

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



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la nature et de la vie.

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

Département : Ecologie et Génie de l'Environnement.

Thème

Recherche des bactéries tolérantes aux métaux lourds (Cadmium et cuivre) dans la région de Guelma.

Présenté par :

Benkhaoua Wided

El Houchet Hala

Haridi Sabah

Devant la commission composée de :

Dr. Torch Asma

Mme Amri Sandra

Dr. Gueroui Yacine

Pr. Houhamdi Moussa

Dr. Benhalima Lamia

Mme Bedioui Souraya

Président

Encadreur

Examineur

Membre

Membre

Membre

Université de Guelma

Juin 2017

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Allah, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience.

Notre sincère gratitude va à Dr. Torch Asma, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nos remerciements vont à Dr. Gueroui Yacine, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons premièrement à remercier notre encadreur Mme Amri Sandra, de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail.

Nos remerciements vont aussi à Pr. Houhamdi Mousa, Dr. Benhalima Lamia et Mme Bedioui Souraya pour avoir accepté être membres dans le jury de ce modeste travail.

Nous remercions l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques pour leur aide et disponibilité.

Nous remercions, du fond du cœur, nos parents pour leur soutien et leur patience durant nos études et pour leur aide et encouragement

Un merci spécial pour nos collègues et amis.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est

toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon très cher père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur,

ma vie et mon bonheur, maman que j'adore.

Vous resterez à jamais dans mon cœur.

A ma très chère sœur Alima et mes très chers frères Tarek, Issam et Halim.

A tous la famille de Benkhaoua

A mes très chères amies : Amira et Amel, sans oublier mes collègues Hala, Sabah et Rawdha.

A ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail.

Merci à tous

Benkhaoua Wided

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

À la mémoire de Mon Grand-père, j'aurais tant aimé que tu sois présent.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur,

ma vie et mon bonheur, Maman que j'adore.

À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, à toi mon très cher père.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Vos prières et vos bénédictions mes chers parents, m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, mon profond respect pour tous les efforts que vous avez fournis pour moi. J'espère qu'un jour je peux leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

À Mon Mari Saif, tes sacrifices, ton soutien, et ton encouragement m'ont permis de réussir mes études. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

À mes frères et leurs femmes, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

À mes neveux : Kousay, Darine, Adam, Iyed, Jaouad, et la petite Jomana qui m'ont donnée le sourire et la joie de vivre.

À Ma Grand mère Chérie, Puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé.

À ma chère belle mère Habiba et mon beau père Said, ainsi que toute la famille Derghal.
Sans oublier toutes mes amies et mes collègues.

El houchett Hala

Dédicace

Tout d'abord, je remercie ALLAH tous puissant qui m'a permit de suivre mes études et m'a muni de volonté, force et patience à fin de réaliser ce travail.

A mes chers parents, source de tendresse, de volonté, et de patience, mes yeux à travers lesquels j'ai vu et je vois ce monde. Je vous remercie d'être toujours à mes cotés.

A mes frères et sœurs: Nadir, Waheb, Wahide, Wahiba et Hanen.

A celles qui je passe avec elles les bonnes heures et je porte avec elles que les bonnes souvenirs , à mes amies intimes : Wided, Halima, Nada, Ibtisem , Asma , Insaf .

A tout mes amies, surtout : Hala et wided.

Haridi Sabah

Table des matières

Tire	Page
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
Chapitre I : Synthèse bibliographiques	
I.1 Métaux lourds.....	01
I.1.1 Définition.....	01
I.1.2. Classification des métaux lourds.....	01
I.1.3. Origine des métaux lourds.....	02
I.1.4. Propriétés des métaux lourds.....	03
I.1.5. Effets toxiques des métaux lourds.....	04
I.1.6. Normes et réglementation.....	04
I.2. Métallo résistance bactériennes.....	05
I.2.1. Notion de résistance et tolérance.....	05
I.2.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne.....	05
I.2.3. Résistance bactériennes aux métaux lourds.....	06
I.2.4. Effet des métaux sur la cellule bactérienne.....	07
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Description des stations d'étude.....	09
II.1.1. Oued Seybouse.....	09
II.1.2. Oued Zimba.....	11
II.1.3. Oued Maïz.....	11

II.2. Paramètres météorologiques.....	11
II.3. Mesure des paramètres physico-chimique de l'eau.....	12
II.4. Prélèvements de l'eau pour les analyses microbiologique.....	12
II.5. Isolement de la flore bactérienne.....	12
II.6. Identification de la flore bactérienne.....	14
II.6.1.Examen macroscopique.....	14
II.6.2. Examen microscopique.....	14
II.6.3. Recherche de l'oxydase.....	15
II.6.4. Recherche de la catalase.....	15
II.6.5. Identification biochimique.....	16
II.7. Conservation des souches bactériennes.....	22
II.8. Etude de la sensibilité aux métaux lourds.....	22
II.8.1. Milieux utilisés.....	22
II.8.2. Préparation des solutions mères.....	23
II.8.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	23

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Paramètres physicochimiques de l'eau.....	24
III.2. Identification de la flore bactérienne.....	24
III.2.1. Examens macroscopiques et microscopiques.....	24
III.2.2. Recherche de l'oxydase et la catalase.....	30
III.2.3. Identification biochimique.....	30
III.3. Répartition spatiale de la flore bactérienne.....	40
III.4. Inventaire de la flore bactérienne.....	41
III.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	42
III.5.1. Cadmium.....	42
III.5.2. Cuivre.....	44

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Résumés

Liste des abréviations

% : Pour cent.

µg/ml : Microgramme par millilitre.

µm : Micromètre.

ATP : Adénosine-triphosphate.

C° : Degré Celsius.

Cd : Cadmium.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Cu : Cuivre.

Da : Dalton.

ETM : Eléments traces métalliques.

g : Gramme.

g/cm³ : Gramme par centimètre cube.

g/mol : Gramme par mol.

GN : Gélose nutritif.

h : Heure.

Hg : Mercure.

mg/ml : Milligramme par millilitre.

MH : Muller Hinton.

MIT : Metal Inorganic Transport.

ml : Millilitre.

MT : Méthallothioneine.

mV : Millivolt.

N° : Numéro.

Ni : Nickel.

NI : Nitrate.

O₂ : Oxygène.

Pb : Plomb.

Pb : Plombe.

pH : Potentiel hydrogène.

PM : Poids moléculaire.

RM : Rouge de méthyle.

SS : Gélose Salmonella-Shigella.

TDA : Acide indole-pyruvique.

VP : Voges-proskauer.

Z : Nombre de proton =Np.

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Tableau périodique des éléments	01
02	Origine des métaux lourds	02
03	Localisation des stations d'échantillonnage	09
04	Vue générale de la station d'étude S.1	10
05	Vue générale de la station d'étude S.2	10
06	Vue générale de la station d'étude S.3	11
07	Vue générale de la station d'étude S.4	11
08	(a) : Colonies blanchâtres sur la gélose nutritive, (b) : Bacilles à Gram négatif	26
09	(a) : Colonie rouge brique sur la gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif	26
10	(a) : Colonies jaune saumon sur la gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif	27
11	(a) : Colonies vertes sur la gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif	27
12	(a) : Colonies marron sur la gélose Hektoen, (b) : Cocci à gram négatif	27
13	(a) : Colonies blanchâtres à vertes sur la gélose Cétrimide, (b) : Bacilles à Gram négatif	28
14	(a) : Colonies orangées sur la gélose SS, (b) : Bacilles en chainettes à Gram négatif	28
15	(a) : Colonies roses sur la gélose SS, (b) : Bacilles à Gram négatif	28
16	(a) : Colonies vertes sur la gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif	29
17	(a) : Colonies jaunes sur la gélose Chapman avec virage de couleur, (b) : Cocci à Gram positif	29
18	(a) : Colonies blanches sur la gélose Chapman, (b) : Cocci à Gram positif	29
19	Identification biochimique de l'espèce <i>Serratia odorifera 1</i>	32
20	Identification biochimique de l'espèce <i>Providencia rettgeri</i>	32
21	Identification biochimique de l'espèce <i>Serratia marcescens</i>	32
22	Identification biochimique de l'espèce <i>Providencia stuartii</i>	32
23	Identification biochimique de l'espèce <i>Shigella spp</i>	32
24	Identification biochimique de l'espèce <i>Pantoea spp</i>	32

25	Profil biochimique de l'espèce <i>Serratia odorifera</i>	34
26	Profil biochimique de l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
27	Profil biochimique de l'espèce <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	36
28	Profil biochimique de l'espèce <i>Pseudomonas luteola</i> .	36
29	Profil biochimique de l'espèce <i>Vibrio vulnificus</i>	36
30	Profil biochimique de l'espèce <i>Aeromonas hydrophila</i>	37
31	Profil biochimique de l'espèce <i>Pasteurella multocida</i>	37
32	Profil biochimique de l'espèce <i>Staphylococcus xylosus</i>	39
33	Profil biochimique de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	39
34	Profil biochimique de l'espèce <i>Staphylococcus lentus</i>	39
35	Profil biochimique de l'espèce <i>Staphylococcus hominis</i>	39
36	Répartition bactérienne des stations d'échantillonnage	40

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Normes des métaux lourds pour les eaux de surfaces	05
02	Caractérisation météorologique de la station météorologique 604030	12
03	Variation des paramètres physicochimiques de l'eau des stations d'échantillonnage	24
04	Aspect macroscopique et microscopique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage.	25
05	Identification de l'oxydase et de la catalase des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage	30
06	Résultats des testes biochimiques classique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage	31
07	Résultat de l'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API 20 E	33
08	Résultat de l'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API 20 NE	35
09	Résultat de l'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API Staph	38
10	Inventaire de la flore bactérienne au niveau des stations d'échantillonnage	41
11	Activité intrinsèque des métaux lourds	42
12	Variation de la CMI et de la CMB de la flore bactérienne des stations d'échantillonnage vis-à-vis du cadmium	43
13	Variation de la CMI et de la CMB de la flore bactérienne des stations d'échantillonnage vis-à-vis du cuivre	45

Introduction

Introduction

L'eau est un élément biologique important en tant que support de vie et facteur du développement des pays, elle est considérée comme un vecteur privilégié de l'activité humaine (**Gueroui, 2014**). La qualité des eaux dans le monde a connu ces dernières années une grande détérioration, à cause des rejets industriels non contrôlés et l'utilisation intensive des métaux lourds. Ces derniers produisent une modification chimique de l'eau et la rendent impropre aux usages souhaités [01]. En Algérie, le risque de la contamination des eaux de surface représente un problème environnemental majeur qui remonte très loin dans le temps (**Remini, 2005**), l'impact de la pollution sur les écosystèmes et la santé humaine est une question mondiale d'urgence (**Benfettoume et Khalla, 2014**).

Les métaux lourds sont des composés stables et hautement persistants, des contaminants de l'environnement; qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (**DeForest et al., 2007, Croteau et al., 2005**). Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration (**Mills et Colwell, 1977**) et les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (**Giller et al., 1998**). Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaborés plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et de se développer en présence de métaux lourds (**Silver, 1996**).

De ce fait l'objectif de notre travail est :

- Isolement et identification de la flore bactérienne peuplant 3 Oueds de la ville de Guelma.
- Recherche des bactéries tolérantes au cadmium et au cuivre par la détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.

Notre travail sera organisé en 3 chapitres :

- Le premier est purement théorique rassemble d'une part des généralités sur les métaux lourds et d'autre part la résistance bactérienne aux métaux lourds.
- Le second, chapitre est expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'analyse bactériologique et la recherche des bactéries tolérantes.
- Enfin le troisième chapitre, mentionne les différents résultats obtenus au cours de notre étude avec une discussion.

Synthèse

Bibliographiques

I. 1. Métaux lourds

I.1.1. Définition

Le terme métaux lourds est un mot ambigu et dont la définition varie d'une source à l'autre, jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale mais selon **Nies, (1999)**, ils peuvent être définis comme : Tout métal ayant une densité supérieure à 5g/cm^3 , ayant un numéro atomique élevé supérieur à celui du Sodium ($Z=11$) et pouvant être toxique pour les systèmes biologiques (**Bendjama, 2007**). Le terme élément trace métallique (ETM) est aussi utilisé pour décrire les métaux lourds car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (**Baker et Walker, 1990**). Parmi les éléments recensés dans la classification périodique de Mendeleïev, 53 sont considérés comme des métaux lourds (**Figure 1**).

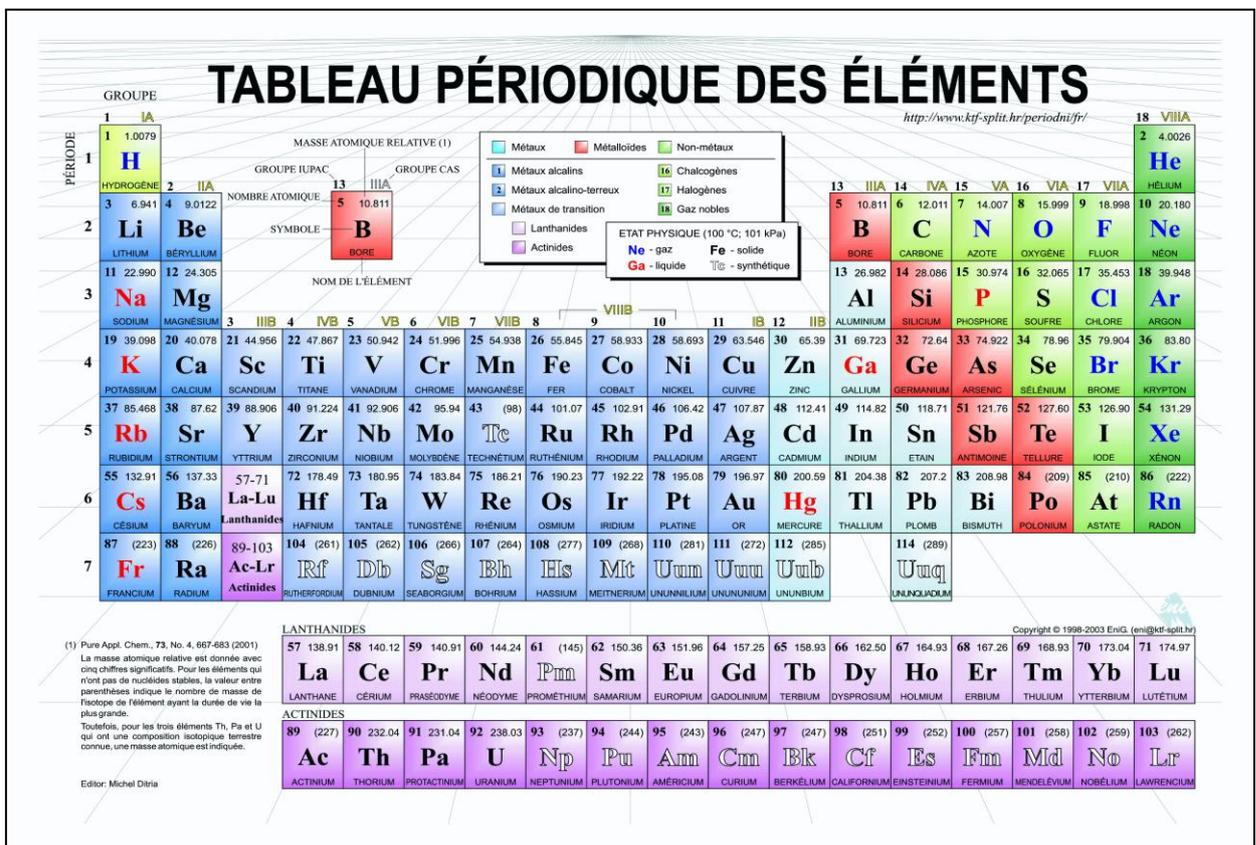


Figure 1 : Tableau périodique des éléments [1].

