. Potentiel d'hydrogène

Le pH des eaux étudiées est dans l'ensemble alcalin. Les valeurs enregistrées varient entre 7.8 et 8.7 (Figure 8). Ces valeurs sont en conformité avec la norme algérienne relative à la qualité des eaux superficielles ( $6.5 < \text{pH} < 9$ ) (J.O.R.A, 2014).



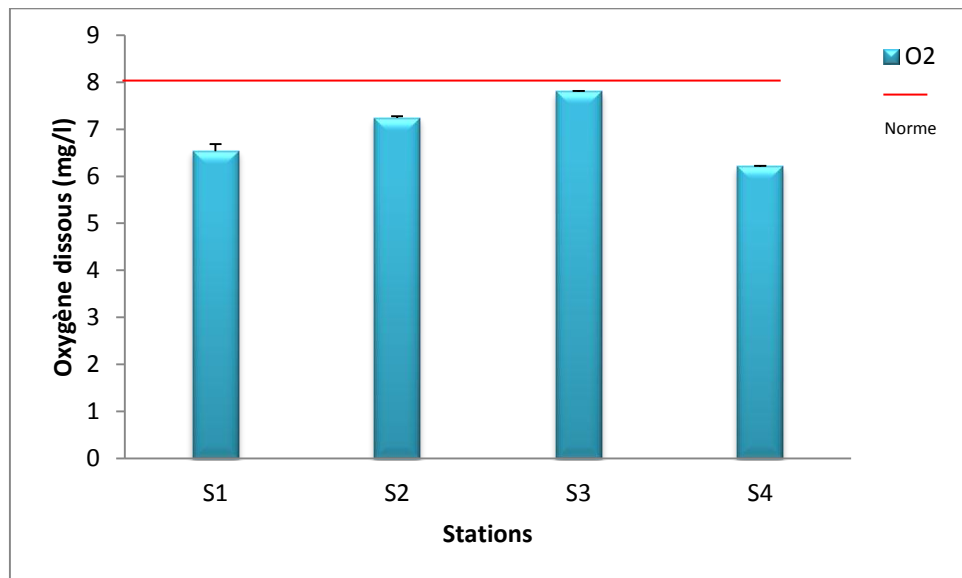
**Figure 8 :** Variation spatiale du pH des eaux de surface de la région de Guelma.

### I.1.3. Oxygène dissous

Les teneurs moyennes en oxygène dissous dans les quatre stations dépassent 6 mg/l.

La station S3 semble être bien oxygénée par rapport aux autres stations (Figure 9).

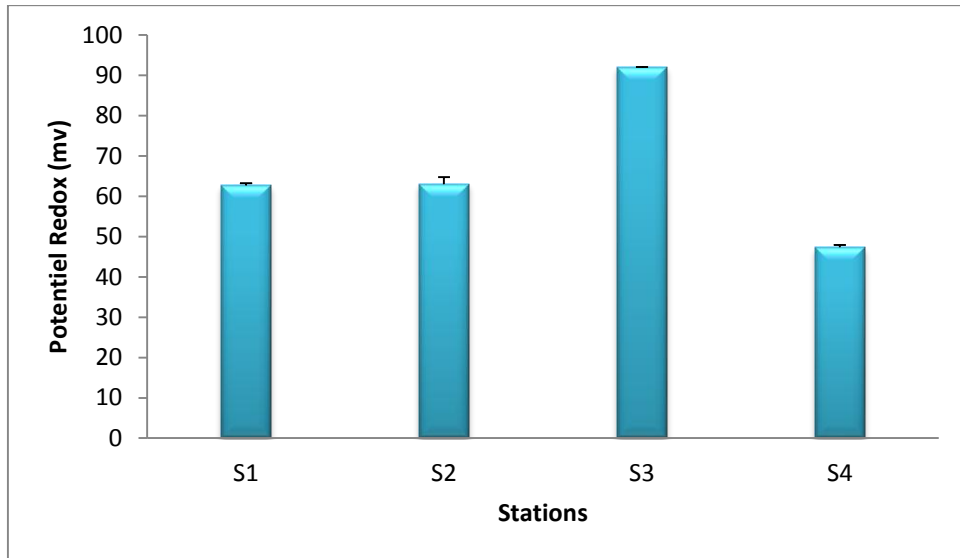
Toutes les stations montrent des teneurs inférieures à la valeur guide (8 mg/l) (J.O.R.A, 2014).



**Figure 9 :** Variation spatiale de l'oxygène dissous des eaux de surface de la région de Guelma.

### I.1.4. Potentiel Redox

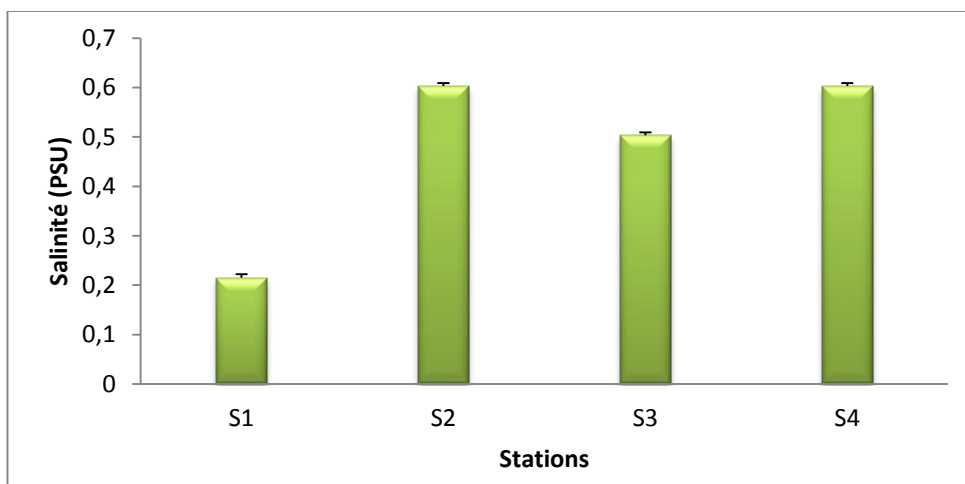
La valeur moyenne la plus élevée du pouvoir réducteur est enregistrée dans la station 3. Les stations 1 et 2 montrent des valeurs moyennes très proches (Figure 10).



**Figure 10** : Variation spatiale du potentiel redox des eaux de surface de la région de Guelma.

### I.1.5. Salinité

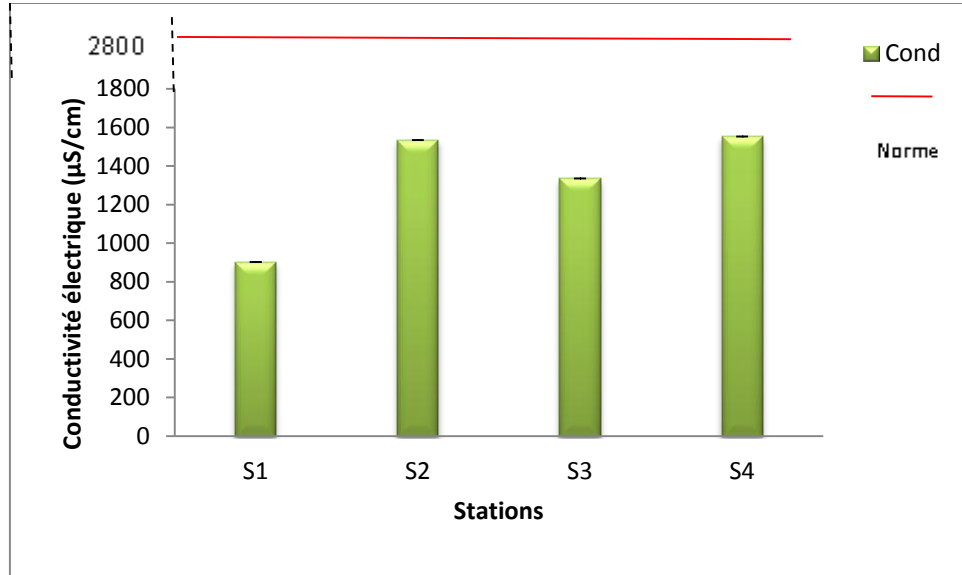
Les valeurs moyennes maximales de la salinité sont enregistrées dans les stations 2 et 4, par ailleurs c'est la station 1 qui montre la valeur la plus basse (Figure 11).



**Figure 11** : Variation spatiale de la salinité des eaux de surface de la région de Guelma

### I.1.6. Conductivité électrique

La conductivité des oueds étudiés n'a jamais dépassée la valeur limite (2800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) recommandée par les autorités algériennes (Figure 12) (J.O.R.A, 2014).



**Figure 12:** Variation spatiale de la conductivité électrique des eaux de surface de la région de Guelma.

## I.2. Identification des bactéries aquicoles

Dans la présente étude, nous avons identifié et conservé 27 bactéries rattachées à quatre classes : *Gamma proteobacteria*, *Bacilli*, *Actinobacteria* et *Flavobacteria*.

25.93 % des bactéries identifiées proviennent de la station 1, 18.52 % de la station 2, 18.52 % de la station 3 et 37.03 % de la station 4.

### I.2.1. Bacilles à Gram négatif

#### I.2.1.1. Entérobactéries

L'étude des caractères cultureux et biochimiques des bactéries qui ont été poussées sur les géloses Mac Conkey, Hektoen et SS, nous a permis d'identifier et de conserver 9 entérobactéries (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 et E9).



- **Aspects macroscopiques et microscopiques**

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies des entérobactéries qui ont été isolées sont représentés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Aspects macroscopiques et microscopiques des entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Station	Code de la souche	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1	E1	Hectoen	Colonies moyennes, rouges, bombées, Lisses, crémeuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E2	Mac Conkey	Petites colonies blanchâtres, demi bombées crémeuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E3	Hectoen	Petites colonies saumons à centre noir, lisses, demi bombées, crémeuses et à contours réguliers	Bacilles à Gram négatif
S2	E4	Mac Conkey	Colonies blanchâtres, lisses, crémeuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
S4	E5	SS	Colonies moyennes, incolores, brillantes, bombées lisses, et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E6	Hectoen	Petites colonies vertes, crémeuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E7	SS	Petites colonies noires, demi bombées, crémeuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E8	Hectoen	Colonies moyennes, incolores, bombées et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	E9	Hectoen	Colonies moyennes, incolores, bombées et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif

SS : gélose *Salmonella-Shigella*

- **Enzymes respiratoires**

Les résultats des tests catalase, oxydase, et nitrate réductase des entérobactéries isolées sont mentionnés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Enzymes respiratoires des entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Code de la souche	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
<b>E1</b>	+	-	+
<b>E2</b>	+	-	+
<b>E3</b>	+	-	+
<b>E4</b>	+	-	+
<b>E5</b>	+	-	+
<b>E6</b>	+	-	+
<b>E7</b>	+	-	+
<b>E8</b>	+	-	+
<b>E9</b>	+	-	+

(+) : test positif, (-) : test négatif.

- **Identification biochimique**

Les souches E5, E6, E8 et E9 ont été identifiées par la galerie biochimique classique, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7.

Les souches E1, E2, E3, E4 et E7 ont été identifiées par la galerie API 20 E, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.

**Tableau 7 :** Tests biochimiques classiques de certaines entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Test Souche	TSI					Citrates de Simmons	Mannitol mobilité		Urée - indole			Clark et Lubs		ONPG
	H <sub>2</sub> S	GAZ	GLU	LAC	SAC		mannitol	mobilité	urée	indole	TDA	VP	RM	
<b>E5</b>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>E6</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>E8</b>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
<b>E9</b>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-

(+) : test positif, (-) : test négatif.

**Tableau 8:** Profil biochimique sur l'API 20 E de certaines entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Code de la souche	Profil Biochimique																				Code de l'API	Degré de parenté (%)
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA		
<b>E1</b>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	5044572	95
<b>E2</b>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	7646772	95
<b>E3</b>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	5044572	99.9
<b>E4</b>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7354773	99
<b>E7</b>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	5734542	97.6

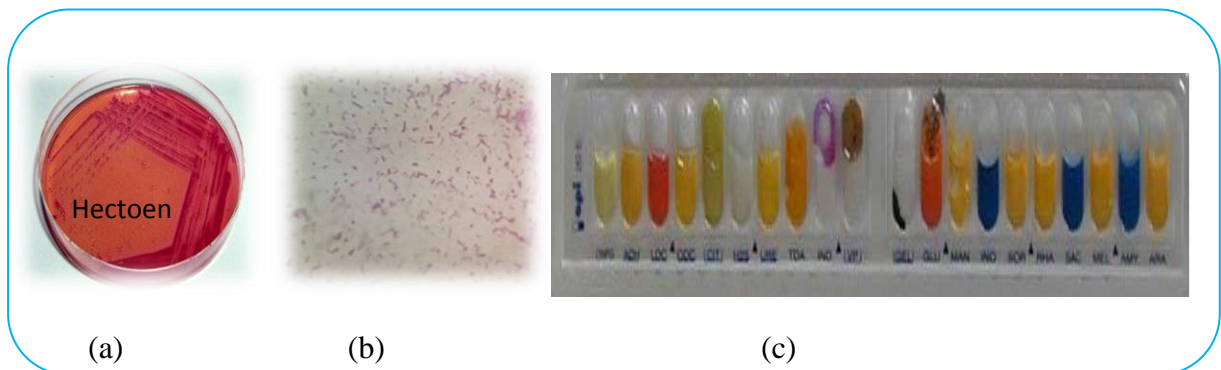
(+) : test positif, (-) : test négatif.

