

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DÉPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement: Santé, Eau et Environnement

---

**Thème : La Recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de surface : cas de l'oued Messida (Nord-Est Algérien)**

---

Présenté par :

- ADJEROUD Nadjat
- NAHAL Meriem

Devant le jury composé de :

Président: Mr. HOUHAMDI M.

(Pr. Université de Guelma)

Examinatrice: Mme AMRI S.

(M.A.A.Université de Guelma)

Encadreur: Mme BENHALIMA L.

(M.A.A.Université de Guelma)

**Juin 2014**

# Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage et la force pour mener a bout ce modeste travail.*

*Nos reconnaissances, nos vives gratitudees et nos sincères remerciements vont à Monsieur **HOUHAMD I M.**, Professeur au département de Biologie, d'avoir bien accepté de présider ce jury.*

*Nous tenons à remercier **Mme AMR I S.** Maître assistante au Département de biologie à l'Université de Guelma pour avoir exprimé sa entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements et nos respects vont à notre encadreur **Mme Benhalima L.**, qui nous a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Nous la remercions de tout cœur pour sa patience et sa confiance qu'elle nous a toujours accordée durant ces moins. Nous la remercions également pour sa disponibilité sans faille, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui nous ont indiscutablement permis d'évoluer.*

*N'oublions pas aussi de remercier Monsieur **Kebieche hassen**, chef de laboratoire de la direction de la santé de la Wilaya de Guelma ; ainsi que l'ensemble de l'équipe de la DDS, pour leur accueil bienveillant et leurs conseils avisés, et cela malgré leur emploi du temps chargé.*

*Nos remerciements vont également à tous les professeurs et les enseignants qui nous beaucoup encouragé et soutenu depuis début de nos premier cycle d'étude jusqu'à la fin de cinquième année universitaire.*

*Nous sincères gratitudees vont également à tous nos collègues et amis (es) de la promotion  
2013-2014*

*A tous ceux qui nous contribués de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**Nadjat et Meriem**

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des schémas

## **Introduction**

### **Chapitre I : Description du site d'étude**

I. Description de la région d'étude (PNEK) .....	1
1. Situation générale de la région .....	1
2. Hydrologie .....	1
II. Description du site d'étude : Oued Messida .....	3
1. Situation géographique .....	3
2. Caractéristiques de l'Oued Messida .....	5
3. Diversité biologique de l'oued Messida .....	6
4. Utilisation des eaux de l'oued Messida .....	8
5. Pollutions au niveau d'oued Messid.....	8
6. Caractéristiques climatiques .....	9

### **Chapitre II : Pollution des eaux et Émergence des bactéries multirésistantes**

I. La pollution des eaux .....	11
1. Généralité .....	11
2. Différent types de pollution .....	12
3. Facteurs favorisant la pollution microbiologique .....	12
4.Émergence des bactéries multi-résistantes dans les milieux aquatiques .....	13
II. Impact de la pollution des eaux sur la santé .....	18
1. Risques liés à la présence des bactéries pathogènes.....	18
2. Risques liés à la présence des bactéries multirésistantes.....	19

### **Chapitre III : Matériel et Méthodes**

I. Matériel .....	20
II. Méthodes.....	20
1. Echantillonnage .....	20
1.1. Présentation des points de prélèvement .....	20
1.2. Technique de prélèvement .....	23

1.3. Transport et conservation des échantillons.....	24
2. Méthodes d'étude de la qualité bactériologique des eaux de l'oued Messida.....	24
2.1. Dénombrement des germes totaux(GT).....	24
2.2. Recherche et dénombrement des bactéries tests de contamination fécale.....	27
2.2.1. Recherche et dénombrement des (CT) et des (CF) .....	27
2.2.2. Recherche et dénombrement des (SF).....	30
2.2.3. Recherche et dénombrement des (ASR) .....	33
3. Recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de l'oued Messida .....	35
3.1. Isolement et identification de la flore bactérienne.....	35
3.1.1. Entérobactéries .....	35
3.1.2. <i>Vibrions cholériques</i> .....	45
3.1.3. <i>Pseudomonas</i> .....	47
3.1.4. Staphylocoques pathogènes.....	49
3.1.5. Les streptocoques .....	53
3.1.6. Autres bactéries .....	55
3.2. Conservation des souches bactériennes .....	55
3.3.Étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	56

#### **Chapitre IV : Résultats et discussion**

I. Résultats .....	60
1. Résultats de l'analyse bactériologique .....	60
1.1. Résultat de dénombrement des germes totaux (GT).....	60
1.2. Résultat de dénombrement des coliformes totaux (CT) .....	61
1.3. Résultat de dénombrement des coliformes fécaux (CF).....	62
1.4. Résultat de dénombrement des streptocoques fécaux (SF) .....	63
1.5. Résultat de dénombrement des (ASR).....	65
2. Résultats de la recherche des bactéries antibiorésistantes.....	65
2.1. Résultats d'isolement et d'identification de la flore bactérienne.....	65
2.2. Résultats de l'antibiogramme .....	78
II. Discussion.....	82
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

## Principales abréviations utilisées

**PNEK:** Parc National d'EL Kala

**U.S.A:** The United States of America

**MNT:** mycobactérie non tuberculose

**PCR:** Réaction en chaîne par polymérase

**GT:** germe totaux

**TGEA:** gélose tryptone glucose à l'extrait de levure

**CT:** Coliformes Totaux

**CF:** Coliforme Fécaux

**NPP:** Nombre le plus probable

**BCPL:** Bouillon lactosé au bromocrésol- pourpre

**SF:** Streptocoque Fécaux

**ASR:** Anaérobie Sulfite-Réductrice

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**VF:** Viande- Foie

**D/C:** Double concentration

**S/C:** simple concentration

**SS:** *Salmonella-Shigella*

**T:** Température

**NR:** Nitrate réductase

**API:** Analytique Prophylactic Index

**TSI:** Triple Sugar Iron

**VP:** Voges Proskauer

**TDA:** Tryptophane décarboxylase

**ONPG:** Ortho-Nitrophényle-B-D-Galactosidase

**EPA:** Eau peptonée alcaline

**GNAB :** Gélose nutritive alcaline et biliée

**GN:** Gélose Nutritive

**UV:** Ultra violet

**MH:** Mueller Hinton

**Glu:** glucose

**Lac:** lactose

**Sac:** saccharose

**IND:** Indole

**RM :** Rouge de méthyle

**NIT:** Nitrate

**S :** sensible

**R :** résistance

## Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	N° de Page
01	les principaux caractères de l'oued Messida	05
02	Présentation des points de prélèvement et de rythme d'échantillonnage	23
03	Aspects culturels des Entérobactéries sur les milieux sélectifs	38
04	Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries	42
05	Tableau d'identification des staphylocoques	51
06	Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des entérobactéries	58
07	Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des staphylocoques	58
08	Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des streptocoques	59
09	Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des <i>Pseudomonas</i>	59
10	Nombre des germes totaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida	60
11	Nombre des coliformes totaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida	61
12	Nombre des coliformes fécaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida	62
13	Nombre des streptocoques fécaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida	63
14	Aspect macroscopique et microscopique des colonies des entérobactéries isolées des eaux d'Oued Messida	65
15	Les résultats de la recherche des enzymes respiratoires des entérobactéries isolées des eaux d'oued Messida	67
16	Résultats des tests biochimiques classiques des entérobactéries isolées des eaux de l'oued Messida	68
17	Aspect macroscopique et microscopique des colonies de <i>Pseudomonas</i> poussées sur la gélose GN	71
18	Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose Chapman	72
19	Résultat de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose Chapman	73
20	Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose GN	75
21	Les bactéries identifiées à partir des eaux d'oued Messida	77
22	Résultats de l'antibiogramme	78

## Liste des figures

N° de Figure	Titre	N° de Page
01	Carte du Parc National d'El Kala et de ses sites d'intérêt touristique	02
02	Carte de localisation du site d'étude	04
03	La richesse faunistique observée au niveau de l'oued Messida	06
04	La richesse floristique observée au niveau de l'oued Messida	08
05	Localisation des trois points de prélèvement	21
06	Vue générale des points de prélèvement	22
07	Application des disques d'antibiotique	57
08	Répartition des germes totaux dans les eaux de l'Oued Messida	60
09	Répartition des coliformes totaux dans les eaux de l'Oued Messida	61
10	Répartition des coliformes fécaux dans les eaux de l'Oued Messida	62
11	Test indole positif sur eau peptonée exempte d'indole incubée à 44°C confirme la présence d' <i>E. coli</i>	63
12	Variation spatio-temporelle des Streptocoques fécaux dans les eaux de l'Oued Messida	64
13	Confirmation de la présence des Streptocoques fécaux par la formation d'un dépôt violet dans le milieu Eva-Litsky	64
14	Colonies blanchâtres sur la gélose Mac Conkey	66
15	Colonies jaunes sur la gélose Mac Conkey	66
16	Colonies orangées sur la gélose Hectoen	66
17	Colonies vertes sur la gélose Hectoen	66
18	Colonies rouges sur la gélose Hectoen	66
19	Colonies noires sur la gélose SS	66
20	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Escherichia coli</i> ( $E_1$ )	68
21	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_1$ )	68
22	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Citrobacter freundii</i> ( $C_1$ )	69
23	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Proteus vulgaris</i>	69
24	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Serratia marcescens</i>	69
25	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Yersinia enterocolitica</i>	69
26	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Edwardsiella tarda</i>	69
27	Résultat de la galerie biochimique classique pour <i>Levinea</i>	69



## Suite de la liste des figures

28	Profil biochimique de <i>Salmonella typhimurium</i>	70
29	Profil biochimique de <i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_2$ )	70
30	Profil biochimique de <i>Citrobacter freundii</i> ( $C_3$ )	70
31	Profil biochimique d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	70
32	Aspect des colonies de <i>Pseudomonas</i> ; (a) : diffusion du pigment vert sur GN, (b) : bacilles Gram négatif ( $\times 100$ )	71
33	Profil biochimique de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	72
34	Aspect des colonies de la souche $S1$ ; (a) : Colonies blanchâtres sur Chapman, (b) : Cocci groupées en amas, Gram positif ( $\times 100$ )	72
35	Aspect des colonies de la souche $S2$ ; (a) : Colonie jaune sur Chapman, (b) : Cocci, Gram positif ( $\times 100$ )	73
36	Aspect des colonies de la souche $S3$ ; (a) : virage du couleur de milieu vers le jaune, (b): Cocci regroupées en amas en grappes de raisin, Gram positif ( $\times 100$ )	73
37	Résultat du test Staphylocoagulase	74
38	Profil biochimique de <i>Micrococcus roseus</i>	74
39	Profil biochimique de <i>Staphylococcus aureus</i>	74
40	Aspect des colonies de la souche $St2$ ; (a) : Colonies blanchâtres sur GN, (b) : Cocci en chainettes, Gram positif ( $\times 100$ )	75
41	Aspect des colonies de la souche $St3$ ; (a) : Colonie blanchâtres sur GN, (b) : Cocci regroupées en diplocoque, Gram positif ( $\times 100$ )	75
42	Profil biochimique d' <i>Enterococcus faecium</i>	76
43	Profil biochimique d' <i>Aerococcus viridans 2</i>	76
44	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> ( $E_1$ )	79
45	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> ( $E_2$ )	79
46	Résultat de l'antibiogramme de <i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_1$ )	79
47	Résultat de l'antibiogramme de <i>Serratia marcescens</i>	79
48	Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter freundii</i> ( $C_1$ )	79
49	Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter freundii</i> ( $C_2$ )	79
50	Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter freundii</i> ( $C_3$ )	80
51	Résultat de l'antibiogramme de <i>Levinea</i>	80
52	Résultat de l'antibiogramme de <i>Yersinia enterocolitica</i>	80
53	Résultat de l'antibiogramme de <i>Proteus vulgaris</i>	80
54	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Edwardsiella tarda</i>	80

## Suite de la liste des figures

<b>55</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Salmonella typhimurium</i>	80
<b>56</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	80
<b>57</b>	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	81
<b>58</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	81
<b>59</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	81
<b>60</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Micrococcus roseus</i>	81
<b>61</b>	Résultat de l'antibiogramme de <i>Streptococcus sp.</i>	81
<b>62</b>	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Enterococcus faecium</i>	81
<b>63</b>	Résultat de l'antibiogramme d' <i>Aerococcus viridans 2</i>	81

## Liste des schémas

<b>N° de schéma</b>	<b>Titre</b>	<b>N° de Page</b>
<b>01</b>	Technique de dénombrement des germes totaux	26
<b>02</b>	Recherche et dénombrement des CT et des CF	29
<b>03</b>	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	32
<b>04</b>	Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices	34
<b>05</b>	Isolement des Entérobactéries pathogènes	37
<b>06</b>	Recherche des <i>Vibrions cholériques</i>	46
<b>07</b>	Isolement et identification de <i>Pseudomonas</i>	48
<b>08</b>	Recherche des Staphylocoques pathogènes.	52

## **Introduction :**

Dans tous l'univers, il y a une molécule que l'homme cherche avidement, à cause de sa grande importance dans la vie biologique. Sa formule, peut s'écrire de façon très simple: H<sub>2</sub>O, l'eau [1].

Derrière ce mot peut se cacher un monde très vaste, c'est le monde des microorganismes qui pose, par leur présence dans l'eau, un véritable problème pour la santé humaine [1].

La qualité et la protection des ressources en eau sont aujourd'hui des sujets de préoccupation majeurs pour nos sociétés, puisque les conditions de vie la modernisation et l'urbanisation de notre monde, ont conduit à un éloignement de la population des milieux naturels, et malheureusement à une destruction des écosystèmes aquatiques, sources de vie [2].

En Algérie, le risque de contamination des eaux de surface représente un problème environnemental majeur qui remonte très loins dans le temps, où la qualité de ces eaux est également soumise à une forte pression exercée par l'accroissement de la population et par les activités industrielles (Remini, 2005).

Actuellement, la présence d'antibiotiques dans les eaux de surface constitue un risque à part en matière de pollution "pharmaceutique" (Joëlle et *al.*, 2006).

Les sources de ces substances sont constituées par les rejets hospitaliers, les rejets domestiques qui aboutissent dans les stations d'épuration où ils ne sont pas complètement dégradés (Kümmerer. 2001). Et les produits vétérinaires administrés à l'animal qui sont rejetés dans l'environnement directement par les excréments des animaux ou indirectement par les effluents d'élevage.

La conséquence de ce type de pollution, est la sélection de souches de bactéries résistantes aux antibiotiques (Schwarz et *al.*, 2001) ; les eaux superficielles seraient donc un milieu favorisant la diffusion des bactéries et l'échange de leurs gènes de résistance aux antibiotiques entre espèces différentes (homme, animal) (Joëlle et *al.*, 2006).

Pour faire face au risque de pollution par des bactéries antibio-résistantes des eaux de surface, nous avons proposé d'étudier et d'évaluer ce type de pollution à partir des

échantillons d'eau de l'oued Messida (situé dans Parc National d'El-Kala, Nord-Est Algérien).

L'Oued Messida reliant le lac Tonga à la Méditerranéen, est confronté à plusieurs sources de contaminations (rejets d'eau usée, excréments des animaux d'élevage), sa qualité microbiologique peut répercuter négativement sur le fonctionnement hydrologique de la mer en causant la pollution de cette zone touristique importante ce qui a un effet direct sur la santé humaine en provoquant plusieurs maladies surtout pendant la période estivale caractérisé par l'activité humaine intense.

L'objectif du présent travail est de :

- Évaluer la qualité bactériologique des eaux de l'oued Messida par détermination de degré de leur contamination fécale.
- Rechercher et identifier le maximum des souches bactériennes présentes dans ces eaux.
- Étudier la résistance aux antibiotiques des souches isolées afin de déterminer la présence ou non des bactéries antibiorésistantes.
- Prévoir et envisager le risque sanitaire (humain et environnemental).

Nous avons organisé notre démarche en quatre chapitres :

- \* Le premier et le second est purement théorique rassemble d'une part des généralités sur le site d'étude, et d'autre part la pollution des eaux de surface et l'émergence des bactéries multirésistantes.
- \* Le troisième est un chapitre expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'analyse bactériologique et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.
- \* Enfin, le quatrième chapitre, mentionne les différents résultats obtenus au cours de notre étude sous forme des tableaux et des graphes, avec une discussion et une conclusion clôturant le mémoire.

## I. Description de la région d'étude (PNEK):

### 1. Situation générale de la région : (Fig. 1)

Le Parc National d'EL-Kala (PNEK) est un ensemble de plans d'eau répartis entre lacs et marais dont les principaux sont le lac Tonga, le lac Oubeira, le lac Mellah, le lac Bleu, le marais de Bourdim et beaucoup d'autres d'importances écologiques égales. Il a été créé en 1983, et classé réserve de Biosphère en 1990 [3].

PNEK se situe dans la wilaya d'EL Tarf à l'Est Algérien et s'étend sur une superficie de 78 400 ha. Appartenant à la partie Nord-Est du tell Algérien, il est limité au Nord par la mer méditerranéenne, à l'Est par la frontière Algéro-Tunisienne, au sud par les monts de la Medjerda et à l'Ouest par la ville d'EL-Tarf et par les marais de la Mekkada [3].

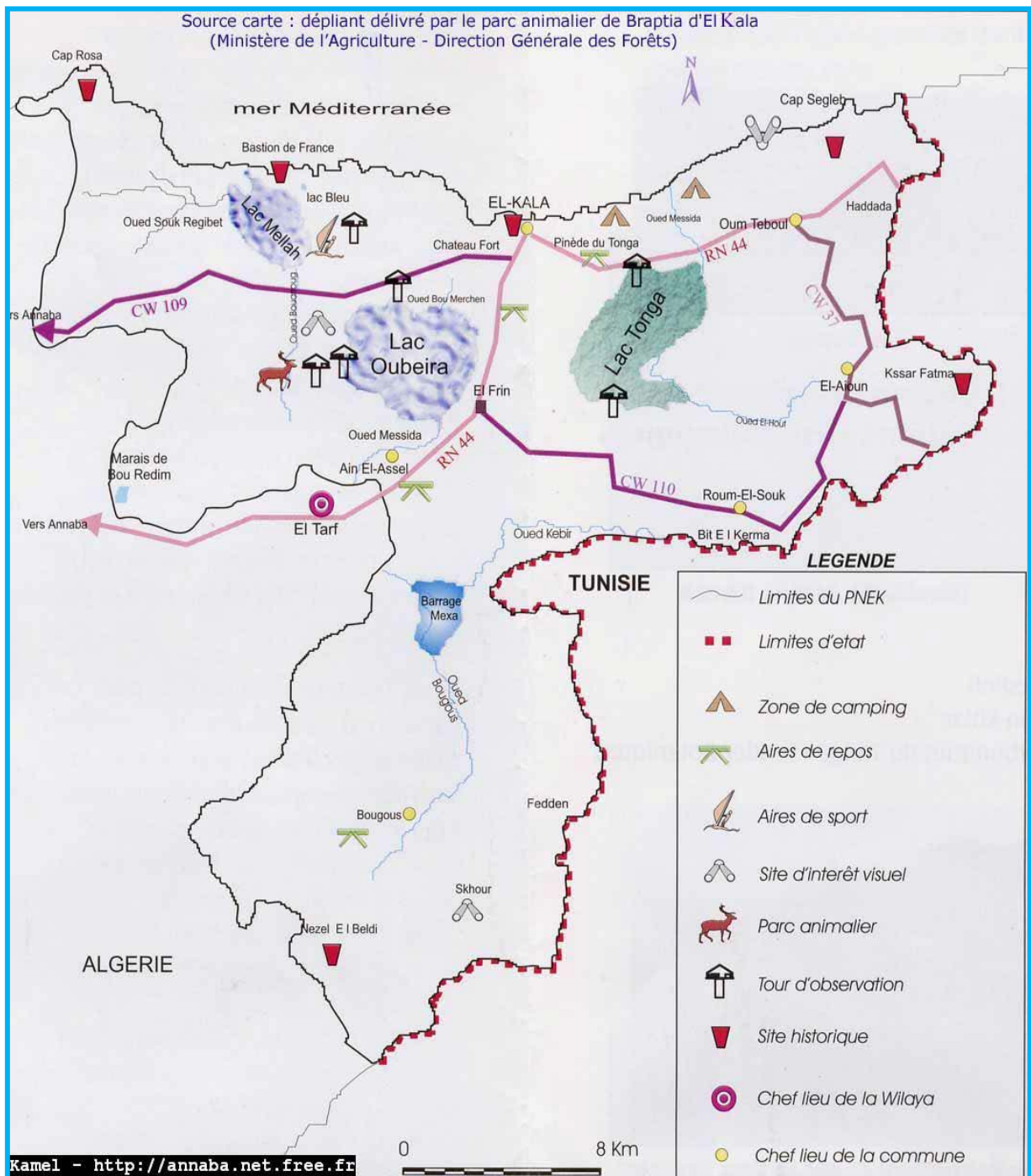
Il constitue une région très diversifiée abritant une richesse floristique et faunistique remarquable et unique au monde qui a attiré depuis très longtemps l'attention des naturalistes nationaux et internationaux; mille deux cent soixante quatre espèces végétales, et huit cent soixante dix huit espèces animales ont été recensés [3].

### 2. Hydrologie :

A l'intérieure du PNEK, se situent deux plus belles zones d'expansion touristique à savoir : Messida et Cap Rosa, ainsi que les lacs : Mellah (eau salée), Oubeira (eau douce), et le lac Tonga (eau saumâtre) [4].

De nombreux affluents issus des massifs formant la frontière Algéro-Tunisienne, s'écoulent suivant une direction de l'Est vers l'Ouest et aboutissent à la plaine d'Oum Teboul. Une partie des eaux alimente alors le lac Tonga par l'intermédiaire de l'Oued El-Hout. Une autre partie s'infiltré dans les alluvions et recharge la nappe phréatique. Le reste stagne sous la forme de marécages sur les argiles de Numidie [4].

Par ailleurs la partie méridionale de cette région est drainée par 3 oueds avec Oued Bougous, Oued Mellila et Oued El-Kebir lequel joue le rôle de collecteur principal. Par contre la partie occidentale englobe plusieurs chaâbet et oueds liés aux lacs Mellah et Oubeira [4]. L'importance du réseau hydrographique existant dans la région d'El Kala joue un rôle considérable dans le maintien du complexe de zone humide. La longueur de chaque oued existant dans la région varie entre 1,5 à 35 km [3].



**Figure1** : Carte du parc national d'El Kala et de ses sites d'intérêt touristique (source : Ministère algérien de l'Agriculture, Direction des Forêts, dépliant délivré par le parc animalier de Braptia)

## **II. Description du site d'étude : Oued Messida**

### **1. Situation géographique :**

Le canal Messida est un Oued artificiel creusé par les français pendant l'époque coloniale afin d'assécher le lac Tonga. Il présente une altitude égale à 0 et de ce fait coule dans les deux sens suivant le niveau d'eau du lac. Ainsi, en hiver l'écoulement se fait du lac vers la méditerranée et en été, il coule dans le sens inverse (Zeraoula, 2011).

Le canal Messida reliant le lac Tonga (site RAMSAR) à la mer Méditerranée est localisé dans le Parc National d'EI-Kala (PNEK) à l'extrême Nord-Est de l'Algérie (Fig.2). Il est limité par le lac Tonga au Sud, la mer Méditerranée au Nord, les plaines de la commune de Souarekh à l'Ouest et les pinèdes qui fixent la plus grande partie de la dune de la plage Messida à l'Est.

Ses coordonnées géographiques sont comprises entre 36° 53' 60 N et 8° 31' 0 E, à environ 22 km de la frontière Algéro-Tunisienne à l'Est et à l'Ouest d'environ 11 km de la ville d'El Kala.

L'Oued est alimenté par les eaux du lac qui est considéré comme le distributeur principal de l'Oued, ainsi que par deux autres distributeurs secondaires : la nappe dunaire de Maloul et la nappe dunaire de la pinède Tonga voisine surtout dans la période sèche où ces deux nappes dégagent les eaux vers l'Oued (Zeraoula, 2011).





## 2. Caractéristiques de l'Oued Messida :

Les caractéristiques de l'oued Messida sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 1 : les principaux caractères de l'oued Messida**

(Bazine et Bourenane, 2011).

Cours d'eau	Oued Messida
Type	Canal
Largeur moyenne (m)	> 3
Profondeur moyenne (m)	1 – 2,5
Vitesse du courant	Modérée
Type du terrain (lit du cours d'eau)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A dominance : de sable</li> <li>• Peu de : gravier, grosses pièces, boue.</li> </ul>
Conditions du fond	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Branches</li> <li>• Feuilles</li> <li>• Peu de déchets</li> <li>• Matière organique en décomposition</li> </ul>
Structure des bords	Naturelle
Exposition	Ouvert
Végétation aquatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sur les bords : abondante</li> <li>• Au milieu : modérée</li> </ul>
Environnements aux alentours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auberge</li> <li>• Agriculture</li> <li>• Pâturage</li> <li>• Quelques habitations</li> </ul>

### 3. Diversité biologique de l'oued Messida :

De par sa localisation, l'oued Messida héberge une faune et une flore bien diversifiée.

- **La faune : (Fig.3)**

L'oued Messida constitue l'habitat d'espèces animales d'immenses valeurs [5] :

- Des oiseaux migrateurs et hivernant (dont des canards, foulques et autres).
- Des poissons d'eau douce ainsi que de nombreux groupes de la faune intérieure.
- des herbivores et des insectes.

La faune recensée, reste insuffisante et ne représente qu'une fraction de la véritable richesse biologique du site.



*Oiseau d'eau*



*Civelles d'anguilles*



*Des herbivores*

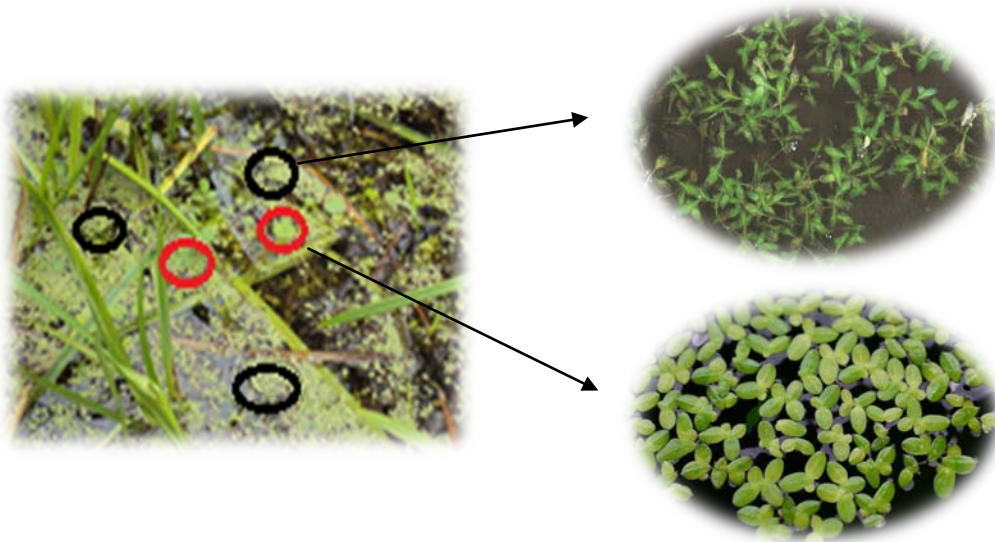
**Figure3** : La richesse faunistique observée au niveau de l'oued Messida (*Photos prises par BENHALIMA, 2013*)

- **La flore : (fig.4)**

Le lit de l'oued Messida est caractérisé par une organisation typique de végétation, sa superficie est encombrée d'herbiers flottants, d'hydrophytes courant le plan d'eau en partie.