I.1.2 Classification des métaux lourds

D'un point de vue biologique on peut distinguer deux types de métaux lourds en fonction de leurs effets physiologiques.

I.1.2.1. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993), ils interviennent dans de nombreuses réactions enzymatiques et leur rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, cependant ils peuvent devenir toxiques lorsque leur concentration dépasse un certain seuil (Kabata Pendias et Pendias, 2001).

I.1.2.2. Métaux non essentiels

Métaux non essentiels ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effets bénéfiques connu pour la cellule, c'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd) (Chiffolleau *et al.*, 2004).

I.1.3. Origine des métaux lourds

L'origine des métaux lourds dans l'environnement peut être naturelle ou anthropique.

I.1.3.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Bourelhier et Berthelin, 1998).

I.1.3.2. Origine anthropique

La source majeure de la contamination est d'origine anthropique, les principaux types de la pollution anthropique sont : la pollution atmosphérique, la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle (Baize, 1997 ; Robert et Juste, 1999).

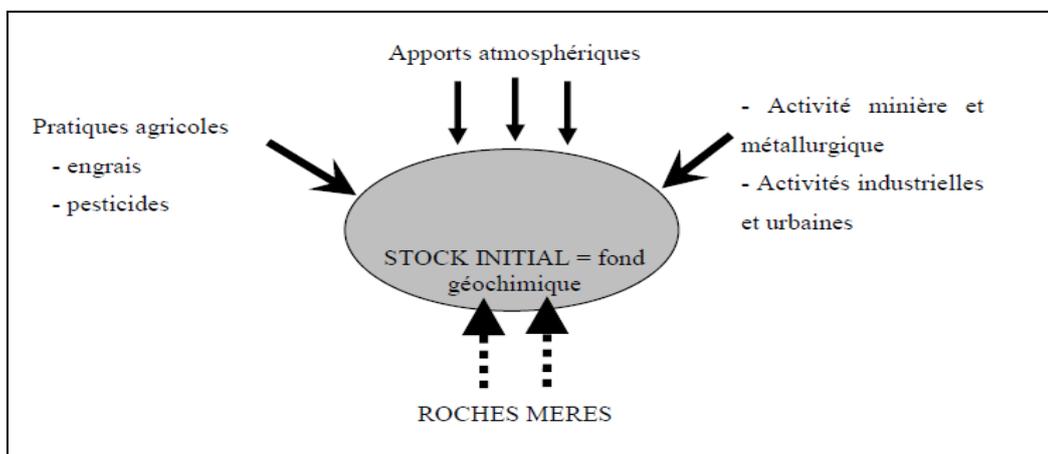


Figure 2: Origine des métaux lourds (Robert et Juste, 1999).

I.1.4. Propriétés des métaux lourds

Un métal lourd est un élément chimique doté d'un éclat particulier, c'est un bon conducteur de la chaleur et de l'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité. Ils peuvent se combiner avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'Homme depuis l'antiquité (**Rouane, 2013**). Nous nous limitons à décrire seulement 2 métaux : le cadmium et cuivre.

I.1.4.1. Cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal de transition purement toxique pour la cellule, de solubilité élevée ce qui fait de lui l'un des métaux lourds les plus dangereux après le mercure (**Nies, 1999**). Il est naturellement présent à l'état de traces dans les roches superficielles de l'écorce terrestre (**Bendjama, 2007**). Les usages du cadmium se situent principalement en électricité, en métallurgie et dans l'industrie des matières plastiques «stabilisateur des polymères» (**Ramade, 1992**). Il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium ce qui facilite ainsi sa pénétration dans les organismes (**Borchardt, 1985**). Le cadmium est rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoute ou colloïdale) et chimiques (minérale ou organique), la variation des caractères physico-chimiques du milieu peuvent gérer sa transformation dans l'environnement (**Gonzalez et al., 1999**). Contrairement à de nombreux métaux, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants (**Chiffolleau et al., 2001**).

I.1.4.2. Cuivre

Le cuivre (Cu) est un oligoélément indispensable au métabolisme des êtres vivants, il forme de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux (les chlorures ou l'ammonium) ou avec des ligands organiques (**ATSDR, 1990 ; Dameron et Howe, 1998**). C'est l'un des métaux les plus employés à cause de ses propriétés physiques et de sa conductibilité électrique et thermique. Il est utilisé dans la métallurgie, la fabrication des alliages de bronze, du matériel électrique, la plomberie et les équipements industriels. C'est un élément essentiel chez l'Homme et l'animal. Il est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques notamment la formation d'hémoglobine et la maturation des polynucléaires neutrophiles. De plus, c'est un cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines intervenant dans le métabolisme oxydatif et la respiration cellulaire. La toxicité des organismes vivants vis à vis du cuivre dépend de sa forme, de son état d'oxydation et de sa concentration (**Bendjama, 2007**).

I.1.5. Effets toxiques des métaux lourds

I.1.5.1. Effets toxiques sur la santé humaine

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer, elle a été reconnue depuis l'Antiquité, leur présence est responsable des nombreuses maladies connues chez l'Homme. Ainsi près de 30 % de la population mondiale souffre d'anémie due à une déficience en fer. De même, un défaut d'absorption du cuivre peut être à l'origine de la maladie de Wilson ou de Menkes (**Mercer et al., 2001**). Une surcharge en fer conduit à la thalassémie, cataracte ou l'hémochromatose. Un dérèglement dans l'homéostasie du cuivre peut être à l'origine de troubles neurologiques graves comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Certains métaux peuvent entrer en compétition avec des ions physiologiques ce qui peut inhiber les fonctions propres de ces derniers (**Nies, 1999**). Un autre exemple est celui du nickel, qui a la faculté de se solubiliser dans les lipides et les graisses sous-cutanée. Ainsi sous la forme Ni^{2+} , il peut interagir avec les acides aminés de la peau tels que les histidines ou les cystéines (**Savolainen, 1996**). Enfin, leurs propriétés redox peuvent conduire à la formation de radicaux libres créant alors un stress important (**Nelson, 1999 ; Nies, 1999**).

I.1.5.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques

La contamination par des métaux peut avoir des effets toxiques sur la vie aquatique, à faibles concentrations, beaucoup de métaux lourds peuvent inhiber la photosynthèse et la croissance des microorganismes (**Burnol et al., 2006**). Aussi des effets indésirables ont été observés chez les poissons, les mollusques et les crustacés qui se manifestent par un retard du développement embryonnaire, des malformations, une croissance tardive des adultes (**Zhao et al., 2000**), des perturbations de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux des bio marqueurs de défenses (**Huynh, 2009**).

I.1.6. Normes et réglementation

L'établissement de normes des métaux lourds présente un intérêt particulier, ceci s'explique par le fait que leurs effets sur l'homme et l'environnement ne cessent d'être mis en lumière [2].

Tableau 1 : Normes des métaux lourds pour les eaux de surfaces (JORA, 2011).

Métaux lourds	Valeur maximale	Unité
Mercure	10	µg/L
Fer dissous	1	mg/ L
Plomb	50	µg/ L
Cadmium	5	µg/ L
Cuivre	2	mg/ L
Zinc	5	mg/ L
Arsenic	100	µg/ L

I.2. Métallo résistance bactérienne

I.2.1. Notion de résistance et tolérance

Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations de métaux lourds, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance. Il est très difficile de distinguer une différence entre les deux termes. Le Conseil de la Recherche National du Canada définit globalement la résistance et la tolérance comme la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment (**Wright et Welbourn, 2002**).

I.2.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne

Les cellules bactériennes utilisent deux types de systèmes servant à l'entrée des métaux lourds à l'intérieur des cellules. Le premier est un système passif constitutif de la cellule, il est de faible affinité et rapide, emprunté par une grande variété de substrats. Il est constitué principalement par les protéines de la famille MIT (Metal Inorganic Transport). Ce système n'étant pas spécifique d'un ion particulier (**Nies, 1999**). Le second système de transport est un système actif de haute affinité pour le substrat, il est plus lent, inductible et utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Il est constitué principalement par le regroupe des ATPases de type P (**Odermatt et al., 1993**) et les ATPases de type A (**Nies, 1999 ; Gatti et al., 2000**).

I.2.3. Résistance bactérienne aux métaux lourds

La résistance bactérienne aux ions métalliques est apparue probablement tôt dans l'évolution, la pression sélective exercée par l'environnement a entraîné le développement des systèmes de résistance pour la plupart des métaux (**Senez, 1968**). Les différents systèmes de résistance utilisés par les bactéries sont comme suite :

I.2.3.1. Modifications dans la paroi cellulaire

La membrane ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des barrières de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux (**Rouch et al., 1995**).

I.2.3.2. Séquestration

C'est la première ligne de défense pour l'immobilisation rapide des métaux lourds afin d'éviter leurs effets toxiques dans la cellule. On a comme exemple la Méthallothioneine (MT), elle appartient à la famille des protéines intracellulaires, leur poids moléculaire est < 7000 Da. Elle est très riche en cystéine et possède la capacité de se lier à des métaux en particulier ceux qui régulent l'homéostasie des métaux essentiels (**Latendre, 2009**). Potentiellement présente dans tous les organismes vivants, elle passionne beaucoup de chercheurs en raison de leur structure chimique très particulière (**Picard et al., 2010**). La fonction la plus importante de la MT est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux tels que le cuivre et le zinc. Elle les séquestre afin d'éviter leur circulation à l'état libre et leur fixation sur d'autres protéines vitales (**Achard, 2005**). La liaison covalente des métaux avec les groupements thiols des MT est dynamique puisque les métaux prisonniers peuvent être libérés à tout moment. Les MT assurent un rôle de protection contre les éléments métalliques en limitant leur accessibilité à d'autres sites cellulaires participant de cette manière à la détoxification cellulaire (**Nezengue, 2008**).

I.2.3.3. Transformation en une forme moins toxique

Les métaux peuvent être bio transformés par des mécanismes d'oxydoréduction (ex Fe et Mn) liés à la respiration cellulaire, ou par alkylation (ex Hg). Ces transformations sont très importantes pour certaines bactéries (bactéries sulfato-réductrices en particulier) et ont une incidence sur la biodisponibilité, la mobilité et la toxicité du métal (dépendant de sa spéciation). Les métaux toxiques peuvent être également transformés en une forme moins toxique voire non toxique par oxydation ou réduction enzymatique. Pour leur métabolisme énergétique, de

nombreux procaryotes peuvent utiliser les métaux présents sous différents états d'oxydation (Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As ou Se) comme donneurs ou accepteurs d'électrons (**Ledin, 2000**).

I.2.3.4. Porte hors cellule

C'est le système d'efflux qui permet de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux lourds. Par exemple chez les procaryotes, il existe une pompe à cadmium codée par le gène YCF1 qui permet d'expulser les métaux or cellule (**Li et al., 1997**).

I.2.3.5. Réduction

C'est un procédé utilisé par divers micro-organismes pour éliminer les métaux, il se fait par la réduction du métal jusqu'à un état d'oxydation moins toxique. Pour être réduit, le métal doit posséder un potentiel redox compris entre celui des couples hydrogène/proton (-421 mv) et oxygène/hydrogène (+808 mv), ceci représente l'échelle physiologique redox pour la plupart des cellules aérobies. Ainsi, la réduction est nécessairement couplée à la séquestration de l'ion réduit (**Nies, 1999**).

I.2.3.6. Plasmides et transposons

Ce sont des éléments génétiques très spécifiques et présents chez toute les cellules procaryotes. La résistance aux métaux lourds peut correspondre à l'acquisition d'un système permettant à la bactérie de rejeter à l'extérieur l'élément indésirable. C'est justement ce qui se passe pour l'arséniate chez *E.coli* et *S.aureus*. L'arséniate fonctionne en générale comme un analogue du phosphate et rentre dans la cellule à l'aide des transporteurs de phosphate. La résistance est augmentée par l'acquisition d'une ATPase codée par le plasmide. La sélection spontanée des formes hautement résistantes à des concentrations élevées des métaux lourds est probablement assez commune dans la nature et au voisinage des régions minières et surtout dans les zones de déchets industrielles (**Chennouf et Siradj, 2008**).

I.2.4. Effets des métaux sur la cellule bactérienne

Les microorganismes sont les premiers organismes influencés par la toxicité des métaux (**Giller et al., 1998**), ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (**Morozzi et al., 1982**), l'inhibition des activités enzymatiques (**Nweke et al., 2007**), l'altération de la structure de l'ADN (**Bruins et al., 2000**; **Rathnayake et al., 2009**), la modification de la composition et de la structure des populations

microbiennes (**Kozdrój et Van Elsas, 2001**) et la réduction de la diversité microbienne (**Sandaa et al., 1999**). Du fait que les bactéries jouent un rôle clé dans l'environnement, les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes et par conséquent leur pérennité, pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (**Silver, 1996**).