- ❖ D'après les résultats d'identification, les espèces d'entérobactéries isolées à partir des oueds étudiés sont les suivantes (Tableau 9) :

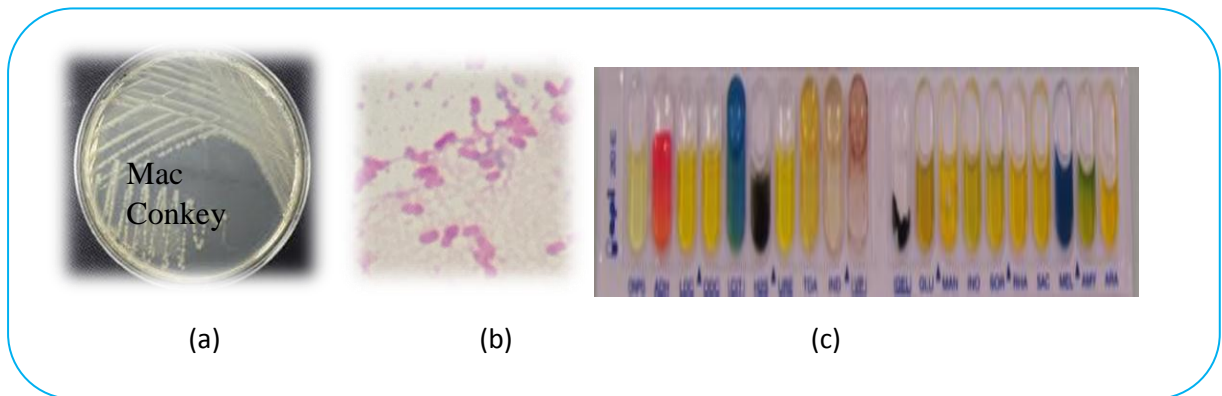
**Tableau 9 :** Entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Station	Code de la souche	Espèce identifiée
S1	E1	<i>Escherichia coli</i>
	E2	<i>Citrobacter freundii</i>
	E3	<i>Citrobacter freundii</i>
S2	E4	<i>Raoutella ornithinolytica</i>
S4	E5	<i>Shigella</i> spp.
	E6	<i>Shigella</i> spp.
	E7	<i>Salmonella typhimurium</i>
	E8	<i>Proteus vulgaris</i>
	E9	<i>Proteus vulgaris</i>

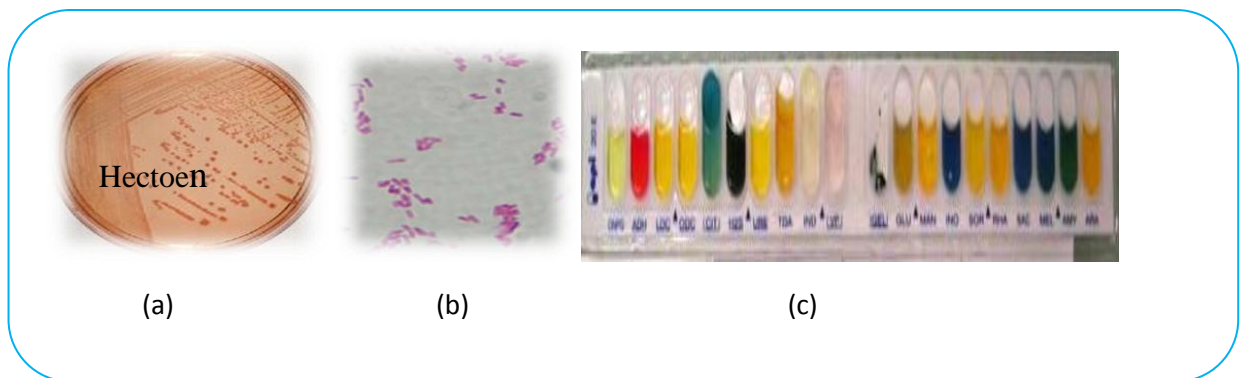
- ❖ Les aspects macroscopiques, microscopiques et les caractères biochimiques de certaines entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma sont illustrés par les planches 1 à 7.



**Planche 1 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique d'*Escherichia coli* (E1) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.



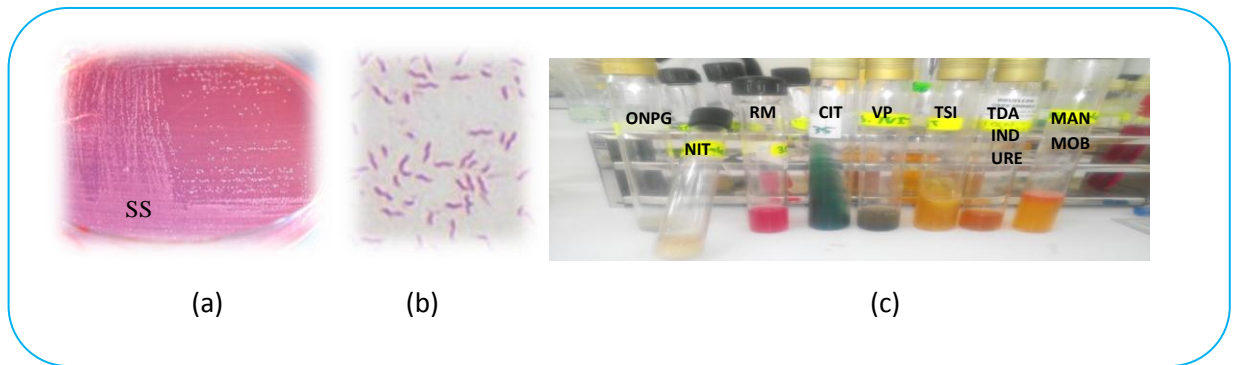
**Planche 2 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Citrobacter freundii* (E2) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.



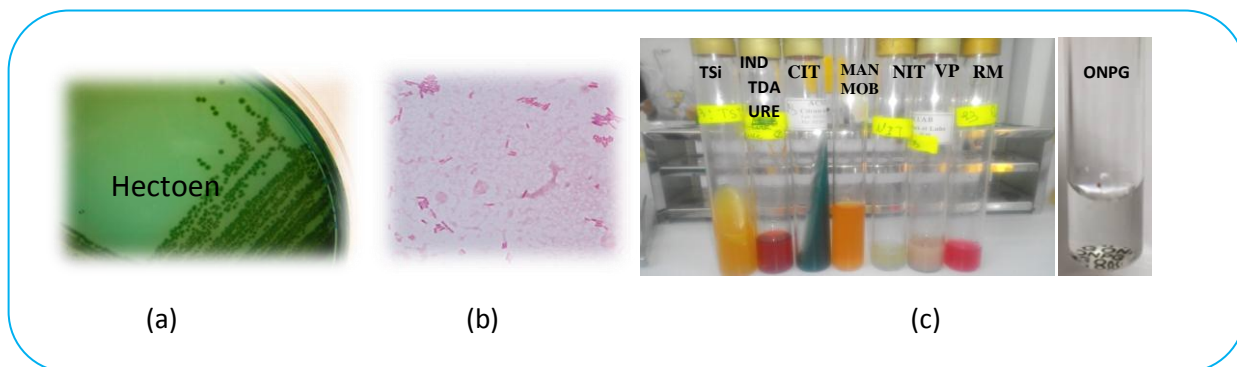
**Planche 3 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Citrobacter freundii* (E3) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.



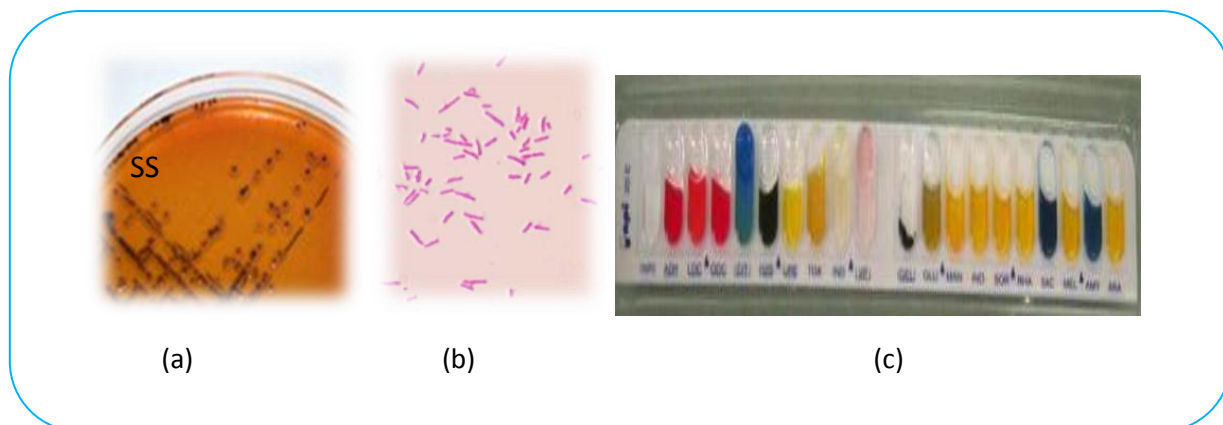
**Planche 4 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Raoutella ornithinolytica* (E4) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E.



**Planche 5 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Shigella* spp. (E5) et (c) ses caractères biochimiques obtenus par galerie classique.



**Planche 6 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Shigella* spp. (E6) et (c) ces Caractères biochimiques obtenus par galerie classique.



**Planche 7 :** (a) Aspect macroscopique et (b) microscopique de *Salmonella typhimurium* (E7) et (c) ses caractères biochimiques sur l'API 20E

### I.2.1.2. Autres bacilles à Gram négatif

L'isolement de certaines souches bactériennes sur les géloses : Mac Conkey, GN, GN à pH alcalin et Cétrimide, nous a permis d'identifier 4 espèces bactériennes bâtonnets à Gram négatif et qui n'appartiennent pas aux entérobactéries:

*Pasteurella trehalosi* (NE1), *Aeromonas hydrophila* (NE2), *Chryseobacterium indologenes* (NE3), et *Acinetobacter baumannii* (NE4).

- **Aspects macroscopiques et microscopiques**

Le tableau 10 représente l'aspect macroscopique et microscopique des espèces bactériennes bâtonnets à Gram négatif non entérobactéries.

**Tableau 10 :** Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Station	Code de la souche	Milieu de culture	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1	NE1	Mac Conkey	Colonies incolores brillantes, moyennes, demi bombées et à contours réguliers	Coccobacilles à Gram négatif
	NE2	GN	Colonies translucides et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif
	NE3	Cétrimide	Colonies lisses, faiblement convexes, pigmentées en jaune.	Bacilles à Gram négatif
S4	NE4	GN à pH alcalin	Colonies convexes, lisses, translucides ou légèrement opaques, muqueuses et à contours réguliers.	Bacilles à Gram négatif

- **Enzymes respiratoires**

Les résultats des tests catalase, oxydase, et nitrate réductase des bacilles à Gram négatif (non entérobactéries) isolés sont mentionnés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Enzymes respiratoires des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Station	Code de la souche	oxydase	Catalase	Nitrate réductase
S1	NE1	+	+	+
	NE2	+	+	+
	NE3	+	+	+
S4	NE4	-	+	-

(+) : test positif, (-) : test négatif.





- **Identification biochimique**

L'identification des souches NE1 et NE3 a été réalisée par l'API 20 NE (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) et les résultats obtenus montrent que ces souches se rapprochent respectivement à l'espèce *Pasteurella trehalosi*, avec un degré de parenté de 85 % et à l'espèce *Chryseobacterium indologenes* avec un degré de parenté de 95.7 % (Tableau 12).