La végétation aquatique est à dominance de :

*Lemna minor callitriche sp*, *Lemna trisulca*, *Nymphaea alba*, *Alisma plantago aquatica*,  
*Mille feuilles Myriophyllum spicatum*, *Typha angustifolia*, *Veronica sp*, *Cynodondactylon*.



○ *Lemna minor callitriche sp*

○ *Lemna trisulca*



*Mille feuilles Myriophyllum spicatum*

*Nymphaea alba**Alisma plantago aquatica*

**Figure 4** : La richesse floristique observée au niveau de l'oued Messida (*Photos prises par BENHALIMA, 2013*)

#### 4. Utilisation des eaux de l'oued Messida :

Les eaux de l'oued sont destinée à :

- L'agriculture est le premier secteur de consommation d'eau, notamment pour l'irrigation (au niveau de la pépinière du Tonga).
- Corridor biologique permette aux civelles d'anguilles de se déplacer de la mer vers le lac Tonga et vice versa.
- Ecosystème recèle une diversité biologique importante par la faune et la flore qu'elle abrite, ce qui lui confère un rôle de conservation important (reproduction, développement).
- Lieu où les animaux qui vivent aux alentours (vaches, chèvre, chevaux...) abreuvées.
- Offre un milieu favorable aux scientifiques et aux chercheurs qui engagent leurs recherches sur diverses problématiques liées aux milieux aquatiques.
- Place pour la chasse, la pêche, loisirs, et activités touristique.

#### 5. Pollutions au niveau d'oued Messida :

##### 5.1. Rejets des eaux usées :

Les eaux usées des localités fortement peuplé dans la région ; Malloul, Oumchtab, Souarakh et Tonga, sont totalement rejettent dans l'Oued El Eurg qui est directement lié avec Oued Messida.

D'autres localités : Maizilla, Oued El-Hout et El Aioun, rejettent les eaux usées au niveau du lac Tonga et atteignent ensuite Oued Messida.

### **5.2. La pollution agricole :**

Plusieurs activités humaines sont pratiquées dans le bassin versant du lac (la chasse, élevage et l'agriculture). Ces activités agissent directement ou indirectement et à degrés divers sur la structure, le fonctionnement et la délimitation de l'écosystème du bassin puisque elles sont responsables du rejet de nombreux polluants organiques et inorganiques dans les eaux de surface et souterraines.

La pollution causée par les activités de l'agriculture survient quand les cultures sont traitées en excès, dont les engrais et les pesticides représentent une menace pour la qualité des eaux s'ils sont appliqués en période de fort lessivage des sols ou évacués vers les cours d'eau (Bouchaala, 2010).

Dans la partie des terres basses, les plaines, près d'Oued Messida et autour du lac Tonga, l'élevage (élevage traditionnel incontrôlé) est complémentaire aux cultures, le troupeau est généralement constitué d'une douzaine ou une vingtaine de bovins qu'accompagnent fréquemment un nombre équivalent d'ovins ou de caprins et qui ne sont pas systématiquement destinés à la vente (Raachi, 2007). Les excréments des animaux, sont lessivés par les pluies, et peuvent être amenés à contaminer un point d'eau (Zeraoula, 2011).

### **5.3. Le trafic Routier :**

Le canal Messida est traversé dans sa partie amont par la route nationale N°44 ce qui a entraîné un risque de pollution de ces eaux par, les huiles moteurs, filtre à huile, liquide de frein, liquide de refroidissement, fluides de climatisation, et aussi par l'essence qui est riche en plomb. Il est important de signaler aussi que la circulation perturbe la faune riveraine et les migrations de plusieurs espèces telles que les oiseaux [6].

## **6. Caractéristiques climatiques :**

Le climat est certainement un facteur du milieu très important (Samraoui et al., 1998).

La zone d'étude est sous l'influence d'un climat subhumide, caractérisé par un hiver doux et humide et un été chaud et sec [7]. La forte humidité de la région est causée

par la forte évaporation de nombreuses zones humides et la proximité de la mer, ainsi que la richesse de la région en écosystèmes forestiers (Samraoui *et al.*, 1998).

Le régime pluviométrique est de type Méditerranéen [4]. Le niveau moyen de précipitations atteint 800 mm [7].

Par ailleurs, la pluviométrie forte généreuse de la zone d'étude permet non seulement l'entretien du couvert forestier, mais surtout le maintien du réseau hydrographique important existant au sein du Parc [7].

La température moyenne annuelle est de l'ordre de 18°C. Les mois les plus chauds sont Juillet et Août où la température moyenne oscille autour de 25°C. Les mois les plus froids sont décembre et janvier avec des températures moyennes de l'ordre de 12°C [7].

Les vents du Nord-Ouest sont prédominants, surtout en hiver, et leur stabilité depuis le quaternaire est attestée par l'orientation des dunes dans toute la Numidie (Samraoui *et al.*, 1998).



## I. La pollution des eaux :

### 1. Généralité :

Pour qu'un écosystème aquatique puisse se développer de façon équilibrée, il faut que la qualité de l'eau soit bonne. Dans le cas contraire, lorsque les qualités naturelles de l'eau sont dégradées et l'écosystème aquatique perturbé on parle de pollution de l'eau. La pollution d'eau est une altération qui rend son utilisation dangereuse et/ou perturbe l'écosystème aquatique. Elle peut concerner les eaux superficielles (rivières, plans d'eau) et/ou les eaux souterraines [8].

L'organisation des Nations Unies définit comme suit la pollution : « c'est l'introduction par l'homme dans le milieu marin ou dulçaquicole, directement ou indirectement, de substances ou d'énergies, ce qui entraîne des effets délétères tels que : dommage aux ressources biologiques, danger pour la santé humaine, entrave aux activités y compris la pêche, diminution de la qualité de l'eau du point de vue de son utilisation et réduction des possibilités offertes dans les domaines des loisirs (Ait Kaci et *al.*, 2008).

Plusieurs types de polluants peuvent être retrouvés dans les écosystèmes aquatiques, ils sont formés des rejets chimiques (solvants, nitrates, phosphates, détergents) des produits cosmétiques, et des substances pharmaceutiques (anti-inflammatoires, anti-cholestérol, antibiotiques, anticancéreux.....) [9].

Les polluants peuvent avoir comme origine principale l'activité humaine : les décharges de déchets domestiques, les industries, l'agriculture....

Elle se manifeste principalement dans les eaux de surface par :

- Une diminution de la teneur en oxygène dissous.
- La présence de produits toxiques.
- Une modification physique du milieu récepteur.
- La présence de bactérie ou virus dangereuse [8].



## 2. Différent types de pollution :

La pollution de l'eau est une dégradation physique, chimique ou biologique de ses qualités naturelles, provoquée par l'homme et par ses activités. Elle perturbe les conditions de vie et l'équilibre du milieu aquatique et compromet les utilisations de l'eau [10].

Il existe différents types de pollution :

- La pollution physique qui altère la transparence de l'eau par la présence de matières en suspension, elle peut être une pollution radioactive ou thermique proviennent du rejet de radio-isotopes ou ayant servi au refroidissement des centrales électriques et nucléaires. Les conséquences directes de ce rejet est l'élévation de la température des eaux ce qui modifie le taux d'oxygène, augmente l'activité cellulaire et la respiration de la biocénose, diminue la diversité du phytoplancton et peut provoquer la prolifération d'espèces thermophiles [10].
- La pollution chimique qui est due à des substances indésirables ou dangereuses d'origines diverses ; les déchets et les déversements industriels minéraux et organiques, qui peuvent être dégradables par les phénomènes biologique, chimique ou physique, ou non dégradables. Ces polluants provoquent de profonds déséquilibres chimiques ayant des effets biologiques.
- La pollution organique de l'eau, provenant des eaux usées domestiques et des industries agroalimentaires, provoquent une surconsommation d'oxygène et peut entraîner la mort de la vie aquatique.
- La pollution microbiologique qui désigne la présence des microorganismes: des bactéries (*Salmonella*, *Staphylococcus*, *vibrions...*), virus (virus de l'hépatite, entérovirus....), champignons (*Candida*, *Torula...*), protozoaires et les oeufs de parasites (*Ascaris*, *Tenia...*). Ces microorganismes sont à l'origine de contamination des milieux aquatiques, ils proviennent des eaux usées improprement traitées ou des eaux de ruissellement provenant d'installations d'élevage [11].

Dans la présente étude, nous nous intéressons par la pollution microbiologique

## 3. Facteurs favorisant la pollution microbiologique :

Plusieurs facteurs pouvant avoir une incidence sur les concentrations de microorganismes dans l'eau, à savoir :

- Les animaux sauvages, qui constituent un réservoir de bactéries ou de protozoaires pouvant infecter les humains ;
- Les variations de la turbidité ou de la composition chimique de l'eau, qui peuvent avoir une incidence sur les densités bactériennes ;
- La prolifération des algues, qui peut rendre les bactéries plus abondantes; etc.

Aujourd'hui il y a un autre facteur qui a un effet sur la présence et résistance de la flore bactérienne dans les milieux aquatiques : ce sont les antibiotiques.

L'utilisation excessive d'antibiotiques dans la production animale et en médecine humaine a conduit à l'apparition dans l'environnement, des taux élevés de bactéries résistants aux antibiotiques [12].

La présence de bactéries aquicoles résistantes aux antibiotiques, peut ne constituer pas un danger direct pour l'homme, car la majorité de cette flore n'est pas pathogène, c'est-à-dire qu'elle n'engendre aucune maladie. Le danger, c'est que ces gènes résistants soient communiqués à des bactéries pathogènes qu'il serait ensuite beaucoup plus difficile, voire impossible, de combattre.

Des transferts d'éléments génétiques résistants entre bactéries ont déjà été mis en lumière par des études précédentes [12].

Donc le scénario catastrophe consisterait pour une bactérie inoffensive mais multi-résistante à transmettre ses propriétés à une autre beaucoup plus dangereuse, comme le staphylocoque doré (bactérie virulente responsable de la plupart des infections nosocomiales).

Il n'y aurait plus alors d'antibiotique disponible pour le traiter et l'infection développée ne pourrait être guérie.

#### **4. Émergence des bactéries multi-résistantes dans les milieux aquatiques :**

L'utilisation excessive d'antibiotiques mène à la sélection de bactéries résistantes dans l'écosystème où ils sont utilisés. Le passage de bactéries ayant acquis une ou plusieurs résistances, ou le transfert de gènes de résistance, depuis le réservoir où s'exerce la pression de sélection par l'antibiotique, vers un autre réservoir tel que les milieux aquatiques, fait craindre la contamination d'autres animaux mais également de l'Homme par des bactéries multi-résistantes, avec la perspective de situations où toute antibiothérapie deviendrait inefficace (Bories et *al.*, 1998).

La sélection de ces bactéries résistantes aux antibiotiques pathogènes ou non pathogènes dans le tube digestif de l'animal et de l'homme, pouvant contaminer et/ou recontaminer les eaux, le problème général de ces bactéries c'est qu'elles persistent dans

l'eau. Les environnements naturels seraient donc des réservoirs favorisant le phénomène d'antibiorésistance et la diffusion des bactéries et l'échange de leurs gènes de résistance entre espèces différentes (homme, animal) (Berthe, 2003).

Plusieurs études ont confirmé la présence de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques ; dans le cadre du programme Seine-aval, il a déjà été montré la présence d'*E. coli* multirésistantes aux antibiotiques dans les eaux de l'estuaire de la Seine. Une étude de Koenraad *et al.* (1994), dans des eaux usées d'élevages, ont observé la présence de 30 % de *Campylobacter* résistants. Junco *et al.*, (2001) ont aussi observé une augmentation de la fréquence de bactéries résistantes dans les eaux de mer. Le phénomène concerne aussi les eaux souterraines (Mac Keon *et al.*, 1995), les eaux potables (Leclerc *et al.*, 1996) et même les eaux embouteillées (Massa *et al.*, 1995).

Dans les pays industrialisés, Albrich *et al.*, (2004) montrent une corrélation positive entre la quantité d'antibiotiques utilisés par habitant et le pourcentage de souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la pénicilline et aux macrolides. La France apparaît en tête des pays particulièrement concernés par rapport à ses voisins européens.

Dans des eaux potables, dès 1996, Leclerc *et al.*, (1996), montrent dans le Pas-de-Calais que 100% des *Aeromonas hydrophila* et 88% des *Klebsiella pneumoniae* résistent à l'ampicilline [12].

Plusieurs agents bactériens zoonotiques ont développé des résistances multiples, et sont devenus de plus en plus préoccupants à l'heure actuelle :

- **Les entérobactéries :**

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large : eau douce, sol, végétaux, animaux (insectes jusqu'à l'homme) et peuvent contaminer des denrées alimentaires. Certaines espèces sont responsables de diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites) (Zogheib *et al.*, 2005).

Elles sont généralement traitées par des bêtalactamines, donc les pénicillines, les céphalosporines à large spectre et les carbapénèmes (imipénem, méropénem, ertapénem), ou encore les fluoroquinolones. Au cours des deux dernières décennies, on observe une

augmentation importante de la résistance des entérobactéries à ces antibiotiques, en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* [13].

La propagation des entérobactéries résistantes aux antibiotiques est de plus en plus un problème de santé publique. Bien que les milieux hospitaliers et le secteur de la vente des aliments au détail sont reconnus de plus en plus comme des sources importantes de ces bactéries, on comprend moins bien encore l'importance de ces sources d'origine hydrique. De grandes quantités d'entérobactéries issues des matières fécales humaines et animales peuvent être rejetées dans les rivières et les lacs qui constituent les sources d'eau utilisées pour la consommation, les activités récréatives ou l'irrigation. Il est nécessaire de mieux comprendre la prévalence de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries et l'importance de leur présence dans les écosystèmes aquatiques [13].

- ***Escherichia coli* :**

*Escherichia coli* fait partie de la flore endogène des mammifères et des oiseaux. certaines souches pathogènes sont souvent associées, tant chez l'homme que chez les animaux, à des troubles digestifs (Caprioli *et al.*, 2005).

La première souche pathogène isolée était O157 : H7 en 1982 et depuis cette date *E. coli* continue à être impliquée dans les infections d'origine alimentaires et hydrique. Des souches multirésistantes sont devenues de plus en plus fréquentes (Trevejo *et al.*, 2005). La sélection d'*Escherichia coli* multirésistantes a été la conséquence de l'utilisation accrue d'antibiotiques à large spectre chez l'Homme et chez les animaux. Le développement de l'antibiorésistance chez *E. coli* crée des problèmes dus à leur propension élevée de disséminer leurs gènes d'antibiorésistance : il a été possible de "tracer" des plasmides de résistance transmis de *E. Coli* animaux à des entérobactéries humaines (Bories *et al.*, 1998).

- **Les salmonelles :**

Les oiseaux domestiques et sauvages, volaille en particulier, constituent un réservoir majeur de ces micro-organismes (Panin *et al.*, 2005). Ces bactéries peuvent se transmettre à l'homme par contact direct avec les animaux infectés ou par le biais de la consommation de leurs denrées ou l'eau contaminée (Trevejo *et al.*, 2005).

L'utilisation des antibiotiques chez les animaux mène à la sélection de sérotypes antibiorésistants de *Salmonella* non typhiques. L'antibiorésistance limite les choix

thérapeutiques aux vétérinaires comme aux médecins à l'encontre de formes cliniques de salmonelles non typhiques exigeants un traitement antibactérien (Trevejo *et al.*, 2005).

Récemment, des souches de *Salmonella typhimurium* de lysotype 104 (= DT104) comportant une résistance chromosomique à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et à la tétracycline (phénotype : ACSSuT) sont devenues de plus en plus fréquentes chez l'homme et même dans les milieux aquatiques en de nombreux pays du monde (Angleterre, Pays de Galles, Allemagne, U.S.A,...)

Dans ces pays, l'émergence et la propagation des isolats présentant une résistance supplémentaire à la ciprofloxacine, qui est actuellement le médicament de choix pour le traitement des salmonelloses humaines invasives, sont apparues après l'autorisation de commercialisation de l'enrofloxacin pour l'usage vétérinaire (Velge *et al.*, 2005).

- **Les Entérocoques :**

On les retrouvent souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (Clausen *et al.*, 1977). Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains, à des concentrations variant de 10<sup>5</sup> à 10<sup>8</sup> bactéries/g (Edberg *et al.*, 2000).

Quant aux streptocoques du groupe D susceptibles de contaminer les eaux d'approvisionnement, ils sont plutôt typiques des déjections animales, comme *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus* (Farrow *et al.*, 1984).

La persistance des entérocoques dans divers types d'eau peut être supérieure à celle des autres organismes indicateurs (OMS, 2000). notamment à cause de leur résistance notoire aux agents désinfectants (Haslay *et al.*, 1993).

Chez les animaux, la sélection d'entérocoques résistants à la vancomycine du fait de l'utilisation de l'avoparcine comme facteur de croissance, et la sélection d'entérocoques, surtout d'*Enterococcus faecium*, résistants aux streptogramines du fait de l'utilisation de la virginiamycine ont fait l'objet de nombreux travaux (Leclerc *et al.*, 1996).

La possibilité de transfert de ces souches résistantes des animaux à l'homme, via l'alimentation et l'eau ont été analysés et discutés. Bien qu'il n'est pas été mis en évidence de liens directs entre ces souches issues des animaux et les souches pathogènes responsables d'infections nosocomiales à l'hôpital, le transfert de gènes de résistances entre les différentes populations d'entérocoques ne peut pas être exclu (Sanders, 2005).

- **Les *Campylobacter* :**

Même si elle est probablement sous-estimée, l'incidence des infections intestinales par des bactéries du genre *Campylobacter* est actuellement très élevée. L'infection par *Campylobacter* est une zoonose alimentaire dont la transmission principale se fait par l'ingestion d'aliments et/ou eau contaminés (Gallay *et al.*, 2005).

Les déjections d'oiseaux aquatiques, l'écoulement d'eau venant de surfaces agricoles et, notamment, les eaux usées d'origine humaine (non épurées) peuvent contaminer les eaux de surface avec *Campylobacter*, les bactéries pouvant y survivre longtemps.

Une PCR quantitative menée dans 23 stations d'épuration de Suisse a mis en évidence *Campylobacter* dans 87,5 % des échantillons d'eaux usées non épurées et dans 64 % des échantillons d'eaux usées épurées [14].

Dans les échantillons contaminés, la concentration en germes s'élevait entre  $6,8 \times 10^4$  et  $2,3 \times 10^6$  cellules par litre dans les eaux non épurées et entre  $1,1 \times 10^4$  et  $2,8 \times 10^4$  cellules par litre dans les eaux épurées [14]. Ces résultats montrent qu'en Suisse aussi, les eaux usées d'origine humaine non épurées peuvent être fortement contaminées par *Campylobacter* et constituent donc une source potentielle d'agents pathogènes pouvant provoquer des maladies.

Les *Campylobacter* ont développé des résistances acquises à diverses familles d'antibiotiques d'intérêt thérapeutique chez l'homme, dont les fluoroquinolones (Lehours, 2005).

Une augmentation rapide du nombre de souches résistantes aux quinolones, a été constatée dans les pays européens, depuis le début des années 1990. En Europe, des enquêtes de type écologiques ont lié l'évolution de la résistance aux quinolones à l'augmentation de l'utilisation de ces antibiotiques en médecine vétérinaires. L'apparition rapide de souches résistantes a été mise en évidence chez les poulet recevant de quinolones en supplément nutritionnel (Gallay *et al.*, 2005).

L'utilisation dans l'alimentation animale, de dérivés proches des fluoroquinolones utilisés en clinique humaine comme l'enrofloxacin, a probablement exercé une pression de sélection chez des réservoirs animaux (Lehours, 2005). Après l'autorisation des fluoroquinolones pour l'usage vétérinaire dans la filière avicole, cela a été rapidement suivi d'une élévation importante de la prévalence de *Campylobacter jejuni*, fluoroquinolone-résistant, isolé des volailles vivantes et de leurs denrées et dans l'eau, ainsi que des humains infectés (Lehours, 2005).

## Impact de la pollution des eaux sur la santé :

### 1. Risques liés à la présence des bactéries pathogènes :

Les maladies transportées ou occasionnées par l'eau, comme la typhoïde, le choléra, la dysenterie furent, jusqu'à la fin du siècle dernier, responsables de graves épidémies qui dévastaient des régions entières (Guiraud, 1998).

Les maladies d'origine hydrique sont le plus souvent transmises par voie féco-orale et la contamination de l'homme se réalise alors soit par consommation d'aliments et/ou d'eau contaminés, ainsi par voie respiratoire soit lors d'un bain ou d'un contact avec des eaux à usage récréatif (Guiraud, 1998).

La baignade en eau polluée augmente le risque d'apparition de troubles de santé. Ce risque dépend du niveau de contamination de l'eau par des germes pathogènes, mais aussi de l'état de santé du baigneur lui-même et de ses pratiques (durée de la baignade, immersion de la tête) .ce contact produit des affections cutanéomuqueuses diverses (rhino-pharyngite, oculaires, otites, dermatoses...) Exemple : la baignade dans une eau contenant le staphylocoque doré peut causer plusieurs infections cutanées (furoncle, folliculite, impétigo, infection de plaie, panaris...) comme elle peut donner des otites, des sinusites, des conjonctivites, des gastro-entérites, et autres infections plus ou moins graves, avec risque de septicémie si la bactérie passe dans le sang [23].

L'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés et de produits de la mer infectés conduit fréquemment à des troubles gastro intestinal (gastro-entérites aigue inflammatoire). Ces infections sont dues à plusieurs espèces bactériennes tel que : *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, et *E. coli* entérohémorragique qui sont responsables respectivement du choléra, la typhoïde, et les diarrhées.

La contamination de l'homme se fait aussi par voie aérienne, par inhalation de gouttelettes d'eau d'un diamètre inférieur à 5µm contenant des baéties ( *legionella*, mycobacterie non tuberculose) en suspension dans l'air. Les principales maladies provoquées par cette voie: la légionellose causée par *Legionella*, infections pulmonaires provoqués par MNT (mycobacterie non tuberculose) [23].

## **2. Risques liés à la présence des bactéries multirésistantes :**

La présence des bactéries multirésistantes dans les eaux naturelles, constitue actuellement un problème majeur de la santé publique. Elles pourraient être à l'origine de différents problèmes dont les principaux :

- Risque de perturbation des traitements biologiques du fait d'une action sur les bactéries impliquées dans ces traitements ;
- Propagation des infections chroniques difficiles à traiter (la difficulté de l'antibiothérapie) ;
- Transformation des gènes de résistance à d'autres bactéries ;
- Perturbation de la population bactérienne intervenant dans le cycle des nutriments dans les eaux naturelles (Tamtam et *al.*, 2008).



Les analyses bactériologiques ont été réalisées au niveau de laboratoire de microbiologie de Département de Biologie à l'Université de Guelma et le laboratoire de la Direction de Santé et de Population de la wilaya de Guelma.

## **I. Matériel :**

L'ensemble des milieux de cultures, réactifs, instruments et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

## **II. Méthodes :**

### **1. Echantillonnage :**

#### **1.1. Présentation des points de prélèvement :**

Pour étudier la qualité bactériologique de l'eau de « Oued Messida », on a choisi trois points de prélèvement : P1, P2 et P3, de l'exutoire du lac Tonga à l'embouchure (Fig. 5 et 6).

Au niveau de ces points de prélèvement, trois campagnes d'échantillonnages ont été organisées durant trois mois successifs : Février, Mars et Avril 2014

#### **• Choix des points de prélèvement :**

Le choix des points d'échantillonnage a été effectué après avoir pris connaissance du terrain et de manière à être représentatifs des diverses activités pratiquées le long de l'oued et susceptibles d'altérer la qualité de l'eau.

##### **➤ Premier point de prélèvement :**

Ce point est situé à côté de la route nationale n° 44, près du lac Tonga qui est riche par un grand nombre d'espèces animales et végétales rares.

##### **➤ Deuxième point de prélèvement :**

On a choisi ce point en raison de sa proximité des zones de pâturage des bovins et des ovins de la région ; l'eau de cette zone est utilisée pour l'irrigation de la pépinière de Tonga.

➤ Troisième point de prélèvement :

Ce point est situé à la fin de l'oued et près de la mer Méditerranée ; c'est une zone de pêche et de baignade (la plage Messida).

Les coordonnées, les caractéristiques des trois points de prélèvement et le rythme d'échantillonnage des eaux de l'oued Messida sont résumés dans le tableau 2.



**Figure 5 :** Localisation des trois points de prélèvement (Google Earth, 2014).



**Premier point de prélèvement (P1)**



**Deuxième point de prélèvement (P2)**



**Troisième point de prélèvement (P3)**

**Figure 6 : Vue générale des points de prélèvement (photos prises par Benhalima, 2014)**

**Tableau 2** : Présentation des points de prélèvement et de rythme d'échantillonnage.

	Date de prélèvement		Heure de prélèvement	Caractéristiques
P1	Prélèvement 1	10-02-2014	14 :40h	Près de la route nationale N °44; près du lac Tonga (environ 100 m) <b>36°53'1.70"N</b> <b>8°31'47.03"E</b>
	Prélèvement 2	09-03-2014	12 :35h	
	Prélèvement 3	06-04-2014	14 :00h	
P2	Prélèvement 1	10-02-2014	15:10h	Près d'une zone de pâturage des bétails ; point d'irrigation <b>36°53'51.63"N</b> <b>8°31'8.61"E</b>
	Prélèvement 2	09-03-2014	12 :50h	
	Prélèvement 3	06-04-2014	14:20h	
P3	Prélèvement 1	10-02-2014	15 :30h	Près de la Méditerranée (environ 50 m) <b>36°54'26.91"N</b> <b>8°31'6.79"E</b>
	Prélèvement 2	09-03-2014	13:15h	
	Prélèvement 3	06-04-2014	14:45h	

### 1.2. Technique de prélèvement :

Le prélèvement de l'eau pour une analyse bactériologique doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuses, et il faut utiliser de préférence des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon à visse métallique (Derwich et *al.*, 2008).

Les techniques de prélèvement sont variables en fonction du but recherché et de la nature de l'eau à analyser (Rodier, 1996).

Dans notre cas, nous avons suivi la technique de prélèvement destinée aux eaux de surface, des flacons en verre de 250 ml stériles sont prolongés à une distance qui varie de 25 à 30 cm de la surface assez loin des bords, ainsi que des obstacles naturels.