Matériel
et
Méthodes

Les manipulations ont été réalisées au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'université de Guelma. L'ensemble des milieux de cultures, réactifs, instrument et appareillages seront cités au fur et à mesure de leurs utilisations.

II.1. Description des stations d'étude

Pour mieux cerner les problèmes et les nuisances engendrés par la pollution métallique la campagne d'échantillonnage a été effectuée au niveau de 3 Oueds (**Figure 03**), l'échantillonnage a été effectuée le 19/02/2017. Le choix des stations d'échantillonnage a été réalisé selon leur accessibilité, la description des stations d'échantillonnage est comme suite :

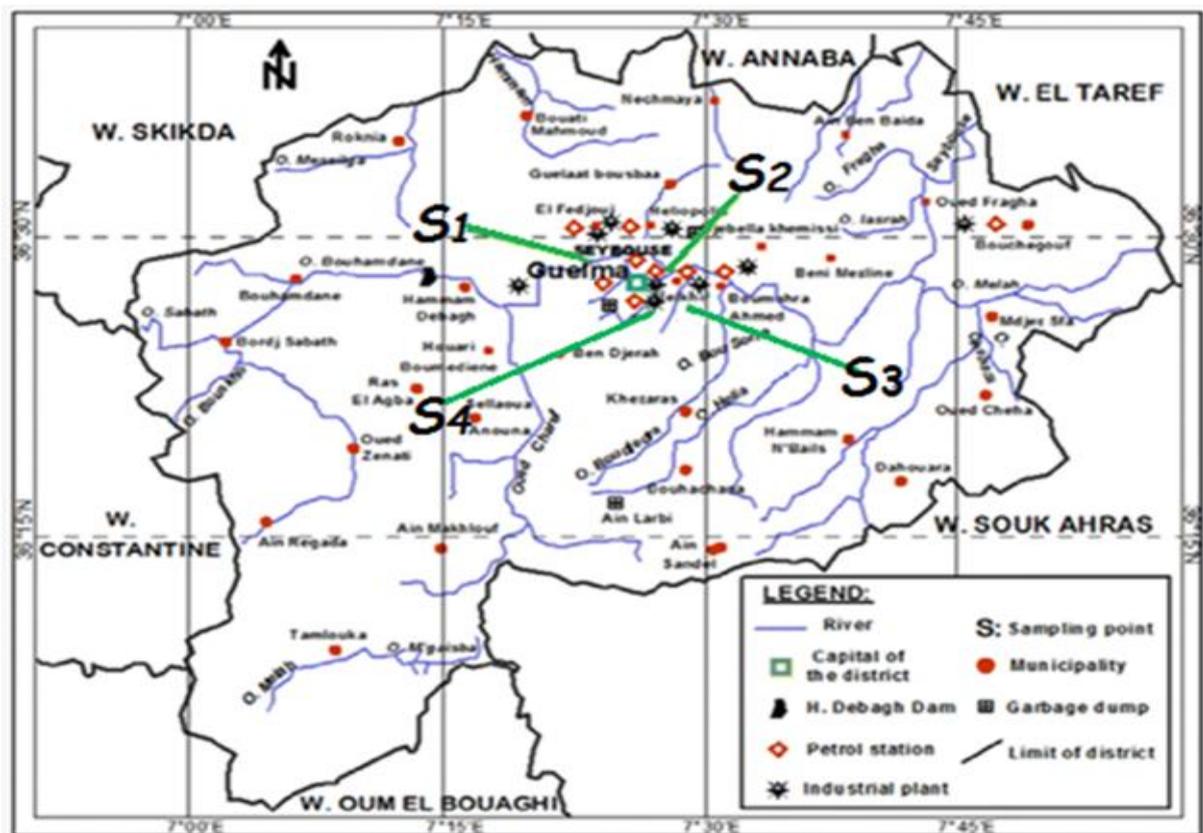


Figure 03: Localisation des stations d'échantillonnage (Guettaf *et al.*, 2014).

II.1.1. Oued Seybouse

Il s'étend sur 225 km de long et draine un vaste bassin versant d'une superficie de 6474 km² (Guettaf *et al.*, 2014) ou s'exercent d'importantes activités agricoles et industrielles intenses (ABH, 2002). Le débit de l'oued varie entre 0 et 100 m³.s⁻¹, mais pendant les périodes de fortes averses, il peut atteindre des valeurs de l'ordre de 630 m³.s⁻¹ (Bougherira et Aoun-Sebaiti,

2012). D'après **Djabri (1992)**, les eaux de l'oued Seybouse sont excessivement riches en nutriments engendrant une eutrophisation du milieu (**Gaïd, 1986; Djabri et al., 1998**). Au niveau de l'oued Seybouse nous avons choisis deux stations, l'une en amont (Bentabouch : S.1) et l'autre en aval (Héliopolis : S.2)

La station S.1 (Bentabouch) est située en amont de l'oued, caractérisée par des rejets domestiques, industrielles (usine de carrelage) et agricoles assez remarquable. C'est une source d'irrigation et une zone de pâturage pour les animaux domestiques.



Figure 04 : Vue générale de la station d'étude S.1 (Photo prise le : 19/02/ 2017).

La station S.2 (Héliopolis) est située en aval de l'oued Seybouse, localisé à côté du pont de Héliopolis près de la route nationale N° 21. Son bassin versant subit des activités agricoles intenses, son eau est très utilisée pour l'irrigation des cultures maraichères.



Figure 05 : Vue générale de la station d'étude S.2 (Photo prise le : 19/02/ 2017).

II.1.2. Oued Zimba

La station S.3 est localisée au niveau du Oued Zimba, le point de prélèvement est localisé à proximité de la station de distribution des produits pétroliers Naftal, le bassin versant de l'Oued est dominé par des aires de pâturage et des zones d'élevages des bovins.



Figure 06 : Vue générale de la station d'étude S.3 (Photo prise le : 19/02/ 2017).

II.1.3. Oued Maïz

La station S.4 est localisée au niveau de l'Oued Maïz, caractérisée par la présence des rejets urbains des agglomérations et des activités agricoles.



Figure 07 : Vue générale de la station d'étude S.4 (Photo prise le : 19/02/ 2017).

II.2. Paramètres météorologiques

Les caractérisations météorologiques du site d'étude sont obtenues à partir de la station météorologique de Guelma (**Tableau 02**).

Tableau 02 : Caractérisation météorologique de la station météorologique 604030 (le : 19/02/2017) [04].

Température de l'air (°C)	Précipitation (mm)	Vitesse des vents (km /h)
12,9	0	1,5

II.3. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

La mesure des paramètres physicochimiques de l'eau (pH, Température, salinité, oxygène dissous et la conductivité électrique) des stations d'échantillonnage a été réalisée à l'aide d'un multiparamètre.

II.4. Prélèvement de l'eau pour les analyses microbiologiques

Les flacons destinés au prélèvement sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 min (**Delarras, 2000**), les bouteilles sont plongées à une distance de 50 cm de la surface assez loin des rives ou des bords ainsi que des obstacles naturels ou artificiels et en évitant la remise en suspension des dépôts (**Rodier et al., 2009**). 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 haut que le fond et dirigé dans le sens contraire du courant (**Rodier, 1996**). Les flacons ont été transportés dans une glacière dont la température est comprise entre 4 à 6 °C. L'analyse bactériologique a débuté dans un délai maximal de 24 heures (**Rodier et al., 2009**).

II.5. Isolement de la flore bactérienne

Pour étudier les bactéries, il est indispensable d'isoler et d'en faire une culture pure (**Reggam, 2014**), pour la recherche des Salmonelles et des Shigelles nous avons fait un Pré-enrichissement et un enrichissement dans de l'eau péptonée tamponnée.

- **Pré-enrichissement** : Le pré-enrichissement a été effectué à l'aide de l'eau péptonée tamponnée double concentration réparti à raison de 10 ml par tube, ce dernier sera donc

inoculé à l'aide de 10 ml de la solution mère à analyser puis incubé à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**Larpent , 1997**).

- **Enrichissement** : A partir du tube du pré-enrichissement nous avons inoculé un bouillon au Sélénité - Cystéine avec un volume d'échantillon correspond au 1/10 du volume du bouillon, l'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 heures (**Larpent, 1997**).

Six milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement de la flore bactérienne, leurs compositions sont indiquées en **Annexe I**.

- **Gélose Mac Conkey** : C'est un milieu sélectif pour l'isolement des Entérobactéries, elle permet l'élimination de la flore secondaire grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore à Gram positive) et les sels biliaries (sélection des Entérobactéries) (**Larpent, 1997**).
- **Gélose Hektoen** : C'est un 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, 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 sulfate de fer (**Larpent, 1997**).
- **Gélose Salmonella-Shigella (SS)** : C'est un milieu sélectif pour l'isolement des Salmonelles et des Shigelles, il contient du vert brillant, sels biliaries et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire à Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes (**Larpent, 1997**).
- **Gélose nutritive** : C'est est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants, elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits [**05**].
- **Gélose Cétrimide** : C'est est un milieu largement utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive de *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine [**06**].

- **Gélose Chapman** : c'est un milieu caractérisé par une forte concentration de chlorure de sodium, ce qui permet de sélectionner les microorganismes halophiles parmi lesquels figurent les *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus* et certains *Bacillus* et levures. Les souches de *Staphylococcus* forment des colonies entourées d'un halo jaune dû à l'utilisation du mannitol (**Joffin et Leyral, 2006**).

La gélose SS a étéensemencée avec 0,1 ml de la culture prélevée en milieu d'enrichissement, par contre pour la gélose nutritif, Mac Conkey, Hektoen, Chapman et Cétrimide, l'ensemencement à été réalisé directement à partir des flacons de prélèvement. Toutes les boîtes Pétriensemencées sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**Larpent, 1997**).

II.6. Identification de la flore bactérienne

Après incubation nous avons effectué l'identification des espèces bactérienne. La composition des milieux utilisés est représentée en **Annexe I**, les étapes de l'identification sont comme suite :

II.6.1.Examen macroscopique

Pour les examens macroscopiques des bactéries, l'observation des colonies a été faite à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, chaque espèce bactérien développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristique (**Singleton, 1999**). L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, pour chaque colonie distincte nous avons noté les caractéristiques suivantes : la taille, l'aspect de la surface et la couleur (**Rouaiguia, 2014**).

II.6.2. Examen microscopique

La coloration de Gram permet de déterminer deux grands groupes bactériens (Gram positif et Gram négatif), elle nous permet aussi de reconnaître la morphologie et le mode de regroupement de bactéries, les étapes de la méthode sont comme suivant (**Joffin et Leyral 2006**).

- **Préparation du frottis bactérien** : Prélever la colonie bactérienne à identifier et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique puis le fixer par simple passage sur la flamme du bec bensen.
- **Coloration au Violet de Gentiane**: Chaque frottis fixé est coloré pendant une minute au Violet de Gentiane puis laver à l'eau courante.

- **Mordantage** : Traiter durant une minute la lame par une solution de Lugol, puis laver à l'eau courante.
- **Décoloration**: Faire couler l'éthanol à 0,95 % durant 10 seconds sur la lame puis laver immédiatement à l'eau courante. À ce stade les cellules à Gram négatives seront incolores, les cellules à Gram positives restent violettes.
- **Recoloration**: Faire traiter la lame durant 30 secondes à une courte coloration par la fuchsine, puis rincer et sécher la lame entre deux feuilles de papier buvard propres.
- **Lecture** : Examiner le frottis au microscope optique en ajouter une goutte de l'huile à immersion (au Gx100). Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet alors que les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

II.6.3. Recherche de l'oxydase

Ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram négatif, il 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, les étapes sont comme suite (**LFNF, 2002**) :

❖ Technique

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

❖ 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.

II.6. 4. Recherche de la catalase

Cette enzyme empêche en effet l'accumulation d' H_2O_2 et le dégrade en H_2O et O_2 , ce test est à la base de l'identification des bactéries à Gram positif les étapes sont comme suite (**Rodier, 1996**) :

❖ **Technique**

- Sur une lame propre et sèche déposé une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- À l'aide d'une pipette Pasteur ajouter la souche bactérienne.

❖ **Lecture**

- Dégagement immédiat de bulles gazeuses indique un test positif catalase.
- Absence de dégagement de bulles gazeuses indique un test négatif.

II.6.5. Identification biochimique

L'identification des différentes bactéries isolées a été réalisée à l'aide de la galerie biochimique classique ou bien la galerie biochimique miniaturisée API selon leur disponibilité.

II.6.5.1. Galerie biochimique classique**a) Recherche du nitrate réductase**

La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrate en nitrites, les étapes de la méthode sont comme suite (**Delarras, 2000**) :

❖ **Technique**

- Inoculer le bouillon nitrate avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.
- La mise en évidence de l'apparition des nitrites est réalisé par l'addition de 3 gouttes d'acide parasulfanilique (NIT I), puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine (NIT II).

❖ **Lecture**

- Si le milieu prend une coloration rouge : Présence de nitrites, donc la bactérie possède un nitrate réductase.
- Si le milieu reste incolore : On ajoute alors de la poudre de zinc :
 - Si la coloration est rouge : la bactérie ne possédait pas cette enzyme.
 - Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites, la bactérie possède cette enzyme et en plus de nitrite réductase.

b) Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le milieu Citrate de Simmons est un milieu solide en pente, ne contenant aucune autre source de carbone que le citrate, les autres constituants étant les ions minéraux indispensables, les étapes de la méthode sont comme suite (**Joffin et Leyral, 2006**) :

❖ **Technique**

- Ensemencée la pente du milieu Citrate de Simmons par des stries longitudinales.
- Incuber à l'étuve durant 24 heures à 37 °C.