Les souches NE2 et NE4 ont été identifiées par l'API 20 E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) et les résultats obtenus montrent que ces souches se rapprochent respectivement à l'espèce *Aeromonas hydrophila*, avec un degré de parenté de 86 % et à l'espèce *Acinetobacter baumannii* avec un degré de parenté de 70 % (Tableau 12).



**Tableau 12 :** Profil biochimique des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux Entérobactéries isolés à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

Code de la souche	Système API	Profil biochimique	Code de l'API	Degré de parenté (%)
NE1	API 20 NE		1020004	85
NE2	API 20 E		3267127	86
NE3	API 20 NE		6630004	95.7
NE4	API 20 E		0204042	70

### I.2.2. Bacilles à Gram positif

L'étude des caractères culturels et biochimiques de certaines souches bactériennes qui ont été poussées sur les milieux gélosés utilisés, nous a permis d'identifier et de conserver 9 bacilles à Gram positif pour lesquelles nous avons utilisés les codes suivants : B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 et B9.

- **Aspects macroscopiques et microscopiques**

Les aspects macroscopiques et microscopiques des bacilles à Gram positif isolés sont représentés dans le tableau 13.

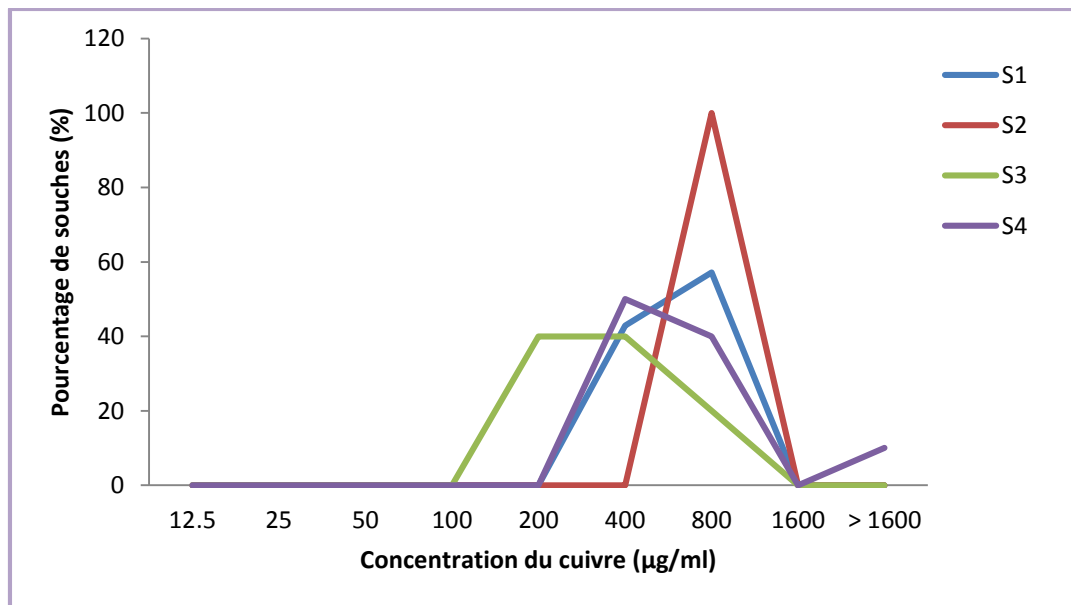
### I.3. Métallo-résistance bactérienne

#### I.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les valeurs des CMI du cuivre obtenues se situent entre 200 et  $>1600$   $\mu\text{g/ml}$  pour la totalité des souches bactériennes étudiées (Figure 13).

La CMI du cuivre la plus élevée ( $>1600$   $\mu\text{g/ml}$ ) est enregistrée avec une bactérie isolée de la station 4, par ailleurs, la CMI la plus faible (200  $\mu\text{g/ml}$ ) est enregistré avec 40 % des souches bactériennes de la station 3.

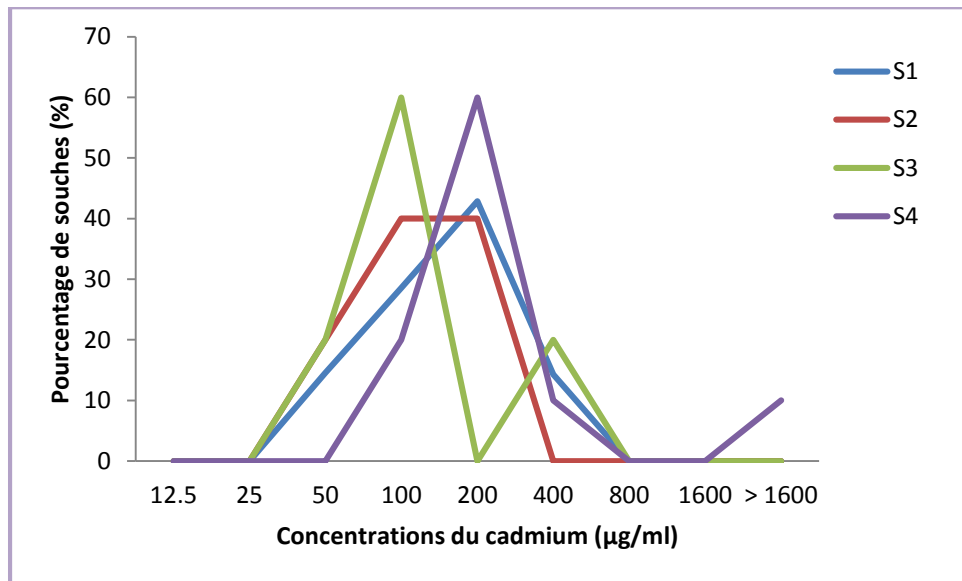
La CMI du cuivre la plus remarquable est égale à 800  $\mu\text{g/ml}$  vis-à-vis de toutes les bactéries (100%) de la station 2, suivi par 57.14 % des bactéries de la station 1 et 40 % des bactéries de la station 4 (Figure 13).



**Figure 13:** Distribution des CMI du cuivre pour toutes les bactéries isolées à partir des quatre stations de prélèvement.

En ce qui concerne le cadmium, les valeurs des CMI obtenues varient d'une station à une autre, elles sont de 50 à 400  $\mu\text{g/ml}$  pour les bactéries de la station 1 avec une dominance de la CMI qui égale à 200  $\mu\text{g/ml}$  (42.85 % des bactéries), de 50 à 200  $\mu\text{g/ml}$  pour les bactéries de la station 2 et de 50 à 400  $\mu\text{g/ml}$  pour les bactéries de la station 3 avec une dominance de la CMI qui égale à 100  $\mu\text{g/ml}$  (42.85 % des bactéries) (Figure 14).

Les souches de la station 4 sont plus résistantes au cadmium par rapport aux autres stations avec des CMI allant de 100 à >1600  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 14).



**Figure 14:** Distribution des CMI du cadmium pour toutes les bactéries isolées à partir des quatre stations de prélèvement.

- **Entérobactéries**

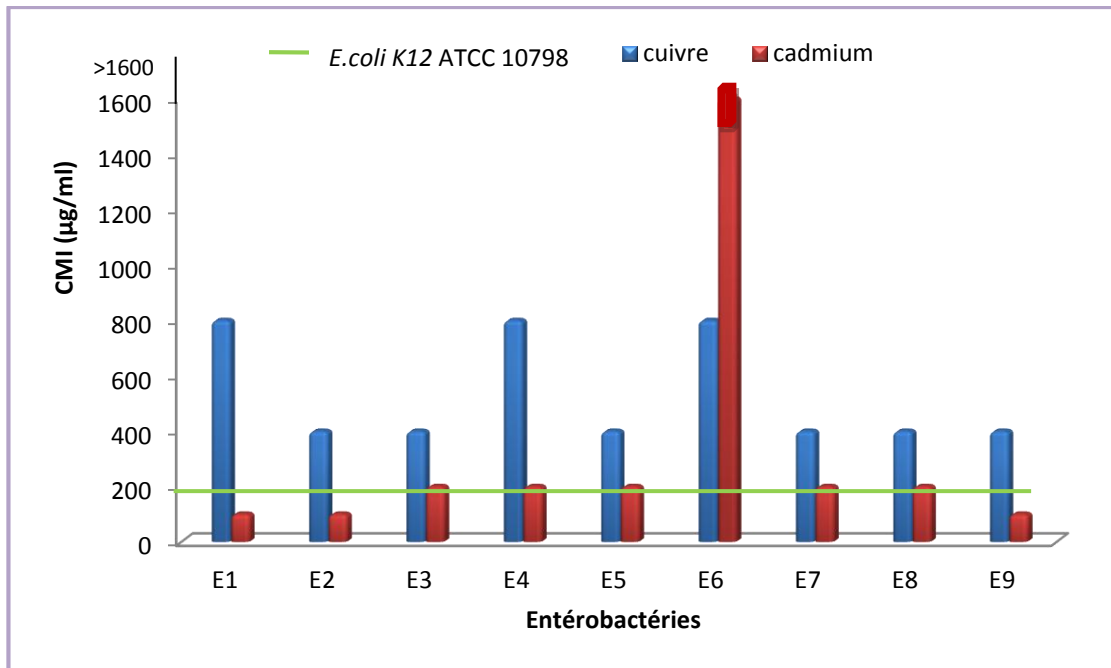
Les CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des entérobactéries étudiées (33.33 % des bactéries isolées) se trouvent représentées sur l'histogramme ci-après (Figure 15).

Sur l'ensemble des entérobactéries étudiées, une concentration de 400  $\mu\text{g/ml}$  du cuivre est efficace contre 66.67 % des souches, par ailleurs, une concentration de 800  $\mu\text{g/ml}$  du cuivre est efficace sur 33.33 % des souches. Ce sont les espèces : *Escherichia coli* (E1 : isolée de la station 1), *Raoutella ornithinolytica* (E4 : isolée de la station 2) et *Shigella* spp. (E6 : isolée de la station 4) qui sont les plus résistantes au cuivre (Figure 15).

Le cadmium semble être plus actif sur les entérobactéries isolées (Figure 15), une concentration de 100 et de 200  $\mu\text{g/ml}$  est efficace contre 33.33 % et 55.55 % des entérobactéries étudiées respectivement.

L'espèce *Shigella* spp. (E6 : isolée de la station 4) semble être la plus résistante au cadmium (CMI > 1600  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figure 15).

En comparant les valeurs des CMI du cuivre pour les entérobactéries étudiées et celles de la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 (Figure 15), nous pouvons constater que toutes les entérobactéries étudiées (100 %) sont considérées comme des souches résistantes au cuivre, en revanche, 11.11 % des entérobactéries étudiées sont résistantes au cadmium.



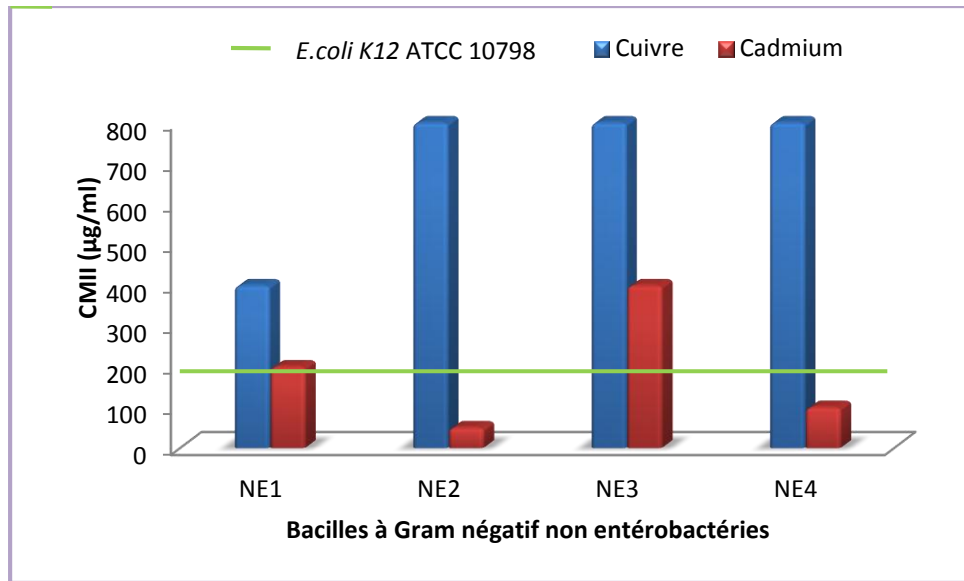
**Figure 15:** Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des entérobactéries étudiées.

- **Bacilles à Gram négatif non entérobactéries**

La figure 16 représente les valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries (14.81 % des bactéries isolées)

Le cuivre est actif sur la majorité des bacilles à Gram (-) à partir de 800 µg/ml ce qui montre que ces bactéries sont résistantes à ce métal rappelant que la CMI du cuivre pour la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 est égale à 200 µg/ml (Figure 16).