Les flacons sont ouverts sous l'eau et immergés 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 (Rodier, 1996).



### 1.3. Transport et conservation des échantillons :

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.

Les analyses bactériologiques ont été débutées dans un délai maximal de 24 heures, après le recueil de l'échantillon (Rodier et *al.*, 2009).

## 2. Méthodes d'étude de la qualité bactériologique des eaux de l'oued Messida:

### 2.1. Dénombrement des germes totaux (GT): (Schéma01)

Les GT sont des micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance (après 24 h à 37°C). La technique de numération de ces microorganismes est effectuée après incorporation d'un volume déterminé d'échantillon ou de ces dilutions dans un milieu gélosé.

La présence en grande quantité de cette microflore totale aérobie mésophile n'est, a priori, aucune valeur indicative, par contre son évolution d'une manière importante, peut être représentative d'un apport contaminant (matières organiques par exemple) (Bouchaala, 2010).

#### Mode opératoire :

- A partir de l'échantillon mère nous réalisons une série de dilution décimale en reportant 1 ml de chaque échantillon dans 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ . Cette série de dilution sera utilisé pour toutes les recherches ultérieures.
- Dans des boites de Pétri vides, on met 1 ml d'un échantillon non dilué et de diverses dilutions décimales de cet échantillon ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , .....  $10^{-6}$ ).
- Compléter ensuite chacune des boites avec environ 20ml de gélose TGEA fondue et refroidie à 45°C.
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose sur une surface horizontale.
- Laisser solidifier les boites sur pailleasse.
- Incuber à 37°C pendant 24 h à 72 h (Labres et *al.*, 2006).

**Lecture :**

Les germes revivifiables se présentent sous forme de colonies lenticulaires poussant en masse (Labres et *al.*, 2006).

**Dénombrement :**

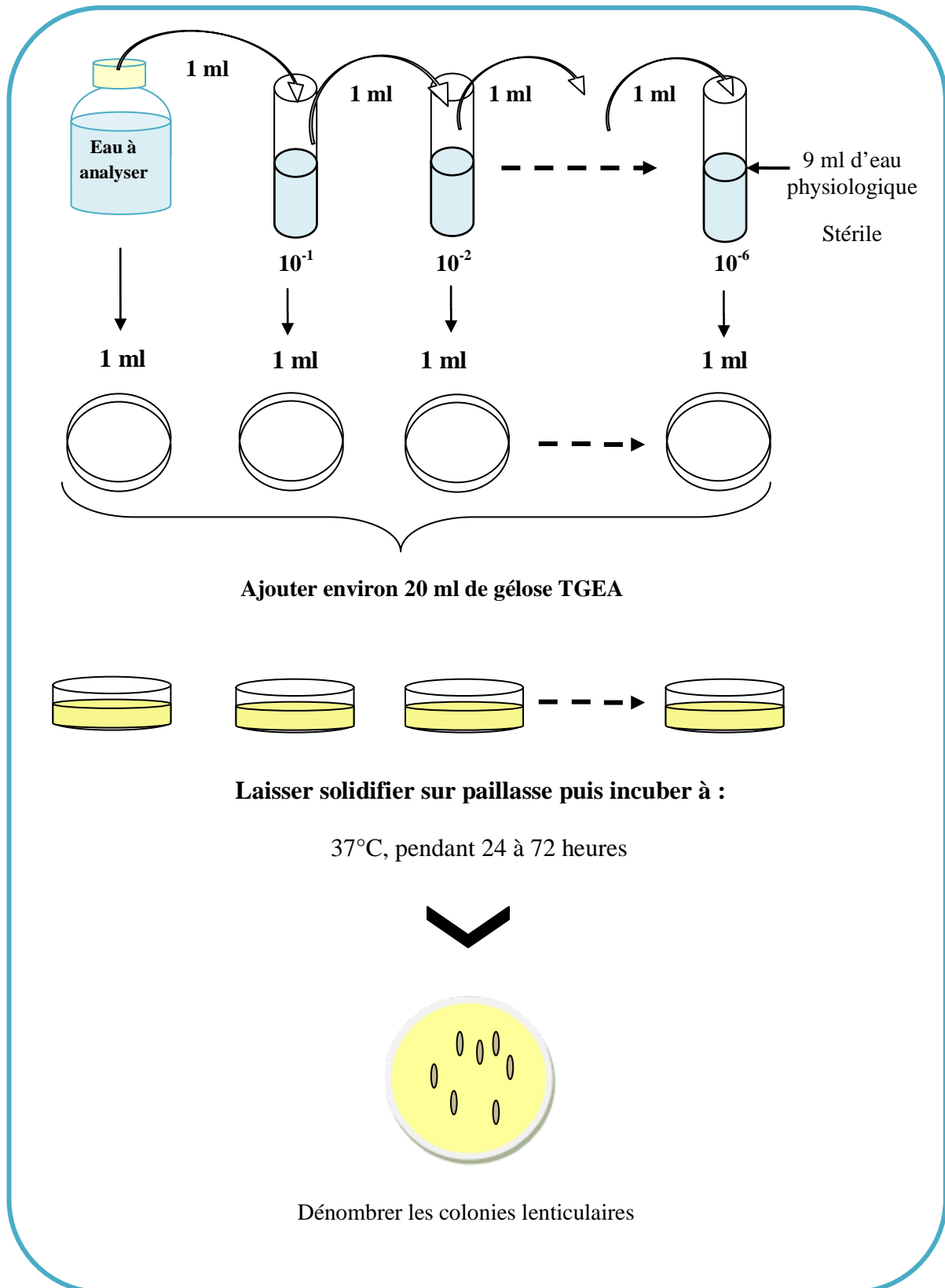
- Calculer la valeur du nombre **N** de microorganismes revivifiables à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum c}{1.1 \times d} \quad \text{où}$$

**$\Sigma c$**  : est la somme des colonies dénombrées sur deux boîtes de dilutions successives retenues.

**d** : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

- Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs après la virgule.
- Le résultat final de microorganismes revivifiables dénombrés à  $37^\circ\text{C}$  par ml d'eau est noté par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$  où x est la puissance appropriée de 10.
- Le nombre de colonies dénombrées est ensuite ramené au nombre de microorganisme présents dans 1 ml, en suite au nombre de microorganisme dans 100 ml d'eau (Rodier, 1996).



**Schéma 01:** Technique de dénombrement des germes totaux (Labres et *al.*, 2006).

## 2.2. Recherche et dénombrement des bactéries tests de contamination fécale :

### 2.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT) et des coliformes fécaux (CF) : (Schéma02)

Les coliformes font partie des entérobactéries, ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, oxydase «-», aérobies ou anaérobies facultatifs, ils fermentent le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à une température de 35 à 37°C (Dellarras, 2003).

Les coliformes fécaux ou thermotolérants ont les mêmes propriétés que les coliformes mais à une température de 44°C. L'espèce la plus importante de ce groupe est *Escherichia coli* qui a la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à  $42 \pm 2^\circ\text{C}$  (Labres et al., 2008).

La recherche et le dénombrement des coliformes ont été réalisées selon la technique du NPP (Nombre le Plus Probable), c'est une technique réalisée en milieu liquide, elle fait appel à deux tests consécutifs à savoir (Dellarras et al., 2008).

- ❖ Le test de présomption : réservé à la recherche des coliformes totaux.
- ❖ Le test de confirmation : encore appelé test de Mac Kenzie est réservé à la recherche d'*E.coli* avec confirmation de la présence des coliformes totaux et les coliformes thermotolérants.

#### ❖ Test présomptif :

#### Technique :

- Préparer une série de tubes contenant le milieu BCPL (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol) simple concentration qui est un milieu liquide avec cloche de Durham (Dellarras et al., 2008).
- A partir des dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-6}$ ) de l'eau à analyser de chaque point porter aseptiquement 1 ml, dans chacun des 3 tubes de BCPL à partir de la même dilution.
- Incuber à 37°C pendant 24 h à 48 h (Dellarras et al., 2008).

#### Lecture :

Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).



- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui signifie la fermentation du lactose présent dans le milieu) (Dellarras et *al.*, 2008).

#### **Dénombrement :**

Nous notons le nombre de tubes positifs dans chaque série, puis nous reportons à la table de Mac Grady (voir Annexe II) pour déterminer le nombre de coliformes présents dans 1ml ensuite dans 100 ml d'eau.

#### **❖ Test confirmatif :**

Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie est basé sur la recherche de Coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli* (Dellarras et *al.*, 2008).

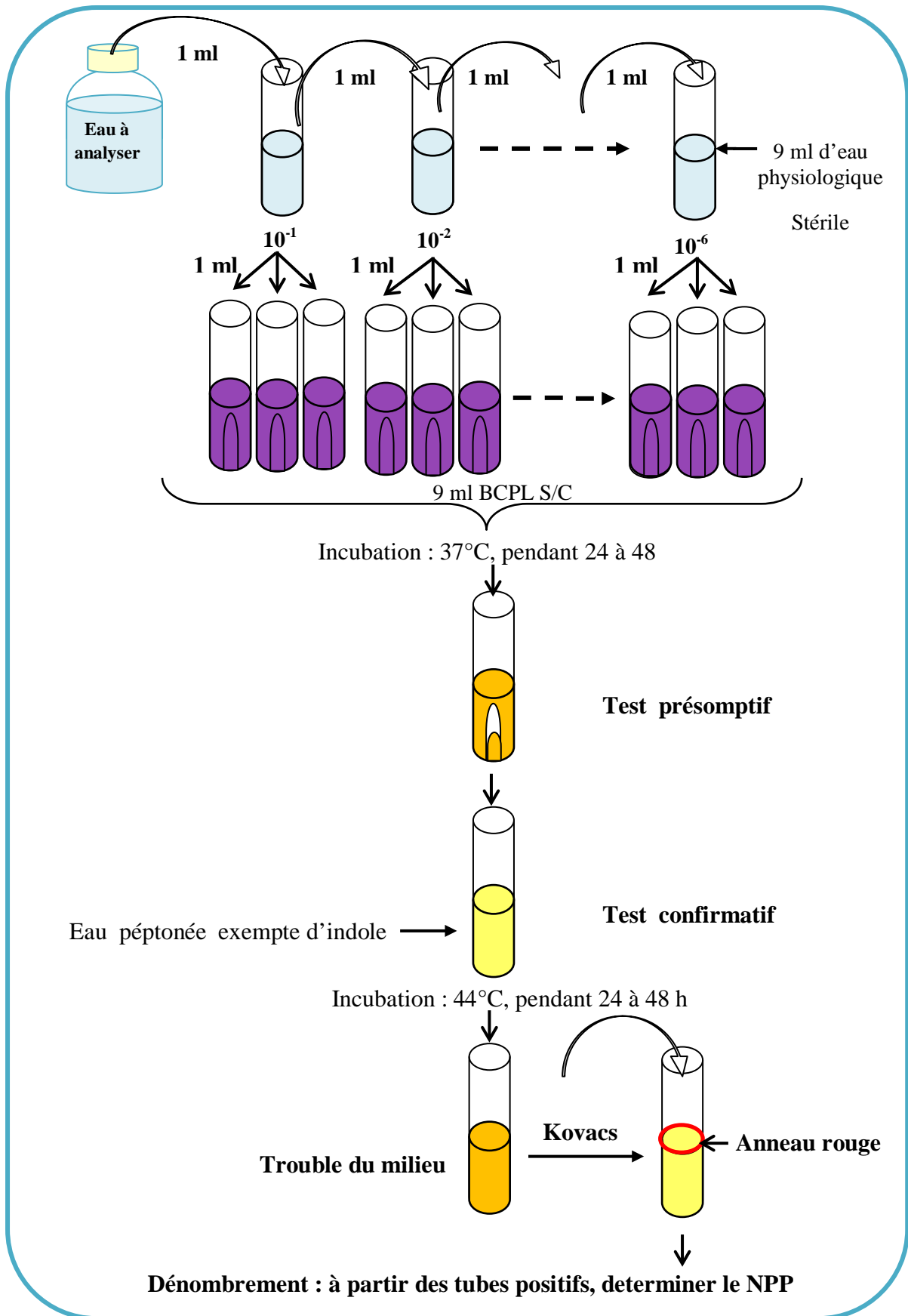
#### **Technique :**

- Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'un öse bouclé dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham ou un tube d'eau peptonée exempte d'indole.
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- L'incubation se fait cette fois-ci à 44°C pendant 24h à 48h (Dellarras et *al.*, 2008).

#### **Lecture :**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant :

- Un dégagement gazeux, et un trouble dans le tube de l'eau peptonée exempte d'indole.
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs dans le tube de l'eau peptonée exempte d'indole.
- La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady pour déterminer le NPP d'*E.Coli* présents dans 1ml ensuite dans 100 ml d'eau (Dellarras et *al.*, 2008).



**Schéma 02:** Recherche et dénombrement des CT et des CF (Dellarras et al., 2008).

### 2.2.2. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux(SF): (Schéma03)

❖ Les streptocoques se caractérisent par leur morphologie (coques en chainettes), Gram positif, et un métabolisme anaérobie (Degremont, 2005).

La recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux sont réalisées selon la technique de colimétrie en milieu liquide.

Les milieux utilisés sont :

❖ Le milieu de ROTHE (pour le test présomptif) qui contient comme agent sélectif l'azide de sodium (inhibiteur de la flore secondaire Gram négatif).

❖ Le milieu d'Eva-Litsky (pour le test confirmatif) qui renferme en plus de l'azide de sodium une faible concentration de cristal violet qui freine le développement des bactéries Gram positif (Degremont, 2005).

#### ❖ Test présomptif :

##### Technique :

- Préparer une série de tubes contenant le milieu ROTHE simple concentration.
- A partir des dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-6}$ ) de l'eau à analyser, porter aseptiquement 1 ml, dans chacun des 3 tubes de ROTHE à partir de la même dilution.
- Incuber à 37°C pendant 24 h à 48 h (Larpent, 1997).

##### Lecture :

- Les tubes présentant un trouble microbien lors de la période d'incubation seront susceptibles de contenir des streptocoques fécaux ; doivent subir un test confirmatif (Larpent, 1997).

#### ❖ Test confirmatif :

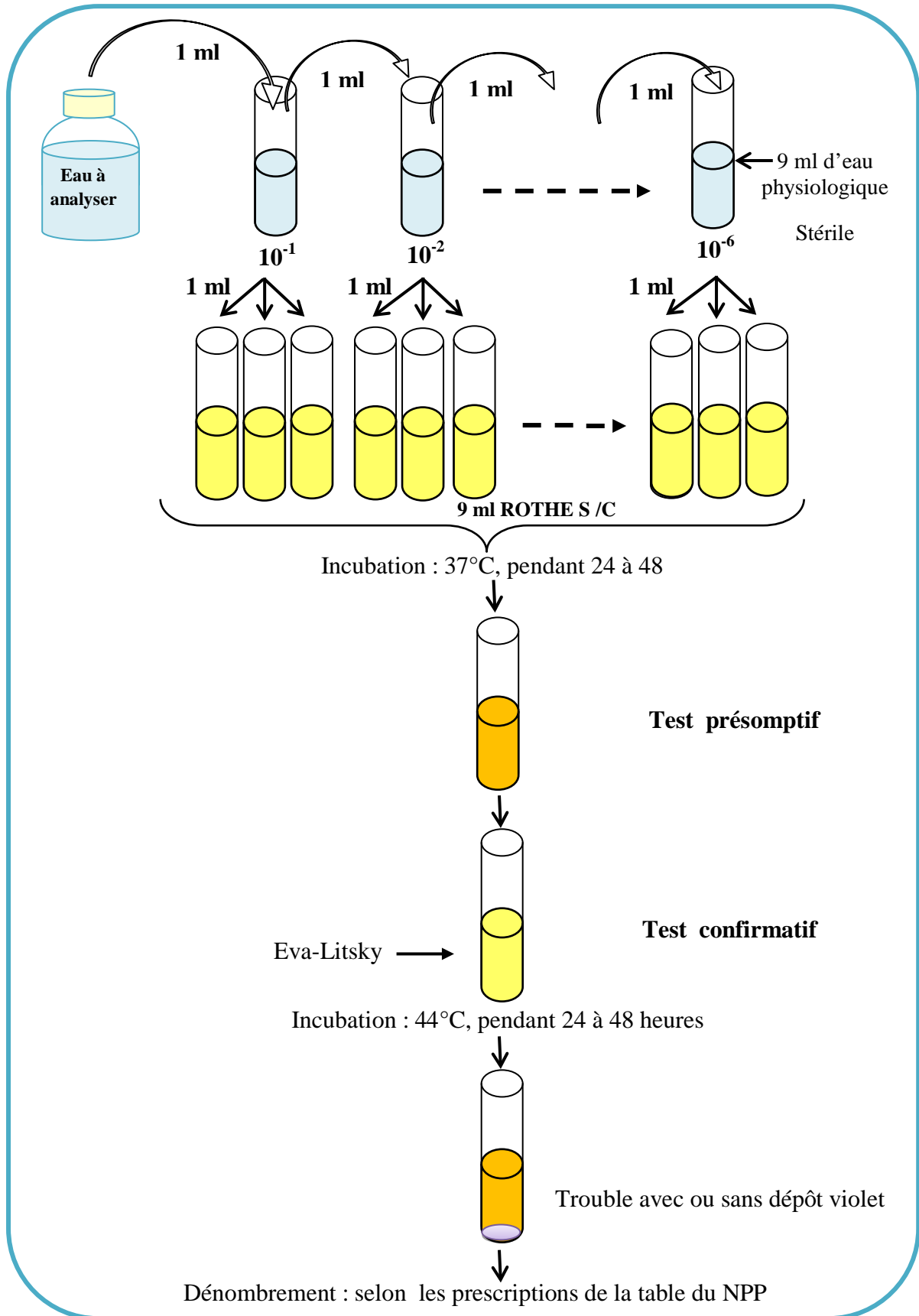
##### Technique :

- Les tubes de ROTHE trouvés positifs dans le test de présomption feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'un öse bouclé dans des tubes contenant le milieu Eva-Litsky.
- L'incubation se fait à 44°C, pendant 24 h à 48 h (Larpent, 1997).

**Lecture :**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant :

- Un trouble microbien, qui confirme la présence de streptocoques fécaux, parfois la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes (Larpen, 1997).
- La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP.



**Schéma 03:** Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (Larpent, 1997).

### 2.2.3. Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) : (Schéma04)

Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) se présentent sous forme de bactérie à Gram positif, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande-Foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de fer ( $\text{Fe}^{+2}$ ) qui donne  $\text{FeS}$  (sulfure de Fer) de couleur noir. Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne (Labres et *al.*, 2008).

#### Mode opératoire :

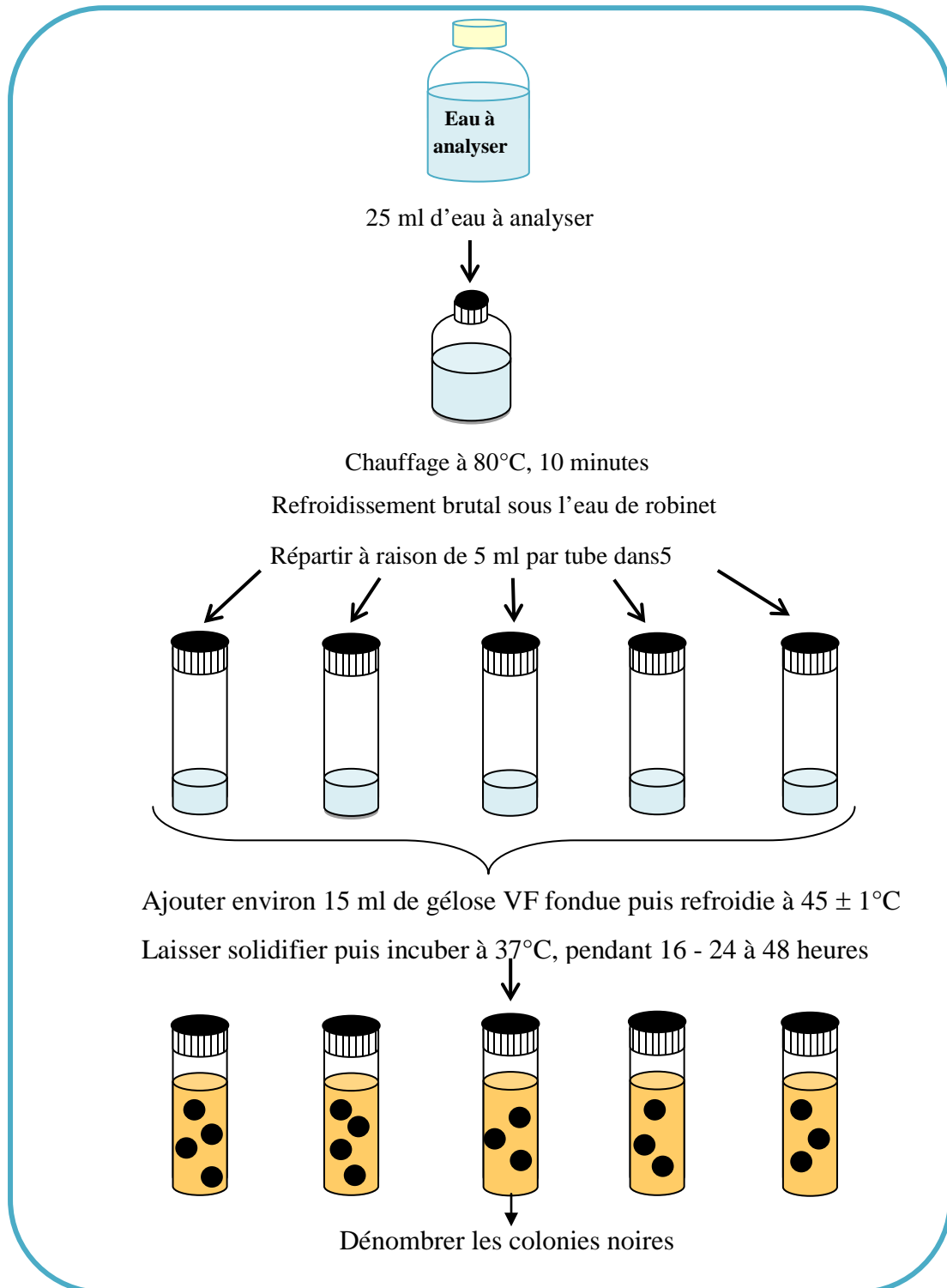
A partir de l'eau à analyser :

- Transférer environ 25 ml dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre à  $80^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives de bactéries anaérobies sulfito-réductrices éventuellement présentes.
- Après chauffage, refroidir immédiatement le flacon destiné à l'analyse, sous l'eau de robinet (Dellarras et *al.*, 2008).
- Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 5 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube.
- Ajouter environ 20 ml de gélose Viande- Foie, fondus puis refroidie à  $45\pm 1^\circ\text{C}$ , additionnée d'une ampoule d'Alun de fer (4 gouttes) et d'une ampoule de sulfite de sodium (0,5 ml) (Dellarras et *al.*, 2008).
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air et de l'oxygène.
- Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes environ, puis incuber à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 24 à 48 heures (Dellarras et *al.*, 2008).

#### Lecture et interprétation :

- Considérer comme résultant d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie entourée d'un halo noir.
- La première lecture doit absolument être faite à 16 heures car très souvent les spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont envahissantes auquel cas on se trouvera en face d'un tube complètement noir.
- La deuxième lecture se fera à 24 heures et la troisième et dernière à 48 heures.

- Dénombrer toute colonie noire de 0.5 mm de diamètre, ayant poussé en masse et rapporter le nombre total des colonies dans les 5 tubes à 25 ml d'eau à analyser (Dellarras et al., 2008).



**Schéma 04** : Recherche et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (Dellarras et al., 2008).

### 3. Recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de l'oued Messida :

La recherche des bactéries résistantes aux antibiotiques nécessite l'application de l'antibiogramme qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*, mais cette étape ne peut être réalisée qu'après identification précise des souches bactériennes (Amhis et *al.*, 2005).

#### 3.1. Isolement et identification de la flore bactérienne:

##### 3.1.1. Entérobactéries :

###### a- Isolement : (schéma05)

###### ❖ *Pré Enrichissement :*

Cette étape a été réalisée uniquement pour la recherche des Salmonelles et Shigelles.

Le pré-enrichissement s'effectue sur le milieu d'eau péptonée 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 (Larpen, 1997).

###### ❖ *Enrichissement:*

- A partir du milieu de pré-enrichissement, nous ensemencions 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 (Larpen, 1997).

###### ❖ *Isolement (proprement dite):*

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 biliaires (sélection des Entérobactéries) (Larpen, 1997).

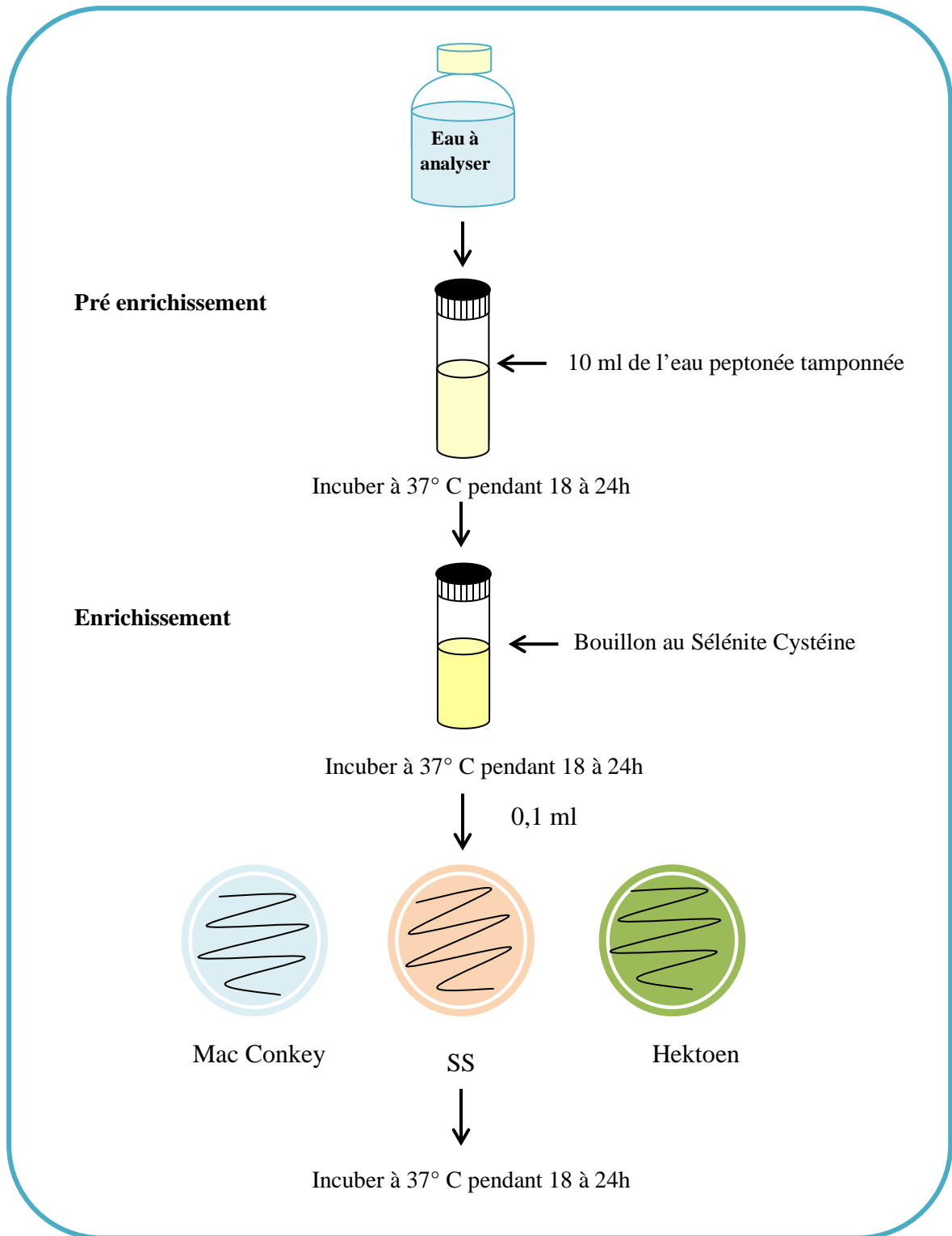
- La gélose Hektoen : c'est le milieu de choix pour l'isolement des Entérobactéries pathogènes. Ce milieu permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce



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 biliaires 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 ont étéensemencés 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 05** : Isolement des Entérobactéries pathogènes (Larpent, 1997).