❖ **Lecture**

- Virage de milieu vers le bleu (alcalinisation de milieu) : Résultat positif, la bactérie utilise le citrate.
- Le milieu reste vert : Résultat négatif, la bactérie n'est pas capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

c) Production de l'acétoïne

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C. ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose [07], les étapes de la technique sont comme suite (Delarras, 2003) :

❖ **Technique**

- Inoculé le bouillon Clark et Lubs avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

❖ **Lecture**

- Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes de VP I (alpha naphthol) et attendre 10 min puis ajouter 2 à 3 gouttes de VP II (une solution de soude).
- Virage du milieu vers le rouge : Présence d'acétoïne, fermentation du glucose par la voie butylène glycolique avec production (VP⁺).
- Le milieu reste jaune : Absence d'acétoïne, pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (VP⁻).

d) Mise en évidence de la voie des fermentations des acides mixtes

Le milieu de Clark et Lubs permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au rouge de méthyl et de Voges-Proskauer. Le rouge de méthyl différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétyl méthyl carbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu [08], les étapes de la technique sont comme suite (Joffin et Leyral 2006) :

❖ **Technique**

- Inoculer le milieu Clark et Lubs.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.

❖ Lecture

- Après incubation, ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyl.
- Virage du milieu vers le rouge : Souche RM^+ . Fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (Production d'acides forts).
- Le milieu reste jaune : Souche RM^- . Pas de fermentation du glucose par la voie des acides mixtes.

e) Dégradation du mannitol

Le milieu Mannitol-mobilité est un milieu complexe utile pour l'identification des entérobactéries, il permet d'étudier en plus de la dégradation du mannitol la mobilité. Les étapes de la technique sont comme suite (**Joffin et Leyral, 2006**) :

❖ Technique

- Ensemencer le milieu mannitol-Mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Apparition d'une couleur rouge : Absence de la fermentation du mannitol.
- Apparition d'une couleur jaune : Fermentation du mannitol.
- Pas de diffusion en voile : Bactéries immobiles.
- Diffusion et formation d'un voile autour de la piqure : Bactéries mobiles.

f) Production de l'uréase et de l'indole

Le milieu urée-indole est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autres bactéries, les étapes de la technique sont comme suite (**Joffin et Leyral 2006**) :

❖ Technique

- Inoculé le milieu urée-indole avec une suspension bactérienne.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Uréase :
 - Virage de la couleur vers le rose / rouge, traduit une alcalinisation du milieu du à l'hydrolyse de l'urée : Uréase (+).
 - Absence de virage: indique absence de l'hydrolyse de l'urée : Uréase (-).

- Indole : La lecture se fait après l'ajout du réactif de Kovacs.
 - Apparition d'un anneau rouge traduit la présence d'indole issu de la dégradation du tryptophane par la tryptophanase : Indole (+).
 - Absence d'un anneau rouge traduit l'absence de production d'indole : Indole (-).

g) Production du tryptophane désaminase (TDA)

La tryptophanase est un complexe multienzymatique permettant aux micro-organismes de produire de l'indole à partir du tryptophane, les étapes de la technique sont comme suite (Joffin et Leyral, 2006) :

❖ Technique

- Faire une suspension bactérienne dans le milieu urée - indole.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Après incubation, ajouter quelques gouttes du réactif de chlorure de fer III , puis lire immédiatement.
- Apparition d'un précipité brun : Présence d'acide indole pyruvique issu de la désamination du tryptophane (TDA⁺).
- Absence de précipité brun : Absence d'acide indole pyruvique issu de la désamination du tryptophane (TDA⁻).

h) Production de la β -galactosidase

La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante, il est particulièrement important pour les entérobactéries à la mesure de la place du lactose dans l'étude de ces bactéries, les étapes de la technique sont comme suite (Joffin et Leyral 2006) :

❖ Technique

- Faire une suspension dense dans de l'eau distillée stérile.
- Déposer un disque d'ONPG.
- Placer au bain d'eau à 37 °C durant 30 minutes.

❖ Lecture

- Coloration jaune traduit l'hydrolyse de l'ONPG : Présence d'une β -galactosidase.
- Absence de coloration jaune indique l'absence d'hydrolyse de l'ONPG : Absence d'une β -galactosidase.

i) Fermentation des sucres avec ou sans gaz et production d'H₂S

Le milieu TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation des sucres (glucose, lactose et saccharose), la production de gaz et d'H₂S [09], les étapes de la technique sont comme suite (**Delarras, 2000**) :

❖ Techniques

- Ensemencement de la pente du milieu TSI par stries et le culot par une pique centrale.
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

❖ Lecture

- Pente jaune : Fermentation du lactose et /ou du saccharose.
- Culot jaune : Fermentation du glucose.
- Noircissement : Production d'H₂S (+).
- Bulles gazeuses : Production du gaz.

j) Identification

L'ensemble des résultats obtenus vont servir pour l'identification des bactéries à l'aide d'un logiciel d'identification **api 10s_matrice** [10].

II.6.5.2. Galerie biochimique miniaturisé

Pour l'identification des bactéries nous avons utilisé 3 types de galeries biochimiques miniaturisées :

- Galerie API 20 E pour l'identification des entérobactéries
- Galerie API Staph pour l'identification des staphylocoques
- Galerie API 20 NE pour l'identification des bactéries à Gram négatif non entérobactéries.

a) Galerie biochimique miniaturisé API 20E

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydraté, 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 se fait à l'aide de la table de lecture (**Annexe II**). Le dosage a été réalisé selon le mode opératoire proposé par l'API dont les étapes sont comme suite [11] :

❖ Préparation de la galerie

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

❖ Préparation de l'inoculum

- Faire une suspension bactérienne dans 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.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 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 :

- **VP** : Ajouter les réactifs (VP I + VP II) puis attendre 10 min, une couleur rose rouge indique une réaction positive.
- **TDA** : Ajouter le réactif TDA, une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- **IND** : Ajouter le réactif de Kovacs puis attendre 2 min, un anneau rouge apparaît indique une réaction positive.
- **NO₂** : Ajouter les réactifs (NIT I + NIT II) puis attendre 2 à 3 min, une coloration rouge indique une réaction positive (NO₂). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote, alors ajouter 2 à 3 mg de la poudre de zinc dans la cupule du GLU. Après 5 minutes, si la couleur resté jaune, cela indique une réaction positive (N₂). Si la couleur est orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates sont encore présents.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**annexe II**), Les tests sont regroupés en groupe de 3 et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification (**Guiraud, 2003**). Le code

II.8.2. Préparation des solutions mères

Chaque métal est solubilisé dans de l'eau distillé stérile à raison de 5 g /l, juste avant son utilisation.

II.8.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) a été réalisée selon la méthode décrite par (**Bolou *et al.*, 2010**), une gamme de concentration stérile allant de 12,5 à 1600 µg/ml été préparée pour chaque métal, on prépare également pour chaque souche bactérienne un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée à 10^4 bactéries /ml dans du bouillon Mueller Hinton. Ensuite on ajoute dans des tubes à essai, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien (10^4 bactéries/ml), les tubes sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, on examine la croissance bactérienne dans chaque tube qui se traduit par une turbidité. La CMI d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible.

Pour déterminer la CMB, on réalise 24 heures plus tôt, un témoin bactéricide en ensemençant par stries une gélose Muller Hinton en boîte Pétri, la solution mère et les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} de l'inoculum de départ correspondant respectivement à 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % et 0,01 % de survivants. Après la lecture de la CMI on effectue des repiquages en stries en gélose Muller Hinton des tubes sans croissance visible. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures, après on compare les stries au témoin bactéricide. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0,01 % de survivants.

Résultats
et
Discussion

III. 1. Paramètres physicochimiques de l'eau

La variation des paramètres physicochimiques de l'eau des stations d'échantillonnages est représentée au **tableau 03**.

Tableau 03 : Variation des paramètres physicochimiques de l'eau des stations d'échantillonnage.

	Température (°C)	pH	Salinité (‰)	Conductivité électrique (µS/cm)	Oxygène dissous (%)
Station S.1	7	7,97	0,5	1402	86,4
Station S.2	7	7,83	0,6	1488	7,87
Station S.3	7	7,91	0,5	1332	5,84
Station S.4	7	7,71	0,8	1892	0,83

Les mesures de la température ont indiqué des valeurs constantes dans les 4 stations d'échantillonnage. Les valeurs du pH ont indiqué que les eaux des stations sont relativement neutres. Les mesures de la salinité ont été toujours inférieures à 1. La mesure de la conductivité électrique permet d'évaluer rapidement la minéralisation globale de l'eau (**Rodier et al., 2009**). Les valeurs de la conductivité électrique des stations S.1, S.2 et S.3 ont été comprises entre 750 - 1500 µS/cm ce qui indique une qualité médiocre de leurs eaux, cependant au niveau de la station S.4, la qualité est mauvaise (supérieure à 1500 µS/cm). Au niveau des milieux aquatiques l'oxygène est la variable environnementale qui a le plus évolué au cours des dernières décennies (**Diaz et al., 1995**), dans les conditions normales la quantité d'oxygène dissoute en eau serait d'environ de 8,6 mg/L (**Davis, 1975**), sa disponibilité pour les organismes aquatiques dépend d'un certain nombre de facteurs qui agissent sur la solubilité (**Davis et al., 1963**). La fluctuation de l'oxygène dissous aux stations d'échantillonnage a été très variable, la valeur la plus élevée a été mesurée au niveau de la station S.1 et la valeur la plus faible au niveau de la station S.4.

III.2. Identification de la flore bactérienne

III.2.1. Examens macroscopiques et microscopiques

Les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes qui ont été isolées et purifiées à partir des différents milieux de culture utilisés sont représentés dans le **tableau 04** et les photos présentées dans les **figure 08-18**.

Tableau 04 : Aspect macroscopique et microscopique des colonies bactériennes isolées à partir des stations d'échantillonnage.

Station	Milieux	Code	Observation		
			Macroscopique	Microscopique	
Oued Seybouse (S.1)	Chapman	C1	Colonies jaune bombée à contour régulier	Cocci à Gram +	
	SS	S1	Colonie rose à contour régulier	Cocci à Gram -	
		S2			
	Hektoen	H1	Colonie verte plate à contour régulier	Bacilles à Gram -	
Mac Conkey	M1	Colonie verte jaunâtre	Bacilles à Gram -		
Oued Seybouse (S.2)	Chapman	C 2	Colonie jaune, bombée à contour régulier	Cocci à Gram +	
		C 3			
		C 4			Colonie blanchâtre bombée à contour régulier
	SS	S 3	Colonie rose à contour régulier	Bacille à Gram -	
	GN	G 1	Colonies blanchâtres plate irrégulier	Bacille à Gram -	
	Hektoen	H 2	Colonies vertes plates à contour régulier	Bacilles à Gram -	
Oued Zimba (S.3)	Chapman	C 5	Colonie jaunes bombée à contour régulier	Cocci à Gram +	
		C 6			
	Cétrimide	Ct 1	Colonie incolore à contour régulier	Bacilles à Gram -	
	GN	G 2	Colonie blanchâtre plate à contour régulier	Bacilles à Gram +	
	Hektoen	H 3	H 3	Colonie jaune saumon à contour régulier	Bacilles à Gram -
			H 4	Colonie verte à contour régulier	Bacilles à Gram -
		H 5	H 6	Colonie marron plate à contour régulier	Cocci à Gram -
	Mac Conkey	M 2	Colonie blanchâtre	Bacilles à Gram -	
	SS	S 4	Colonie marron plate à contour régulier	Cocci à Gram -	
S 5		Colonie verte plate à contour régulier	Bacille à Gram -		
Oued Maiz (S.4)	Chapman	C 7	Colonie jaune bombée à contour régulier	Cocci à Gram +	
		C 8			
		C 9			
	Cétrimide	Ct 2	Colonie verte jaunâtre	Bacille à Gram -	
		Ct 3	Petite colonie blanchâtre à verte, ronde, bombée à contour régulier	Bacille à Gram -	
	GN	G 3	Colonie jaune bombée à contour régulier	Cocci à Gram +	
Hektoen	H 7	Colonie marron plate à contour régulier	Cocci à Gram -		

		H 8	Colonie verte plate à contour régulier	Bacille à Gram -
		H 9	Colonie marron plate à contour régulier	Cocci à Gram -
		H 10	Colonie rouge brique, ronde à contour régulier	Bacille à Gram -
	SS	S6	Colonie rose à contour régulier	Cocci à Gram -
		S7	Colonie incolore à centre orangé	Bacilles à Gram -
		S8	Colonie orangé à contours régulier	Bacilles à Gram -
		S9		
		S10	Colonie incolore à centre orangé	Bacilles à Gram -

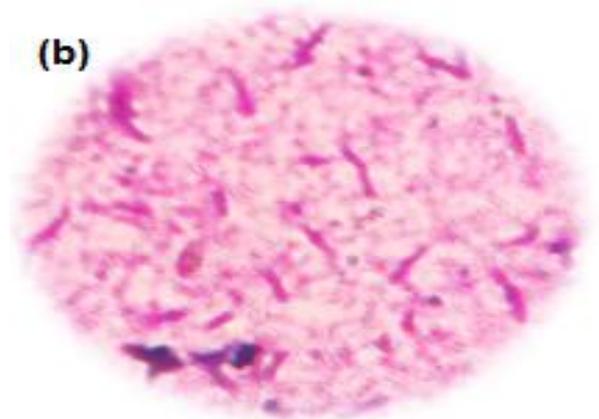
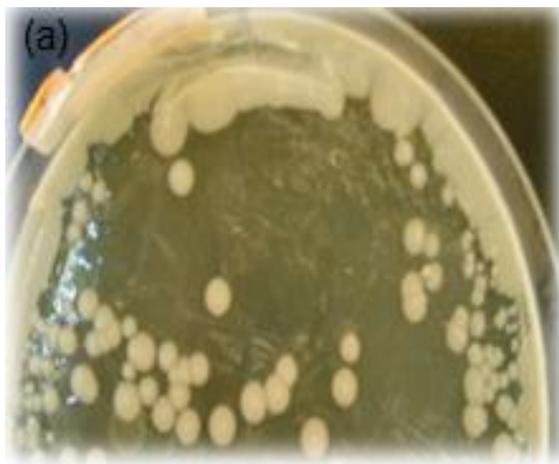


Figure 08 : (a) : Colonies blanchâtres sur gélose nutritive, (b) : Bacilles à Gram négatif (Gx100).