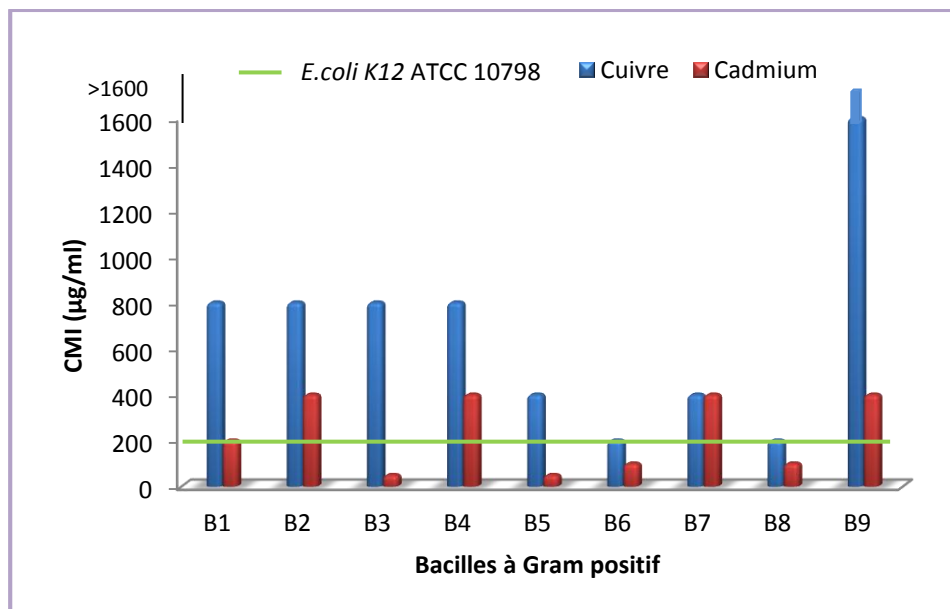
Une CMI du cadmium égale à 400 µg/ml est observée vis-à-vis d'une souche de *Chryseobacterium indologenes* (NE3 : isolée de la station 1) ce qui nous a permis de la classer comme une souche résistante au cadmium (CMI NE3 > CMI *Escherichia coli* K12 ATCC 10798) (Figure 16).



**Figure 16:** Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bacilles à Gram négatif non entérobactéries étudiées.

- **Bacilles à Gram positif**

Les CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des Bacilles à Gram positif étudiés (33.33 % des bactéries isolées) se trouvent représentées sur l’histogramme ci-dessous (Figure 17).



**Figure 17:** Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bacilles à Gram positif étudiés.

La majorité des bacilles à Gram positif (7/9) est résistante au cuivre (CMI comprise entre : 400 et > 1600 µg/ml) (Figure 17).

Il est très important de mentionner la résistance de l'espèce *Bacillus macerans* (B9 : isolée de la station 4) qui a la capacité de se développer à une concentration de 1600 µg/ml du cuivre.

Dans l'ensemble des bacilles à Gram positif étudiés, une concentration de 400 µg/ml du cadmium est efficace sur 44.44 % des souches, par ailleurs, des concentrations de 200, 100 et 50 µg/ml du cadmium sont efficaces sur 11.11 % et 22.22 % des souches respectivement. Ce sont les espèces : *Bacillus carotarum* (B1 : isolée de la station 2), *Bacillus sphaericus* (B4 : isolée de la station 2), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (B7 : isolée de la station 3) et *Bacillus macerans* (B9 : isolée de la station 4) qui sont les souches résistantes au cadmium (Figure 17).

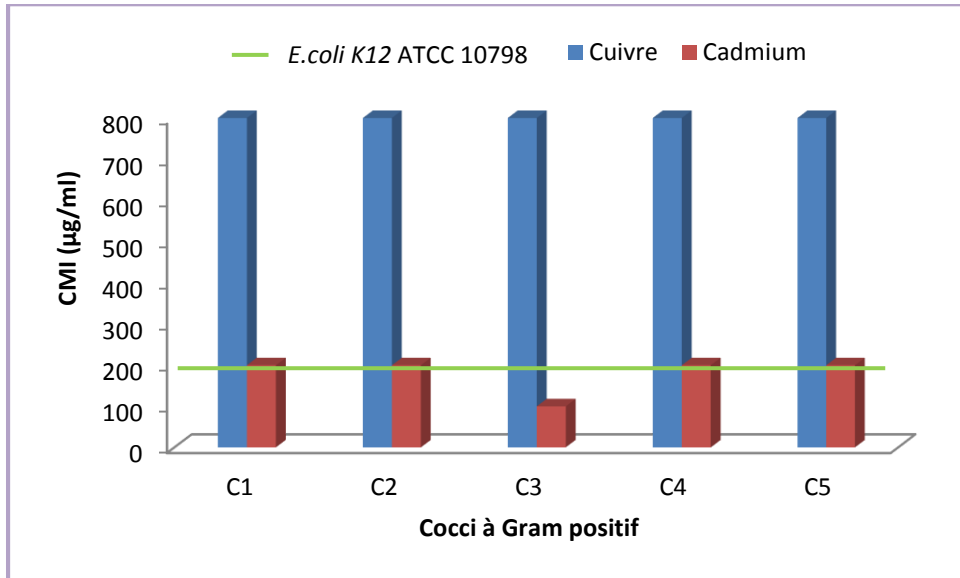
- **Cocci à Gram positif**

Les CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des cocci à Gram positif étudiés se trouvent représentées par la figure 18.

Le cuivre n'a pas un effet sur les cocci isolés qu'à partir d'une concentration égale à 800 µg/ml, donc, nous pouvons constater que toutes les souches étudiées sont résistantes au cuivre (leurs CMI > CMI *Escherichia coli* K12 ATCC 10798) (Figure 18).

Le cadmium est actif sur l'espèce *Aerococcus viridans* (C1 : isolée de la station 1) à partir de 100 µg/ml et sur les autres espèces (C2-C5) à partir de 200 µg/ml.

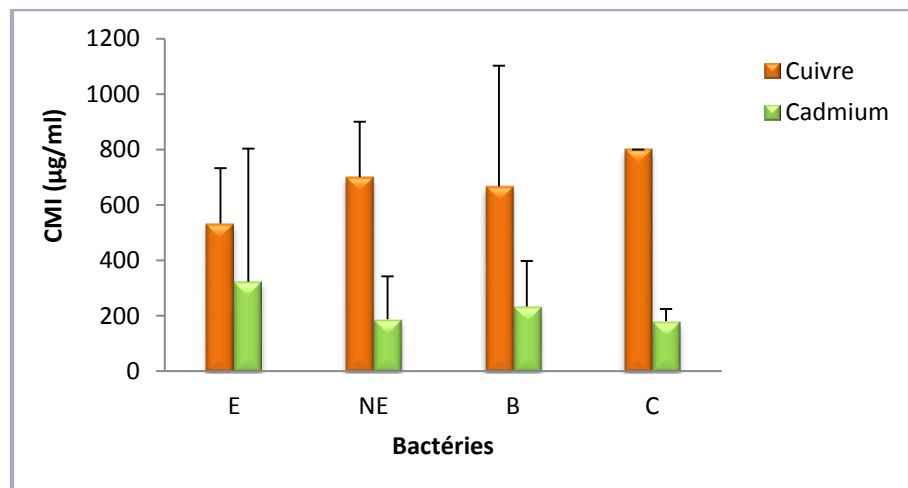
Ces résultats permettent de constater qu'aucune souche cocci à Gram positif n'est résistante au cadmium (CMI Cocci < CMI *Escherichia coli* K12 ATCC 10798) (Figure 18).



**Figure 18:** Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des cocci à Gram positif étudiés.

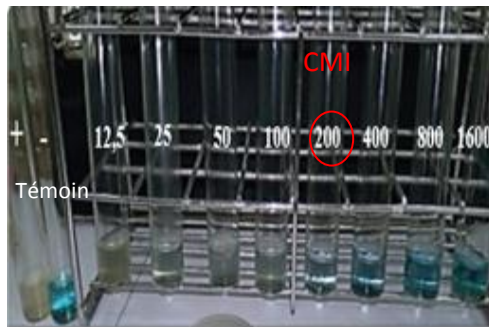
- ❖ En générale, nous pouvons conclure que 92.59 % et 22.22 % des souches isolées sont résistantes au cuivre et au cadmium respectivement.

En comparant les groupes bactériens isolés (Figure 19), nous constatons que les cocci à Gram positif sont les plus résistantes au cuivre suivi par les bacilles à Gram négatif. En revanche, ce sont les entérobactéries suivi par les bacilles à Gram positif qui sont les plus résistants au cadmium.

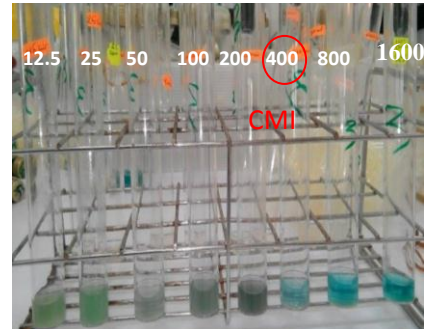


**Figure 19:** Valeurs des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis de tous les groupes bactériens étudiés. E : entérobactéries ; NE : bacilles à Gram négatif non entérobactéries ; B : bacilles à Gram positif ; C : cocci à Gram positif.

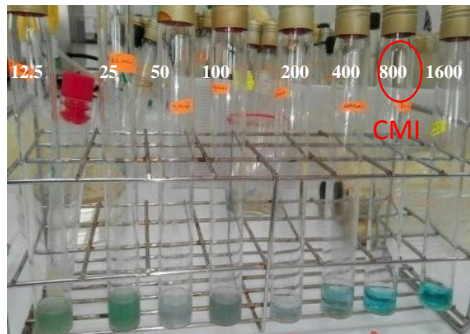
- ❖ Les planches 13 et 14 illustrent les CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis de la souche de référence et de certaines souches bactériennes étudiées.



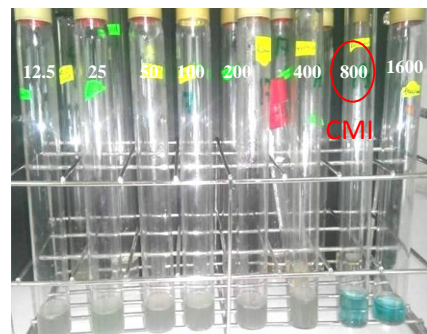
*Escherichia coli* K12 ATCC 10798



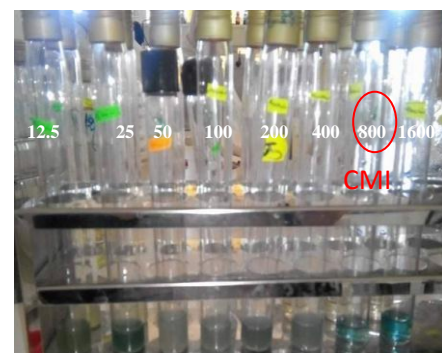
*Escherichia coli* (E1)



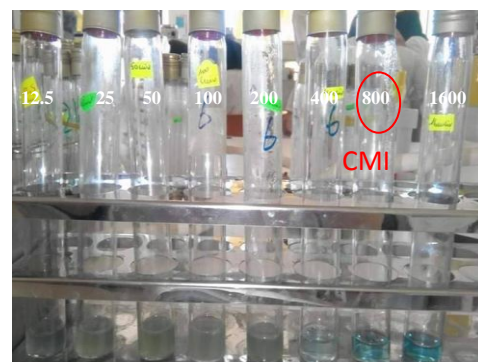
*Raoutella ornithinolytica* (E4)



*Bacillus sphaericus* (B4)



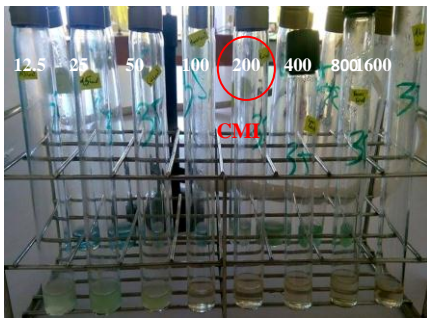
*Aerococcus viridans*1(C1)



*Chryseobacterium indologenes* (NE3)

**Planche 13:** Détermination de CMI du cuivre vis-à-vis de la souche de référence et de certaines souches bactériennes isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