**b- Identification :****➤ Examen macroscopique :**

À l'œil nu, on peut 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 (Light foot Nigel Francis, 2002).

L'aspect des colonies suspectes des entérobactéries sur chaque milieu de culture utilisé est représenté dans le tableau suivant :

**Tableau 03 :** Aspects cultureux des Entérobactéries sur les milieux sélectifs

(Rodier et *al.*, 2005).

Milieu d'isolement	Micro-organismes	Colonies
<b>Mac Conkey</b>	- <i>E. coli</i> . - <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> et autres. - <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> .	-Grandes, rouges. -Incolores, transparentes. -Grandes Roses, visqueuses.
<b>Hektoen</b>	- <i>E.coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Arizona</i> . - <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> . - <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> . - <i>Shigella</i> , <i>Providentia</i> , <i>Proteus morgani</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S négatif.	- jaunes saumon. - jaunes saumon à centre noir -bleues ou vertes à centre noir - blanchâtres ou vertes
<b>SS</b>	- <i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S(+), <i>Proteus vulgaris</i> Et <i>mirabilis</i> - <i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S(-), <i>Shigella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus morgani</i> - <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Providencia</i>	- incolores à centre noir -incolores transparentes -des colonies à centre orangé

➤ **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 (Light foot Nigel Francis, 2002).

**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 (Light foot Nigel Francis, 2002).

• **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, 2005).

**Principe :**

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

**-Préparation d'un frottis bactérien**, on prélève la colonie bactérienne à identifier, et on l'étale sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis on la fixe 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.

**-Mordantage**, traité durant une minute par la solution de Lugol et lavé à l'eau.

**-Décoloration**, en traitant avec l'alcool, C'est une étape critique, on fait 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**, on soumet 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 feuille de papier buvard propre.

**-Examiner le frottis**, a immersion à l'objectif  $\times 100$  (Joffin et *al.*, 2003).

**Lecture :**

Les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatif sont bien colorées en rose.

➤ **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 des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthylparaphénylène diamine.

**Technique :**

- Déposer un disque pré-imprégné par le Réactif N diméthylparaphénylène 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 (Light foot Nigel Francis, 2002).

**Lecture :**

- Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif.
- Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif (Light foot Nigel Francis, 2002).

- **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 catalyse la Réduction des nitrates en Nitrites suivant la Réaction suivante : (Dellarras, 2000)

**Techniques :**

- 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) (Dellarras, 2000).

**Lecture :**

Elle est immédiate.

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites.

Donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat Nitrate Réductase (+).

- Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de 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 possédait pas cette enzyme. Résultat NR(-).

▪ Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR (+)(Dellarras,2000).

### ➤ 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 (Bio Merieux) pour d'autres souches.

#### • Galerie biochimique classique :

Les tests biochimiques qui ont été effectuée dans notre étude sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 04:** Tests biochimiques utilisés pour l'identification des entérobactéries.

Test	But	Technique/ Lecture	Référence
<b>Fermentation des sucres avec ou sans gaz + Production d'H<sub>2</sub>S.</b>	-Utilisation du glucose, sccharose 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 pique.  -Après 24H à 37°C, la pente jaune= fermentation du glucose ; culot jaune= fermentation du lactose ; noircissement= H <sub>2</sub> S+, bulles gazeuses= production du gaz	Dellarras,2000
<b>Citrate de Simmons</b>	-utilisation du citrate comme seule source de carbone.	-la pente du milieu Citrate de Simmons est ensemencée par une strie longitudinale.  -mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.  -Virage de la couleur du milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : résultat positive, la bactérie utilise le citrate.	Dellarras,2000
<b>VP (voges Proskauer)</b>	- La production de l'acétoïne	Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs. -Incuber à 37°C pendant 24h.  <b>Après culture :</b> Ajouter 2 à 3 gouttes de VPI (alpha naphтол) et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VPII (une solution de soude) : -Milieu rouge : VP(+) -Milieu jaune : VP(-)	Dellarras,2003

## Suite du Tableau 04 :

<b>RM (rouge de méthyle)</b>	Mise en évidence de la voie des fermentations acides mixtes	<p>-Ensemencer largement le milieu Clark et Lubs.</p> <p>-Incuber à 37°C pendant 48 h.</p> <p>-Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle.</p> <p>-La lecture est immédiate :</p> <p>-Milieu rouge : <b>RM (+)</b></p> <p>-Milieu jaune : <b>RM(-)</b></p>	Dellarras,2003
<b>Mannitol mobilité</b>	-Dégradation du mannitol La mobilité	<p>-Ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit.</p> <p>-Incuber à 37° C pendant 24 h</p> <p>-Caractère mannitol : Apparition de couleur jaune.</p> <p>-La mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle (formation d'un voile autour de la piqure).</p>	Guiraud, 2003
<b>Urée Indole</b>	-Uréase  -Formation d'indole	<p>-Faire une suspension en milieu Urée-indole.</p> <p>- Incuber à 37° C pendant 24h.</p> <p>-Uréase(+): Apparition de couleur rose</p> <p>-Indole(+): Après l'ajout du réactif de Kovacs, apparition d'un anneau rouge à la surface.</p>	Dellarras,2003
<b>TDA</b>	-Le tryptophane désaminase (TDA).	<p>-Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane</p> <p>-Incuber à 37°C pendant 24 h.</p> <p>-Obtention d'un précipité brun foncé signifie que le test est positif.</p>	Dellarras,2003
<b>ONPG</b>	$\beta$ -galactosidase	<p>-Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.</p> <p>-Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.</p> <p>-incuber 30 min à 37°C</p> <p>-virage de couleur du milieu au jaune : ONPG (+)</p>	Dellarras,2003

- **Galerie biochimique miniaturisé API 20E :**

**Principe :**

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.



Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture (Voir Annexe II) et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification [15].

### **Technique :**

#### **Préparation de la galerie :**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau 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, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

#### **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 [15].

#### **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 mn, une couleur rose-rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : Réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- Test IND : Réactif de Kovacs, attendre 2 mn, Anneau rouge.
- Test NO<sub>2</sub>: NIT I + NIT II, attendre 2-3 mn, une couleur rouge

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 ou4) est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre 7 chiffres qui sert de code d'identification (Guiraud, 2003).

Le code numérique obtenu permet d'identifier la souche étudiée en se référant au catalogue analytique, soit avec un logiciel d'identification.

### 3.1.2. *Vibrions cholériques* : (Schéma06)

Les *Vibrions* se présentent sous forme de Bacilles Gram Négatifs droits ou incurvés, très mobiles, possédant une oxydase, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S.

#### a- Isolement :

- **Enrichissement :**

- Ajouter 1 ml de l'eau à analyser dans un tube de 10 ml de l'eau peptonée alcaline (EPA : milieu d'enrichissement)

- Incuber à 37° C pendant 3 heures.

- Après incubation, prélever en surface une anse de culture et ensemercer un autre tube contenant 10 ml E.P.A.

- Incuber à 37°C pendant 3 heures.

- Procéder à un troisième ensemercement de même type si les possibilités d'horaires le permettent (Dellarras, 2000).

- **Isolement (proprement dite):**

- Ensemercer une boîte de GNAB ou GN à pH=8 à partir du dernier milieu d'enrichissement.

- Incuber à 37° C pendant 24 h (Dellarras, 2000).

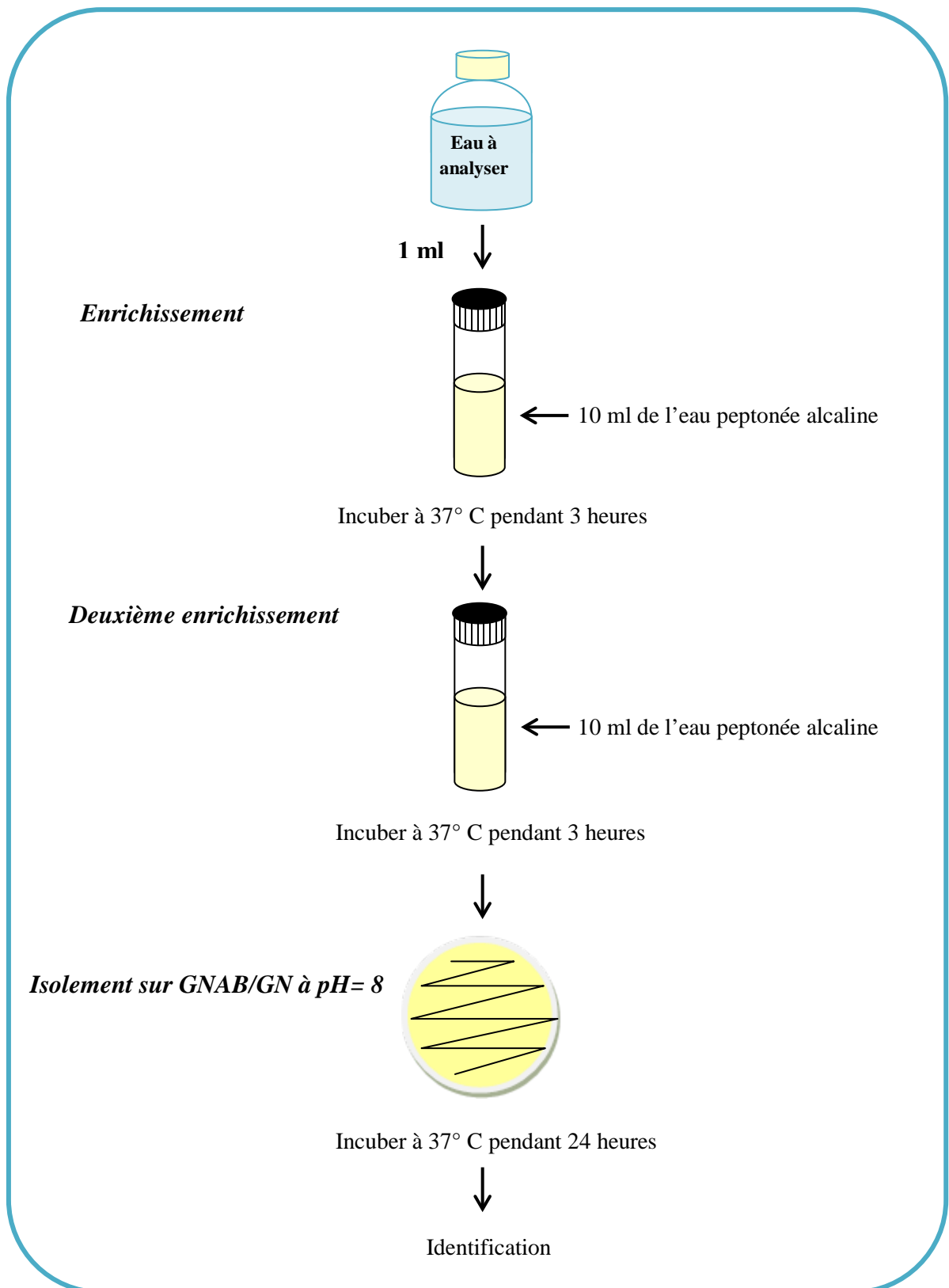
#### b- Identification :

- **Aspect macroscopique :** Les *Vibrions* se présentent le plus souvent sous forme de grosse colonies lisses et transparentes caractéristique sur la gélose ensemercé (Dellarras, 2000).

- **Aspect microscopique :** Etat frais (bacilles, mobiles), et Coloration de Gram (bacilles Gram négatifs).

- **Test oxydase :** les *vibrions* sont Oxydase (+).

- **Tests biochimiques :** classiques ou de préférence une API20E (comme déjà citer pour les entérobactéries) (Dellarras, 2000).



**Schéma 06** : Recherche des *Vibrions cholériques* (Dellarras, 2000).

### 3.1.3. *Pseudomonas* : (schéma 07)

#### a- Isolement :

Lorsque le germe *Pseudomonas* a la capacité de se cultiver très facilement sur un milieu ordinaire à cause de leur faible exigence nutritive, son isolement a été réalisé sur GN ordinaire. L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h (Dellarras, 2000).

#### b-Identification :

- **Examen macroscopique** : Sur GN, les colonies de *Pseudomonas* apparaissent souvent de grandes tailles (1-3mm), à bord irréguliers, lisses régulières et bombées (elles sont souvent pigmentées en vert du fait de la production des pigments) (Dellarras, 2000).

- **Examen microscopique** : état frais (mobile grâce à des flagelles polaires) et coloration de Gram (bacille à Gram négatif).

- **Recherche de l'oxydase** : les *Pseudomonas* sont oxydase positif.

- **Tests biochimiques** : par galerie classique ou API 20NE (selon la disponibilité) (Dellarras, 2000).

- **Recherche de la pyoverdine et la pyocyanine** :

#### *Technique* :

- A partir d'une culture sur GN (faire une suspension en eau distillée stérile), ensemercer deux milieux gélosés : King A et King B.

Le milieu King A est destiné à favoriser sélectivement la synthèse de la pyocyanine (pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique).

Le milieu King B est destiné à favoriser la synthèse du pigment jaune-vert fluorescent (pyoverdine) par le bacille pyocyanique et divers autres *Pseudomonas*. Exemple : *Pseudomonas fluorescens*.

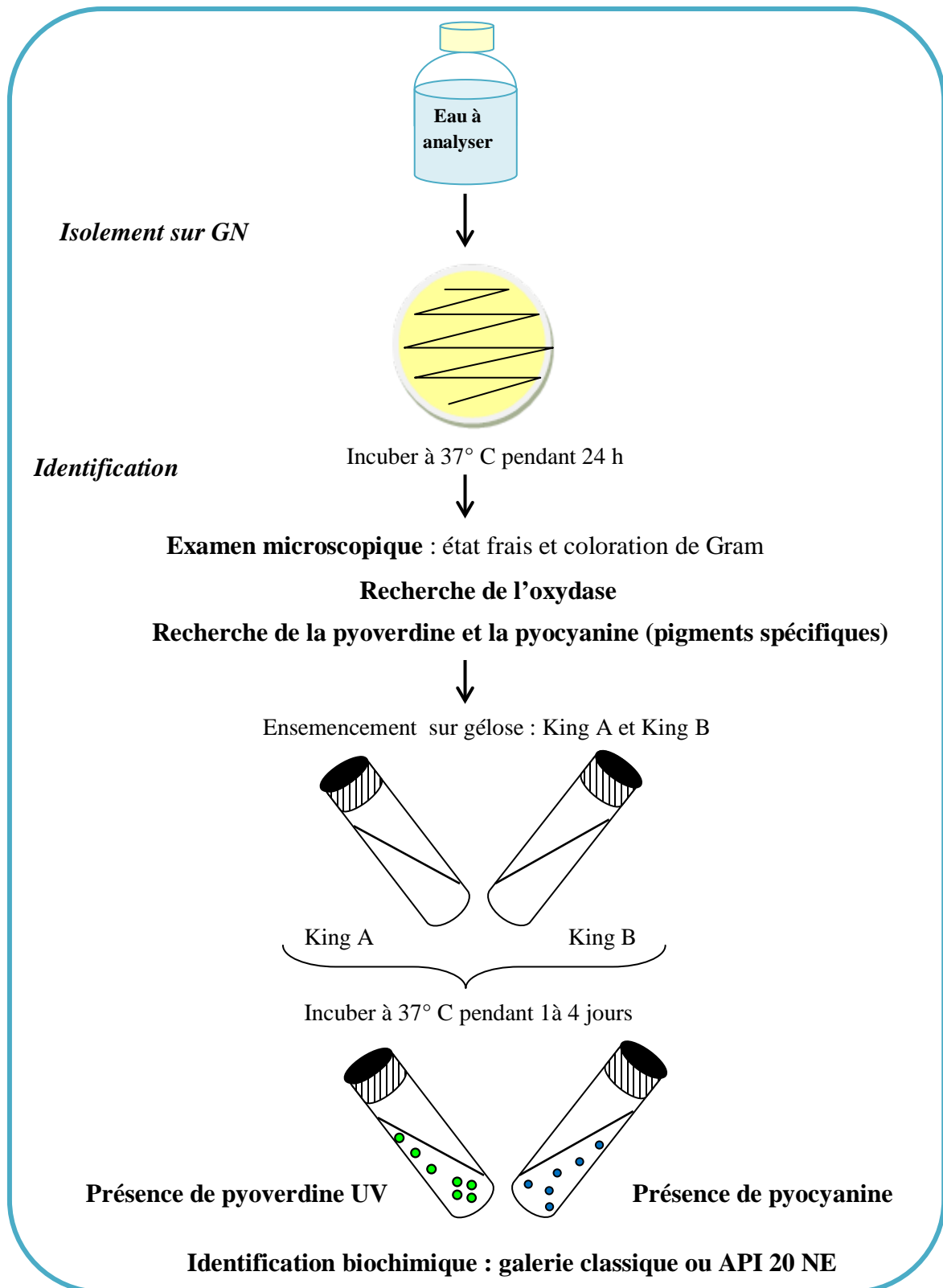
- Les milieux sont inoculés par une strie médiane.
- L'incubation se fait à 37° C pendant 1 à 4 jours (Dellarras, 2000).

#### *Lecture* :

- Couleur bleue sur le milieu King A : présence de pyocyanine.
- Couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu King B sous UV : présence de pyoverdine (Dellarras, 2000).

**Remarque** : En cas de doute pour la production de la pyocyanine, verser 0.5 ml de chloroforme à la surface de la culture sur le King A et laisser les tubes inclinés pendant 10

à 15 minutes. La pyocyanine est soluble dans le chloroforme coloré celui-ci en bleu (Rodier et *al.*, 2005).



**Schéma 07** : Isolement et identification de *Pseudomonas* (Dellarras, 2000).

### 3.1.4. Staphylocoques pathogènes : (schéma 8)

Ce sont des coques à Gram positifs, immobile, en générale groupés en amas dans un plan irrégulier, mais on peut les rencontrer également sous forme de diplocoques, en tétrades, ou en courtes chainettes (Tableau 05).

#### a-Isolement :

- L'isolement sélectif des Staphylocoques a été réalisé sur la gélose Chapman qui contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl.
- L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation.

On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies (Rodier, 1996).

#### b-Identification :

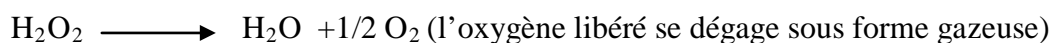
➤ **Examen macroscopique :** les colonies pigmentées en jaunes et entourées d'une auréole jaune : forte suspicion de *Staphylococcus aureus*. Les autres espèces de Staphylocoques donnent généralement des colonies plus petites, rosées et n'entraîne pas de virage du milieu (Rodier, 1996).

➤ **Examen microscopique :** Ce sont des cocci Gram positive, regroupés en amas (grappe de raisin).

➤ **Recherche de la catalase :**

#### Principe :

Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et le dégrade selon la Réaction suivante :



Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram + (Rodier, 1996).

**Techniques :**

- 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 (Rodier, 1996).

**Lecture :**

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses: test catalase est positif.
- Pas de dégagement de bulles gazeuses: test catalase est négatif (Rodier, 1996).

**➤ Recherche de la Staphylocoagulase :**

La recherche de la Staphylocoagulase in vitro est mise en évidence par la capacité de cette enzyme à coaguler le plasma de lapin dans un délai de 24 h (Rodier, 1996).

Cette recherche constitue un critère taxonomique important pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* (Rodier, 1996).

**Techniques :**

- Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma de lapin (ou de l'homme) + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon nutritif de la souche à étudier.
- Placer le mélange à 37°C.
- Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures (Rodier, 1996).

**Lecture :**

- Coagulation du plasma : test Coagulase est positif : la souche est *Staphylococcus aureus*.
- Pas de coagulation du plasma : test Coagulase est négatif : la souche n'est pas une *S. aureus* (Rodier, 1996).

En se basant sur les tests : coagulase, catalase et le mannitol, nous pouvons différencier entre les espèces du genre *Staphylococcus* selon le tableau suivant :

**Tableau 05:** Tableau d'identification des staphylocoques [16].

<i>Staphylocoques</i>	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>epidermidis</i>	<i>saprophyticus</i>
<b>Catalase</b>	+	+	+	+
<b>Coagulase</b>	+	-	-	-
<b>Mannitol</b>	+	-	+/-	+

➤ **Etude des caractères biochimiques par la galerie API Staph :**

**Principe et mode opératoire :**

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.

**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 [16].

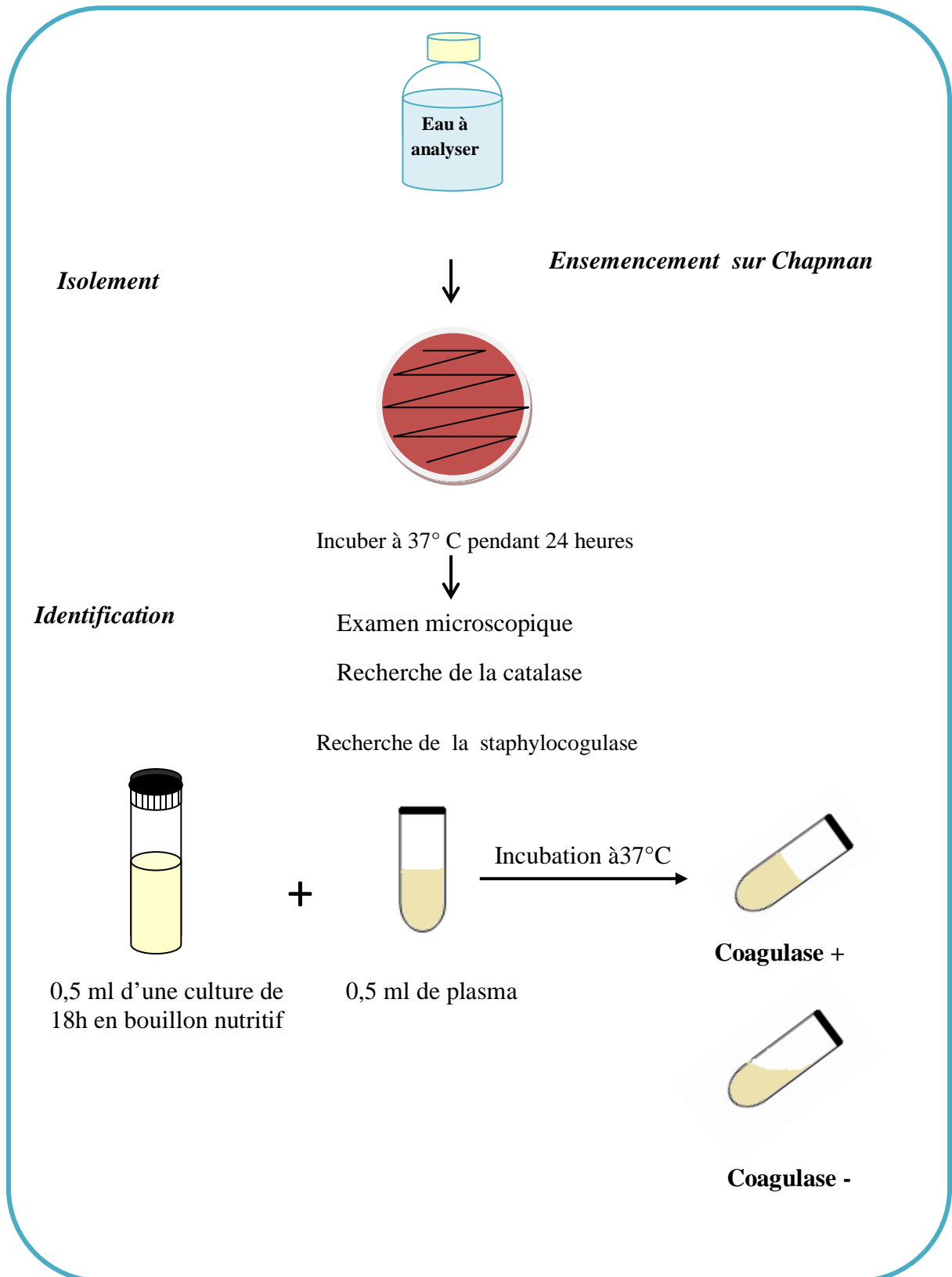
**Lecture :**

- Après incubation, 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 (Annexe II) [16].

**Identification :**

L'identification des espèces est réalisée de la même manière que la galerie API 20E.





**Schéma 08** : Recherche des Staphylocoques pathogènes.

### 3.1.5. Les streptocoques:

Les streptocoques sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Ils sont considérés comme un bon indicateur spécifique de la contamination fécale (Bouchaala, 2010).

Néanmoins les streptocoques du groupe D sont parfois à l'origine de septicémie et d'endocardite (infection et inflammation de la paroi de l'intérieur du cœur). Ils peuvent également être responsables d'infections urinaires qui, le plus souvent, sont résistantes aux antibiotiques.

#### **a-Isolement :**

Dans notre étude, nous avons isolé les streptocoques à partir du milieu Eva-Litsky utilisé dans le dénombrement de ce groupe lorsque nous avons étudié la qualité bactériologique (précisément la contamination fécale) des eaux de l'oued Messida (voir méthode 2.2.2). Les cultures positives (dépôt violet sur Eva-Litsky) sont repiquées sur la gélose nutritive.

#### **b-Identification :**

➤ **Aspect microscopique :** Sont des coques Gram positifs ronds ou ovoïdes, groupés en chaînettes plus ou moins longues ou en diplocoques (Joffin et *al.*, 2003).