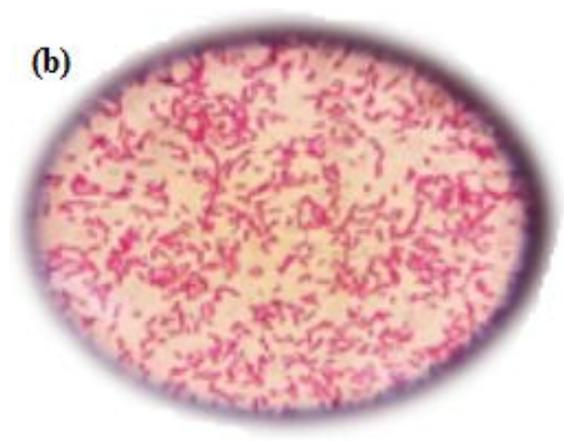
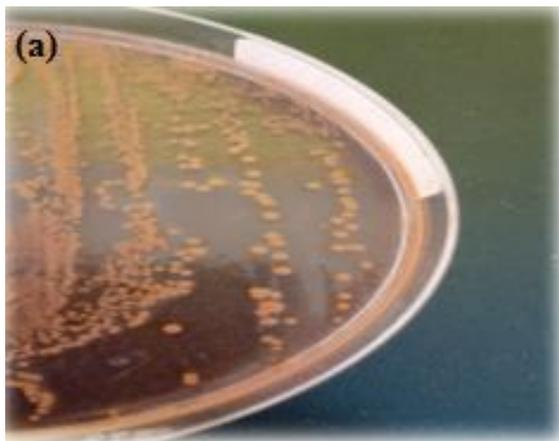


Figure 09 : (a) : Colonies rouges brique sur gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif (Gx100).

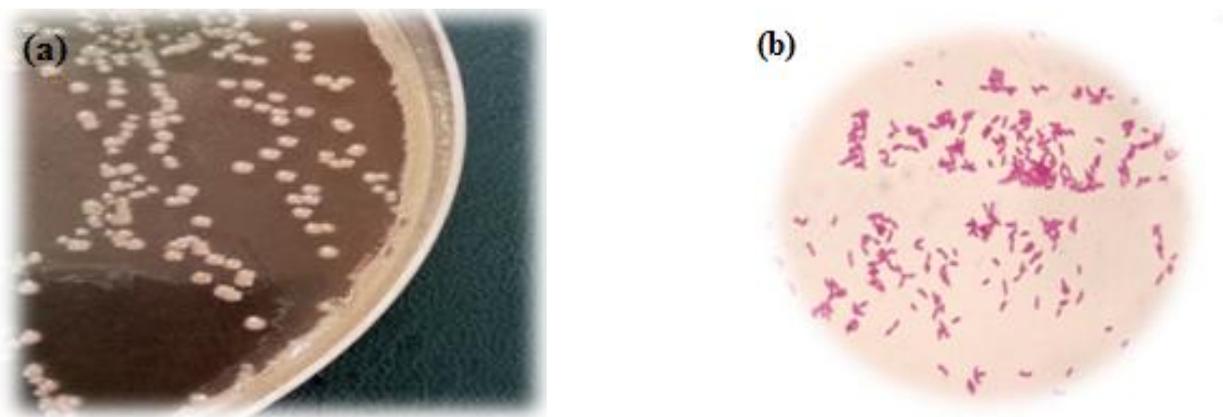


Figure 10 : (a): Colonies jaunes saumon sur gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100).

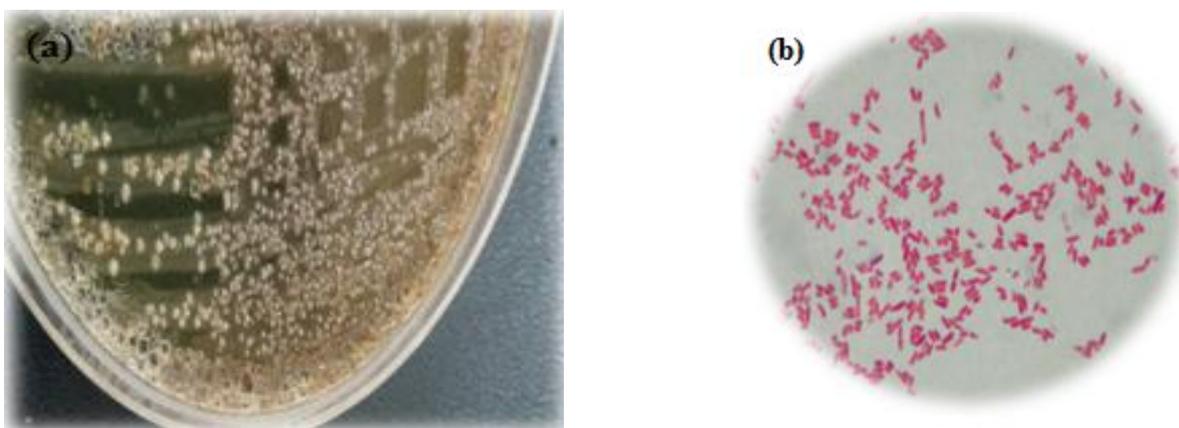


Figure 11 : (a) : Colonies vertes sur gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100).

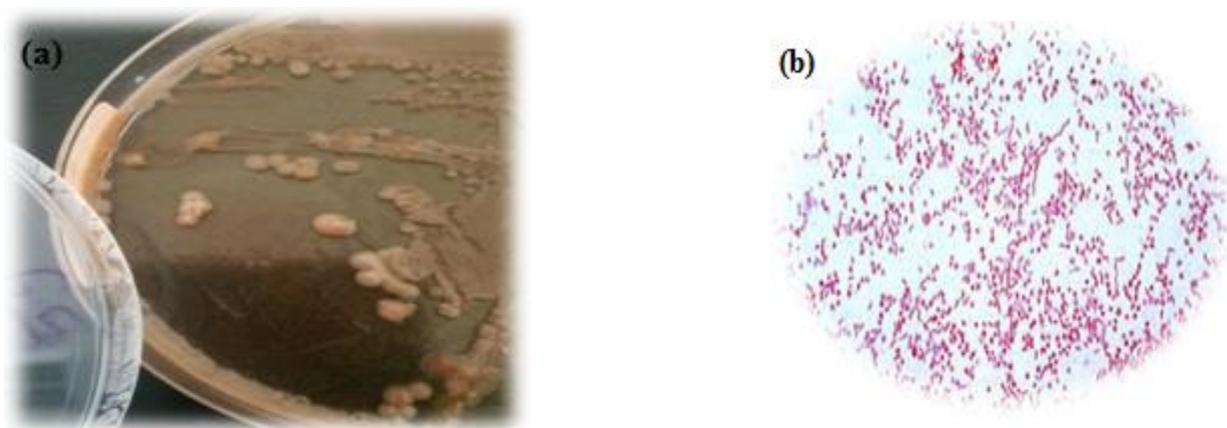


Figure 12 : (a) : Colonies marron sur gélose Hektoen, (b) : Cocci à Gram négatif (G×100).

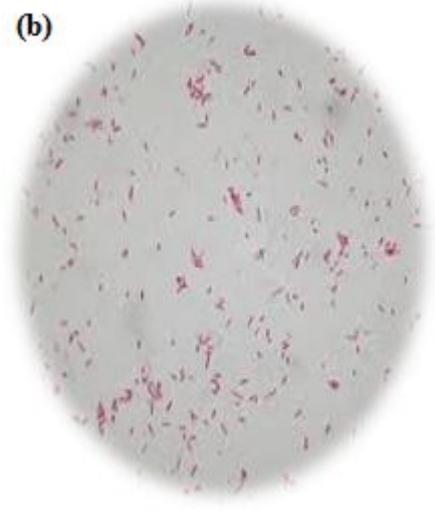
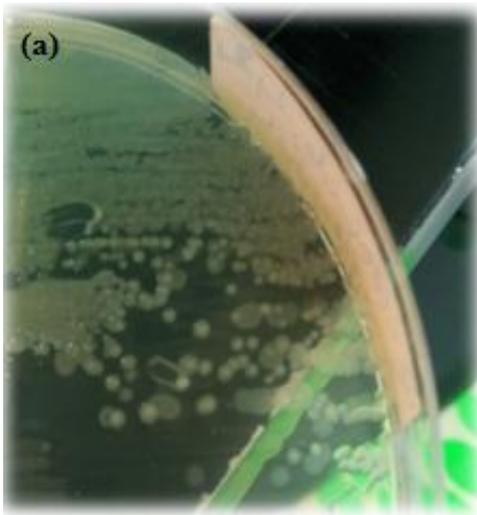


Figure 13 : (a) : Colonies blanchâtres à vertes sur gélose Cétrimide, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100).

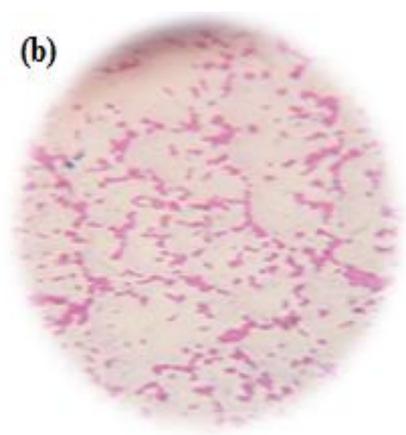
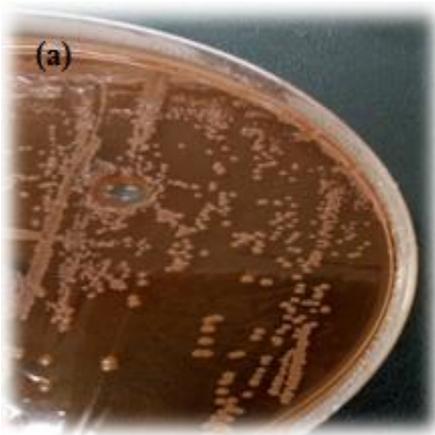


Figure 14 : (a) : Colonies orangées sur la gélose SS, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100).

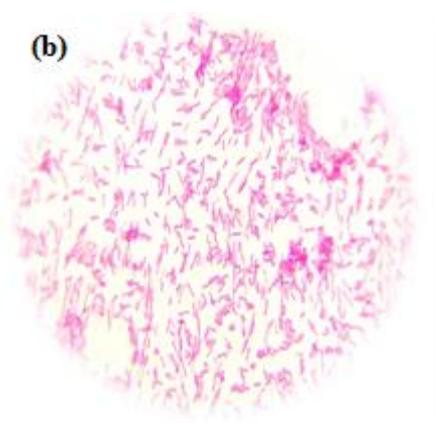
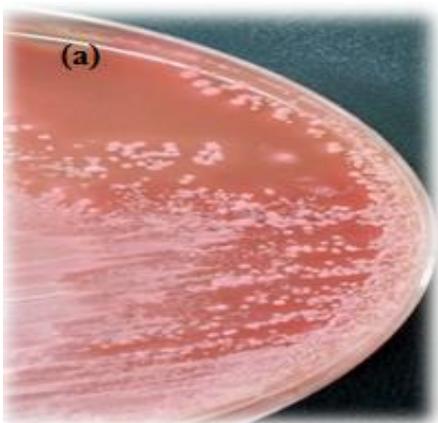


Figure 15 : (a) : Colonies roses sur gélose SS, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100)

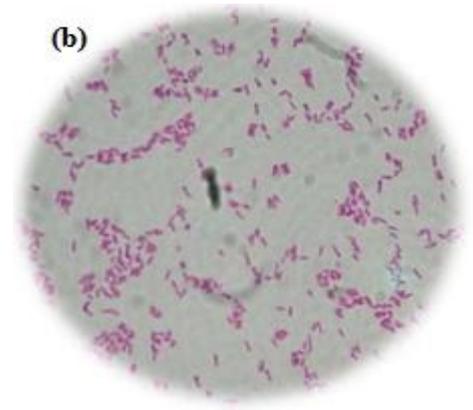


Figure 16 : (a) : Colonies vertes sur gélose Hektoen, (b) : Bacilles à Gram négatif (G×100).

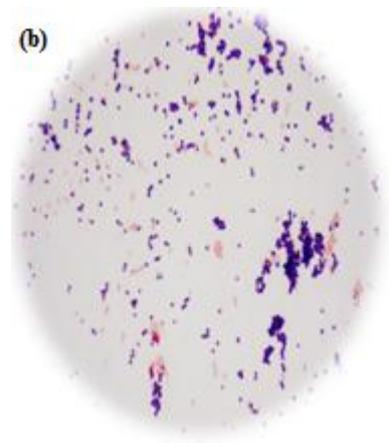


Figure 17 : (a) : Colonies jaunes sur gélose Chapman avec virage de couleur, (b) : Cocci à Gram positif (G×100).

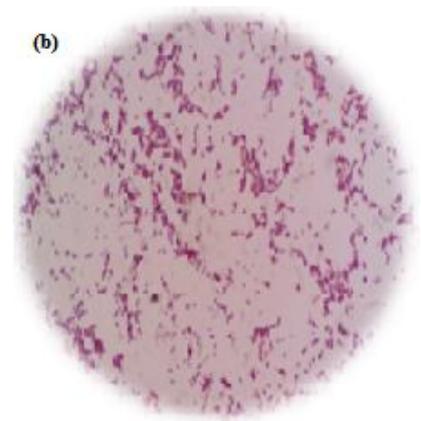


Figure 18 : (a) : Colonies blanches sur gélose Chapman, (b) : Cocci à Gram positif (G×100).

III.2.2. Recherche de l'oxydase et la catalase

Les résultats des tests de la recherche de la catalase et de l'oxydase des souches isolées à partir des stations d'étude sont mentionnés dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Identification de l'oxydase et de la catalase des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage.

Code	Oxydase	Catalase	Code	Oxydase	Catalase	Code	Oxydase	Catalase	
Ct1	+	-	G2	-	+	M2	+	+	
Ct2	+	+	G3	-	+	S1	-	+	
Ct3	-	+	H1	-	+	S2	-	-	
C1	-	+	H2	-	-	S3	+	-	
C2			H3	+	-	S4	-	+	
C3			H4	/	/	S5	-	-	
C4			H5	-	+	S6	+	-	
C5			H6	-	-	S7	-	-	
C6			H7	-	+	S8	-	+	
C7			H8	-	-	S9	-	-	
C8			H9	-	-	S10	-	+	
C9			H10	-	-	(+) : Résultat positif (-) : Résultat négatif (/) : Non effectuée			
G1			+	+	M1				

III.2.3. Identification biochimique

Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des différentes espèces bactériennes sont représentés dans le **tableau 06** et les photos présent dans les **figures 19-24**, les résultats de l'identification biochimique par les API sont représentés dans les **tableaux 07- 09** et les photos présent dans les **figures 25- 35**.