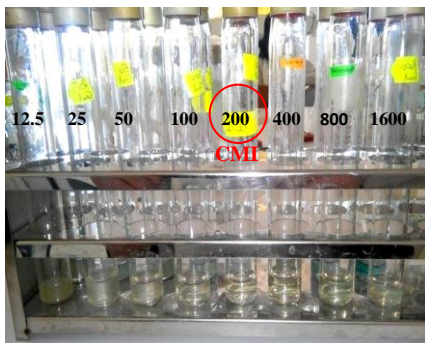




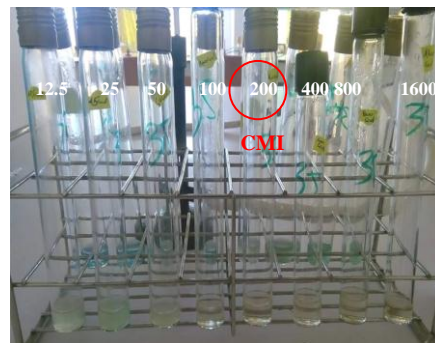
*Escherichia coli* K12 ATCC 10798



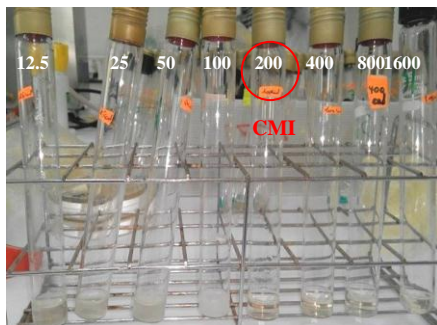
*Aeromonas hydrophila* (NE2)



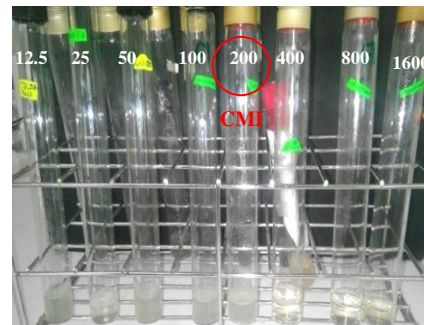
*Salmonella typhimurium* (E7)



*Enterococcus faecium* (C5)



*Staphylococcus xylosus* (C4)



*Bacillus sphaericus* (B4)

**Planche 14 :** Détermination de CMI du cadmium vis-à-vis de la souche de référence et de certaines souches bactériennes isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma.

**I.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)**

En milieu solide, les CMB du cuivre et du cadmium enregistrées avec les bactéries isolées vont de 400 à >1600 µg/ml, tandis que, les CMB du cadmium vont de 50 à >1600 µg/ml (Tableau 23).

En ce qui concerne le cuivre, une concentration de 400 µg/ml est suffisante pour réduire le nombre de survivants de la population de 11.11 % des bactéries étudiées à au moins de  $10^{-4}$  bactéries/ml. En revanche, la CMB du cuivre vis-à-vis de 40.74 % et 44.44 % des bactéries étudiées est égale à 800 et 1600 µg/ml respectivement.

Nous avons noté que la CMB du cuivre vis-à-vis de la souche *Bacillus macerans* (B9) est supérieure à 1600 µg/ml (Tableau 23).

Pour le cadmium, la CMB la plus faible (50 µg/ml) est enregistrée pour la souche *Aeromonas hydrophila* (NE2), par contre, la CMB la plus élevée (> 1600 µg/ml) est enregistrée pour la souche *Shigella* spp. (E6) (Tableau 23).

**Tableau 23:** Valeurs des CMB du cuivre et du cadmium (µg/ml) vis-à-vis des souches bactériennes étudiées.

Entérobactéries										
Souche	K12	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
CMB cuivre		800	800	400	1600	1600	800	1600	800	400
CMB cadmium		200	1600	1600	400	400	>1600	400	200	800
Bacilles à Gram négatif non entérobactéries										
Souche	NE 1		NE2		NE3		NE4			
CMB cuivre	800		800		1600		1600			
CMB cadmium	400		50		800		400			
Bacilles à Gram positif										
Souche	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	
CMB cuivre	1600	800	1600	1600	800	800	1600	400	>1600	
CMB cadmium	400	800	400	400	1600	200	800	1600	800	
Cocci à Gram positif										
Souche	C1		C2		C3		C4		C5	
CMB cuivre	800		1600		1600		1600		800	
CMB cadmium	800		400		200		1600		200	

K12:*Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

### I.3.3. Détermination du rapport CMB/CMI

Dans le but de vérifier si les activités antibactériennes observées étaient bactéricides ou bactériostatiques, nous avons calculé le rapport CMB/ CMI.

Le récapitulatif de ces différentes activités pour le cuivre et le cadmium se trouve consigné dans les tableaux 24 - 25

**Tableau 24 :** Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cuivre.

Souche bactérienne	Gram	CMB/CMI (moyenne±ecartype)	Effet
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	-	2±00	Bactéricide
<i>Citrobacterfreundii</i>	-	1.5±0.7	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	-	1±00	Bactéricide
<i>Raoutella ornithinolytica</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Shigella</i> spp.	-	2.5±2.1	Bactériostatique
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	4±00	Bactériostatique
<i>Proteus vulgaris</i>	-	1.5±0.7	Bactéricide
<i>Pasteurella trehalosi</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	1±00	Bactéricide
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus carotarum</i>	+	1.5±0.7	Bactéricide
<i>Bacillus lentus</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus sphaericus</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus pasteurii</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	4±00	Bactériostatique
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+	4±00	Bactériostatique
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus macerans</i>	+	<1±00	Bactéricide
<i>Aerococcus viridans 1</i>	+	1±00	Bactéricide
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Enterococcus faecium</i>	+	1±00	Bactéricide

**Tableau 25:** Récapitulatif des activités antibactériennes observées avec le cadmium.

<b>Souche bactérienne</b>	<b>Gram</b>	<b>CMB/CMI (moyenne±ecartype)</b>	<b>Effet</b>
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	-	2±00	Bactéricide
<i>Citrobacterfreundii</i>	-	9±9.8	Bactériostatique
<i>Escherichia coli</i>	-	8±00	Bactériostatique
<i>Raoutellaornithinolytica</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Shigella</i> spp	-	<1.5±0.7	Bactéricide
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Proteus vulgaris</i>	-	4.5±4.9	Bactériostatique
<i>Pasteurella trehalosi</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	1±00	Bactéricide
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	2±00	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	4±00	bactériostatique
<i>Bacillus carotarum</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Bacillus lentus</i>	+	8±00	Bactériostatique
<i>Bacillus sphaericus</i>	+	1±00	Bactéricide
<i>Bacillus pasteurii</i>	+	32±00	Bactériostatique (souche tolérante)
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Corynebacteriumdiphtheriae</i>	+	16±00	Bactériostatique
<i>Bacillus macerans</i>	+	2±00	Bactéricide
<i>Aerococcus viridans</i> 1	+	4±00	Bactériostatique
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	4±3.4	Bactériostatique
<i>Enterococcus faecium</i>	+	1±00	Bactéricide

## II. Discussion

### II.1. Paramètres physicochimiques

La température de l'eau varie en fonction de la température extérieure de l'air, de la saison, de la nature géologique et de la profondeur d'eau par rapport au sol (Rodier *et al.*, 2005).

Nos résultats montrent que la moyenne de la température des eaux des quatre stations est égale à 7°C ; Par conséquent, les eaux étudiées sensibles aux variations extérieures du degré thermique (la période hivernale est caractérisée par des basses températures) en raison de leurs faibles profondeurs et au degré d'exposition au soleil (toutes les stations sont riches en végétations avec présence d'arbres sur les rives).

Les valeurs du pH dans les quatre stations varient entre 7.8 et 8.7 ; le pH d'eau proche à l'alcalinité ou légèrement alcalin dépend généralement de la nature géologique des cours d'eau et au système carbonate (Rodier *et al.*, 2005), ce qui nous mènerons à conclure donc que les terrains des oueds étudiés sont de nature calcaire

La concentration d'oxygène dissous varie de manière journalière et saisonnière et elle dépend de plusieurs facteurs comme : la température, la vitesse du courant d'eau, le niveau d'eau (Rodier *et al.*, 2005).

Les quatre stations semble être bien oxygéné ; cette oxygénation est due probablement aux agitations mécaniques provoquées par les vents et les basses températures (Antoine et Bowker, 1996). La meilleure oxygénation enregistrée dans la station 3 pourrait s'expliquer par le débit élevé du cours d'eau.

Les stations 2 et 4 présentent une salinité élevée par rapport aux autres stations (0.6 PSU) ceci est lié probablement aux rejets de l'usine de production de tomate conserve et de l'usine de transformation de marbre respectivement.

La variation du potentiel d'oxydoréduction dans les eaux de surfaces étudiées est liée aux effets de pluies pendant la saison hivernale.

Les stations 1, 2 et 3 ; montrent un potentiel redox élevé, cela est dû à une bonne oxygénation. En revanche, la station 4 a un potentiel redox faible par rapport aux autres indiquant la présence d'un rejet organique (urbain, industriel) qui diminue l'oxygénation de l'eau.

Donc les trois premières stations dévoilent un caractère plus oxydant par rapport à la dernière qui révèle un caractère plus réduit.

Les stations 2 et 4 présentent une salinité élevée par rapport aux autres stations (0.6 PSU) ceci est lié probablement aux rejets de l'usine de production de tomate conserve et de l'usine de transformation de marbre respectivement

Les valeurs maximales de la conductivité sont enregistrées dans les stations 2 et 4 (1534  $\mu\text{s/cm}$  et 1552  $\mu\text{s/cm}$  respectivement). Cette augmentation est probablement favorisée par l'accélération du processus bactérien de la minéralisation de la matière organique (Silva et Sacomani, 2001), et par les apports des industries situées proches de ces deux stations.

Généralement, des résultats comparables à nos résultats ont été déjà signalés par Draredja (1992), Bou Saabeet *al.* (2007) et Guettaf (2015).

## II.2. Identification des bactéries aquicoles

Quatre groupes bactériens ont été identifiés : 33.33 % des entérobactéries, 33.33 % des bacilles à Gram positif, 18.51 % des cocci à Gram positif et 14.81 % des bacilles à Gram négatif non entérobactéries.

La majorité des entérobactéries sont isolées des stations 1 et 4. Ces stations sont à proximité des terres agricoles et des agglomérations, rappelant que les entérobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et l'animal soit à l'état pathogène ou commensal (Schaechter *et al.*, 1999).

Les entérobactéries isolées sont représentées par 2 souches de *Citrobacter freundii*, souches de 2 *Proteus vulgaris*, 2 souches de *Shigella* spp., une *Salmonella typhimurium*, une *Escherichia coli* et une *Raoutella ornithinolytica*. Toutes ces souches sont des pathogènes opportunistes impliquées dans différentes infections humaines et animales (Brisse et Duijkeren, 2005 ; Kao *et al.*, 2010).

La détection de certains bacilles à Gram négatif n'appartenant pas aux entérobactéries dans les stations 3 et 4 pourrait s'expliquer par leur caractère ubiquitaire :

les espèces *Aeromonas hydrophila* et *Chryseobacterium indolegenes* sont présent dans les eaux douces, saumâtres et les eaux usées domestiques (Jawetz *et al.*, 1973).

*Pasteurella* est une bactérie commensale de nombreuses espèces de vertébrés, en particulier chat, chien mais aussi d'autres mammifères (Gourgand, 2005).

L'espèce *Acinetobacter baumannii* se retrouve dans de nombreux milieux naturels (le sol, les eaux, les végétaux...). Elle fait partie de la flore cutanée normale de l'homme et des animaux mais elle est également isolée des flores buccale, rhino-pharyngée et fécale (Bergogne-Bérézin, 2008)

Actuellement, cette espèce constitue un grand problème de santé publique, elle est responsable d'infections nosocomiales, surtout chez les patients affaiblis (immunodépression) et elle se caractérise par sa résistance multiple aux antibiotiques (Es-said, 2015).

Les bacilles à Gram positif isolés sont représentés majoritairement par le genre *Bacillus* ; Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature (leur habitat principal est le sol) Certaines espèces isolées des eaux étudiées sont des pathogènes des insectes nuisibles en agriculture (Quinn *et al.*, 2011).

La présence de l'espèce *Erysipelothrix rhusiopathiae* (agent du rouget) dans la station 3 pourrait s'expliquer par la contamination de l'oued Boussora par les urines et les matières fécales des ruminants (élevage intensive dans la région) et surtout du porc, qui constituent leurs réservoirs principaux (Hunter, 2006).

*Corynebacterium diphtheriae* est une bactérie toxigène, elle se multiplie au niveau du rhinopharynx où elle excrète une exotoxine. Cette dernière, avec son action localisée au rhinopharynx, entraîne une angine diphtérique (Flandrois, 1997). Cette bactérie résiste dans le milieu extérieur ce qui explique son isolement de la station 3.