➤ **Test catalase**

Afin de différencier entre les staphylocoques et les streptocoques, on réalise le test catalase (déjà décrit pour l'identification des Staph). Les streptocoques sont caractérisés par l'absence de la catalase (Joffin et *al.*, 2003).

➤ **Etude des caractères biochimique par la galleries 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 [17].

**Mode opératoire :**

Après isolement et vérification de l'appartenance de la souche à identifier à la famille des *Streptococcaceae* (coloration de Gram, catalase), l'inoculation de la galerie API20 Strep s'effectue selon les étapes suivantes :

- 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 0,5ml 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  $36^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  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: 2goutte de NIN.
- Test PYRA, GAL, GUR, GAL, PAL, LAP:1goutte de ZYM A et ZYM B.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

**Identification :**

- Identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification.

### 3.1.6. Autres bactéries :

#### API 20NE :

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation (voir Annexe II) [18].

#### Mode opératoire :

- Est le même que la galerie API 20E.

#### Préparation de l'inoculum :

- Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

#### Inoculation de la galerie :

- Remplir uniquement les tubes des tests NO<sub>3</sub> à PNPG,
- Créer une anaérobiose 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 de Kovacs [18].

Sur la fiche de résultat, déterminer le profil numérique.

#### Identification

- L'identification de la souche se fait à l'aide d'un logiciel d'identification.

### 3.2. Conservation des souches bactériennes :

En attente de l'application de l'antibiogramme (faute de moyen), nous avons conservés nos souches (après identification précise) en utilisant deux méthodes : (Guiraud, 2005).

- A la température ambiante, par ensemencement par stries sur la gélose nutritive (Chapman pour Staph) inclinées en tubes à essai en faisant des repiquages chaque mois

- Au congélateur, après isolement dans un milieu contenant du glycérol et le bouillon nutritif.

### **3.3.Étude de la sensibilité aux antibiotiques :**

#### **Technique de l'antibiogramme :**

L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose (gélose Mueller Hinton) à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations de Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2013).

#### ➤ **Préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identique.

- Bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort [19].

#### ➤ **Ensemencement de la gélose de l'antibiogramme:**

La gélose utilisée est la gélose Mueller Hinton (MH), son ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum selon les étapes suivantes [20]:

- Couler la gélose MH en boites de Pétri ; Laisser sécher et solidifier avant utilisation.

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum préparé.

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la gélose de haut en bas, en stries serrées.

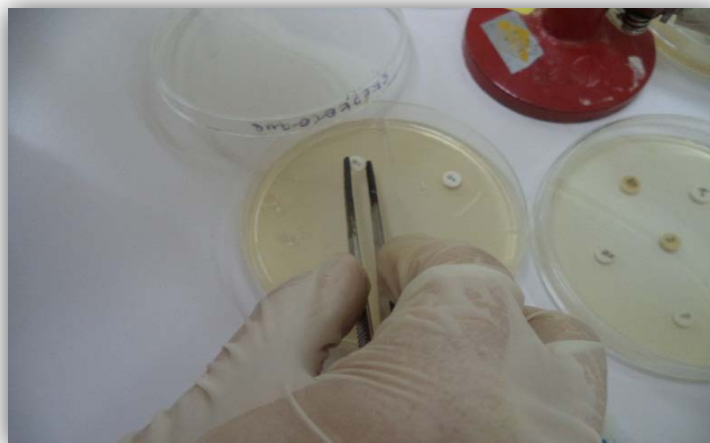
- Répéter l'opération 2 fois en tournant la boite de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon par la périphérie de la gélose [20].

#### ➤ **Application des disques d'antibiotique :**

Les antibiotiques qui ont été testés pour chaque groupe bactérien étudié sont représentés dans les tableaux (6, 7,8 et 9).

Chaque disque d'antibiotique a été appliqué sur gélose ensemencé par une culture bactérienne (de chaque espèce) à l'aide de pinces bactériologiques (Fig.7) [20].

**NB :** Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90mm, et de ne pas déplacer les disques après application [19].



**Figure 07:** Application des disques d'antibiotique (photos prise par Adjeroud, 2014).

**Condition d'incubation :** Incuber à 37°C pendant 24h.

➤ **Lecture :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- classer la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistante) ou I (intermédiaire) [19].

**Remarque :** Comme témoins nous avons utilisés des souches de références :

- *E.coli* ATCC 25922 pour l'antibiogramme des entérobactéries.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour l'antibiogramme des *Staphylococcus*.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour l'antibiogramme des *Pseudomonas*.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pour l'antibiogramme des streptocoques.

Les limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) des souches de références utilisées sont représentées dans le tableau 06 (Annexe II).

**Tableau 06:** Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des entérobactéries [21].

Antibiotique	Classe	Charge de disque	Sigle	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
<b>Famille de Bêta-lactamines</b>					
Ticarcilline	Carboxy-pénicilline	75 µg	TI	≥24	<22
Imipénème	Carbapenem	10 µg	IPM	≥24	<17
Céfotaxime	Céphalosporines	30µg	CTX	≥26	<23
<b>Famille de Phenicoles</b>					
Chloramphénicol	Phenicoles	30µg	C	≥23	<23
<b>Famille de Tétracyclines</b>					
Tétracycline	Tétracyclines	30UI	TE	≥19	<17
<b>Famille de Quinolones</b>					
Ciprofloxacine	Quinolones	5µg	CIP	≥25	<22
<b>Divers</b>					
Nitrofuranes	Nitrofuranes	300 µg	NIT	≥ 15	< 15

**Tableau 07:** Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des staphylocoques [21].

Antibiotique	Classe	Charge de disque	Sigle	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
<b>Famille des Bêta-lactamines</b>					
Pénicilline	Pénicilline G	6µg	P	≥29	<29
<b>Famille de Macrolides</b>					
Erythromycine	Macrolides	15UI	E	≥ 22	<19
Lincomycine	Lincosamides	15µg	L	≥21	<17
Pristinamycine	Streptogramines	15 µg	RP	≥ 22	< 19
<b>Divers</b>					
Rifampicine	Rifampicine	5µg	RIF	≥29	<24
Acide fusidique	Acide fusidique	10µg	FC	≥24	<24

**Tableau 08 :** Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des streptocoques [21].

Antibiotique	Classe	Charge de disque	Sigle	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
<b>Famille des Bêta-lactamines</b>					
Pénicilline	Pénicilline G	6µg	P	≥ 26	<26
Céfotaxime	Céphalosporines	30µg	CTX	≥19	<19
<b>Famille de Macrolides</b>					
Erythromycine	Macrolides	15µg	E	≥26	<24
<b>Famille de Phenicoles</b>					
Chloramphénicol	phenicoles	30µg	C	≥23	<23
<b>Famille de Tétracyclines</b>					
Tétracycline	Tétracyclines	30UI	TE	≥23	<21
<b>Divers</b>					
Rifampicine	Rifampicine	5µg	RIF	≥29	<24

**Tableau 09 :** Liste des antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme des *Pseudomonas* [21].

Antibiotique	Classe	Charge de disque	Sigle	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
<b>Famille des Bêta-lactamines</b>					
Ticarcilline	Carboxy-pénicilline	75µg	TI	≥15	<14
Péperacilline	Urédopénicilline	100µg	PRL	≥21	<17
Céfalexine	Céphalosporines	30µg	CN	≥18	<14
<b>Famille de Tétracyclines</b>					
Tétracycline	Tétracyclines	30UI	TE	≥19	<14
<b>Famille de Quinolones</b>					
Ciprofloxacine	Quinolones	5µg	CIP	≥21	<15
<b>Divers</b>					
Nitrofuranes	Nitrofuranes	300µg	NIT	≥15	<15



## I. Résultats :

### 1. Résultats de l'analyse bactériologique :

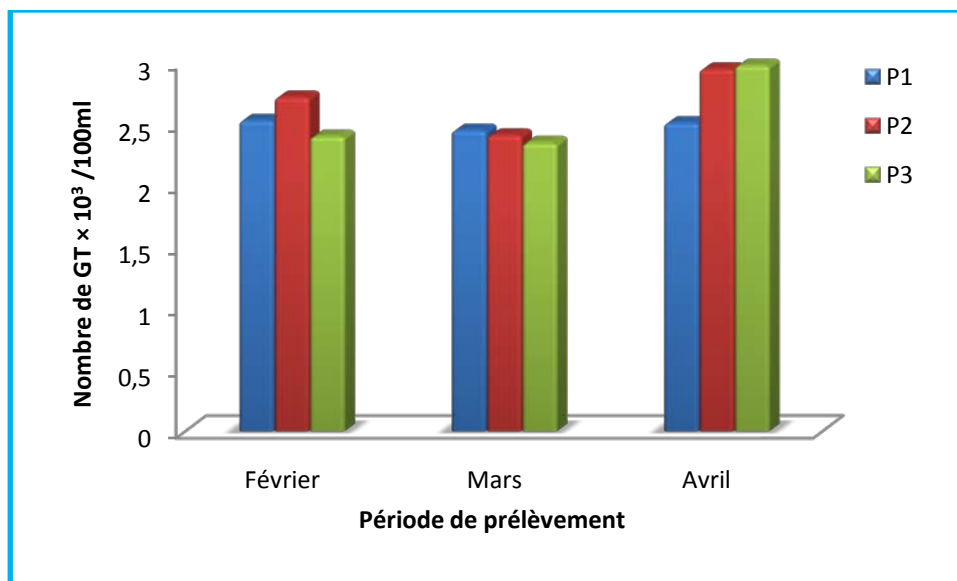
#### 1.1. Résultat de dénombrement des germes totaux (GT):

Les résultats de dénombrement des germes totaux (à 37°C) au niveau des trois points de prélèvement sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 10:** Nombre des germes totaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida

Point de prélèvement période	Février	Mars	Avril
<b>P1</b>	$2,53 \times 10^3$	$2,45 \times 10^3$	$2,51 \times 10^3$
<b>P2</b>	$2,72 \times 10^3$	$2,41 \times 10^3$	$2,95 \times 10^3$
<b>P3</b>	$2,4 \times 10^3$	$2,35 \times 10^3$	$2,98 \times 10^3$

Les résultats de dénombrement des germes totaux à 37°C durant notre période d'étude montrent un nombre important de cette flore totale dans les trois points de prélèvement (Fig. 8), avec un maximum enregistré au niveau du point 3 durant le mois d'Avril ( $2,98 \times 10^3$  germes/100ml). Un minimum a été noté au niveau du P3 pendant le mois de Mars avec un nombre de  $2,35 \times 10^3$  germes/100ml.



**Figure 8 :** Répartition des germes totaux dans les eaux de l'Oued Messida.

## 1.2. Résultat de dénombrement des coliformes totaux (CT):

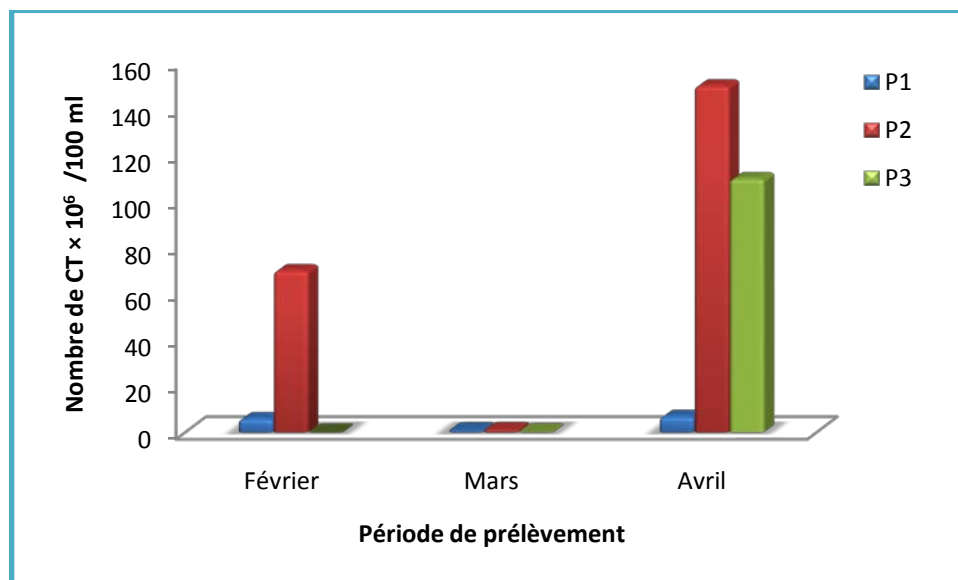
Les résultats de dénombrement des coliformes totaux sont les suivants :

**Tableau11** : Nombre des coliformes totaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida.

Point de prélèvement période	Février	Mars	Avril
<b>P1</b>	$6 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$7 \times 10^6$
<b>P2</b>	$70 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$150 \times 10^6$
<b>P3</b>	0	$0,2 \times 10^6$	$110 \times 10^6$

Les valeurs des coliformes totaux ont atteint leur maximum en mois d'Avril dans les points P2 et P3 avec un nombre de  $150 \times 10^6$  germes/100 ml et  $110 \times 10^6$  germes/100 ml respectivement. Par contre les valeurs les plus faibles ont été observées pendant le mois de Mars dans tous les points de prélèvement avec absence totale de ces bactéries au niveau du point P3 en mois de Février.

La figure 9 représente l'évolution spatio-temporelle des CT dans les eaux de l'oued Messida.



**Figure 9:** Répartition des coliformes totaux dans les eaux de l'Oued Messida.

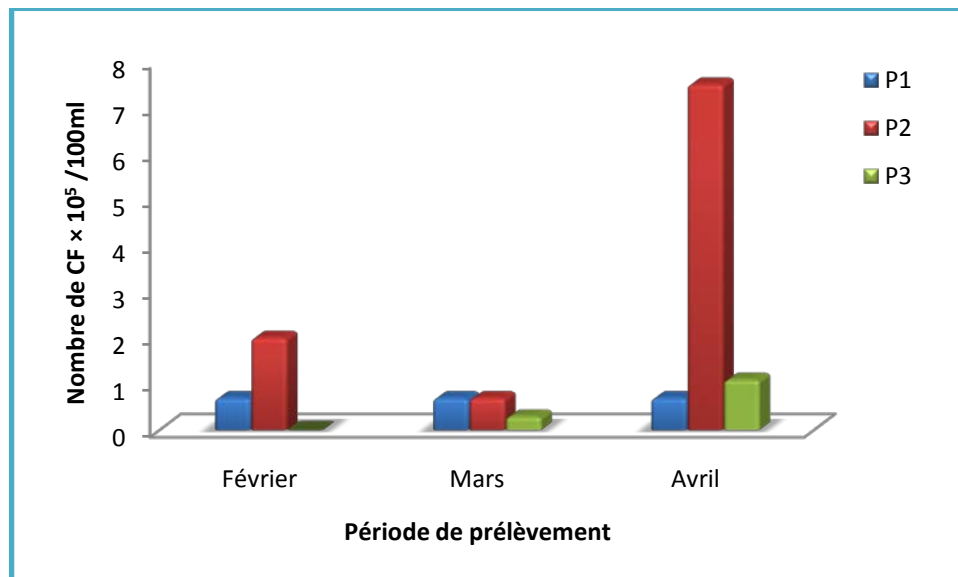
### 1.3. Résultat de dénombrement des coliformes fécaux (CF):

Les résultats de dénombrement des coliformes fécaux sont les suivants :

**Tableau 12 :** Nombre des coliformes fécaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida.

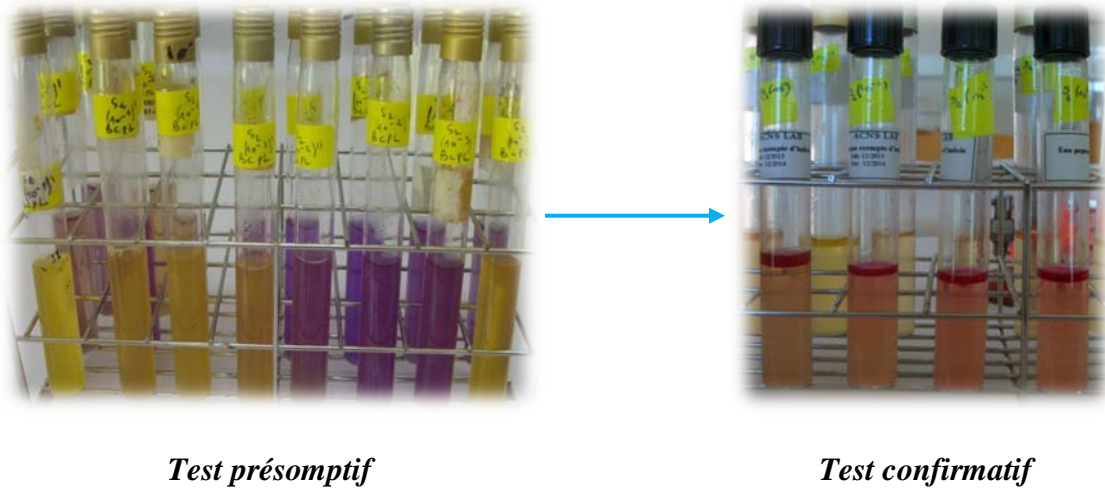
Point de prélèvement / Période	Février	Mars	Avril
<b>P1</b>	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$
<b>P2</b>	$2 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
<b>P3</b>	0	$0,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$

Les résultats de dénombrement des coliformes fécaux pendant les trois mois d'étude ont montré une différence quantitative entre les trois points de prélèvements (Fig.10); le maximum a été enregistré en mois d'avril au niveau du point P2 avec un nombre de  $7,5 \times 10^5$  germes/100 ml, et le minimum a été observé pendant le mois de Février au niveau du (P3).



**Figure 10 :** Répartition des coliformes fécaux dans les eaux de l'Oued Messida.

Les résultats des tests présomptif et confirmatif de la présence d'*Escherichia coli* sont représentés par la figure 11.



**Figure 11:** Test indole positif sur eau peptonée exempte d'indole incubée à 44°C confirme la présence d'*E. coli*.

#### 1.4. Résultat de dénombrement des streptocoques fécaux (SF) :

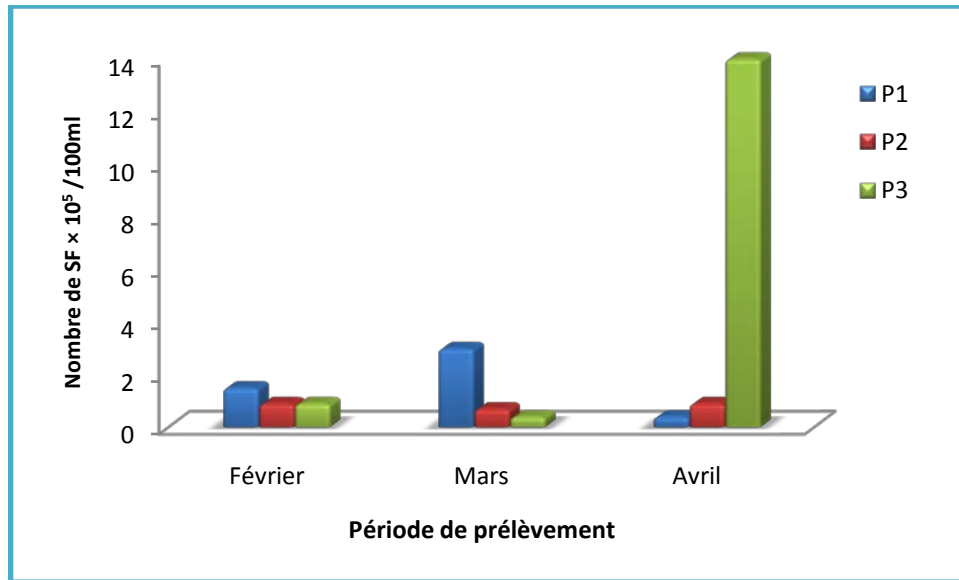
Les résultats de dénombrement des streptocoques fécaux sont les suivants :

**Tableau 13 :** Nombre des streptocoques fécaux dans 100 ml d'eau de l'oued Messida.

Point de prélèvement période	Février	Mars	Avril
<b>P1</b>	$1,5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$
<b>P2</b>	$0,9 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$
<b>P3</b>	$0,9 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$	$14 \times 10^5$

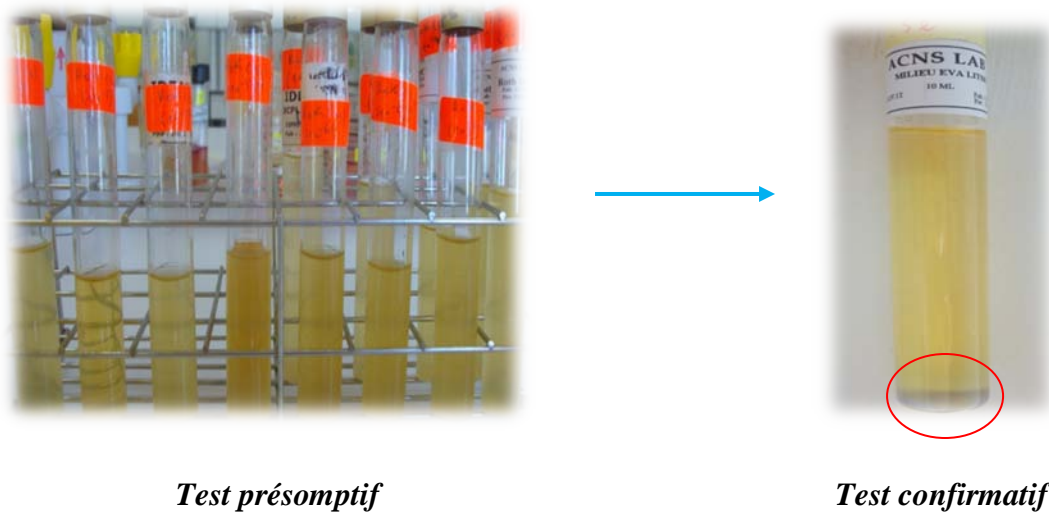
La valeur maximale des streptocoques fécaux ( $14 \times 10^5$  germes/100 ml) a été enregistrée au niveau de P3 durant le mois d'avril et la valeur minimale ( $0,4 \times 10^5$  germes/100 ml) a été notée dans P3 et P1 pendant les deux mois Mars et Avril.

La figure 12 illustre la variation spatio-temporelle des streptocoques fécaux au niveau des trois points de prélèvement.



**Figure 12 :** Variation spatio-temporelle des Streptocoques fécaux dans les eaux de l'Oued Messida.

Les résultats des tests présomptif et confirmatif de la présence des streptocoques fécaux sont représentés par la figure 13.



**Figure 13 :** Confirmation de la présence des Streptocoques fécaux par la formation d'un dépôt violet dans le milieu Eva-Litsky.

### 1.5. Résultat de dénombrement des Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) :

La détermination des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices est un indice de pollution ancienne à cause de la résistance de leurs spores contrairement aux formes végétatives.

Nos résultats montrent l'absence totale d'halo noire dans les tubes contenant le milieu VF (viande foie) ce qui explique l'absence des spores des anaérobies sulfito-réducteurs dans les trois points de prélèvement pendant les trois mois d'étude.

## 2. Résultats de la recherche des bactéries antibiorésistantes :

### 2.1. Résultats d'isolement et d'identification de la flore bactérienne:

#### 2.1.1. Les entérobactéries :

##### ➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes qui ont été cultivées sur les différents milieux de culture utilisés pour la recherche des entérobactéries sont représentés dans le tableau 14.

**Tableau 14 :** Aspect macroscopique et microscopique des colonies des entérobactéries isolées des eaux d'Oued Messida.

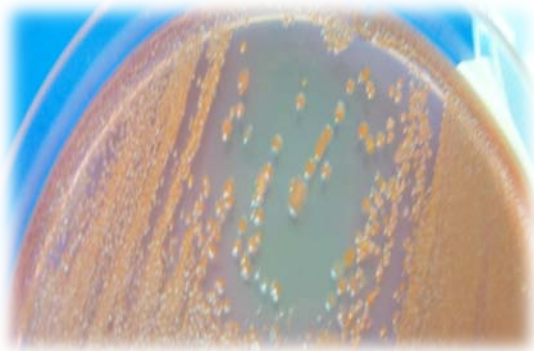
Milieu de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
<b>Mac Conkey</b>	-Colonies moyennes et petites, blanchâtres à contours réguliers, brillantes, bombées (Fig.14). -Colonies jaunes, petites à moyennes à contours réguliers (Fig.15).	-Coccobacille, Gram négatif  -Bacille, Gram négatif
<b>Hektoen</b>	-Colonies moyennes, orangées à contours réguliers, lisses, crémeuses, bombées (Fig.16). -Colonies moyennes, vertes à contours réguliers, crémeuses, lisses, bombées (Fig.17) -Colonies rouges, petites, à contours réguliers, crémeuses, lisses, bombées (Fig.18)	-Bacilles en chainettes, Gram négatif  - Bacilles isolés, Gram négatif  -Coccobacille, Gram négatif
<b>Gélose SS</b>	-Colonies noires, petites, à contours réguliers, lisses, crémeuses, bombées (Fig.19)	-Bacilles isolés, Gram négatif



**Figure 14 :** Colonies blanchâtres sur la gélose  
Mac Conkey



**Figure 15:** Colonies jaunes sur la gélose  
Mac Conkey



**Figure 16:** Colonies orangées sur la gélose  
Hektoen



**Figure 17:** Colonies vertes sur la gélose  
Hektoen



**Figure 18:** Colonies rouges sur la gélose  
Hektoen



**Figure 19:** Colonies noires sur la gélose SS



➤ **Résultats de l'identification des 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 14 entérobactéries dans les trois points de prélèvement durant notre période d'étude :

- 3 souches d'*Escherichia coli* ( $E_1, E_2, E_3$ ) : colonies rouges sur Hektoen.
- 2 souches *Klebsiella oxytoca* ( $K_1, K_2$ ) : colonies orangées sur Hektoen.
- 3 souches *Citrobacter freundii* ( $C_1, C_2, C_3$ ) : colonies jaunes sur SS.
- Une souche *Proteus vulgaris* : colonies jaunes à centre noire sur SS.
- Une souche *Serratia marcescens* : colonies blanchâtres sur Mac Conkey.
- Une souche *Yersinia enterocolitica* : colonies vertes sur Hektoen.
- Une souche *Edwardsiella tarda* : colonies vertes foncés sur Hektoen.
- Une souche *Levinea* : colonies jaunes sur Mac Conkey.
- Une souche *Salmonella typhimurium* : colonies noires sur SS.

- **Résultats de la recherche des enzymes respiratoires :**

Les résultats des tests catalase, oxydase et nitrate réductase des entérobactéries sont mentionnés dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Les résultats de la recherche des enzymes respiratoires des entérobactéries isolées des eaux d'oued Messida.