Tableau 06 : Résultats des testes biochimiques classique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage.

Code	TSI					Citrates de Simmons	Mannitol mobilité		Urée indole			Clarck et Lubs		ONPG	Nitrate réductase	Nitrite réductase	Identification	Degré de parenté %
	H ₂ S	Gaz	Glu	Sac	Lac		MAN	MOB	URE	IND	TDA	VP	RM					
G 1	-	-	+	+	+	/	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,8
G 2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>Providencia rettgeri</i>	62,6
H 1	-	-	+	+	+	/	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>Providencia rettgeri</i>	91
H 2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	<i>Providencia rettgeri</i>	62,5
H 4	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	<i>Shigella spp</i>	40,5
H 8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	<i>Providencia rettgeri</i>	95,5
S 2	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	<i>Serratia odorifera</i>	72
S 5	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	<i>Providencia stuartii</i>	80,5
S 6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	98,3
S 7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	<i>Providencia stuartii</i>	95,4
S 9	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	<i>Pantoea spp1</i>	69,8
S 10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Providencia rettgeri</i>	80,9

Tableau 06 : Résultats des testes biochimique classique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage.



Figure 19 : Identification biochimique de l'espèce *Serratia odorifera 1*.



Figure 20 : Identification biochimique de l'espèce *Providencia rettgeri*.



Figure 21 : Identification biochimique de l'espèce *Serratia marcescens*.



Figure 22 : Identification biochimique de l'espèce *Providencia stuartii*.



Figure 23 : Identification biochimique de l'espèce *Shigella spp.*



Figure 24 : Identification biochimique de l'espèce *Pantoea spp.*

Tableau 07 : Résultat de l'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API 20 E.

Code	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	Identification	Degré de parenté %
H 5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	90%
H 6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>	79%
H 7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera 1</i>	98%
H 9	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>	98%
H 10	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae ssp</i>	80%
S 1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>	57%
S 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia odorifera</i>	35%



Figure 25 : Profil biochimique de l'espèce *Serratia odorifera*.



Figure 26 : Profil biochimique de l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau 08 : Résultat de l'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API 20 NE .

Code	NO ₃	TRP	GLU	A DH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	Identification	Degré de parenté (%)
Ct 1	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Photobacterium damsella</i>	100
Ct 2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,8
Ct 3	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	<i>Pseudomonas luteola</i>	97
H 3	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99
M 1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	97
M 2	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Vibrio vulnificus</i>	98,2
S 3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pasteurella multocida</i>	63



Figure 27 : Profil biochimique de l'espèce *Vibrio parahaemolyticus*.



Figure 28 : Profil biochimique de l'espèce *Pseudomonas luteola*.

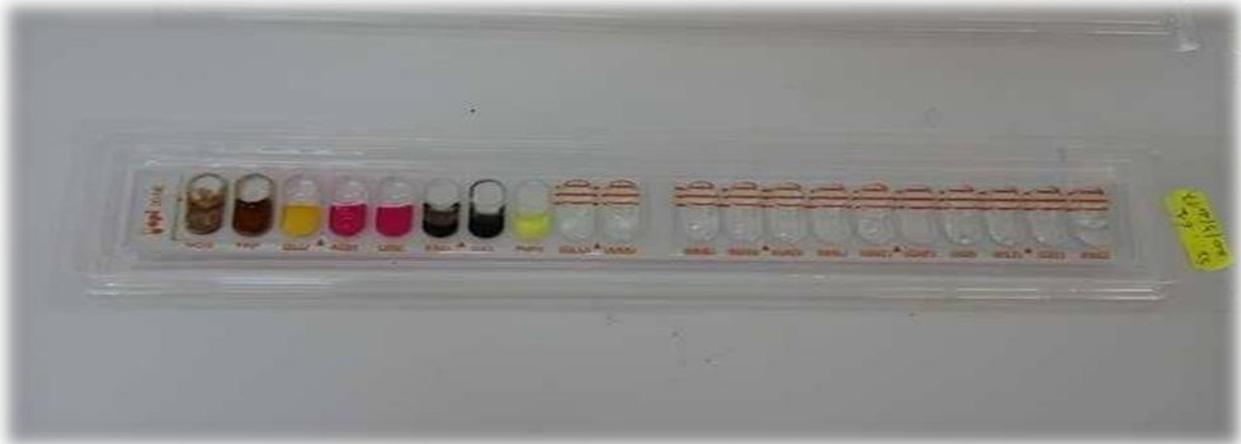


Figure 29 : Profil biochimique de l'espèce *Vibrio vulnificus*.



Figure 30 : Profil biochimique de l'espèce *Aeromonas hydrophila*.



Figure 31 : Profil biochimique de l'espèce *Pasteurella multocida*.

Tableau 09 : Résultat d'identification biochimique des souches isolées à partir des stations d'échantillonnage par l'API Staph.

Code	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	Identification	Degré de parenté (%)
C 1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus scurei</i>	89
C 2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	95
C 3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>Staphylococcus lentus</i>	99
C 4	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	<i>Staphylococcus hominis</i>	52
C 5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	97,8
C 6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	97,8
C 7	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	77,9
C 8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99,8
C 9	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Staphylococcus lentus</i>	94,1
G 3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	97,8



Figure 32 : Profil biochimique de l'espèce *Staphylococcus xylosus*.



Figure 33 : Profil biochimique de l'espèce *Staphylococcus aureus*.



Figure 34 : Profil biochimique de l'espèce *Staphylococcus lentus*.



Figure 35 : Profil biochimique de l'espèce *Staphylococcus hominis*.

III.3. Répartition spatiale de la flore bactérienne

Nous avons isolées et identifiées le maximum des souches bactériennes, la répartition des familles dans les 4 stations d'échantillonnages est comme suite (**Figure 36**).

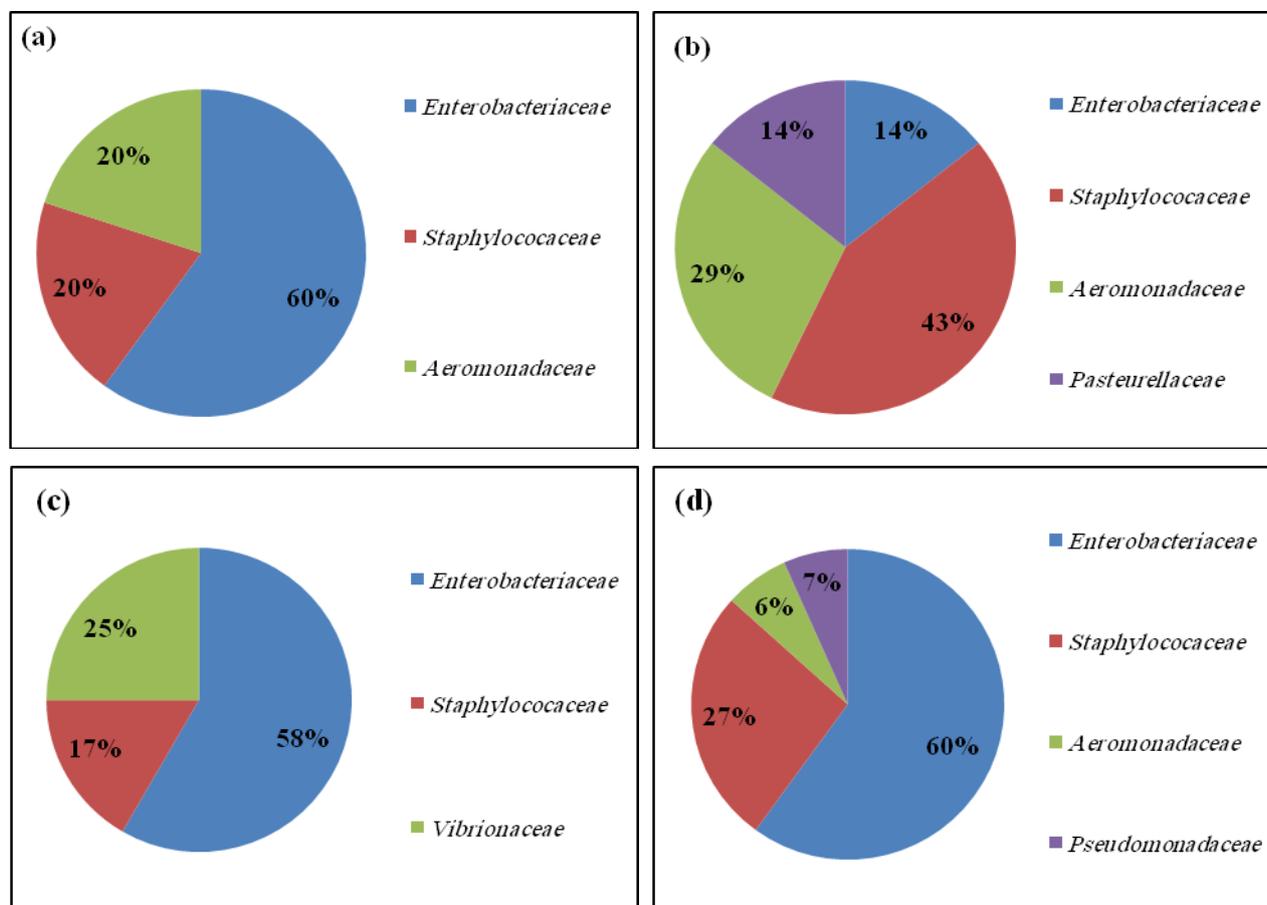


Figure 36 : Répartition bactérienne des stations d'échantillonnage ((a): Station S.1, (b): Station S.2, (c): Station S.3, (d): Station S.4).

A partir des résultats obtenus, nous avons isolé au niveau de la station S.1, 60 % d'*Enterobacteriaceae*, 20 % des *Staphylococaceae* et 20 % des *Aeromonadaceae*. Cependant au niveau de la station S.2, nous avons isolé 43 % de *Staphylococaceae*, 29 % d'*Aeromonadaceae*, 14 % d'*Enterobacteriaceae*, et 14 % de *Pasteurellaceae*.

Au niveau de la station S.3, nous avons isolé 58 % d'*Enterobacteriaceae*, 25 % de *Vibrionaceae* et 17 % de *Staphylococaceae*. Cependant au niveau de la station S.4, nous avons isolé 60 % d'*Enterobacteriaceae*, 27 % de *Staphylococaceae*, 7% de *Pseudomonadaceae* et 6 % d'*Aeromonadaceae*.

III.4. Inventaire de la flore bactérienne

L'inventaire des espèces bactériennes isolées et identifiées au niveau des 4 stations d'échantillonnage est représenté au niveau du **tableau 10**.

18 espèces bactériennes appartenant à différents familles ont été identifiées, 7 espèces pour les *Enterobacteriaceae*, 5 espèces pour *Staphylococaceae*, 3 espèces pour *Vibrionaceae* et 1 espèce seulement pour *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae* et *Pasteurellaceae*.

Tableau 10 : Inventaire de la flore bactérienne au niveau des stations d'échantillonnage.

Famille	Stations	Espèces
<i>Enterobacteriaceae</i>	S.1	<i>Serratia odorifera</i> 1
	S.1	<i>Providencia rettgeri</i>
	S.2	<i>Providencia rettgeri</i>
	S.3	<i>Serratia odorifera</i>
	S.3	<i>Serratia odorifera</i> 1
	S.3	<i>Shigella spp</i>
	S.3	<i>Providencia stuartii</i>
	S.3	<i>Providencia rettgeri</i>
	S.4	<i>Serratia odorifera</i> 1
	S.4	<i>Klebssiella pneumoniae</i>
	S.4	<i>Providencia rettgeri</i>
	S.4	<i>Providencia stuartii</i>
	S.4	<i>Serratia odorifera</i>
S.4	<i>Pantoea spp</i>	
<i>Staphylococaceae</i>	S.1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	S.2	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	S.2	<i>Staphylococcus lentus</i>
	S.2	<i>Staphylococcus hominis</i>
	S.3	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	S.4	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	S.4	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.4	<i>Staphylococcus lentus</i>	
<i>Pseudomonadaceae</i>	S.4	<i>Pseudomonas luteola</i>
<i>Vibrionaceae</i>	S.3	<i>Vibrio vulnificus</i>
	S.3	<i>Photobacterium damsella</i>
	S.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Aeromonadaceae</i>	S.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	S.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	S.4	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Pasteurellaceae</i>	S.2	<i>Pasteurella multocida</i>

Plusieurs genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ont été détectés dans les 4 stations d'échantillonnages, ceci s'explique par la présence ubiquitaire des entérobactéries dans la nature, on peut les retrouver notamment dans la flore digestive de l'homme et des animaux, chez les végétaux, et dans l'environnement (sol et eau) (**Cristian et al., 2008**).

Trois espèces de *Vibrio* ont été détectées : *Vibrio paraemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, et *Photobacterium damsella* au niveau de la station S.3, Ces espèces sont considérées comme les espèces les plus fréquentes vivant librement dans l'eau et les sédiments et peuvent survivre dans les conditions de stress tout en conservant leur virulence (**Mustapha et al., 2013**).

Le genre *Pseudomonas* est très répandue dans la nature, mais nos analyses ont permis d'isoler seulement une seule espèce : *Pseudomonas luteola* au niveau de la station S.4. Pour l'espèce *Pasteurella multocida*, elle a été isolée à partir de la station S.2, cette espèce est une bactérie commensale des muqueuses des animaux (mammifère, oiseau et poissons) domestiques et sauvages.

Pour les *Aeromonadaceae*, la même espèce a été identifiée dans 3 stations d'échantillonnages, cette espèce est aussi une espèce ubiquiste très fréquente en eaux. D'une manière générale l'environnement aquatique constitue l'habitat principal de ce germe (**Euzéby, 2002**).

La présence du genre *Staphylococcus* est due au caractère ubiquiste de cette bactérie, elle est très répandue dans la nature (eau, sol, et air) (**Mustapha et al., 2013**).