Cinq Cocci à Gram positif ont été isolées appartenant à trois genres : *Staphylococcus*, *Aerococcus* et *Enterococcus*.

Les staphylocoques sont de bactéries ubiquitaires commensales fréquentent aussi les humains et les animaux sur la peau et les muqueuses. *Aerococcus viridans* 1 et *Enterococcus faecium* sont parmi la flore intestinale de l'homme et l'animal (Flandrois, 1997).

### II.3. Métabolisme bactérienne

Les résultats de la détermination des CMI du cuivre et du cadmium vis-à-vis des bactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma montrent que 92.59 % des souches bactériennes sont résistantes au cuivre. En revanche, 22.22 % des souches sont résistantes au cadmium.

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature scientifique qui cite l'efficacité intrinsèque du cadmium pour détruire rapidement plusieurs types de bactéries pathogènes dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., et *Staphylococcus aureus* (Harrison *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montré que le cadmium est un métal toxique pour les microorganismes en provoquant divers effets nuisibles tels que l'altération du matériel génétique (Rathnayake *et al.*, 2009) et l'inhibition des enzymes respiratoires (Nweke *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la forte capacité bactérienne de résistance au cuivre pourrait s'expliquer par le fait que les microorganismes (en excluant les virus), Borkow et Gabbay (2004) ont développé des systèmes complexes pour maintenir des taux précis d'ions cuivre au niveau intracellulaire. En plus de pompes ioniques à flux entrant/sortant spécifiques, d'autres mécanismes de tolérance existent comme :

- une barrière perméable,
- la séquestration intra-extracellulaire,
- la détoxification enzymatique,
- la réduction de sensibilité aux ions cuivre de ses cibles (O'Gorman et Humphreys, 2012).

L'étude de la métabolisme des entérobactéries isolées montre que les souches *Escherichia coli* (E1 : isolée de la station 1), *Raoutella ornithinolytica* (E4 : isolée de la station 2) et *Shigella* spp. (E6 : isolée de la station 4) sont les plus résistantes au cuivre (CMI = 800 µg/ml). L'espèce *Shigella* spp. (E6 : isolée de la station 4) semble être la plus résistante au cadmium (CMI > 1600 µg/ml). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que ces souches possèdent des mécanismes de résistance aux métaux testés. Plusieurs études ont montré la résistance des entérobactéries au cuivre et au cadmium mais avec des CMI beaucoup plus inférieures que celles enregistrées dans la présente étude ; Karbasizaed *et al.* (2003) ont isolés des souches d'entérobactéries nosocomiales et de fèces humains qui ont produit des CMI de 200 µg/ml pour le cadmium. Piotrowska-Segeta *et al.* (2005) ont isolés, à partir de sols



pollués par des métaux lourds, deux souches d'entérobactéries, *Serratia fonticola* et *Providencia stuartii*. Ces souches présentèrent une CMI au cadmium de 0,1mM. [Espirito Santo et al. \(2008\)](#) ont montré que  $2 \times 10^7$  d'*E.coli* peut résister entre 75 et 90 minutes en contact du cuivre.

Parmi les bacilles à Gram négatif non entérobactérie, nous avons remarqué que l'espèce *Chryseobacterium indologenes* est la souche unique résistante au cadmium, ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette espèce bactérienne possède des plasmides de résistance aux métaux lourds (protéine CzcA) ([Eberlin et Tavares, 2007](#)); il faut signaler également que *Chryseobacterium indologenes* est multi-résistance à autres agents antibactériens tels que les antibiotiques ([Lin et al., 2010](#)).

Dans l'ensemble des bacilles à Gram positif étudiés, les espèces du genre *Bacillus* sont les plus résistantes aux métaux testés. Ce genre est sporogène ce qui lui confère une adaptation aux environnements hostiles ([Guiraud, 2003](#)).

Les cocci à Gram positif sont résistantes au cuivre, par contre, le cadmium semble être toxique vis-à-vis de ce groupe bactérien. En revanche, [Noyce et Keevil \(2006\)](#) ont montré une grande tolérance de l'effet antibactérien du cuivre des staphylocoques résistants à la méthicilline.

En générale, nous avons constaté que les cocci à Gram positif sont les plus résistantes au cuivre suivi par les bacilles à Gram négatif. En revanche, ce sont les entérobactéries suivi par les bacilles à Gram positif qui sont les plus résistants au cadmium. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette variabilité : la taille du microorganisme, sa composition chimique, son activité physiologique à les quelles s'ajoute les conditions de culture. Par ailleurs, l'importance de la composition chimique des enveloppes cellulaires a été mise en évidence par une étude comparative de la fixation de 15 métaux par des parois extraites à partir d'*Escherichia coli*, et de *Bacillus subtilis*. Les résultats révélaient une fixation approximativement dix fois supérieure avec les parois de *Bacillus subtilis* ([Bauda, 1986](#)).

En comparant les stations d'échantillonnage, le plus grand nombre de souches résistantes au cuivre est enregistré dans les stations S1 et S2. Par contre ce sont les eaux des stations S4 et S3 qui hébergent les bactéries les plus résistantes au cadmium.

Ces résultats pourraient s'expliquer probablement par la pollution des stations citées ci-dessus par le cuivre et/ou le cadmium (à cause des activités anthropiques : agricultures, industries, eaux usées) rappelant que la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes comme le cadmium peut entraîner en cas de pollution des écosystèmes des modifications structurales et fonctionnelles des communautés présentes. Ces modifications résultent de la mise en place de mécanismes d'adaptation intervenant soit à l'échelle des cellules (expression de gènes, activité enzymatique,...) soit à l'échelle des populations (transferts de gènes) (Karbasizaed *et al.*, 2003).

La détermination du rapport CMB/CMI a montré que l'action du cuivre sur les bactéries testées est bactéricide exceptées les souches *Shigella* spp., *Salmonella typhimurium*, *Bacillus licheniformis* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Le cadmium est bactéricide vis-à-vis de la majorité des souches bactériennes isolées (plus de 59 %).

Le mode d'action proprement dit du cuivre et du cadmium sur les microorganismes est encore discuté. Certaines études avancent que l'ADN est la cible principale de la toxicité de ces métaux, ce qui mène à une fragmentation rapide de l'ADN et à la mort cellulaire (Grass *et al.*, 2011).

# Conclusion et Perspectives

## Conclusion

Les eaux de surface du bassin versant de l'oued Seybouse sont soumises à l'impact des flux de polluants générés par les activités humaines, ce qui mérite une attention particulière. Les résultats de l'étude de la qualité des eaux de quatre oueds situées dans le sous bassin de Guelma, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les paramètres physicochimiques mesurés *in situ* montrent une qualité acceptable des eaux étudiées ;
- L'isolement et l'identification des bactéries aquicoles révèlent la présence des espèces pathogènes (strictes ou opportunistes) ;
- Un taux important des souches bactériennes isolées sont résistantes au cuivre et au cadmium ;
- Les cocci à Gram positif sont les plus résistants au cuivre ;
- Les entérobactéries sont les plus résistantes au cadmium ;
- La détection d'une espèce tolérante au cadmium : *Bacillus pasteurii* ;
- Les stations recevant des polluants d'origine agricole et industrielle hébergent les bactéries les plus résistantes aux métaux testés ;
- L'activité antibactérienne du cuivre et du cadmium est dans la majorité des cas bactéricide.

## Perspectives

Il serait judicieux de:

- Travailler sur une large gamme d'espèces ;
- Tester d'autres métaux lourds avec des concentrations supérieures à 1600 µg/ml ;
- Identifier le profil de résistance aux métaux (phénotypes de résistance) ;
- Faire une analyse et une comparaison des phénotypes de résistance aux métaux lourds sur les souches isolées des différents cours d'eau ;
- Chercher la corrélation entre la résistance aux métaux et la présence des plasmides.

# Références Bibliographiques

**A**

Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., & Barton M.D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 30:177–82.

Antoine Y.W.S., & Bowker D. (1996). Hydrological Characteristics of the River Taff, South Wales, U.K. *Limnologica.* 26: 217-233.

Arana I., Justo J.L., Muela A., Pocino M., Iriberry J., Barcina I. (1997). Influence of a survival process in a freshwater system upon plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Microbial Ecology.* 31: 41-49.

**B**

Babich H., Stotzky G. (1977). Sensitivity of Various Bacteria, Including Actinomycetes, and Fungi to Cadmium and the Influence of pH on Sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 681-695.

Banci L., Bertini I., Del Conte R., Markey J., & Ruiz-Dueñas F. J. (2001). Copper trafficking : the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry.* 40: 15660–8.

Barcina I., Lebaron P., & Vives-Rego J. (1997). Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems. *Abiological approach FEMS Microbiol. Ecol.* 23:1-9.

Bauda P. (1986). « Accumulation et toxicité du cadmium chez les bactéries Gram négatif : rôle des enveloppes bactériennes ». Thèse de Doctorat, Université de Metz. 13p.

Bechiri N. (2011). Evolution du chimisme des eaux de surface et souterraines dans le bassin versant de la seyouse (Nord- Est Algerien). Mémoire de Magister, Université de badjimokhtar. Annaba. 97p.

Berg J., Tom-Petersen A., & Nybroe O. (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol.* 40:146–51.

Bergogne-Bérézin E., Friedman H., Bendinelli M. (2008). *Acinetobacter*: Biology and Pathogenesis Infectious Agents and Pathogenesis, Edition illustrée, Springer Science & Business Media. 220p.

Beveridge T.J. (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual review of microbiology.* 43: 147-171.

Blair J.E., Woo-Ming M.A., Mc-Guire P.K. (1999). *Aeromonas hydrophila* bacteremia acquired from an infected swimming pool. p: 1336-1337.

Boo Saab H., Nassif N., Antione G., El Samrani D.R., Medawer S., & Ouaini N. (2007). Suivi de la qualité bactériologique des eaux de surface (rivière Nahr Ibrahim, Liban). *Revue des sciences de l'eau des sciences de l'eau/ journal of water science.* 20 (4): 341-352.

Borkow G.G., Gabbay J. (2004). Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J.*

Boucheseiche C., Crémille E., Pelte T., Pojer K. (2002). Pollution toxique et écotoxicologie : Notions de base. *Guide technique n°7 du SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse*. 83p.

Boust D., Fischer J.C., Ouddane B., Petit F., & Wartel M. (1999). *Fer et manganèse: réactivités et recyclages*. Rapport Seine Aval. Ifremer. 40 pp.

Bouziani M. (2000). « L'eau de la pénurie l'eau de la pénurie aux maladies ». Edition Ibn - khaldoun, Oran. Algérie. 247p.

Brisse S., & Engeline V.D. (2005). Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology*. 105: 307–312.

Brown N. L., Barrett S. R., Camakaris J., Lee B. T., & Rouch D. A. (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 17: 1153-1166.

Brown N. L., Rouch D. A., & Lee B. T. (1992). Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid*. 27: 41-51.

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

Brynhildsen L., Lundgren B.V., Allard B., & Rosswall T. (1988). Effects of Glucose Concentrations on Cadmium, Copper, Mercury, and Zinc Toxicity to a *Klebsiella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1689-1693.

## C

Carginale V., Capasso C., Scudiero R., & Parisi E. (2002). Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish *Chionodracohamatus* by messenger RNA differential display. *Gene*. 299: 117-124.

CASFM-Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2016). source: <http://www.sfm-microbiologie.org/> (consulté le 02/03/2017).

Chang J. (1997). Biosorption of Lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*. 31 : 1651-1658.

Chauvette L. (2005). *Diagnostic du bassin versant de la rivière Bécancour*. Groupe de concertation du bassin de la rivière Bécancour (GROBEC).

Cours de Bactériologie, Service de Bactériologie. (2003). France : Université Pierre et Marie Curie. 2-122pp.

Croteau M.N., Luoma S.N., & Stewart A.R. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.* 50:1511–1519.