Test Germe identifié	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase
<i>Escherichia coli</i> ( $E_1, E_2, E_3$ )	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_1, K_2$ )	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_1, C_2$ )	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	+
<i>Levinea</i>	+	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	+



(+) : Résultat positive (-) : Résultat négatif

• **Résultat de l'identification biochimique :**

❖ Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des différentes souches des *Entérobactéries* sont présentés dans le tableau suivant :

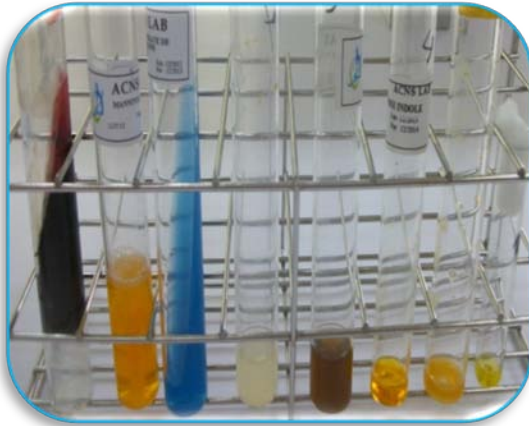
**Tableau 16 :** Résultats des tests biochimiques classiques des entérobactéries isolées des eaux de l'oued Messida.

Test Germe identifié	TSI					Citrates de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole			Clark et Lubs		ONPG
	H <sub>2</sub> S	Gaz	Glu	Lac	Sac		MAN	MOB	URE	IND	TDA	VP	RM	
<i>Escherichia coli</i> (E <sub>1</sub> ,E <sub>2</sub> ,E <sub>3</sub> ) (Fig. 20)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> (K <sub>1</sub> ) (Fig. 21)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i> (C <sub>1</sub> ,C <sub>2</sub> ) (Fig. 22)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> (Fig. 23)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Serratia marcescens</i> (Fig. 24)	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Fig. 25)	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i> (Fig. 26)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Levinea</i> (Fig. 27)	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+

(+) : Résultat positive (-) : Résultat négatif



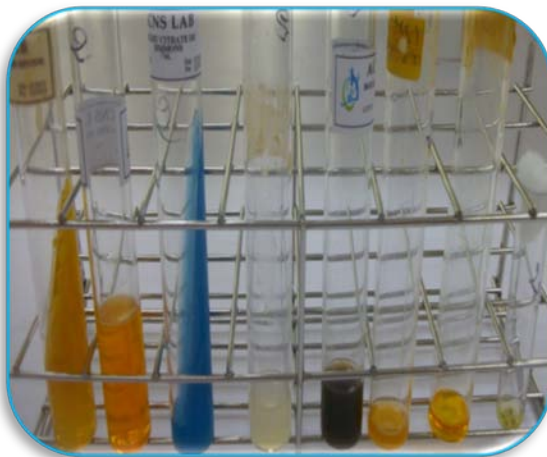
**Figure 20:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Escherichia coli* ( $E_1$ )



**Figure 21:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Klebsiella oxytoca* ( $K_1$ )



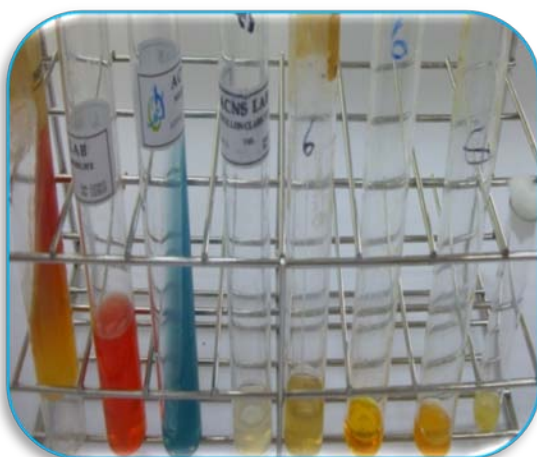
**Figure 22:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Citrobacter freundii* ( $C_1$ )



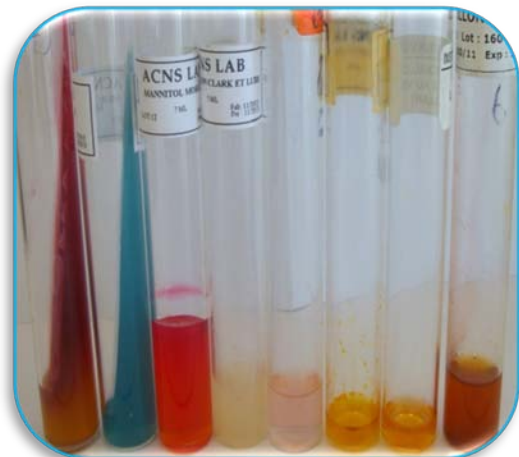
**Figure 23:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Proteus vulgaris*



**Figure 24:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Serratia marcescens*



**Figure 25:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Yersinia enterocolitica*



**Figure 26:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Edwardsiella tarda*

**Figure 27:** Résultat de la galerie biochimique classique pour *Levinea*

❖ Les résultats de l'identification de certaines espèces des entérobactéries par l'API 20E sont les suivants :



**Figure 28:** Profil biochimique de *Salmonella typhimurium*



**Figure 29:** Profil biochimique de *Klebsiella oxytoca* ( $K_2$ )



**Figure 30:** Profil biochimique de *Citrobacter freundii* ( $C_3$ )

### 2.1.2. Les Vibrions cholériques :

Les résultats de la recherche des Vibrions cholériques ont été négatifs dans les trois points de prélèvement durant toute la période d'étude.

Par ailleurs, une espèce du genre apparenté a été identifiée, c'est : l'*Aeromonas hydrophila*.

Le résultat de l'identification biochimique de l'*Aeromonas hydrophila* par la galerie miniaturisée API 20 E est la suivante :

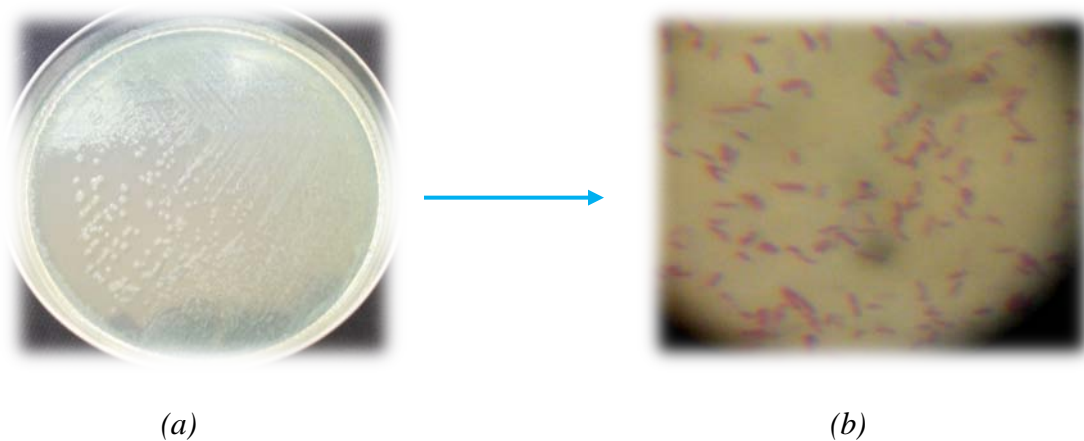


**Figure 31:** Profil biochimique d'*Aeromonas hydrophila***2.1.3. Pseudomonas :**➤ **Résultats des examens macroscopique et microscopique :**

L'aspect des colonies de *Pseudomonas* qui ont été poussées sur la gélose GN est le suivant (Tableau 17) :

**Tableau 17:** Aspect macroscopique et microscopique des colonies de *Pseudomonas* poussées sur la gélose GN.

Point de prélèvement	Observation macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies
P3	- Colonies blanchâtres à vertes, moyennes, à contours réguliers ; diffusion de pigment vert sur le milieu (Fig. 32.a)	Bacilles Gram négatif (Fig. 32.b)



**Figure 32:** Aspect des colonies de *Pseudomonas* ; (a) : diffusion du pigment vert sur GN, (b) : bacilles Gram négatif (×100).

➤ **Résultats de l'identification biochimique :**

La souche isolée du P3 est un bacille Gram (-), Oxydase (+), sur TSI ne fermente aucun sucre. Ces caractères nous orientent vers *Pseudomonas fluorescens*.

Les résultats d'identification biochimique par l'API 20NE ont permis de confirmer que la souche isolée sur GN est une *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 33).





**Figure 33:** Profil biochimique de *Pseudomonas fluorescens*

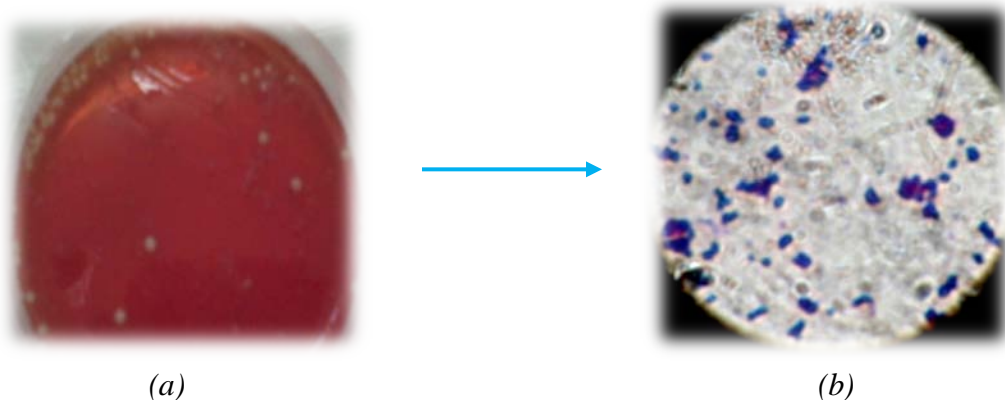
#### 2.1.4. Les staphylocoques pathogènes :

##### ➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

L'aspect des colonies qui ont été poussées sur la gélose Chapman est le suivant :

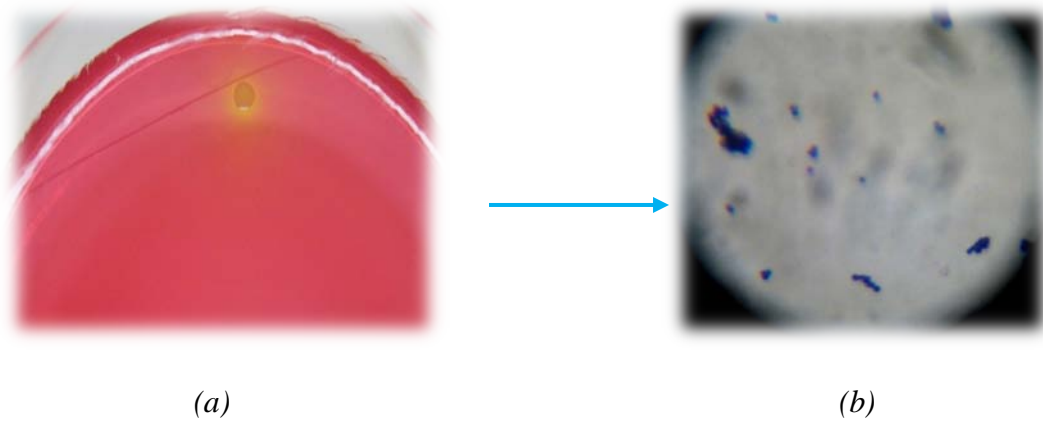
**Tableau18 :** Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose Chapman.

Point de prélèvement	Observation macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies	Code de la souche
P1	Colonies blanchâtres de taille moyenne rondes, opaques à contours réguliers (Fig. 34.a).	- Cocci regroupées en amas, Gram positif (Fig. 34.b).	S1
	-Colonies moyennes, jaunes, à contours réguliers, lisses, crémeuses, bombées (Fig. 35.a).	-Cocci isolés et en amas, Gram positif (Fig. 35.b).	S2
P2	- Colonies petites, jaunes, lisses, crémeuses, virage du couleur de milieu vers le jaune (Fig. 36.a).	- Cocci regroupées en amas en grappes de raisin, Gram positif (Fig. 36.b).	S3

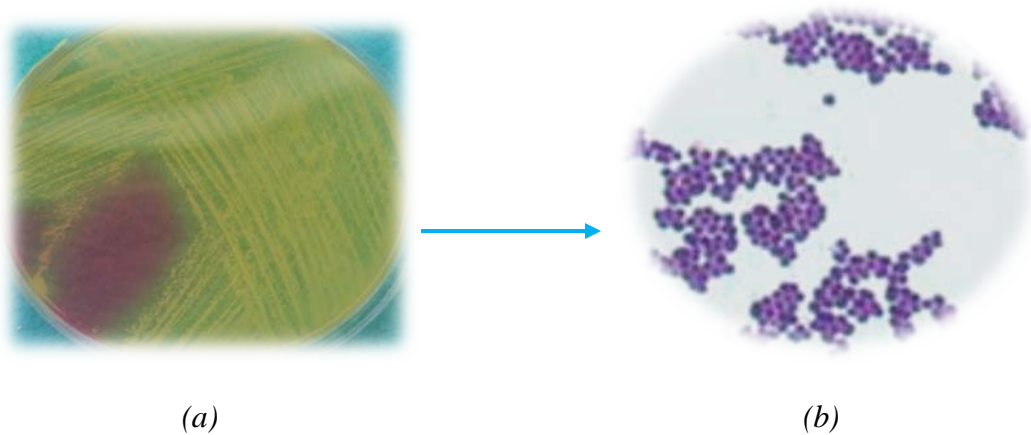


**Figure 34 :** Aspect des colonies de la souche S1; (a) : Colonies blanchâtres sur Chapman,

(b) : Cocci regroupées en amas, Gram positif ( $\times 100$ ).



**Figure 35:** Aspect des colonies de la souche S2 ; (a) : Colonie jaune sur Chapman, (b) : Cocci, Gram positif ( $\times 100$ ).



**Figure 36:** Aspect des colonies de la souche S3 ; (a) : virage du couleur de milieu vers le jaune, (b) : Cocci regroupées en amas en grappes de raisin, Gram positif ( $\times 100$ ).

➤ **Résultats de l'identification biochimique :**

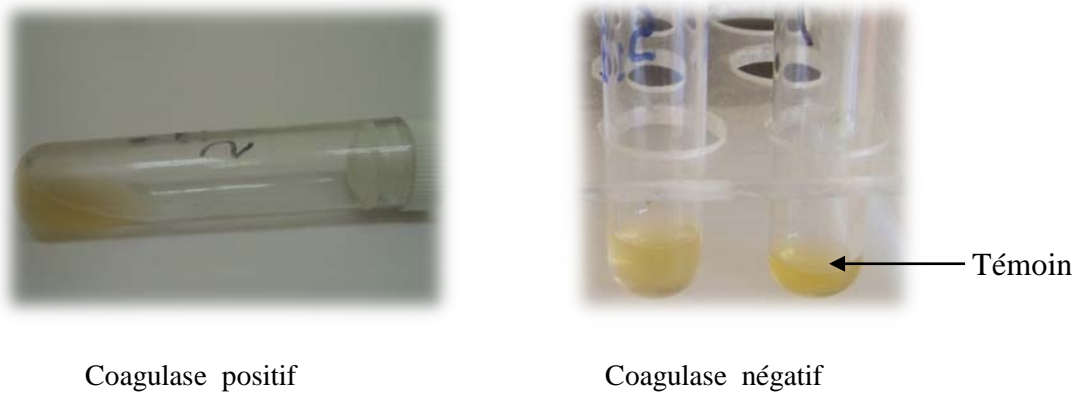
Les résultats de l'identification des bactéries poussées sur Chapman sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 19:** Résultat de l'identification des souches bactériennes poussées sur la gélose Chapman.

Souche \ Test	Catalase	Oxydase	Coagulase	Mannitol
S1	+	-	- (Fig.37)	-
S2	+	-	-	-
S3	+	-	+ (Fig.37)	+

Suivant les résultats obtenus, nous pouvons déterminer approximativement les espèces suivantes :

- La souche S1 est une *Staphylococcus epidermidis*.
- La souche S3 est une *Staphylococcus aureus*.



**Figure 37:** Résultat du test Staphylocoagulase.

❖ L'identification des souches S2 et S3 a été complétée par l'API Staph et les résultats obtenus ont confirmé que :

- La souche S2 est une *Micrococcus roseus* (Fig. 38).
- La souche S3 est une *Staphylococcus aureus* (Fig. 39).



**Figure 38 :** Profil biochimique de *Micrococcus roseus*.



**Figure 39:** Profil biochimique de *Staphylococcus aureus*.

### 2.1.5. Streptocoques :

#### ➤ Résultats des examens macroscopique et microscopique :

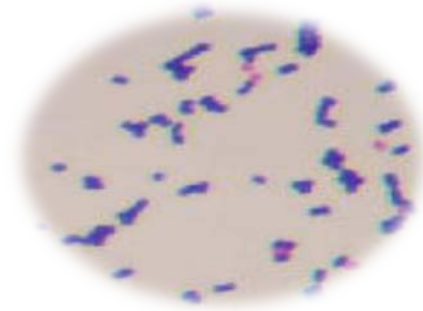
L'aspect des colonies qui ont été poussées sur la gélose GN est le suivant :

**Tableau 20** : Aspect macroscopique et microscopique des colonies poussées sur la gélose GN.

Point de prélèvement	Observation macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies	Code de la souche
P1	-Colonies blanchâtres, petites, à contours réguliers.	- Cocci isolé et en chainettes, Gram positif.	<i>St1</i>
P2	-Colonies petites, blanchâtres, à contours réguliers, lisses (Fig.40.a).	-Cocci en chainettes , Gram positif (Fig.40.b).	<i>St2</i>
P3	- Colonies petites, blanchâtres, à contours réguliers, lisses, bombées (Fig.41.a).	- Cocci regroupées en diplocoques et en chainette, Gram positif (Fig.41.b).	<i>St3</i>



(a)



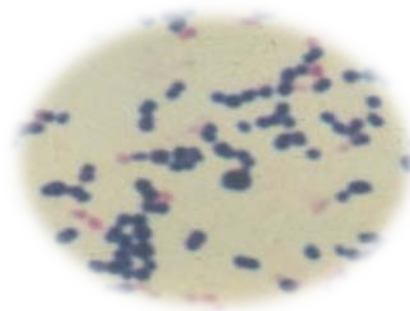
(b)

**Figure 40**: Aspect des colonies de la souche *St2* ; (a) : Colonies blanchâtres sur GN,

(b) : Cocci en chainettes, Gram positif (×100).



(a)



(b)

**Figure 41**: Aspect des colonies de la souche *St3* ; (a) : Colonie blanchâtres sur GN,



(b) : Cocci regroupées en diplocoque, Gram positif ( $\times 100$ ).

➤ **Résultats de l'identification biochimique :**

La souche *St1* a été identifiée par certains caractères biochimiques. Les résultats obtenus sont : Catalase (-), lactose (-), mannitol (-), VP (-), citrate de Simmons (non déterminé) Ces caractères nous orientent vers l'espèce : *Streptococcus sp.*

❖ L'identification des souches *St2* et *St3* a été effectuée par l'API 20 Strep et les résultats obtenus ont confirmé que :

- La souche *St2* est une *Enterococcus faecium* (Fig.42).
- La souche *St3* est une *Aerococcus viridans 2* (Fig.43).



**Figure 42 :** Profil biochimique d'*Enterococcus faecium*.



**Figure 43 :** Profil biochimique d'*Aerococcus viridans 2*.

- ❖ Au total, l'identification de la flore bactérienne des eaux de l'oued Messida a révélé la présence de 22 espèces réparties comme suite (tableau 21) :

**Tableau 21** : Les bactéries identifiées à partir des eaux d'oued Messida.

Points de prélèvement	Les bactéries identifiées
<b>P1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Klebsiella oxytoca</i> (<math>K_1</math>)</li> <li>○ <i>Citrobacter freundii</i> (<math>C_1</math>)</li> <li>○ <i>Proteus vulgaris</i></li> <li>○ <i>Escherichia coli</i> (<math>E_2</math>)</li> <li>○ <i>Salmonella typhimurium</i></li> <li>○ <i>Micrococcus roseus</i></li> <li>○ <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>○ <i>Streptococcus sp.</i></li> </ul>
<b>P2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Serratia marcescens</i></li> <li>○ <i>Yersinia enterocolitica</i></li> <li>○ <i>Edwardsiella tarda</i></li> <li>○ <i>Escherichia coli</i> (<math>E_1</math>)</li> <li>○ <i>Citrobacter freundii</i> (<math>C_2, C_3</math>)</li> <li>○ <i>Aeromonas hydrophila</i></li> <li>○ <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>○ <i>Enterococcus faecium</i></li> </ul>
<b>P3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Klebsiella oxytoca</i> (<math>K_2</math>)</li> <li>○ <i>Escherichia coli</i> (<math>E_3</math>)</li> <li>○ <i>Levinea</i></li> <li>○ <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> <li>○ <i>Aerococcus viridans 2</i></li> </ul>

## 2.2. Résultats de l'antibiogramme:

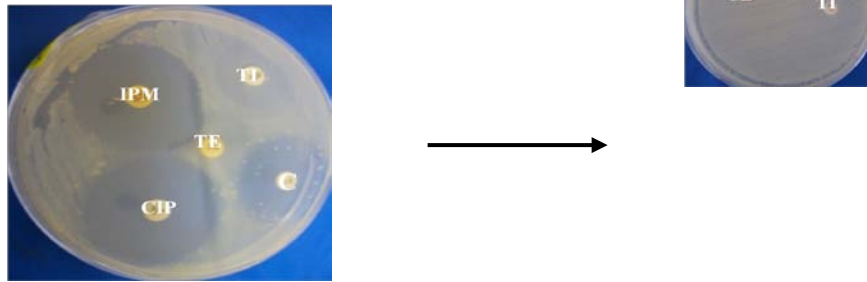
Les résultats de l'antibiogramme réalisé pour les espèces identifiées sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 22** : Résultats de l'antibiogramme.

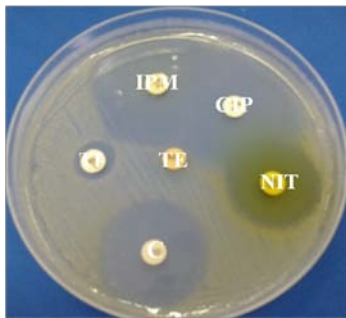
Espèces \ Antibiotiques	Antibiotiques														
	TI75	IPM10	CTX30	P10	PRL100	CN10	C30	TE30	CIP5	E15	L10	RP	NT300	FC10	RIF5
<i>Escherichia coli</i> ( $E_1$ ) (Fig.44)	R	S	/	/	/	/	S	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ( $E_2$ ) (Fig.45)	R	S	/	/	/	/	S	R	S	/	/	/	S	/	/
<i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_1$ ) (Fig.46)	R	S	R	/	/	/	S	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Serratia marcescens</i> (Fig.47)	R	S	R	/	/	/	R	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_1$ )(Fig.48)	S	S	R	/	/	/	R	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_2$ )(Fig.49)	S	S	/	/	/	/	S	/	S	/	/	/	S	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_3$ )(Fig.50)	R	/	S	/	/	/	S	R	S	/	/	/	S	/	/
<i>Levinea</i> (Fig.51)	S	S	/	/	/	/	S	S	S	/	/	/	S	/	/
<i>Proteus vulgaris</i> (Fig.53)	R	S	/	/	/	/	R	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Edwardsiella tarda</i> (Fig.54)	S	S	/	/	/	/	R	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Fig.52)	S	S	R	/	/	/	R	R	S	/	/	/	/	/	/
<i>Salmonella typhimurium</i> (Fig.55)	R	/	S	/	/	/	S	R	S	/	/	/	S	/	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Fig.56)	R	/	/	/	S	R	/	R	S	/	/	/	R	/	/
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Fig.57)	R	S	/	/	/	S	/	I	S	/	/	/	S	/	/
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Fig.58)	/	/	/	R	/	/	/	/	/	R	R	/	/	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> (Fig.59)	/	/	/	R	/	/	/	/	/	R	R	R	/	R	R
<i>Micrococcus roseus</i> (Fig.60)	/	/	/	R	/	/	/	/	/	R	R	R	/	R	/
<i>Streptococcus sp.</i> (Fig.61)	/	/	R	R	/	/	S	R	/	R	/	/	/	/	R
<i>Enterococcus faecium</i> (Fig.62)	/	/	/	R	/	/	S	/	/	R	/	/	/	/	R
<i>Aerococcus viridans 2</i> (Fig.63)	/	/	/	R	/	/	S	R	/	R	/	/	/	/	R

S : sensible      R : Résistant      I : Intermédiaire      / : non effectuée

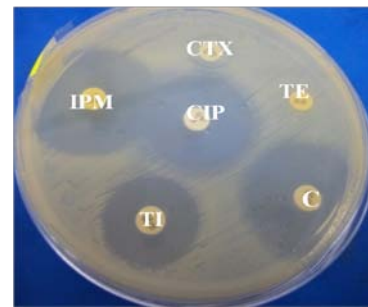
**Remarque :** Faute de moyen, l'antibiogramme des souches *Escherichia coli* ( $E_3$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $K_2$ ) n'a pas été effectué.