III.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

III.5.1. Cadmium

La grille de classification de l'activité intrinsèque des métaux lourds est indiquée dans le **tableau 11**.

Tableau 11: Activité intrinsèque des métaux lourds [15].

CMB /CMI	Activité
4	Effet bactéricide
8-16	Effet bactériostatique
32	Effet de tolérance

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides du cadmium vis-à-vis des différentes espèces bactériennes étudiées sont mentionnées dans le **tableau 12**

Tableau 12 : Variation de la CMI et de la CMB de la flore bactérienne des stations d'échantillonnage vis a vis du cadmium.

Cadmium	Stations	Espèces	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Enterobacteriaceae</i>	S.1	<i>Serratia odorifera</i>	100	200	2
	S.1	<i>Providencia rettgeri</i>	200	400	2
	S.2	<i>Providencia rettgeri</i>	200	400	2
	S.3	<i>Shigella spp</i>	50	1600	32
	S.3	<i>Serratia odorifera</i>	100	400	4
	S.3	<i>Serratia odorifera</i>	100	400	4
	S.3	<i>Providencia rettgeri</i>	100	1600	16
	S.4	<i>Providencia rettgeri</i>	100	400	4
	S.4	<i>Serratia odorifera</i>	200	800	4
	S.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	200	1600	8
	S.4	<i>Providencia stuartii</i>	100	800	8
	S.4	<i>Pantoea spp</i>	100	400	4
	S.4	<i>Providencia rettgeri</i>	100	400	4
	<i>Staphylococaceae</i>	S.1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	400	800
S.2		<i>Staphylococcus xylosus</i>	400	800	2
S.2		<i>Staphylococcus lentus</i>	200	1600	8
S.2		<i>Staphylococcus hominis</i>	400	800	2
S.4		<i>Staphylococcus xylosus</i>	400	800	2
S.4		<i>Staphylococcus aureus</i>	50	800	16
S.4		<i>Staphylococcus xylosus</i>	50	400	8
S.4		<i>Staphylococcus xylosus</i>	400	800	2
<i>Pseudomonadaceae</i>	S.4	<i>Pseudomonas luteola</i>	400	800	2
<i>Vibrionaceae</i>	S.3	<i>Vibrio vulnificus</i>	50	1600	32
	S.3	<i>Photobactérium damsella</i>	100	800	8
	S.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	200	1600	8
<i>Aeromonadaceae</i>	S.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	200	400	2
<i>Pasteurellaceae</i>	S.2	<i>Pasteurella multocida</i>	200	800	4

Pour les entérobactéries, le cadmium a indiqué un effet bactéricide sur 9 espèces et bactériostatique sur 3 espèces. Toutefois une seule espèce peut tolérer le cadmium. Pour les Staphylocoques, il a un effet bactéricide sur 5 espèces et bactériostatique sur 3 espèces, cependant aucune espèce n'a présenté une tolérance.

Aussi un effet bactéricide vis-à-vis du cadmium est noté pour l'espèce *Pseudomonas luteola*, *Pasteurella multocida*, et *Aeromonas hydrophila*. Un effet bactériostatique est noté pour l'espèce *Photobactérium damsella* et *Vibrio parahaemolyticus*. Par contre, seule l'espèce *Vibrio vulnificus* qui peut tolérer le cadmium.

III.5.2. Cuivre

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides du cuivre vis-à-vis des différentes espèces bactériennes étudiées sont mentionnées dans le **tableau 13**.

Les résultats obtenus ont démontrés que le cuivre a un effet bactéricide sur la totalité des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*, *Pasteurellaceae* et *Staphylococaceae*, toutefois un effet bactériostatique est noté sur l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Tableau 13 : Variation de la CMI et de la CMB de la flore bactérienne des stations d'échantillonnage vis a vis du cuivre.

Cuivre	Stations	Espèces	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Enterobacteriaceae</i>	S.1	<i>Serratia odorifera</i>	400	800	2
	S.1	<i>Providencia rettgeri</i>	400	800	2
	S.2	<i>Providencia rettgeri</i>	800	1600	2
	S.3	<i>Shigella spp</i>	1600	> 1600	/
	S.3	<i>Serratia odorifera</i>	800	1600	2
	S.3	<i>Serratia odorifera</i>	400	800	2
	S.3	<i>Providencia rettgeri</i>	400	800	2
	S.4	<i>Providencia rettgeri</i>	400	1600	4
	S.4	<i>Serratia odorifera</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Klebssiella pneumoniae</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Providencia stuartii</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Pantoea spp</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Providencia rettgeri</i>	800	1600	2
<i>Staphylococaceae</i>	S.1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	800	1600	2
	S.2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	800	1600	2
	S.2	<i>Staphylococcus lentus</i>	400	800	2
	S.2	<i>Staphylococcus hominis</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	200	1600	8
	S.4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	800	1600	2
	S.4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	800	1600	2
<i>Pseudomonadaceae</i>	S.4	<i>Pseudomonas luteola</i>	800	1600	2
<i>Vibrionaceae</i>	S.3	<i>Vibrio vulnificus</i>	1600	> 1600	/
	S.3	<i>Photobacterium damsella</i>	400	1600	4
	S.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	800	1600	2
<i>Aeromonadaceae</i>	S.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	800	1600	2
<i>Pasteurellaceae</i>	S.2	<i>Pasteurella multocida</i>	800	1600	2

Conclusion

Conclusion

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les stations d'échantillonnage sont caractérisées par :

- Forte contamination bactérienne d'origine fécale.
- Présence de 2 espèces bactériennes qui peuvent tolérer le cadmium.
- Aucune tolérance bactérienne vis-à-vis du cuivre n'a été retrouvée.

On perspective, il serait important de :

- Doser la Méthallothionine afin de comprendre l'effet des métaux sur les bactéries.
- Tester l'effet d'autres métaux lourds.
- Faire des synergies.

Références bibliographiques

- ABH, 2002.** Agence de Bassins hydrographiques Seybouse-Mellag-constantinois. Bassin de la seybouse. Actualisation. Disponible sur : [file:///C:/Users/user/Downloads/seybousse % 2026 11213 % 20ok%20ok.pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/seybousse%202026%2011213%20ok%20ok.pdf). Consulté le : 10/03/2017.
- Achard, J., 2005.** Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat. Option : Eco toxicologie. Université Bordeaux I. France. p: 254.
- ATSDR, 1990.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profiles for copper. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA: US department of Health and Human Services, Public Health Services. Disponible sur : <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=206&tid=37>. Consulter le : 24/3/2017.
- Baize, D., 1997.** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions. Paris. p: 408.
- Baker, A. J. M., Walker, P. L., 1989.** Ecophysiology of metaluptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC. New York 1: 7-17.
- Benbelkacem, N., 2012.** Synthèse et caractérisation de complexes mixtes de cobalt (III) avec l'éthylènediamine, une série d'acides aminés et des bases azotées. Mémoire de magister. Option : Chimie d'Environnement. Université Mouloud Mammeri Tizi - Ouzou. Disponible sur : www.umto.dz/IMG/pdf/Memoire-de-Melle-BENBELKACMNora.pdf.
- Bendjama, A., 2007.** Niveaux de contamination par les métaux lourds du complexe lacustre «Tonga, Oubeira, El-Mellah » du parc national d'El-Kala. Mémoire de magister. Option : Biologie marine. Université Badji Mokhtar. Annaba. p:100. Disponible sur : www.jsac.arn.dz/Vol21%20N1/E261010G2%20bendjama%20Art5.pdf
- Benfettoume, A., Khalla, N., 2014.** Impact toxicologique des métaux lourds sur le système antioxydant enzymatique chez les mollusques (bivalve).Mémoire de master. Université de Guelma. Algérie. P: 54.
- Bolou, G.E.K., Attioua, B., N'Guessan, A.C., Coulibaly, A., N'Guessan ,J.D., Djaman A.J., 2010.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 80 : 772 – 790.
- Borchardt, T., 1985.** Relationship between carbon and cadmium uptake in *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 85: 233-244.
- Bougherira, N. B., Aoun-Sebaiti, B., 2012.** Impact of urban and industrial wastes on superficial and groundwater in the plain of Annaba (Algeria). Synth. Fac : Courr. Savoir 13:63-69.
- Bourrelier, P.H., Berthelin, J., 1998.** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. Acc Sci, 42. Edition Lavoisier. Paris. P: 145.
- Bruins, M., Kapil, M., Oehme, F.W., 2000.** Microbial Resistance to Metals in the Environment. Ecotoxicol. Envir.Safety. 45:198-207.

- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006.** Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Guide méthodologique. INERIS. p : 119.
- Chennouf, F., Siradj, F., 2008.** Isolement des bactéries métallo-résistant partir de Chott Ain El-Baidha et lac Témaçine . Mémoire de magister . Option : Microbiologie, Université de Kasdi-Merbah Ouargla. p: 56. Disponible sur : www.memoireonline.com.
- Chiffolleau, J.F., 2004.** La contamination métallique. Rapport Ifremer. P : 39.
- Cristian, C., Jacky, M., Eddy, S., Salavert, M., Armand, T., 2008.** Microbiologie Hygiène Bases Microbiologiques de la diététique. Edition TEC, DOC, Lavoisier, Paris. P : 340.
- Davis, G.E., Foster, J., Warren, C.E., Doudoroff, P., 1963.** The influence of oxygen concentration on the swimming performance of juvenile Pacific salmon at various temperatures. Trans. Am. Fish. Soc. 92:111-124.
- Davis, J.C., 1975.** Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: A review. J. Fish. Res. Board Can. 32 :2295-2332.
- DeForest, D.K., Brix, K.V., Adams, W.J., 2007.** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. Aquatic Toxicology. 84 : 236–246.
- Delarras, C., 2000.** Micobiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique. Gaëtan moriu éditeur. Paris. P : 231
- Delarras, C., 2003.** Micribiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaetan Morin Editeur. Paris. P : 269.
- Diaz, R.J., Rosenberg , R., Ansell, A.D., Gibson, R.N., Barnes, M. 1995.** Marine benthic hypoxia : a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna . Oceanogr. Mar. Biol. Annu.rev.33: 245-303.
- Djabri, L., 1992.** Mécanismes de la pollution et vulnérabilité des eaux de la Seybouse. Originesgéologiques, industrielles, agricoles et urbaines. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Badji Mokhtar, Algérie. P: 200.
- Djabri, L., Mania, D., Messadi, A., Hani, R., Djaffer, S., Dffer, S., Benharket, S., Djabri, A., Aidaoui, K., Boukhmis, A. 1998.** Pollution des eaux de l'oued Seybouse et des nappes de Guelma, Bouchegouf et Annaba (Est Algérien) par les nutriments. Bull. Intern. Eau & Environ. 20:16-25.
- Euzéby, J.P., 2002.** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. L'Ordre des médecins vétérinaires du Québec. P: 4.
- Gaïd, A. 1986.** L'eutrophisation des lacs et barrages. Rev. eaux et sols d'Algérie 2-92: 72-82.
- Giller, K. E., Witter, E., McGrath, S. P., 1998.** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem. 30 :1389–1414.

- Gonzalez, J. L., Chiffolleau, J. F., Miramand, P., Thouvenin, B., 1999.** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Fascicule N°10 du Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France : P: 31.
- Gueroui, Y., 2014.** Caractérisation Hydrochimique et Bactériologique des Eaux Souterraines de l'aquifère Superficiel de la Plaine de Tamlouka (Nord-Est Algérien). Thèse de doctorat. Option : Santé, Eau et Environnement. Université de Guelma, Algérie. P: 200.
- Guettaf, M., Maoui, A., Ihdene, Z., 2014.** Assessment of water quality: a case study of the Seybouse River (North East of Algeria). Applied water science. DOI : 10.1007/s13201-014-0245-z.
- Guiraud, J., 2003.** Microbiologie alimentaire. Edition RIA Dunod. France. P: 651.
- Guiraud, J., 2004.** Les pratiques des normes en microbiologie alimentaire. Fluor, France. P: 298
- Huynh, T., 2009.** Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante / ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Option : Ecologie microbiologie, Université Paris Est. P: 260.
- Joffin, J., Leyral, G., 2003.** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3^{ème} éditions ; France. P : 331.
- JORA, 2011.** Journal officiel de la république Algérienne 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. Consulté le : 18/04/2017
- Kabata Pendias, A., Pendias, H., 2001.** Trace elements in soils and plants. CRC Press, London. P: 293.
- Kozdrój, J., Van Elsas, J.D., 2001.** Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. J. Microb. Methods. 43:197-212.
- Larpent, J., 1997.** Microbiologie des eaux d'alimentaire : Technique de labo. Edition Tec et Doc. Paris. P : 1073.
- Latendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Leboulenger, F., Durand, F., 2009.** Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. Mar. Envir. Res. 67: 69-74.
- Ledin, M., 2000.** Accumulation of metals by microorganisms . Processes and importance for soil systems. Earth-Sci. Rev. 51:1-31.
- LFNF, 2002.** Light Foot Nigel Francis. Analyses microbiologiques des aliments et de l'eau. Directives pour l'assurance qualité. Paris. P: 186.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J., Rea, P.A., 1997.** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1- catalyzed transport of bis (glutathionato) cadmium. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 94: 42-7.
- Loué, A., 1993.** Oligo-éléments en agriculture. 2^{ème} édition. Editions Nathan. Paris. P: 577.
- Mercer, J. F., Livingston, J., Hall, B., Paynter, J. A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimes, A., Bhave, M., Siemieniak, D., 1993.** Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. Nat Genet 3: 20-5.
- Mills, A. L., Colwell, R. R., 1977.** Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay and sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18:99-103.