## D

- Dameron C., & Howe P.D. (1998). Copper Environmental Health criteria. n°200, World Health Organization. Geneva.
- Dams W.J., Blust R., Borgmann U., Brix K.V., DeForest D.K., Green A.S., Meyer J.S., McGeer J.C., Paquin P.R., Rainbow P.S., & Woody C.M. (2011). Utility of tissue residues for predicting effects of metals on aquatic organisms. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 7: 75-98.
- Dave G., & Xiu R.Q. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 21, 1, 126-134.
- Debieche H. (2002). Évolution de la qualité des eaux (salinité, azote et métaux lourds) sous l'effet de la pollution saline, agricole et industrielle Application à la basse plaine de la Seybouse - Nord-Est Algérien. Thèse de doctorat U. F. R. des Sciences et Techniques, l'Université de Franche-Comté Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé. Constantine. 199 :40-45.
- DeForest D.K., Brix K.V., & Adams W.J. (2007). Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 84: 236–246.
- Degremont. (1998). Mémento technique de l'eau, tome I. Degremont, Paris. 592p.
- Dellarras C. (2003). Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaetan Morin éditeur. P : 223-230.
- Des Jardins R. (1990). Le traitement des eaux. 2<sup>ème</sup> Edition. Canada.
- Desaunay A. (2011). « Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun ». Thèse de doctorat en science, Ecole Doctorale Terre Univers Environnement. Grenoble. 209p.
- Diels L., Van Roy S., Somers K., Willems I., Doyen W., Mergeay M., Springael D., & Leysen R. (1995): The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *Journal of Membrane Science* 100. p : 249-258.
- Djabri L. (2001). « Mécanisme de la pollution et vulnérabilité des eaux de la Seybouse: Origines géologiques, industrielles, agricoles et urbaines ». Doctorat d'Etat, UBM. Annaba. 176 p.
- Dong Q., & Mergeay M. (1994). Czc/cnr efflux: A three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Molecular Microbiology*. 14: 185-187.
- Draredja B. (1992). « Conditions hydrosédimentaires et structure de la macrofaune benthique en période printanière d'un écosystème lagunaire méditerranéen: lac Mellah (Algérie) ». Thèse Magister en Océanographie biologique, ISMAL (Alger). 147p.



**E**

Eberlin M.N., Tavares F.C.A. (2007). Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*. 128 (3): 693–703

EDF. (1995). Nucléaires et environnement guide pratique pour le contrôles des effluents et de l'environnement. DSRE (Eds). 128 p

Endo G., Narita M., Huang C., & Silver S. (2002). Microbial Heavy Metal Resistance Transposons and Plasmids: Potential Use for Environ. *Biotech of Environ.* 2: 71- 82.

Espirito Santo C., Taudte N., Nies D.H., & Grass G. (2008). « Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces». *Appl. Environ Microbiol.* 3: 977-986.

Es-said I. (2015). Activité des antibiotiques associés contre *Acinetobacterbaumannii*. Edition illustrated. France, 80p.

**F**

Faber F., Egli T., & Harder W. (1993). Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. *FEMS MicrobiolLett.* 111: 189–195.

FILMED. (2010). *Forum Interrégional des Lagunes Méditerranéennes*. Pôle relais lagunes méditerranéennes – Boite à outil interprétation de données – France, V4 avril. 17p.

Flandrois. (1997). Bactériologie médicale. Collection Azay, Presses Universitaires. Lyon, 309p.

**G**

Gadd G.M. (1992). «Metals and microorganisms: A problem definition». *FEMS Microb.Lett.* 100:197-204.

Garin M.A., & Simon O. (2004). Cadmium 109 environnement. Ed. IRSN, 14p.

Garret, G.G. (2000). "Natural sources of metals to the environment". *Human & Ecological Risk Assessment.* 6(6): 945-963.

Gérard M. (2001). Sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport de recherche n° 2979 : Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

Giller K.E., Witter E., & McGrath S.P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *A review. Soil Biol. Biochem.* 30: 1389–1414.

Gourgand C. (2005). Infections bactériémiques à *Pasteurella spp*: pronostic et facteurs de risque de mortalité: étude multicentrique de 34 patients. 190 p.

Grass G., Fan B., Rosen B. P., Lemke K., Schlegel H. G., & Rensing C. (2001). NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J. Bacteriol.* 183: 2803-2807.

Grass G., Rensing C., Solioz M. (2011). « Metallic Copper as an Antimicrobial Surface ». *Appl Environ Microbiol.* 5: 1541-1547.

Guellec V. (2006). Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique *Acinetobacter baumannii*: étude rétrospective sur 48 patients de réanimation. *Revue française de science.* 197p.

Guettaf A.Y. (2015). « Caractérisation hydro chimique et évaluation des indicateurs de pollution dans l'environnement: cas de l'oued Seybouse et ses effluents dans le sous bassin de Guelma (Nord-est Algérien) ». Thèse de doctorat, Faculté des sciences de la nature et de la vie ; science biologique. Guelma. 149p.

Guiraud J. (2003). Microbiologie alimentaire. Édition RIA Dunod, p : 359-722.

Gupta A., Maynes M., & Silver S. (1998). Effects of Halides on Plasmid-Mediated Silver Resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 64: 5042-5045.

## H

Habi S. (2009). « Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif ». Thèse de doctorat en science, Université Ferhat Abbas. Sétif. 102p.

Haferburg G., Kothe E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47: 453-467.

Harrison J.J., Ceri H., Turner R.J. (2007). Multi metal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev Microbiol.* 5: 928-938. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1774>.

Hart B. A., & Scaife B.D. (1977). Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Res.* 14: 401-413.

Hossain S. M., Das M., & Anantharaman N. (2006). Studies on Bacterial Growth and Lead Biosorption using *Escherichia Coli*. *IE (I) Journal-CH.* 87: 9-15.

Hunter A. (2006). *La santé animale: Principales maladies. Agricultures tropicales en poche*, Karthala Editions, 310 p.

Hurlbut Jr., C.S., & Klein C. (1982). *Manual de Mineralogía de Dana*. Editorial Reverté, Barcelona, 564 p.

## J

J.O.R.A (Journal Officiel de la République Algérienne). (2014). N°13. Décret exécutif n°14-96 du 04 mars 2014, modifiant et complétant le décret exécutif N° 11-125 du 22 mars 2011, fixant les objectifs de qualité des eaux superficielles et souterraines destinées à l'alimentation en eau des populations.

Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A. (1973). Microbiologie médicale, librairie Maloine. Paris. 629p  
 Jean M. (2011). *Les risques sanitaires des métaux lourds*. Rapport Commission des questions sociales. 13 p.

Joachim S., Morin A., & Thybaud E. (2009). Effet du cuivre sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. *L'actualité chimique* - n° 334. p : 55-58.

### K

Kao Chih-Chuan., Meei-Fang Liu., Chin-Fu Lin., Yi-Ching Huang., Po-Yu Liua., Ching-Wen Changb., & Zhi-Yuan Shia. (2010). Antimicrobial Susceptibility and Multiplex PCR Screening of AmpC Genes From Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 43(3):180–187.

Karbasizadeh V., Badami N., & Emtiazi G. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Af. J. of Biotechn.* 2: 379-383.

Kondo I., Ishikawa T., & Nakahara H. (1974). Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the penicillinase Plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 117:1-7.

### L

Larpent J. (1997). *Microbiologie des eaux d'alimentaire* : Technique de labo. Edition Tec et Doc, P: 294-300.

Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews.* 51: 1-31.

Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth Science Reviews.* 51(1): 1-31.

Lee M.H., Pankratz H. S., Wang S., Scott R. A., Finnegan M. G., Johnson M. K., Ippolito J. A., Christianson D.W., & Hausinger R.P. (1993). Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metal center assembly. *Protein Sci.* 2: 1042–52.

Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J., & Shadomy H.J. (1985). *Manual of Clinical Microbiology*. Fourth Edition: American Society for Microbiology. Washington, D. ZC.

Liao V.H., Dong J., & Freedman J.H. (2002). Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol Chem.* 277: 42049-42059.

Lin T., Jenq Y.Y., Lin M.L., Wang F.D., & Liu C.Y. (2010). Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacterium. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 43(6): 498-505.

Lundberg I. (1995). Pesticides et eaux de surface: Etude sur la situation concernant la pollution des eaux de surface par des résidus de pesticides dans les pays nordiques, en Allemagne et aux Pays-Bas, et les problèmes associés à la contamination par des pesticides. Council of Europe. 61: 11-20.

**M**

- Mahan B.H. (1987). Química Curso Universitario. Fondo Educativo Interamericano S. A.
- Mallevalle J., Chambolle T. (1990). La Qualité de l'eau, La recherché, n° 221. p : 598-606.
- Malmavist B., & Rundle S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation* 29 (in press).
- Mariano-da-Silva S., de Olivera S.L., Leite C.A.O., do Prado R.S., de Faria F.P., Olivera C. N., & Mariano-da-Silva F. M. de S. (2009). Effect of pH, dextrose and yeast extract on cadmium toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.* 29:295-299.
- Mc Arde H.J. (1995). The metabolism of copper during pregnancy. *A review. Food Chem.* 54: 79-84.
- Milton H., Saier J., (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* 1: 107-125.
- Mitra R. S., & Bernstein I. A. (1978). Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd<sup>2+</sup>. *J.Bacteriol.* 133: 75–80.
- Moncky S. (2007). « Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 ». Thèse de doctorat en science, ULB. Bruxelles. 98p.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., & Tenover F.C. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**N**

- Nedwell D. B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol Ecol.* 30: 101-111.
- Nies D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51: 730-750.
- Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. (2006). « Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment ». *JHosp Infect.* 4: 289-297.
- Nweke C. O., Alisi C.S., Okolo J.C., & Nwanya C.E. (2007). Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from Tropical River Sediment. *Appl. Environ. Res.* 5:23-132.
- Nweke C.O., Alisi C.S., Okolo J.C., & Nwanya C.E. (2007). Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. *Appl Environ. Res.* 5:23-132.

O

O'Gorman J., Humphreys H. (2012). Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *J. Hosp. Infect.* p: 217-223.

P

Paulsen, I. T., & Saier M. H., Jr. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 156, 99-103.

Pennanen T., Frostegård A., Fritze H., & Bååth E. (1996). Phospholipid fatty acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities Along Two Heavy Metal-Polluted Gradients in Coniferous Forests. *Appl. Environ. Microb.* 62: 420-428.

Piotrowska-Seget Z., Cycoń J., & Kozdró J. (2005). Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil. *Appl Soil Ecol.* 28: 237–246.

Prescott M., Harley P., & Klein A. (1999). *Microbiologie*. De Boeck. Université, 981p.

Q

Quinn P.J., Markey B.K., Donnelly W.J., Leonard F.C., Fanning S., & Maguire D. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2<sup>ème</sup> Édition, 400 p.

R

Rathnayake V. N., Megharaj M., Bolan N., & Naidu R. (2009). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *W. Acad. Sc. Engin. Techn.* 53: 1185-1189.

Rathnayake V. N., Megharaj M., Bolan N., & Naidu R. (2009). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *W. Acad. Sc. Engin. Techn.* 53:1185-1189.

Richard C., & kerdjian M. (1995). *Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts*. Ed. Institut pasteur, 332 p.

Robinson N., Whitehall S., & Cavet J. (2001). Microbial metallothioneins. *Advances in microbial physiology.* 44 : 183–213.

Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H., & Rodi L. (2005). L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. Ed. Dunod. 8<sup>ème</sup> Edition. Paris.

Roundhill D.M. (2004). Remediation and liquid-liquid phase transfer extraction of chromium (VI). *Journal of Chemical Education.* p: 275-282.

S

Saadali B. (2007). « Etude de la qualité des eaux des sources issues du massif dunaire de Bouteldja (Algérie Extrême Nord Orientale) ». Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar. Annaba. 83p.

- Saier M.H., Jr., Tam R., Reizer A., & Reizer J. (1999). Convergence and divergence in the evolution of transport proteins. *Bioessays*. 16: 23-29.
- Saier, M. H., Jr., Tam R., Reizer A., & Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847.
- Satchanska G., Pentcheva E.N., Atanasova R., Groudeva R., Trifonova R., & Golovinsky E. (2005). Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. *Biotechnol & Biotechnol. Eq.* 19: 61-67.
- Schaechter M., Medoff G., & Eisenstein B.I. (1999). *Microbiologie et pathologie infectieuse*. 2ème édition, 182 p.
- Scott J., & Palmer S. (1988). Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnology letters*. 10: 21-24.
- Settle D., & Patersson C.C. (1980). Lead in albacore: guide to lead pollution. *Americains science*. 207:1167-1176.
- Sigee D.C. (2005). *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Sigg L., Behra P., & Stumm W. (2001). *Chimie des milieux aquatiques chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*. 3e ed, Dunod, Paris.
- Silva A.M.M., & Sacomani L.B. (2001). Using chemical and physical parameters to define the quality of Pardoriver water (Botucatu-Sp-Brasil). *Technical Note. Water Res.* 35(6): 1609-1616.
- Silver S. & Phung, L.T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.* 50 : 753-789.
- Sirven J.B. (2006). « Détection de métaux lourds dans les sols par spectroscopie d'émission sur plasma induit par laser (LIBS) ». Thèse de doctorat, Université de Sciences physiques et de l'ingénieur. Bordeaux .212 p.
- Sweeney B.W., Bott T. L., Jachson J. K., Kaplan L.A., Newbold J.D., Standley L.J., Hession W.C., & Horwitz R. J. (2004). Riparian de forestation, stream narrowing, and loss of stream ecosystem service. *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* 101: 14132-14137.
- Synthèse spécifique au secteur d'activité Agroalimentaire. (2013). France : I N E R I S Données technico-économiques sur les substances chimiques Agence de l'Eau.
- Szymanowski J. (1993). «Hydroxyoximes and copper hydrometallurgy». *CRC Press. Boca Raton* .159pp.