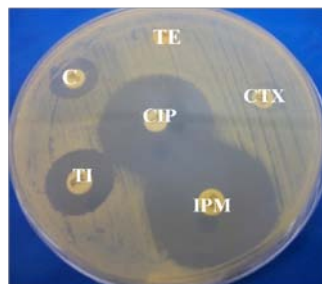
**Figure 44:** Résultat de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* ( $E_1$ )



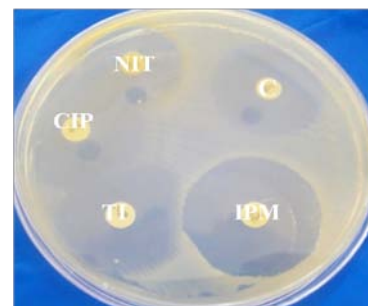
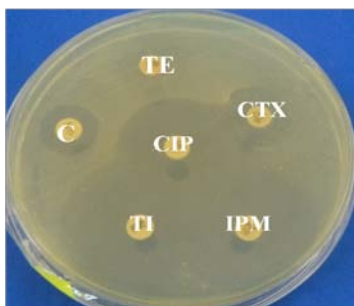
**Figure 45:** Résultat de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* ( $E_2$ )



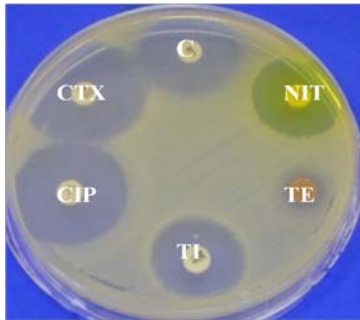
**Figure 46:** Résultat de l'antibiogramme de *Klebsiella oxytoca* ( $K_1$ )



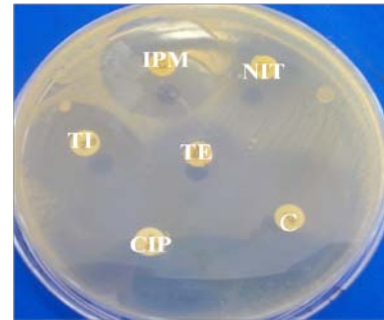
**Figure 47:** Résultat de l'antibiogramme de *Serratia marcescens*



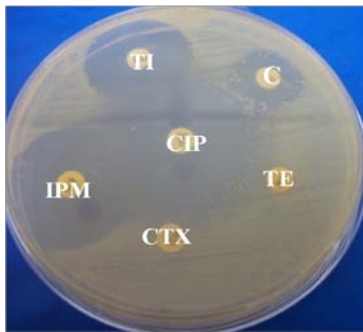
**Figure 48:** Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter freundii* (C<sub>1</sub>)



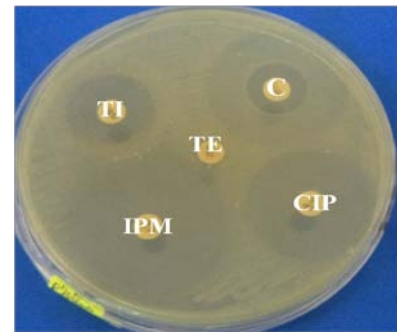
**Figure 49:** Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter freundii* (C<sub>2</sub>)



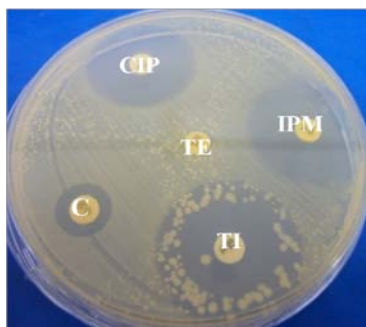
**Figure 50:** Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter freundii* (C<sub>3</sub>)



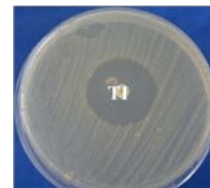
**Figure 51:** Résultat de l'antibiogramme de *Levinea*



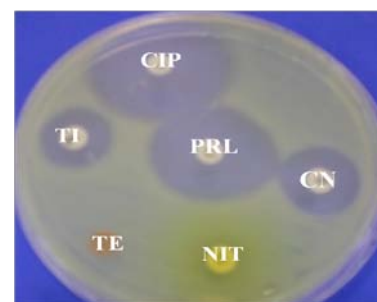
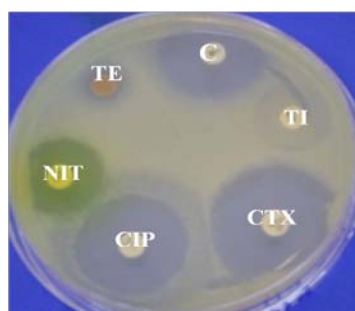
**Figure 52:** Résultat de l'antibiogramme de *Yersinia enterocolitica* vulgaris



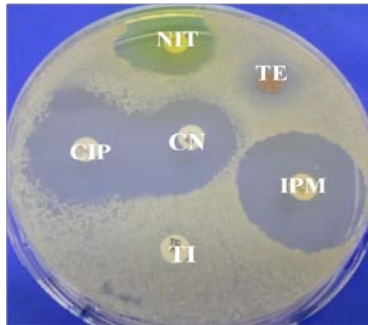
**Figure 53:** Résultat de l'antibiogramme de *Proteus*



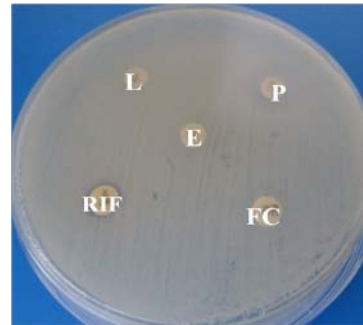
**Figure 54:** Résultat de l'antibiogramme d' *Edwardsiella tarda*



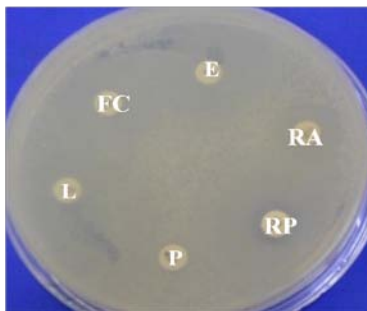
**Figure 55 :** Résultat de l'antibiogramme de *Salmonella typhimurium*



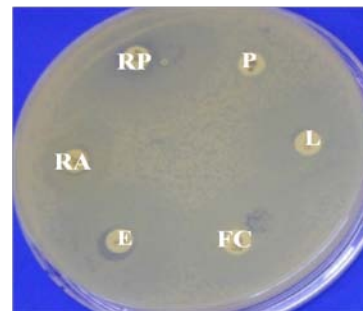
**Figure 56:** Résultat de l'antibiogramme de *Pseudomonas fluorescens*



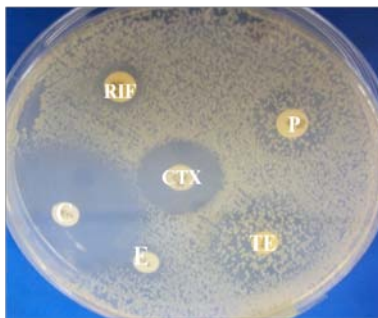
**Figure 57:** Résultat de l'antibiogramme d' *Aeromonas hydrophila*



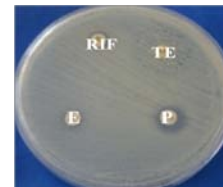
**Figure 58:** Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus epidermidis*



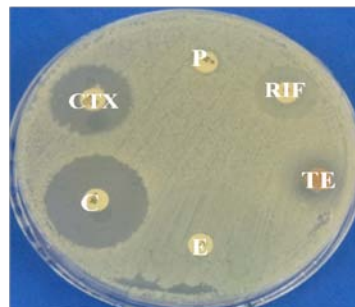
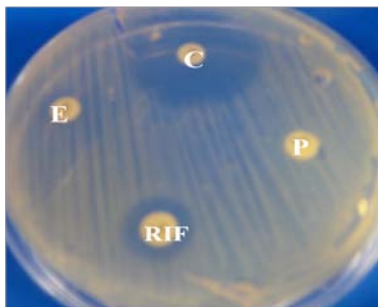
**Figure 59:** Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*  
 Résultat de l'antibiogramme de *Micrococcus roseus*



**Figure 60:** Résultat de l'antibiogramme de *Streptococcus sp.*



**Figure 61:** Résultat de l'antibiogramme de *Streptococcus sp.*





**Figure 62:** Résultat de l'antibiogramme*d' Enterococcus faecium***Figure 63:** Résultat de l'antibiogramme*d' Aerococcus viridans 2*

## II. Discussion :

### **Qualité bactériologique des eaux d'oued Messida :**

La qualité bactériologique des eaux d'oued Messida a été déterminée en étudiant l'évolution des indicateurs de pollution (GT, CT, CF, SF et ASR). Cette évaluation nous a donné une idée sur le degré de la pollution bactériologique des eaux étudiées.

Les germes totaux sont des indicateurs qui révèlent la présence possible d'une contamination bactériologique (Labres et *al.*, 2006).

Le résultat de dénombrement des germes totaux à 37°C est compris entre  $2,53 \times 10^3$  germes /100 ml et  $2,98 \times 10^3$  germes /100 ml d'eau. Il est important de signaler que le nombre élevé des GT est enregistré durant le mois d'avril et le plus faible au mois de Mars. Cette diminution bactérienne est expliquée soit par la dilution des eaux par les pluies durant le mois de Mars, soit par la présence de prédateurs bactériens tels que les protozoaires, comme elle peut être liée aux rejets de produits toxiques (Camille. 2003).

Le nombre des coliformes totaux est un paramètre très important pour estimer le degré de pollution d'un écosystème aquatique et surtout pour déterminer l'origine de la contamination (Dellarras, 2003).

Les résultats de dénombrement des CT montrent que la valeur la plus élevée ( $150 \times 10^6$  germes /100 ml) a été enregistré au niveau du point 2 pendant le mois d'Avril ; cette valeur élevée est due aux rejets des matières fécales des animaux de la région (P2 est près d'une zone de pâturage et elle constitue un site de rafraîchissement des herbivores).

Le nombre des coliformes fécaux est un indice complémentaire confirmatif de la présence d'*Escherichia coli*, l'espèce la plus importante des CF (Labres et *al.*, 2008).

*Escherichia coli* a été détecté pendant les trois mois d'étude avec des valeurs comprises entre 0,7 et  $7,5 \times 10^5$  germes /100ml. La présence de cette bactérie au niveau des trois points de prélèvement confirme que le long de l'oued Messida est confronté à une source de pollution d'origine fécale.

Les streptocoques fécaux sont parmi les flores intestinales dominantes chez les animaux herbivores domestiques, donc la présence de ceux-ci indique un signal de pollution fécale d'origine animale (Rodier *et al.*, 2009).

La valeur maximale des SF a été enregistré au niveau du point P3 ( $14 \times 10^5$  germes /100ml), ce qui confirme que ce point reçoit des polluants fécaux récents. Durant notre période d'étude les eaux d'oued Messida se coulent du lac Tonga vers la Méditerranée, donc les polluants bactériens sont mobilisés de l'amont vers l'aval (l'embouchure) ce qui explique la forte pollution du point P3.

Aucun prélèvement ne s'est révélé positif pour la recherche des ASR dans les trois points de prélèvement durant toute la période d'étude. Ce résultat peut être expliqué soit par l'absence totale de ces bactéries, soit elles ne sont pas cultivables.

En conclusion, les valeurs des CF et SF enregistrées dans tous les points de prélèvement de l'oued Messida dépassent largement les normes algériennes (20.000 germes/100ml et 10.000 germes/100ml respectivement) de la qualité des eaux superficielles (J.O.R.A, 2011). Ces eaux ne répondent pas aussi aux exigences bactériologiques des eaux destinées à des utilisations agricoles, les textes réglementaires français exigent que l'eau utilisée pour l'irrigation des terrains ou sont cultivés des fruits et des légumes susceptibles d'être consommés crus ne doive pas contenir plus de 10 coliformes fécaux et 10 streptocoques fécaux par 100ml [6].

#### ***Recherche des bactéries antibiorésistantes :***

Afin d'évaluer la présence ou non des bactéries résistantes aux antibiotiques, nous avons commencé par l'identification du maximum des souches isolées des eaux d'oued Messida ; 22 espèces bactériennes appartenant à différent groupes ont été identifiées: Entérobactérie (14 espèces), Staphylocoque (02 espèces), Streptocoque (02 espèces), *Pseudomonas* (01 espèce), Entérocoque (01 espèce), Microcoque (01 espèce) et *Aeromonas* (01 espèces).

On peut trouver plusieurs origines de ces germes dans l'eau :

La distribution des entérobactéries dans la nature est néanmoins plus large, puisqu'on les retrouve notamment chez les végétaux, dans l'environnement (sol et eau) et dans la flore digestive de l'homme et des animaux (Cristian *et al.*, 2008).



La présence des espèces du genre *Staphylococcus* et *Micrococcus* (*S.epidermidis*, *S.aureus* et *Micrococcus roseus*) est due au caractère ubiquiste de ces genres bactériens, elles sont très répandue dans la nature (eau, sol, et air) comme on peut les trouvées sur la peau des humains et des animaux (Cristian et *al.*, 2008).

Les streptocoques et les entérocoques isolés sont d'origine fécale, les espèces *Streptococcus sp* et *Aerococcus viridans* sont présentes dans les déjections animales (Cristian et *al.*, 2008) ; ces espèces colonisent le bétail, les chevaux et la volaille bien qu'elles peuvent parfois être présentes chez l'humain.

Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus Faecium* est l'espèce le plus souvent identifiée chez l'humain (Clausen et *al.*, 1977). Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains (Clausen et *al.*, 1977).

La présence de *Pseudomonas fluorescens* est expliqué par sa dispersion fréquente dans des zones naturelles, y compris le sol, l'eau, divers plantes et animaux, et elle est considérée comme l'une des nombreuses bactéries normalement présentes sur la peau humaine et dans l'intestin humain (Cristian et *al.*, 2008).

*Aeromonas hydrophila* est aussi une espèce ubiquiste plus fréquente aussi bien en eaux marines qu'en eaux douces.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que toutes les souches isolées des eaux d'oued Messida (à l'exception de *Levinea*) sont résistantes à un ou plus d'antibiotique.

La majorité des entérobactéries isolées sont résistante à la famille de Béta-lactamine : 58,33 % résistent à la Ticarcilline, et 33,33% résiste au Céfotaxime. Cette résistance est expliquée par la production des  $\beta$ -lactamases qui est retrouvée chez de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* et *Edwardsiella*) (Zogheib et *al.*, 2005).

Nos résultats ont montré aussi que 83,33 % d'entérobactérie sont résistantes à la Tétracycline et 41,66 % résistent au Chloramphénicol. La résistance des souches à la Tétracycline est expliquée par le mécanisme d'efflux, cette résistance est due au gène *tet* qui génère la résistance de la Tétracycline [22].

La résistance de certaines entérobactéries (*Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*(C<sub>1</sub>), *Proteus vulgaris*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*) à la Chloramphénicol est due à la production d'une "chloramphénicol acétyltransférase" [22].

Toute les entérobactéries isolées sont sensibles à l'Imipénème, Ciprofloxacine, et Nitrofuranes, ces antibiotiques sont responsable respectivement de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi, et l'inhibition de la synthèse de l'ADN [22].

Nos résultats indiquent une forte résistance des *Micrococcaceae*, et des streptocoques aux antibiotiques utilisés. Le profil de résistance des espèces *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et *M. roseus* est le suivant : FC<sup>R</sup>, RIF<sup>R</sup>, P<sup>R</sup>, E<sup>R</sup>, L<sup>R</sup>, RP<sup>R</sup> par contre celui de *Streptococcus sp.* *Aerococcus viridans* et *Enterococcus faecium* est : C<sup>S</sup>, E<sup>R</sup>, P<sup>R</sup>, RIF<sup>R</sup>, TET<sup>R</sup>, CTX<sup>R</sup>.

L'habitat de ces bactéries en milieu humide - eau, égouts - et sols riches en antibiotiques, lui confère des facteurs de résistance à plusieurs antibiotiques (Zogheib et al., 2005).

La seule souche de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) est résistante à la Tétracycline, Ticarcilline, Céfalexine et Nitrofurane. Cette bactérie est connue par la faible perméabilité de sa membrane externe, l'expression de plusieurs systèmes d'efflux, dont l'activité a été rapportée pour la première fois en 1994, lui permet de résister à divers antibiotiques (Livermore et al., 1994).

*Aeromonas hydrophila* isolée des eaux étudiées a été résistante à la Ticarcilline. Ce résultat est expliqué par une résistance enzymatique (β-lactamase) (Zogheib et al., 2005).

La dissémination de plusieurs bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux d'oued Messida peut être liée à un réacteur biologique dans lequel les échanges génétiques et les événements de recombinaison, influencés par les conditions biotiques et abiotiques, profilent l'évolution de l'antibiorésistance (Baquero et al., 2008),

- Le premier réacteur est constitué par les microflore humaines et animales, composées d'environ 500 espèces bactériennes qui par exemple, soumises à la pression exercée lors de traitements antibiotiques, augmentent l'émergence et la proportion de souches bactériennes résistantes et multirésistantes. Cette contamination étant principalement d'origine fécale (Sommer et al., 2009). Plusieurs études ont montré que les bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier à la famille des bêta-lactamine, ont été à de nombreuses reprises rapportées chez les animaux d'élevage (Liebana et al., 2006; Mesa et al., 2006), les animaux de compagnie (Wieler et al., 2011 ; Dahmen et al., 2013) et les animaux sauvages (Guenther et al., 2011). Une autre étude a montré qu'aux abords

d'un étang en République tchèque, des souches bactériennes antibio-résistantes ont été isolées des excréments d'oiseaux marins (Simões et al., 2010 ; Dolejská et al., 2009), ce qui montre que ces souches sont implantées dans ces écosystèmes.

- Le second réacteur comprend tous les lieux où les facteurs, tels que les antibiotiques, qui augmentent la proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ceci en fait des lieux d'émergence, d'échange et de dissémination des gènes de résistance dans les populations (Wright, 2010). L'échange naturel de gènes entre bactéries dans l'environnement est un fait connu (Bertolla et al., 2000). Les trois mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT) identifiés (la conjugaison, la transduction et la transformation) ont été largement étudiés (Yin et al., 1997; Demanèche et al., 2000). Par conséquent, la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans la colonne d'eau et dans les sédiments peut affecter la qualité de l'eau mais aussi contribuer au HGT entre les bactéries, ce qui implique la diffusion généralisée de gènes résistants aux antibiotiques (Kümmerer, 2004; Demanèche et al., 2008; Thevenon et al., 2012).

- Le troisième réacteur correspond aux eaux usées, les effluents d'élevage et les résidus biologiques provenant des réacteurs précédents, où le mélange entre bactéries commensales et environnementales d'une part, et bactéries résistantes et sensibles d'autre part augmentent la probabilité des échanges entre bactéries, et par conséquent la dissémination de l'antibiorésistance (Wright, 2010). Machado et coll. ont montré que des souches d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à large spectre étaient présentes dans des échantillons d'eau prélevés dans la rivière Sousa et au niveau de la côte de Porto, au Portugal, à proximité de points de déversement d'eaux usées (Machado et al., 2009). En Irlande, des bactéries antibio-résistantes ont été retrouvées dans des effluents traités se déversant dans la mer (Galvin et al., 2010) et dans une étude espagnole, les eaux de rivières prélevées en aval d'un point de versement d'effluents de stations d'épuration contenaient plus d'entérobactéries et de souches d'*Aeromonas* sp. résistantes aux antibiotiques que les eaux situées en amont de ce point de versement (Goñi-Urriza et al., 2000).

D'après nos résultats, nous pouvons dire que l'activité humaine a un impact sur les écosystèmes aquatiques en termes de multirésistance aux antibiotiques. Les eaux de l'oued Messida étant directement utilisées pour l'arrosage des cultures et pour l'abreuvement des animaux, il y a urgence à développer et promouvoir des traitements des eaux efficaces sur les bactéries afin de rompre le cycle de la multirésistance.

## **Conclusion et perspective:**

Notre étude portant sur la recherche des bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux de l'Oued Messida a permis de confirmer que ces eaux sont caractérisées par :

- Une forte contamination d'origine fécale ;
- La présence des germes pathogènes (stricts ou opportunistes) ;
- La présence des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Nos résultats ont permis de révéler la fréquence des entérobactéries résistantes aux antibiotiques dans les milieux naturels (eau de surface). 85,71% des entérobactéries isolées des eaux de l'Oued Messida ont été résistantes à plusieurs antibiotiques tels que Tétracyclines, Ticarcilline, Chloramphénicol, Céfotaxime.

Cette étude a permis également de révéler la présence des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans un écosystème aquatique naturel ; la présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* résistantes aux antibiotiques constitue réellement un risque pour la santé publique.

En vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'eau de cet écosystème est impropre et de ce fait, il peut engendrer des conséquences néfastes, causant des nuisances importantes pour les usagers (irrigation, baignade, pêche...) et les ressources faunistiques.

En perspective et pour maintenir l'équilibre de cet écosystème lotique il faut veiller à certains points dont les principaux sont :

- La réalisation d'un traitement préalable des rejets avant qu'ils atteignent le lac Tonga et par conséquent l'Oued Messida ;
- La Surveillance périodique de la qualité bactériologique des eaux de la zone d'étude avec recherche de bactéries résistantes aux antibiotiques.
- Utilisation des méthodes génotypiques afin de maîtriser la diffusion de la multirésistance aux antibiotiques.

## Références bibliographiques

- **Ait kaci M et M. Hamdi. (2008).** Contribution à l'étude des paramètres physicochimiques et bactériologiques de l'embouchure de l'oued Béni Messous, Mémoire DEUA, Institutue nationale des sciences de la mer et de l'aménagement du littorale. P : 18-35.
- **Amhis W., H. Ammari., F. Assous et S. Bekkhoucha. (2005).** Standarisation De L'antibiogramme En Medecine Humaine A L'échelle Nationale Selon Les Recommandation De L'OMS 2002. P : 6-8.
- **Baquero F., J. Martínez et R. Cantón. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, P : 260–265.
- **Bazine N et A. Bournane. (2011).** Evalution de la qualité bactériologique des eaux d'Oued Messida. Mémoire de Master.Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 15- 20.
- **Berthe T., A. Touron., N. Renaud et F. Petit. (2003).** Résistance aux antibiotiques de souches d'*E. coli* isolées de Seine. Séminaire de travail Seine-Aval, 29 septembre-1<sup>er</sup> octobre, Rouen. 7p.
- **Bertolla F., R. Pepin., E. Passelegue-robe., A. Simkon., X. Nesme et P. Simonet. (2000).** Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopatogen *Ralstonia solona cearum*. *Appl. Env. Microbiol.* **66**. P: 4161 – 4167.
- **Bories G., P. Louisot., (1998).** Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale. 12 p.
- **Bouchaala L. (2010).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physicochimique de l'eau de l'Oued-Zénati(Guelma).Mémoire de Magister. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 37-45.
- **Camille D., (2003).** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. Réglementation, prélèvements, analyses. Édition Tec et Doc, P : 15-20.
- **Caprioli A., S.Morabito., H. Brugère et E. Oswald. (2005).** Entéroha emorrhagic *Escherichia coli* : emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 2005. P : 289-311.
- **Clausen E., B. Green and W. Litsky. (1977).** Fecal streptococci: indicators of pollution. Indicators/Health hazards associated with water. *American Society for Testing and Materials*, ASTM STP **635**. P: 247-264.

- **Cristian C., B. Jacky., S. Eddy., M. Salavert et T. Armand. (2008).** Microbiologie Hygiène Bases Microbiologiques de la diététique. Édition TEC, DOC, Lavoisier, Paris. P : 76-79.
- **Dahmen S., M. Haenni et P. Châtre. (2013).** Characterization of blaCTXM IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother*; **68**: P : 797-801.
- **Degrement. (2005).** Memento technique de l'eau. Dixième Édition. Tec et Doc. P : 144-173.
- **Dellarras C. (2000).** Microbiologie de l'environnement avec législation : travaux pratiques. Gaëtan moriu éditeur. P : 117-136.
- **Dellarras C. (2003).** Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. gaetan morin éditeur. P : 223-230.
- **Dellarras C., B. Trebaol. (2008).** Surveillance Sanitaire Et Microbiologique Des Eaux : Réglementation – Prélèvements – Analyses. Paris : Édition TEC & DOCG ,2008. P : 32-40.
- **Demanèche S., L. Jocteur-Monrozier., H. Quiquampoix et P. Simonet. (2000).** Evaluation of Biological and Physical Protection against Nuclease Degradation of Clay-Bound Plasmid DNA. *Appl. Env. Microbiol.***67**. P: 293-299.
- **Demanèche S., H. Sanguin., J. Poté., E. Navarro., D. Bernillon., P. Mavingui., M. Vogel et P. Simonet. (2008).** Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**. P: 3957-3962.
- **Derwich E., Z. Beziane., L. Benaabidate et D. Belghyti. (2008).** Evaluation de la qualité des eaux de surface des oueds Fès et Sebou utilisées en agriculture maraichère au Maroc. *Larhyss Journal*. P : 59-77.
- **Dolejská M., B. Bierosová et L. Kohoutová. (2009).** Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black headed gulls. *J Appl Microbiol* ; **106**. P: 941-950.
- **Edberg S., W. Rice., R. Karlin et M. Allen. (2000).** *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, **88**. P : 106-116.

- **Farrow J., G. Bitton. (1984).** Taxonomic studies of *S. bovis* and *S. equinus*: description of *S. alactolyticus* sp. no. and *S. saccharolyticus* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **5**. P : 467- 482.
- **Jehl F., R. Bonnet., F. Caron., J. Cavallo., H. Chardon., C. Chidiac., P. Courvalin., L.Dubreuil et V. Jarlier. (2013).** Comité De L'antibiogramme De La Société Française De Microbiologie. Recommandations 2013. P : 19-40. Ce document peut être téléchargé depuis le site internet de la Société Française de Microbiologie : <http://www.sfm-microbiologie.org/>
- **Joëlle E., D. Ollivon., K. Tiphagne et M. Chevreuil. (2006).** Contamination des eaux superficielles par les substances pharmaceutiques : Diffusion d'antibiotiques par la médecine humaine et les activités d'élevage. Laboratoire Hydrologie et Environnement EPHE/UMR Sisyphe 4, place Jussieu 75252 Paris cedex **5**.P : 2-10.
- **Joffin J., G. Leyrol. (2003).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3<sup>ème</sup> éditions ; CRDP d'Aquitaine ; P: 320-331.
- **JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N°34.** Décret exécutif n°11-219 du 10 Rajab 1432 correspondant au 12 juin 2011 fixant les objectifs de qualité des eaux superficielles et souterraines destinées à l'alimentation en eau des populations.
- **Haslay C., H. Leclerc. (1993).** Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier Tec & Doc, Paris, P : 495-500.
- **Gallay A., V. Prouzet-Mauléon., H. Valk., V. Vaillant., L. Labadi., J. Desenclos et F. Mégraud. (2005).** Les infections à *Campylobacter* chez l'homme en France : bilan des trois années de surveillance 2001-2003. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, n°4, P : 158-160.
- **Galvin S., F. Boyle et P. Hickey. (2010).** Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol* ; **76**. P : 477-479.
- **Goñi-Urriza M., M. Capdepuy et C. Arpin. (2000).** Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* ; **66**. P:125-132.

- **Guenther S., C. Ewers et L. Wieler. (2011).** Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution. *Front Microbiol* ; **2**. P : 246-260.
- **Guiraud J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Édition RIA Dunod. France. P : 186-378.
- **Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Édition RIA Dunod. P : 359-722.
- **Guiraud J. (2005).** Les pratiques des normes en microbiologie alimentaire. Fluor, France. P : 300-305.
- **Koenraad A., D. Trystram., E. Varon., Y. Péan et H. Grundmann. (1994).** Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques. *Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice. BEH n° 32*. P : 143 -150.
- **Kümmerer K. (2001).** Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to others sources - a review. *Chemosphere*, **45**. P: 957-969.
- **Kümmerer K. (2004).** Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemoth.* **54**, P : 311-320.
- **Labres E., D. Azizi et B. Boudjellab. (2006).** Cours d'Hygiène et de Microbiologie des Eaux : Microbiologie des eaux et des boissons, Institut Pasteur d'Algérie. P : 35-40.
- **Labres E., F. Mouffok. (2008).** Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. P : 53-60.
- **Larpent J. (1997).** Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Edition Tec et Doc. P : 294-300.
- **Leclerc H., L. Devriese et D. Mossel. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**. P : 459-466.
- **Lehours P. (2005).** Les *Campylobacter* : diagnostic biologique et surveillance de la résistance aux antibiotiques en France. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, P : 35 - 40.