- Morozzi, G., Cienci, G., Caldini, G., 1982.** The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. Hyg. Orig. 176:189: 55-62.
- Mustapha, S., M. Ennaji, M., Cohen, N., 2013.** *Vibrio alginolyticus* : An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. International Journal of Science and Technology (IJST).2. P: 303.
- Nelson, N., 1999.** Metal ion transporters and homeostasis. Embo. J. 18: 4361-71.
- Nies, D.H., 1999.** Microbiologie heavy métal résistance. Appl microbial. 51 :730-750.
- Nweke, C.O., Alisi, C.S., Okolo, J.C., Nwanyanwu, C.E., 2007.** Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. Appl. Environ. Res. 5: 23-132.
- Nzengue, Y., 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines. Thèse de doctorat. : Université Joseph Fourier. Grenoble. P: 297.
- Odermatt, A., Suter, H.K., Rapf, R., Solioz, M., 1993.** Primary structure of twop -type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus*. J. Biol. chem. 268: 12775-12779.
- Picard, R., Temblay, B., Myrand, B., 2010.** Revue de littérature et fiches descriptives des différents indicateurs de stress et de vitalité utilisés pour caractériser les mollusques bivalves. Les Publications de la Direction de l'innovation et des technologies. Rapport de R-D n° 188. P: 26.
- Reggam, A., 2014.** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique et physico-chimique des eaux d'Oued Seybouse. Thèse de Doctorat. Option : Santé, Eau et Environnement. Université de Guelma. Algérie. P: 141.
- Remini, B., 2005.** La problématique de l'eau en Algérie. Collection hydraulique et transport. Blida. P : 18-23.
- Robert, M., Juste, C., 1999.** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. CRIN, Paris. P: 495.
- Rodier, J., 1996.** L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 8^{ième} édition. Paris. P: 1383.
- Rodier, J., Legure, B., Merlet, N., 2009.** L'analyse de l'eau ; eaux naturelles, Eaux Résiduelles, Eaux de Mer. 9^{ième} édition. Paris. P: 1526.
- Rouaiguia, M., 2014.** Contribution à l'étude écologique de l'Hirondelle de fenêtre *Delichon urbica* dans le Nord-Est de l'Algérie. Thèse de Doctorat. Option : Santé, Eau et Environnement. Université de Guelma. Algérie. P: 239.
- Rouane, O., 2013.** Bio surveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental Algérien par le suivi des indices biologiques de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu ; Pb et Cd) chez la moule *Mytilus gallo provincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. Thèse de doctorat. Option : Biologie marine. Université d'Oran. Algérie. P: 249.

- Rouch, D. A., Lee, B. T., Morby, A. P., 1995.** Understanding cellular responses to toxicagents : A model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* 14: 132- 141.
- Sandaa, R. A. , Enger, Ø., Torsvik, V., 1999.** Abundance and Diversity of *Archaea* in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3293–3297.
- Savolainen, H., 1996.** Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. *Rev. Environ. Health.* 11:167-173.
- Senez , J., 1968.** Microbiologie générale. Edition : Doin. Paris. P: 592.
- Silver, S., 1996.** Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions – a review. *Gene.*179:9-19.
- Silver, S., Phung, L.T., 1996.** Bacterial heavy metal resistance new: Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 5: 753-789.
- Singleton, P., 1999.** Bactériologie 2^{ième} cycle . 4^{ième} édition. Paris. P: 415.
- Wright, D.A., Welbourn, P., 2002.** Environmental Toxicology. Cambridge environmental chemistry. Series 11. Cambridge University Press. Cambridge. 1^{ière} Edition. P: 621.
- Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., Mc Grath, S.P., 2000.** Zinc hyper accumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant .Cell. Environ.* 23: 507-514.

- Sites web

- [01]:https://l.php?u=http%3A%2F%2Fwww.jmaterenvironsci.com%2FDocume%2Fvol6%2Fvol6_N5%2F167-JMES-1463-2015.Reggam.pdf& Consulter le 21/05/2017.
- [02]:<http://bonasavoir.perso.sfr.fr/tableau%20periodique.htm>. Consulter le : 18/04/2017.
- [03]: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112//Chapitre-I.pdf>. Consulter le : 16/ 4/ 2017.
- [04]:<https://en.tutiempo.net/climate>. Consulter le : 20/3/2017.
- [05]:http://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_305Nutritivegelose_FR_030315_4.pdf. Consulter le : 20/3/2017.
- [06]:http://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_045-Cetrimide_FR_230215.pdf. Consulter le : 1/4/2017.
- [07]: <http://microcsb.net/IMG/pdf/doc1-5.pdf> .Consulter le : 1/4/2017.
- [08]:http://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_064-Clark-Lubs_FR_030315.pdf. Consulter le : 1/4/2017.
- [09]:http://www.indicia.fr/documents/1427814656_fr.pdf .consulter le : 1/4/2017.
- [10]:https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiZnpv78ODTAhVMCBoKHcXYCLUQFggjMAA&url=http%3A%2F%2Fwww2.aclyon.fr%2Fenseigne%2Fbiotech%2Fressources%2Fapi10s_matrice.xls&usq=AFQjCNH_UZSkp1CUjEd4rEnGxSB_1NKcwg. Consulter le : 24 /03 /2017.

- [11]: https://www.google.com/search?q=8.%09http%3A%2F%2Fwww.humeau.com%2Fmedia%2Fblfa_files%2FTC_064-Clark-Lubs_FR_030315.pdf&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b#q=galerie+api+20e+catalogue. Consulter le : 11/4/2017.
- [12]: <http://210.242.21.31/servlet/Identify?action=preparNew&stripId=1>. Consulter le : 24/03/ 2017.
- [13]: https://www.google.com/search?q=8.%09http%3A%2F%2Fwww.humeau.com%2Fmedia%2Fblfa_files%2FTC_064-Clark Lubs_FR_030315.pdf&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b#q =galerie +api+staph+catalogue. Consulter le : 11/4/2017.
- [14]: https://www.google.com/search?q=8.%09http%3A%2F%2Fwww.humeau.com%2Fmedia%2Fblfa_files%2FTC_064-Clark-Lubs_FR_030315.pdf&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b#q=galerie+api+NEcatalogue. Consulter le : 11/4/2017.
- [15]: <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/coursdcem1/antibiotiquesgen.htm>. Consulté le : 5 /5/ 2017.

Annexe

➤ Milieux utilisés

Milieux	Composition	
Mac Conkey	Peptone pancréatique de gélatine	17,0 g
	Tryptone	1,5 g
	Peptone pepsique de viande	1,5 g
	Lactose	10,0 g
	Seles biliaries	1,5 g
	Chlorure de sodium	5,0 g
	Rouge neutre	30,0 g
	Cristale violet	1,0 g
	Agar Agar	13,5 g
	Eau distillée	1000ml
Hektoen	pH : 7,3	
	Protease peptone	2g
	Extrait de levure	3g
	Chlorure de sodium	5 g
	Thiosulfate de sodium	5 g
	Seles biliaries	9 g
	Citrate de fer ammoniacale	1,5 g
	Salicine	2 g
	Saccharose	12 g
	Fuchsine acide	2 g
	Lactose	0,1 g
	Bleu de brothynol	0,06 g
	Agar Agar	1,4 g
Eau distillée	1000 ml	
SS	pH=7	
	Peptone pancréatique de viande	5,0 g
	Extrait de viande	5,0 g
	Lactose	10,0 g
	Seles biliaries	8,5 g
	Citrate de sodium	10,0 g
	Thiosulfate de sodium	8,5 g
	Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
	Rouge neutre	25 g
	Vert brillant	0,33 g
	Agar Agar bactériologique	15,0 g
	Eau distillé	1000ml
Gélose nutritive	pH = 7	
	Extrait de viande de l'œuf	1 g
	Agar	15 g
	Peptone	5 g
	Chlorure de sodium	15 g
	Extrait de levure	2 g
Eau distillée	1000 g	
Chapman	pH = 7,4	
	Peptone trypsique de caséine	10 g
	Extrait de viande	1 g
	Chlorure de sodium	75 g
	Mannitol	10 g
	Rouge de phénol	0,025 g
	Agar Agar	15 g
	Eau distillée	1000 ml
pH=7,5		

	Peptone	20 g
	Sulfate de sodium	10 g
	Chlorure de magnésium	3 g
	Phosphate dipotassique	0,3 g
Cétrimide	Cétrimide	0,2 g
	Acide nalidixique	0,015 g
	Glycérol	10 g
	Agar Agar	13 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH=7,1	
	Hydrolisat acide de caséine	17,5 g
Muller-Hinton	Infusion de viande	2,0 g
	Amidon soluble	1,5 g
	Agar Agar	17,0 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 6,7	
	Extrait de l'œuf	3 g
	Agar	12 g
	Extrait de levure	3 g
	Peptone	20 g
	Lactose	10 g
	Saccharose	10 g
TSI	NaCl	5 g
	Glucose	1 g
	Citrate ferrique	3 g
	Thiosulfate de sodium	3 g
	Rouge de phénol	0,025 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,4	
	Chlore de sodium	5 g
	Sulfate de magnésium	0,2 g
	phosphate d'ammonium POH	1 g
Citrate de Simmons	Phosphate di potassique	2 g
	Citrate trisodique	2 g
	Solution de bleu bromothymol 1%	8 g
	Agar Agar	15 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7	
	Peptone pancréatique de viande	20 g
	Agar Agar	4 g
	Mannitol	2 g
Mannitol-mobilité	Nitrate de potassium	1 g
	Rouge de phénol solution à 1%	4 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,2	

Clark Lubs	et	Peptone trypsique de caséin	5 g
		Phosphate di potassique	5 g
		Glucose	5 g
		Eau distillée pH=7,5	1000 ml
Urée-indole		L-tryptophane	3 g
		Phosphate monopotassique	1 g
		Phosphate de sodium	1 g
		Chlorure de sodium	5 g
		Urée	20 g
		Solution rouge de phénol à 1%	2,5 ml
		Alcool à 95°	10 ml
		Eau distillée pH = 6,7	1000 ml

➤ Table de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E.

Test	Groupement active	Réactions/Enzymes	Résultats	
			Négative	Positive
ONPG	Ortho-nitro-Phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine désahydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orange
ODC	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Sodium citrate	Production de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production de H ₂ S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+VP2	
			Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxidation	Bleu /bleu vert	Jaune/vert jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	Sucrose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	Mlebiose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Arabinose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxidation	Bleu/bleu vert	Jaune
NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	GLU tube	Production de NO ₂ Reduction N ₂	NIT1+NIT2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge

➤ Table de lecture de la galerie miniaturisée API 20NE.

Tests	Substrat	Enzymes / Reactions	Resultants	
			Negative	Positive
NO ₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrite	NIT1+NIT2/ 5 min	
			Incolore	Rose/rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN/ 5 min	
			Incolore	Rose
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 min	
			Incolore	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/rose/rouge
GEL	Gélatinase	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNP G	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	Citate			
PAC	Phenyl-acétate			
OX	Tetraméthyl-p-phenylène diamine			

➤ Table de lecture de la galerie miniaturisée API Staph.

Testes	Substrats	Caractère recherché	Résultats	
			Negative	positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif		
FRE MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-fructose D-mannose D-maltose D-lactose (origine bovine) D-tréhalose D-mannitol Xylitol D-mélibiose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
NIT	Nitrate de potassium	Reduction des nitrates en nitrite	NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
			incolore-rose pâle	Rouge
PAL	B-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
			Jaune	Violet
VP	sodium pyruvate	Production d'acétyl méthyl- carbinol (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			incolore-rose pâle	violet-rose
RAF XYL SAC MDG NAG	D-raffinose D-xylose D-saccharose méthyl- α -D glucopyranoside N-acétyl-glucosamine	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Orange-rouge	
URE	Urée	Urease	Rouge-violet	

Résumés

Résumé

Dans le cadre d'une étude comparative entre l'effet de métaux lourds (cadmium et cuivre) sur des souches bactériennes isolées à partir de 3 oueds (Seybouse, Zimba, Maïz), nous pouvons obtenir :

Parmi 36 souches bactériennes isolées, 18 sont des *Enterobacteriaceae*, 10 *Staphylococcaceae*, 3 *Aeromonadaceae*, 3 *Vibrionaceae*, 1 *Pseudomonadaceae* et 1 *Pasteurellaceae*. Les espèces bactériennes identifiées ont été plus sensibles aux concentrations excessives du cuivre par rapport au cadmium, cette sensibilité se manifeste par le calcul du rapport CMB/CMI. Ce dernier a permis de démontrer qu'il y a seulement deux espèces bactériennes qui ont un effet de tolérance vis-à-vis de cadmium, toutefois aucune espèce n'a présenté un effet de tolérance vis-à-vis de cuivre.

Mots clés : Cadmium, cuivre, tolérance bactérienne, pollution.

Summary

Through a comparative study of the heavy metal effect (cadmium and copper) on isolated bacterial strains from the 3 wadis (Seybouse, Zimba, Maïz) we can estimate that: of 36 isolated bacterial strains, 18 are *Ennterobacteriaceae*, 10 *Staphylococcaceae*, 3 *Aeromonadaceae*, 3 *Vibrionaceae*, 1 *Pseudomonadaceae* and 1 *Pasteurellaceae*. Bacterial species have been more sensitive to excessive concentrations of copper due to cadmium, this sensitivity is manifested by calculations by the CMB /CMI ratio. The latter demonstrated that there are only two bacterial species which have a cadmium tolerance effect, however, no species has exhibited a tolerance effect on copper.

Key words: Cadmium, copper, bacterial tolerance, pollution.

ملخص

من خلال دراسة مقارنة لتأثير المعادن الثقيلة (الكاديوم والنحاس) على سلالات بكتيرية معزولة من 3 أودية (سيبوس، زيمبا، وادي معيز) يمكننا تقدير ما يلي:

من بين 36 سلالة بكتيرية، 18 هي *Enterobacteriaceae*، 10 *Staphylococaceae*، 3 *Aeromonadaceae*، 3 *Vibrionaceae*، 1 *Pseudomonadaceae* و 1 *Pasteurellaceae*.

Pasteurellaceae 1، *Pseudomonadaceae* 1، *Vibrionaceae* 3.

الأنواع البكتيرية كانت لديها حساسية مفرطة للتراكيز المتزايدة من النحاس بالنسبة للكاديوم وهذه الحساسية تظهر في الحسابات التي يتم إجراؤها بالتقريب CMB /CMI. وقد أظهرت هذه الأخيرة أن هناك نوعين فقط من الأنواع البكتيرية التي لها تأثير التسامح بالنسبة للكاديوم ولكن لا توجد أنواع لها تأثير التسامح بالنسبة للنحاس.

الكلمات المفتاحية: الكاديوم، النحاس، تسامح بكتيري، التلوث.