## T

- Thierrin J., Steffen P., Cornaz S., Vualaz F.D., Balderer W., Looser M., Zpbrit J., & Zumstein J. (2001). *Guide pratique de l'échantillonnage des eaux souterraines*. Société Suisse D'Hydrogéologie. 57 p.

Trepreau J. (2001). «Perception du stress métallique (nickel/cobalt) par le système de signalisation transmembranaire Cnr chez *Cupriavidus metallidurans* CH34». L'école Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, Grenoble. 186 p.

Tricot A. (1999). Le cadmium. Encyclopédie Universalisa. France.

Tseng T.T., Gratwick K.S., Kollman J., Park D., Nies D.H., Goffeau A., & Saier M. H., Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J.Mol. Microbiol.Biotechnol.* 1 : 107-125.

### V

Vedrenne A. (2008). «Identification des bactéries à gram negative non fermentaire dans la mucovisidose».Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de limoges.Toulouse.53p.

### W

Wepener V., Van Vuren J.H.J., & du Preez H.H. (2000). Application of the equilibrium partitioning method to derive copper and zinc quality criteria for water and sediment: A South African perspective. *Water SA*, 26, 1, 97-104.

Woodbine M. (1950). Erysipelothrix rhusiopathae. *Bacteriology and chemotherapy*. 161 - 178.

Wright D.A., Welbourn P. (2002). Environmental toxicology. Series, RA1226, Cambridge University Press. p: 274-280.

### X

Xiarong W., Mei J., Hao S., & Ouyong X. (1997). Effects of Chelation on the Bioconcentration of Cadmium and Copper by Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* 59 (1): 120-124.

# Annexes



## Annexe I

- **Composition des milieux de culture** (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005)

### 1. Gélose Mac Conkey (g/ litre d'eau distillée)

Peptone pancréatique de gélatine	17.0
Tryptone	1.5
Peptone pepsique de viande	1.5
Lactose	10.0
Sels biliaires	1.5
Chlorure de sodium	5.0
Rouge neutre	30.0
Cristal violet	1.0
Agar agar	13.5
pH= 7.0	

### 2. Gélose SS, *Salmonella-Shigella* (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer (III)	1
Désoxycholate	8.5
Vert brillant	0.3
Rouge neutre	25
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.5
Agar-agar	15
pH = 7.2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.	

### 3. Gélose au cétrimide (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	20
Chlorure de sodium	3
Sulfate de potassium	10
Monohydrogénophosphate de potassium	0.3
Cétrimide (bromure de tétradonium)	0.2
Acide nalidixique	0.015
Agar-agar	12
pH = 7.1 / autoclavage 20 min à 121°C.	

### 4. Chapman (g/ litre d'eau distillée)

Peptone trypsique de caséine	10
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75

Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Agar-agar	15
pH = 7.6 / autoclavage 20 min à 121°C.	

#### 5. Gélose Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Infusion de viande de bœuf	3.0
Peptone de caséine	17.0
Amidon de maïs	1.5
Agar-agar	17.0
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

#### 6. Gélose nutritive (G.N) (g/ litre d'eau distillée)

Peptone pepsique de viande	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15
pH: 7.4±0.2/ autoclavage 15 min à 121°C. Pour les vibrions ajuster le pH à 8.	

#### 7. Bouillon Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Hydrolysât acide de caséine	17.5
Infusion de viande	2.0
Amidon soluble	1.5
Peptone	1.5
pH= 6.7/ autoclavage 15 min à 121°C.	

#### 8. Bouillon Nutritif (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5.0
Extrait de viande	1.0
Extrait de levure	2.0
Chlorure de sodium	5.0
pH=7.4 ±0.2 à 25 °C / autoclavage à 121° Cpendant 15 min	

#### 9. Bouillon Nitrate (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5.0
Extrait de viande	3.0
Nitrate de potassium	1.0
pH = 7.0±0.2 / stérilisation à l'autoclave 15 min à 121°C	

**10. Eau peptonée tamponée (g/litre d'eau distillée)**

Peptone de caséine	10
Chlorure de sodium	5.0
Phosphate de sodium, dibasique, 12H <sub>2</sub> O	9.0
Phosphate de potassium, dibasique	1.50
pH final à 25°C : 7.0 ± 0.2	

**11. Bouillon Sélénite Cystéine (g/litre d'eau distillée)**

Tryptone	5,0
Lactose	4.0
Phosphate disodique	10,0
Hydrogénosélénite de sodium.	4.0
L- cystine	0.01

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7.0 ± 0.2.

**12. Milieu TSI (g/ litre d'eau distillée)**

Extrait de l'œuf	3
Agar	12
Extrait de levure	3
Peptone	20
Lactose	10
Saccharose	10
NaCl	5
Glucose	1
Citrate ferrique	3
Thiosulfate de sodium	3
Rouge de phénol	0.025
pH = 7.4	

**13. Clark et Lubs (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone tryptique de caséine	5
Phosphate bi potassique	5
Glucose	5
pH = 7.5 /autoclavage 15 min à 121°C	

**14. Citrate de Simmons (g/ litre d'eau distillée)**

Citrate de sodium	1.0
Bleu de bromothymol	0.08
Chlorure de sodium	5.0
Sulfate de magnésium	0.2
Hydrogénophosphate de potassium	1.0
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1.0
Agar-agar	15.0
pH = 7/ autoclavage 15 min à 121°C	

**15. Urée-Idole (g/ litre d'eau distillée)**

L-tryptophane	3
Phosphate monopotassique	1
Phosphate di potassique	1
Chlorure de sodium	5
Urée	20
Solution rouge de phénol à 1%	2.5
Alcool à 95°	10
pH = 7 /autoclavage 15 min à 121°C	

**16. Mannitol-Mobilité (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone pancréatique de viande	20.0
Mannitol	2.0
Nitrate de potassium	1.0
Rouge de phénol solution à 1%	4.0
Agar agar	4.0
pH=7.2 /autoclavage 15 min à 121°C.	

- **Composition des réactifs et des colorants** (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005)

**1. Violet de Gentiane**

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	1ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

**2. Lugol**

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	100ml

**3. Fuchshine**

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique	100ml
Phéno	15g
Eau distillée	100ml

**4. Réactif du rouge de méthyle**

Rouge de méthyle	0.5 g
Alcool à 80°	100ml

**5. Réactif TDA (pour la recherche de tryptophane désaminase)**

Perchlorure de fer	3.4g
Eau distillée	100ml

**6. Réactif Kovacs (pour la recherche de l'indole)**

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5.0 g
Alcool isoamylique	75.0 ml
HCL 37%	25.0 ml

**7. Réactif VPI (pour la recherche de l'acétoïne)**

Hydroxyde de potassium	40g
Eau distillée	100ml

**8. Réactif VPII (pour la recherche de l'acétoïne)**

Alpha naphthol	6g
Ethanol	100ml

**9. Réactif NIT I (pour la recherche du nitrate réductase)**

Acide sulfamilique	0.8 g
Acide acétique 5N	100 ml

**10. Réactif NIT II (pour la recherche du nitrate réductase)**

Naphtylamine	0.5 g
Acide acétique 5N	100 ml

**11. Réactif ZYM A**

Tris-hydroxyméthyl-aminométhane	25 g
Acide chlorhydrique à 37 %	11 ml
Laurylsulfate Na	10 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

**12. Réactif ZYM B**

Fast Blue BB	0.35 g
2-méthoxy éthanol	100 ml

## Annexe II

**Tableau 26** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E (source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative incolore	Positive jaune
			<b>ADH</b>	L-Arginine
<b>LDC</b>	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
<b>ODC</b>	L-Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
<b> CIT </b>	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
<b>H2S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
<b> VP </b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1+ VP2</b>	
			Incolore	Rose/rouge
<b> GEL </b>	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
<b>MAN</b>	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>Réduction des nitrates (GLU tube)</b>	Potassium nitrate	Production de NO2	<b>NIT 1+NIT 2, 2-3 min</b>	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N2	<b>Zn / 5 min</b>	
<b>OF-O</b>	glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
<b>OF-F</b>	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune

**Tableau 27:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE (source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats				
			Négatif	Positif			
<b>NO3</b>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose/rouge			
		Réduction des nitrates en azote	<b>ZN / 5 mn</b>				
			Incolore	Rose			
<b>TRP</b>	Tryptophane	Formation d'indole	<b>TRP / 3-5 mn</b>				
			Incolore	Rose / rouge			
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge			
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge			
<b>ESC</b>	Esculine	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/noir			
<b>GEL</b>	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigmen	Diffusion du pigment noir			
<b>PNPG</b>	p-Nitro-phényle- $\beta$ D-Galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune			
<b>GLU</b>	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble			
<b>ARA</b>	Arabinose						
<b>MNE</b>	Mannose						
<b>MAN</b>	Mannitol						
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine						
<b>MAL</b>	Maltose						
<b>GNT</b>	Potassium Gluconate						
<b>CAP</b>	Acide Caprique						
<b>ADI</b>	Acide Adipique						
<b>MLT</b>	Acide Malique						
<b>CIT</b>	Trisodium Citrate						
<b>PAC</b>	Phényl-acétate						
<b>OX</b>	Tetraméthyl-p-phenylène diamine				Cytochrome oxydase	Incolore	Violet



**Tableau 28:** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph (source : <http://www.biomerieux.com>).

Tests	Substrats	Caractère recherché	Résultats	
			Négative	Positive
<b>0</b>	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin négatif	Rouge	Jaune
<b>FRU</b>	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
<b>MNE</b>	D-mannose			
<b>MAL</b>	Maltose			
<b>LAC</b>	Lactose			
<b>TRE</b>	D-tréhalose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>XLT</b>	Xylitol			
<b>MEL</b>	D-melibiose			
<b>NIT</b>	Nitrate de potassium		Réduction des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 + NIT 2 / 10 mn</b>
		Incolore/Rose		Rouge
<b>PAL</b>	$\beta$ -naphtyl. phosphate	Phosphatase alcaline	<b>ZYM A + ZYM B / 10 mn</b>	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	<b>VP 1 + VP 2 / 10 mn</b>	
			Incolore/rose	Violet/rose
<b>RAF</b>	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	Xylose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MDG</b>	$\alpha$ -méthyle-D-glucopyranoside			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

**Tableau 29** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API Strep (source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2/ jusqu'à 10 mn	
			Incolore	Rose/rouge
<b>HIP</b>	Acide hippurique	hydrolyse	NIN/ jusqu'à 10 mn	
			Incolore/Bleu pâle	Bleu foncé/violet
<b>ESC</b>	Esculine Citrat de fer	Hydrolyse $\beta$ -glucosidase	Incolore/ jaune	pâle Noir/gris
<b>PYRA</b>	Acide pyroglutamique- $\beta$ -naphtylamide	PYRrolidonylArylamidase	ZYM A+ZYM B/10mn	
			Incolore/orange pâle	orange
<b><math>\alpha</math>GAL</b>	6-bromo-2-naphtyl- $\alpha$ D-galactopyranoside	$\alpha$ -GALactoside	Incolore	Violet
<b><math>\beta</math>GUR</b>	Acide naphtol-ASBgalactopyranoside	$\beta$ -GLUcuRonidase	Incolore	Bleu
<b><math>\beta</math>GAL</b>	2-naphtyl- $\beta$ Dgalactopyranoside	$\beta$ - GALactoside	Incolore ou violet pâle	Violet
<b>PAL</b>	2-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline	Incolore ou violet pâle	Violet
<b>LAP</b>	L-leucine- $\beta$ -naphtylamine	Leucine AminoPeptidase	Incolora	orange
<b>ADH</b>	L-arginine	Arginine DIHydrolase	Jaune	Rouge
<b>RIB</b>	D-ribose	Acidification	Orange/ Rouge	Jaune
<b>ARA</b>	L-arabinose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>SOR</b>	D-sorbitol			
<b>LAC</b>	D-lactose			
<b>TRE</b>	D-thréhalose			
<b>INU</b>	Inuline			
<b>RAF</b>	d-raffinose			
<b>AMD</b>	Amidon			
<b>GLYG</b>	glycogène			