- **Liebana E., M. Batchelor et K. Hopkins. (2006).** Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* ; **44**:P:16-24.
- **Light foot Nigel Francis. (2002).** Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. P : 387-398.
- **Livermore D., H. Nikaido H. (1994).** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* : Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* P : 38-41.
- **Machado E., T. Coque et R. Cantón. (2009).** Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*; **63**. P : 616-618.
- **Mac Keon H., T. Touron et F. Sevais. (1995).** Sources of microbiological contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries.* **28**, P : 627-633.
- **Massa S., E. Zuccato et S. Bagnati. (1995).** occurrence and fate of antibiotics in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, **179**(1-3). P :1042–1048.
- **Mesa R., V. Blanc et A. Blanch. (2006).** Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother*; **58**: P : 21–25.
- **OMS (2000)** Directives de qualité pour l'eau de boisson; volume 2 – critères d'hygiène et documentation à l'appui. Organisation mondiale de la Santé, 2<sup>e</sup> Édition, 10p. Résumé accessible à:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Summary\\_tables/](http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Summary_tables/)
- **Panin A., N. Lenyov., Y. Malakhov et E. Svetoch. (2005).** Salmophage : une nouvelle préparation pour le traitement et la prévention vaccinale de la salmonellose chez les volailles. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, P : 58-60.
- **Raachi M. (2007).** Étude préalable pour une gestion intégrée des ressources du bassin versant du lac Tonga au Nord-Est Algérien. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en géographie. Université Du Québec À Montréal. P : 154 -159.
- **Remini B. (2005).** la problématique de l'eau en Algérie. Collection hydraulique et transport. Blida. P : 18-23.

- **Rodier J. (1996).** L'analyse de l'eau ; Eaux Naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 8<sup>ième</sup> édition. Dunod. P : 135- 160.
- **Rodier J. (2005).** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles. Résiduaires. Eau de mer. 8<sup>ième</sup> édition. Dunod. Paris, P : 138-145.
- **Rodier J., B. Legure et N. Merlet. (2009).** L'analyse de l'eau ; Eaux Naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 9<sup>ième</sup> édition. Dunod. P : 700- 755.
- **Samraoui B., G. Belair. (1998).** Les zones humides de la Numidie orientale : Bilan des connaissances et perspectives de gestion. Synthèse. P : 90-109.
- **Sanders P. (2005).** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **158**, n°2, P : 139-145.
- **Schwarz S., E. Chaslus-Dancla. (2001).** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, **32**. P:201-205.
- **Simões R., L. Poirel et P. Costa. (2010).** Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* ; **16**. P: 110-112.
- **Sommer M., O. Dantas et G. Church. (2009).** Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, **325**, P : 1128–1131.
- **Tamtam F., F. Mercier., B. Eurin, J. Tuc Dinh., Q. Clément et M. Chevreuil. (2008).** Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, **393**(1), P : 84–95.
- **Thevenon F., N. Regier., C. Benagli., M. Tonolla., T. Adatte et J. Poté. (2012).** Characterization of faecal indicator bacteria in sediments cores from the largest fresh water lake of Western Europe (Lake Geneva, Switzerland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **78**. P: 50-56
- **Trevejo R., T. Barrm et A. Robinson. (2005).** Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immuno compromised. *Veterinary Research*, **36** (3), P : 493-506.
- **Velge P., A. Cloeckaert et P. Barrow. (2005).** Emergence of *Salmonella* epidemics : the problem related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, **26**. P : 267-288.

- **Wieler L., C. Ewers et S. Guenther. (2011).** Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int J Med Microbiol*; **301**. P: 635-641.
- **Wright G. (2010).** Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, P : 589–594.
- **Yin X et G. Stotzky. (1997).** Gene transfer among bacteria innatural environments. *Adv. Appl Microbiol.* **45**. P:153-212.
- **Zeraoula A. (2011).** Microbiologie de l'eau d'une zone humide lotique exoreique cas d'Oued Messida. Mémoire de Magister en Biologie-Ecologie. Université 8 Mai 1945 de Guelma. P : 20-25.
- **Zogheib E., H. Dupont. (2005).** Entérobactéries multirésistantes. Unité de réanimation polyvalente, département d'anesthésie-réanimation, CHU Nord, place Victor Pauchet, 80054 Amiens cedex, France. P : 153-165.

## Les sites web :

- [1] <http://www.bettembourg.lu/ecologie/eau>. Consulter le : (12/03/2014).
- [2] <http://membres.multimania.fr/pollutioneauxdouce/newpage.html> Consulter le : (14/04/2014).
- [3] [http://www.ornithomedia.com/pratique/voyages/voyage\\_art65\\_1.htm](http://www.ornithomedia.com/pratique/voyages/voyage_art65_1.htm). Consulter le : (10/03/2014).
- [4] [http://www.ornithomedia.com/pratique/voyages/voyage\\_art65\\_2.htm](http://www.ornithomedia.com/pratique/voyages/voyage_art65_2.htm). Consulter le : (22/02/2014).
- [5] [www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003\\_147\\_1\\_04.pdf](http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003_147_1_04.pdf). Consulter le: (15/03/2014).
- [6] <http://www.vedura.fr/actualite/7737-secteur-transport-rejette-35-emission-co2>. Consulter le : (26/02/2014).
- [7] [ressources.iamm.fr/thèses/78.pdf](http://ressources.iamm.fr/thèses/78.pdf). Consulter le : (02/04/2014).
- [8] [www.eau-rhin-meuse.fr/.../pollu/pol02.htm](http://www.eau-rhin-meuse.fr/.../pollu/pol02.htm). Consulter le: (18/04/2014).
- [9] [http://www/POLLUTION/Cote d'alerte sur la pollution des eaux -Le journal du CNRS-CNRS.htm](http://www/POLLUTION/Cote_d_alerte_sur_la_pollution_des_eaux_-Le_journal_du_CNRS-CNRS.htm). Consulter le : (25/03/2014).
- [10] [www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm](http://www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm)). Consulter le (03/05/2014).
- [11] [http://www.citesciences.fr/francais/ala\\_cite/eau\\_pour\\_tous/maladies\\_hydriques.php?rub=maitrise\\_eau&ss\\_rub=20](http://www.citesciences.fr/francais/ala_cite/eau_pour_tous/maladies_hydriques.php?rub=maitrise_eau&ss_rub=20). Consulter le: (28/02/2014).
- [12] [http://www/Desktop/eau résiduaire et secteur pharmaceutique.htm](http://www/Desktop/eau_résiduaire_et_secteur_pharmaceutique.htm). Consulter le: (30/04/2014).
- [13] [file:///C:/Users/hp%20650/Desktop/Nouveau%20dossier%20\(7\)/poppp/rrrrrrr/Contaminant](file:///C:/Users/hp%20650/Desktop/Nouveau%20dossier%20(7)/poppp/rrrrrrr/Contaminant). Consulter le: (13/03/2014)
- [14] <http://www.whp-apsf.ca/fr/documents/pharmWaterFR.html>. Consulter le: (04/04/2014).
- [15] [www.arnobio2.com/pratique-bacteriologie-galerie-api.html](http://www.arnobio2.com/pratique-bacteriologie-galerie-api.html). Consulter le: (19/04/2014).
- [16] [www.techmicrobio.eu/.../API20%20Staph/API20%20Staph.pdf](http://www.techmicrobio.eu/.../API20%20Staph/API20%20Staph.pdf). Consulter le : (22/02/2014).

[17] [www.scribd.com/doc/10644/API20Strep](http://www.scribd.com/doc/10644/API20Strep). Consulter le : (20/02/2014).

[18] [http://www.itameriportaali.fi/en/galleria/galleriakuvat/en\\_GB/algae/](http://www.itameriportaali.fi/en/galleria/galleriakuvat/en_GB/algae/). Consulter le : (20/02/2014).

[19] [http://www.cabri.org/CABRI/s-doc/cip\\_bact.info.html](http://www.cabri.org/CABRI/s-doc/cip_bact.info.html). Consulter le : (29/02/2014).

[20] <http://www.dsmz.de/index.htm>. Consulter le : (20/03/2014).

[21] <http://www.sfm-microbiologie.org/>. Consulter le : (01/03/2014).

[22] [http://www.frm.org/informez/info\\_ressources\\_dossiers\\_article\\_sommaire.php?id=7&type=10](http://www.frm.org/informez/info_ressources_dossiers_article_sommaire.php?id=7&type=10). Consulter le : (01/05/2014).

[23] <file:///C:/Users/hp%20650/Desktop/po/La%20pollution%20des%20eaux.htm>

Consulter le : (03/03/2014).

## **Annexe I:**

### **➤ Les milieux de culture utilisés :**

#### **◆ Milieu Chapman:**

##### **Composition:**

-Peptone trypsique de caséine .....	10g
-Extrait de viande.....	1g
-Chlorure de sodium.....	75g
-Mannitol.....	10g
-Rouge de phénol.....	0.025g
-Agar .....	15g
-Eau distillée.....	1000ml

##### **Préparation :**

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7.5 et stériliser à 121C° pendant 20 mn.

#### **◆ Gélose nutritive :**

##### **Composition:**

- extrait de viande de l'œuf .....	1g
- Agar .....	15g
- peptone .....	5g
- chlorure de sodium.....	15g
- extrait de levure .....	2g

##### **Préparation :**

Verser 28 g dans un litre d'eau distillée. Ajuster le pH à 7.4. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

#### **◆ Gélose SS :**

- Peptone pancréatique de viande .....	5,0 g
- Extrait de viande .....	5,0 g
- Lactose .....	10,0 g
- Sels biliaires.....	8,5 g
- Citrate de sodium.....	10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....	8,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	1,0 g

- Rouge neutre .....25,0 mg
- Vert brillant.....0,33 mg
- Agar agar bactériologique.....15,0 g
- Eau distillé.....1000ml      pH = 7,0

◆ **Gélose de Mac Conkey :**

**Composition:**

- Peptone pancréatique de gélatine .....17,0 g
- Tryptone.....1,5 g
- Peptone pepsique de viande .....1,5 g
- Lactose .....10,0 g
- Sels biliaires.....1,5 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Rouge neutre .....30,0 mg
- Cristal violet .....1,0 mg
- Agar agar bactériologique.....13,5 g
- Eau distillé.....1000 ml      pH : 7,3 ± 0,2.

◆ **Gélose Hektoen :**

- Protease peptone.....2 g
- Extrait de levure.....3 g
- Chlorure de sodium.....5 g
- Thiosulfate de sodium.....5 g
- Sels biliaires .....9g
- Citrate de ferammoniacale.....1.5g
- Salicine .....2g
- Saccharose.....12g
- Lactose .....2g
- Fuchsine acide.....0.1g
- Bleu de brothynol.....0.06g
- Agar.....1.4g
- Eau distillée.....1000ml      pH =7.5

◆ **Milieu King A :**

- Bacto-peptone.....20g
- Agar.....15g

- Glycérol C.P.....10g
- K<sub>2</sub> HSO<sub>4</sub> anhydre.....15 g
- MgCl<sub>2</sub> anhydre.....1.4 g
- Eau distillé.....1000 ml      pH = 7,2

**Milieu King B:**

- Protéose peptone (Difco).....20 g
- Agar.....15 g
- Glycérol C.P.....10 g
- K<sub>2</sub> HSO<sub>4</sub> anhydre.....15g
- MgCl<sub>2</sub> anhydre.....1.4 g
- Eau distillé.....1000 ml      pH : 7,2 ± 0,2

◆ **Milieu TSI:**

- Agar.....12g/L
- Extrait de l'œuf .....3g/L
- Extrait de levure .....3g/L
- Peptone .....20g/L
- Lactose.....10g/L
- Saccharose.....10g/L
- NaCl.....5g/L
- Glucose.....1g/L
- Citrate ferrique.....3g/L
- Thiosulfate de sodium.....3g/L
- Rouge de phénol.....0,025g/L
- Eau distillée.....1000 ml      Ajuster le pH à 7.4

◆ **Milieu citrate de Simmons:**

- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium .....0,2g
- Phosphate d'ammonium POH.....1g
- Phosphate di potassique POHK.....2g
- Citrate trisodique.....2g
- Solution de bleu bromothymol 1%.....8ml



- Agar.....15g
  - Eau distillée.....1000ml
- Ajuster le pH à 7-7.2.

◆ **Milieu mannitol- mobilité:**

- Peptone pancréatique de viande.....20g/L
  - Agar-agar.....4g/L
  - Mannitol.....2g/L
  - Nitrate de potassium.....1g/L
  - Rouge de phénol solution à 1%.....4ml
  - Eau distillée.....1000ml
- Ajuster le pH à 7.2.

◆ **Milieu Clark et lubs :**

- Peptone tryptique de casein.....5 g/L
  - Phosphate bi potassique.....5 g/L
  - Glucose.....5 g/L
  - Eau distillée.....1000ml
- pH = 7,5 (environ)

◆ **Milieu Urée-indole:**

- L-tryptophane.....3g
  - Phosphate monopotassique.....1g
  - Phosphate di potassique.....1g
  - Chlorure de sodium.....5g
  - Urée.....20g
  - Solution rouge de phénol à 1%.....2,5ml
  - Alcool à 95°.....10ml
  - Eau distillée.....1000ml
- pH 6,7

◆ **Gélose Mueller-Hinton**

**Composition:**

- Hydrolysât acide de caséine .....17,5 g
- Infusion de viande.....2,0 g
- Amidon soluble .....1,5 g
- Agar agar bactériologique.....17,0 g
- Eau distillé.....1000ml

**Préparation**

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK048) dans 1 litre d'eau distillée

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

- Stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes                      pH 7,3 ± 0,2.

➤ **Réactifs :**

◆ **Réactif TDA :** pour la recherche de tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....3.4g

Eau distillée.....100ml

◆ **Réactif IND :** pour la recherche de l'indole :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde.....5.0g

Alcool isoamylique.....75ml

HCL .....37%

◆ **Réactif de Voges Proskauer (VP) :** pour la recherche de l'acétone :

✓ **VP 1 :**

Hydroxyde de potassium.....40g

Eau distillée.....100ml

✓ **VP 2 :**

Alpha naphthol.....6g

Ethanol .....100ml

◆ **Réactif Kowacks :** pour la recherche de l'indole.

-Paradeethylamino benzaldéhyde.....5g

-Alcool amylique.....75ml

-HCl pur.....25ml

◆ **Rouge de méthyle :**

-Rouge de méthyle.....0,5g

- Alcool éthylique a 60° .....100ml

**Colorants:**

◆ **Lugol :** Elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant

-Iode.....1g

-Iodure de potassium.....2g

- Eau distillée.....3g

◆ **Violet de Gentiane :** Elle est utilisée pour colorer les bactéries.

-Violet de gentiane.....1g

- Ethanol à 90%.....1ml
- Phénol.....2g
- Eau distillée.....100ml

◆ **Fuchsine de Ziehl :**

- Fuchsine basique.....1g
- Alcool éthylique.....100ml
- Phéno.....15g
- Eau distille.....100ml

## Annexe II :

**Tableau 01** : Table de Mac Grady (Rodier et *al.*, 2005).

Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.3
010	0.3
011	0.6
020	0.6
100	0.4
101	0.7
102	1.1
110	0.7
111	1.1
120	1.1
121	1.5
130	1.6
200	0.9
201	1.4
202	2.0
210	1.5
211	2.0
212	3.0
220	2.0
221	3.0
222	3.5
223	4.0
230	3.0
231	3.5
232	4.0
300	2.5
301	4.0
302	6.5
310	4.5
311	7.5
312	11.5
313	16.0
320	9.5
321	15.0
322	20.0
323	30.0
330	25.0
331	45.0
332	110.0
333	140.0

**Tableau 02** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E [15].

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
			Jaune	Rouge/orange
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
<b> CIT </b>	Sodium citrate	Utilisation de citrate	vert	Bleu-vert/orange
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	incolore	Noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophanedésaminase	Jaune	Marron
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	incolore	Rose
<b> VP1</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	<b>VP1+ VP2</b>	
			Incolore	Rose/rouge
<b> GEL </b>	Gélatineemprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/vertjaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	Mlebiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
<b>NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub></b>	GLU tube	Production de NO <sub>2</sub> réduction N <sub>2</sub> gaz	<b>NIT 1+NIT 2, 2-3 min</b>	
			Jaune	Rouge

**Tableau 03 :** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph [16].

Tests	substrats	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	aucun	Témoin négatif	Rouge	-
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin positif	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>	$\beta$ -naphtylac.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- glucosamine			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

**Tableau 04 :** Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API strep [17].

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
<b>vp</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP1+ VP2/ jusqu'à 10 mn</b>	
			Incolore	Rose/rouge
<b>HIP</b>	Acide hippurique	hydrolyse	<b>NIN/ jusqu'à 10 mn</b>	
			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	PYRrolidonyl Arylamidase	<b>ZYM A+ZYM B/10mn</b>	
			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 naphthol- ASBgalactopyranoside	$\beta$ -GIUcuRonidase	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	Incolore	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			

**Tableau 05** : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE [18].

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



**Tableau 06 :** Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) des souches de références utilisées obtenus par diffusion en gélose [21].

<b>Antibiotiques</b>	<b>Charge du disque</b>	<b><i>E.coli</i> (ATCC 25922)</b>	<b><i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)</b>	<b><i>S.aureus</i> (ATCC 25923)</b>	<b><i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)</b>
Pénicilline G	6µg(10UI)	–	–	31,0 – 38,5	–
Ticarcilline	75 µg	–	25,0 – 30,5	–	–
Pipéracilline	75 µg	–	27,5 – 32,5	–	–
Céfotaxime	30 µg	32,5– 37,5	–	–	–
Imipénème	10 µg	–	24,5 – 29,5	–	–
Ciprofloxacine	5 µg	31,0 – 38,0	29,0 – 36,5	–	–
Erythromycine	15 UI	–	–	26,5 – 31,5	14 –22
Lincomycine	15 µg	–	–	24,5 – 29,5	–
Rifampicine	30 µg	–	–	34,0 – 39,0	–
Acidefusidique	10 µg	–	–	28,5 – 34,5	–
Tétracycline	30 µg	–	–	–	15–18

**Tableau07:** Diamètres des zones d'inhibition obtenues (mm) de l'antibiogramme des souches étudiées.

Espèces	Antibiotiques														
	TI75	IPM10	CTX30	P10	PRL100	CN10	C30	TE30	CIP5	E15	L10	RP	NIT300	FC10	RIF5
<i>Escherichia coli</i> ( $E_1$ ) (Fig44)	6	30	/	/	/	/	30	6	33	/	/	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ( $E_2$ ) (Fig45)	11	40	/	/	/	/	26	6	40	/	/	/	24	/	/
<i>Klebsiella oxytoca</i> ( $K_1$ )(Fig46)	20	30	10	/	/	/	30	6	28	/	/	/	/	/	/
<i>Serratia marcescens</i> (Fig47)	17	30	10	/	/	/	14	6	31	/	/	/	/	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_1$ ) (Fig48)	29	32	6	/	/	/	14	6	25	/	/	/	/	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_2$ )(Fig49)	28	30	/	/	/	/	26	/	28	/	/	/	23	/	/
<i>Citrobacter freundii</i> ( $C_3$ ) (Fig50)	20	/	30	/	/	/	25	10	27	/	/	/	24	/	/
<i>Levinea</i> (Fig51)	28	28	/	/	/	/	30	20	40	/	/	/	15	/	/
<i>Proteus vulgaris</i> (Fig53)	21	30	/	/	/	/	14	6	28	/	/	/	/	/	/
<i>Edwardsiella tarda</i> (Fig54)	30	30	/	/	/	/	13	6	28	/	/	/	/	/	/
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Fig52)	28	30	6	/	/	/	18	6	31	/	/	/	/	/	/
<i>Salmonella typhimurium</i> (Fig55)	19	/	30	/	/	/	26	10	25	/	/	/	22	/	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Fig56)	12	/	/	/	26	13	/	6	32	/	/	/	6	/	/
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Fig57)	6	28	/	/	/	22	/	16	26	/	/	/	22	/	/
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Fig58)	/	/	/	7	/	/	/	/	/	6	6	/	/	6	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (Fig59)	/	/	/	6	/	/	/	/	/	6	6	6	/	6	6
<i>Micrococcus roseus</i> (Fig60)	/	/	/	6	/	/	/	/	/	9	6	9	/	/	/
<i>Streptococcus sp.</i> (Fig61)	/	/	18	12	/	/	36	6	/	6	/	/	/	/	9
<i>Enterococcus faecium</i> (Fig62)	/	/	/	6	/	/	30	/	/	6	/	/	/	/	12
<i>Aerococcus viridans</i> 2(Fig63)	/	/	21	6	/	/	26	15	/	23	/	/	/	/	15

## Résumé

La présente étude consiste à évaluer la qualité bactériologique des eaux de l'Oued Messida (situé dans le PNEK –Nord-Est Algérien) par détermination de degré de la contamination fécale et par la recherche des bactéries résistantes aux antibiotiques durant trois mois (Février, Mars et Avril 2014). Trois stations d'échantillonnage s'étendent de l'exutoire du lac Tonga jusqu'à l'embouchure ont été choisies le long d'Oued Messida en fonction de l'implantation des sources de contamination.

La résistance aux antibiotiques fréquemment utilisés en médecine vétérinaire et en médecine humaine a été testée chez les souches bactériennes isolées des eaux étudiées.

Les résultats obtenus ont montré une forte contamination fécale des eaux avec présence de plusieurs genres bactériens résistants aux antibiotiques.

Parmi 22 souches bactériennes isolées, 14 sont des entérobactéries, 02 staphylocoques, 02 streptocoques, une *Pseudomonas*, une entérocoque, une microcoque et une *Aeromonas*.

Les souches d'entérobactéries sont résistantes par ordre décroissant à la Tétracyclines (83,33%), au Ticarcilline (58,33%), à la Chloramphénicol (41,66%) et au Céfotaxime (33,33%). Les *Staphylococcus* et *Micrococcus* sont résistants (100%) à tous les antibiotiques utilisés (Acide fusidique, Rifampicine, Pénicilline, Erythromycine, Lincomycine, Pristinamycine); le même résultat a été obtenu pour les entérocoques et les streptocoques, elles sont résistantes à tous les antibiotiques utilisés (Tétracyclines, Rifampicine, Pénicilline, Erythromycine, Céfotaxime) à l'exception de Chloramphénicol. La souche de *Pseudomonas* isolée est résistante à quatre antibiotiques qui sont (Tétracyclines, Nitrofuranes, Ticarcilline et Céfalexine) et la souche d'*Aeromonas* est résistante à un seul antibiotique (Ticarcilline).

Les résultats obtenus confirment que les eaux d'Oued Messida constituent un risque pour la santé publique.

**Mots-clés :** Oued Messida, qualité bactériologique, résistance aux antibiotiques, risque sanitaire.

## Summary

In this study, we investigated the bacteriological water quality of Oued Messida (situated in the North-East of PNEK –Algeria-) by determination of the degree of fecal contamination and research of antibiotic resistant bacteria during three months (February, March and April 2014).

Three sampling stations extending from the outlet of Lake Tonga to the mouth were selected along oued Messida depending on the location of sources of contamination.

The bacteria isolates from waters studied were tested for susceptibility to antibiotics used in veterinary medicine and in human medicine

The results showed a strong fecal contamination of water with the presence of multiple-antibiotic-resistant bacterial genera.

Among 22 bacterial strains isolated, 14 were *Enterobacteriaceae*, 02 Staphylococci, 02 Streptococci, 01 *Pseudomonas*, 01 *Enterococcus*, 01 *Micrococcus* and 01 *Aeromonas*.

Strains of Enterobacteriaceae are resistant descending to Tetracyclines( 83.33% ), Ticarcilline ( 58.33% ), Chloramphenicol ( 41.66 % ) and to Céfotaxime (33.33%). *Micrococcus* and *Staphylococcus* are resistant (100%) at all used antibiotics (Fusidic acid, Rifampicin, Penicillin, Erythromycin, Lincomycin, Pristinamycin), the same result was obtained for enterococci and streptococci, they are resistant at all antibiotics ( Tetracyclin, Rifampicin, Penicillin, Erythromycin, Céfotaxim) except de Chloramphenicol. *Pseudomonas* strain is resistant to four antibiotics (Tetracyclin, Nitrofurantoin, Ticarcillin and Cephalexin) and *Aeromonas* strain is resistant to a single antibiotic (Ticarcillin).

The results confirm that the waters of a river Messida constitutes a potential risk for public health.

**Keywords:** Oued Messida, bacteriological quality, antibiotic resistance, health risk.

## ملخص

هذه الدراسة تهدف إلى تقييم النوعية البكتيريولوجية لمياه واد مسيدة (الموجود في الحظيرة الوطنية للقاله شمال شرق الجزائر ) عن طريق تحديد درجة التلوث البرازي والبحث عن البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية لمدة ثلاثة أشهر ( فيفري، مارس و أبريل 2014 ) .

تم اختيار ثلاث محطات لأخذ العينات تمتد من مخرج بحيرة تونغا إلى الفم على طول واد مسيدة اعتمادا على موقع مصادر التلوث.

من خلال السلالات البكتيرية المعزولة من المياه التي تمت دراستها قمنا باستخدام المضادات الحيوية التي يتم استعمالها في الطب البيطري و الطب البشري.

أظهرت النتائج وجود تلوث برازي قوي للمياه مع وجود عدة أجناس بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية. ما بين 22 سلالات بكتيرية معزولة، 14 كانت المعوية (entérobactérie)، 02 مكورة عنقودية (staphylocoques)، 02 مكورة عقدية (streptocoques)، الزائفة (Pseudomonas) ، نوع من المكورات المعوية (entérocoque)، ووجود مكورة و غازية (microcoque et Aeromonas) . وقد تم الحصول على سلالات من البكتيريا المعوية مقاومة بالترتيب التنازلي الى ( 83.33 % ) التتراسكلين ، ( 58.33 % ) التكرسلين ( 41.66 % ) الكلورامفينيكول و ( 33.33 % ) سيفوتكسيم.

أما بالنسبة للمكورات العنقودية هي مقاومة ( 100 % ) لكل المضادات الحيوية المستخدمة (حمض الفوسيديك ، ريفامبيسين ، البنسلين ، الاريثروميسين، لنكوميسين ) ، تم الحصول على نفس النتيجة بالنسبة للمكورات المعوية و العقديات ، بمقاومة جميع المضادات الحيوية المستخدمة ( التتراسكلين ، ريفامبيسين ، البنسلين ، الاريثروميسين ) باستثناء الكلورامفينيكول .

أما النتائج المتحصل عليها بالنسبة إلى السلالة الزائفة المعزولة كانت مقاومة لأربع مضادات حيوية وهي التتراسكلين ، نتروفيران، تيكارسيلين سيفالكسين و السلالة الغازية مقاومة لمضاد حيوي واحد ( تيكارسيلين ). تؤكد النتائج المتحصل عليها أن مياه واد مسيدة تكون عدة مخاطر على الصحة العامة.

**الكلمات الرئيسية :** واد مسيدة ، الجودة البكتيريولوجية ، مقاومة المضادات الحيوية ، المخاطر الصحية.