

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie - Ecologie

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

---

Thème : Bactériologie des fientes des Hirondelles  
(Région de Guelma)

---

Présenté par : - CHOUINI Asma

- TABOUCHE Khalida

Devant le jury composé de :

Président :	Mme BOUMAAZA Awatef	(M.A.A)	Université de Guelma.
Examineur :	Mme BOUSADIA Meriem Imen	(M.A.A)	Université de Guelma.
Encadreur :	M. HOUHAMDI Moussa	(Pr.)	Université de Guelma.
	Mlle HADDAD Soumia	(Doctorante)	Université de Guelma.

Juin 2013

## *Remerciements*

*Nous remercions en premier lieu LE BON DIEU*

*Le tout puissant pour le courage et la force que nous a donné pour élaborer ce  
modeste travail.*

*A la présidente de jury : Mme BOUMAAZA A., Maître assistante A au  
département de biologie à l'Université de Guelma, vous avez fait l'honneur de  
présider ce jury.*

*Nous remercions également Mme BOUSSADIA M. I., Maître assistante A au  
département de biologie à l'Université de Guelma d'avoir accepté de participer à  
ce jury.*

*Nous exprimons nos profondes reconnaissances à notre encadreur M.  
HOUHAMDJI Moussa, Professeur au département de biologie à l'Université de  
Guelma 8 Mai 1945.*

*Vous nous avez fait le grand honneur d'encadrer ce travail.  
Veuillez accepter l'expression de notre grande admiration et de notre profonde  
reconnaissance.*

*Nous tenons à remercier notre encadreur Mlle HADDAD SOUMIA pour son  
encadrement, ses conseils avisés et pour ses encouragements.*

*Enfin, à tous ceux qui nous ont aidés de loin  
ou de près à réaliser ce travail.*

## *Dédicace*

*D'un grand cœur plein d'affection et de tendresse,*

*Je dédie ce travail à :*

*Mes très chers parents*

*A mon père qui a consacré sa vie à bâtir la mienne*

*Pour son amour, Pour ses efforts et son soutien,*

*A ma mère pour son amour, son soutien moral et sa grande compréhension.*

*Que DIEU tout puissant vous donne longue vie, santé et bonheur.*

*A ma sœur Moufida et mes deux frères Abdelatif et Waheb.*

*A mes tantes et mes oncles.*

*A mes cousins et cousines.*

*A mon binôme.*

*Mes amies : Mabrouka , Sekfali Soumia.*

*Et toute la promotion 2013.*

*Khalida*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A ma grand-mère*

*A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines.*

*A mes chères sœurs Manel, Hanane et sa petite fille Rimas*

*A mon frère Azzeddine*

*A mon fiancé Issam*

*A mon binôme.*

*A Ilham Boursace, Hadjer et toutes mes amies.*

*Mes proches et toute ma famille, et tous les gens qui m'aiment.*

*A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.*

*A tous mes collègues de la promotion.*

*Asma*

## Table des matières :

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

### Partie I : Etude bibliographique

#### Chapitre I : Description du modèle biologique

1. Description morphologique.....	3
1.2. L’Hirondelle de fenêtre ( <i>Delichon urbica</i> ).....	3
1.2. L’Hirondelle rustique ( <i>Hirundo rustica</i> ).....	4
2. Répartition géographique.....	5
3. Régime alimentaire.....	5
4. Ecologie.....	6
4.1. L’Hirondelle de fenêtre.....	6
4.2. L’Hirondelle rustique.....	6
5. Comportements.....	7
6. Reproduction.....	8
6.1. L’Hirondelle de fenêtre.....	8
6.2. L’Hirondelle rustique.....	9
7. Statut juridique.....	10
8. Le cycle annuel des Hirondelles rustique et de fenêtre.....	11

#### Chapitre II : La résistance bactérienne au chlore et aux antibiotiques

1. Le chlore.....	12
1.1. Spectre d’activité du chlore sur les micro-organismes.....	12
1.2. Les principales cibles du chlore.....	12
1.3. Action bactéricide du chlore.....	13

1.3.1. Oxydation par $\text{ClO}^-$ .....	14
1.3.2. L'oxydation par $\text{HClO}$ des fonctions aminées des protéines membranaires.....	14
1.4. Paramètres qui influencent sur le contact entre le chlore et les bactéries.....	14
1.4.1. Le type de bactéries.....	15
1.4.2. Age des bactéries .....	15
1.4.3. La dose du chlore et le temps de contact .....	15
2. Les antibiotiques .....	15
2.1. Mode d'action .....	16
2.2. Classification selon le mode d'action .....	16
3. La résistance des bactéries à l'action du chlore et des antibiotiques.....	17
3.1. Les mécanismes de résistance bactérienne.....	17
3.1.1. La résistance naturelle .....	17
❖ Mécanisme de résistance intrinsèque .....	17
✓ La paroi cellulaire .....	17
✓ La membrane cytoplasmique .....	18
3.1.2. La résistance acquise .....	19
- La résistance chromosomique .....	19
- La résistance par acquisition de gènes .....	19
3.2. Types et niveaux de résistance aux antibiotiques.....	20
3.2.1. Mutation de la cible de l'antibiotique .....	20
3.2.2. Modification de l'antibiotique .....	20
3.2.3. Réduction de la perméabilité membranaire.....	21
3.2.4. Efflux des antibiotiques .....	21

## Partie II : Etude expérimentale

### Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude.....	22
2. Choix de site de prélèvement.....	22
3. Le protocole expérimental .....	23
4. Méthode de prélèvement .....	23
4.1. Recommandations de l'O.I.E pour la réalisation du prélèvement .....	24
5. Analyses bactériologiques .....	24
5.1 Recherche bactérienne et isolement .....	25
5.1.1. Recherche de <i>Salmonella</i> .....	25
5.1.2. Recherche des <i>Yersinia</i> .....	26
5.1.3. Recherche des <i>Pseudomonas</i> .....	26
5.1.4. Recherche de Vibrions .....	27
5.1.5. Recherche des spores de bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) .....	28
5.1.6. Recherche des Streptocoques .....	28
5.1.7. Recherche des Staphylocoques .....	29
❖ Recherche d'une staphylocoagulase .....	30
5.1.8. Ensemencement .....	30
5.1.9. Repiquage.....	31
6. Identification.....	31
6.1. Examen macroscopique .....	31
6.2. Examen microscopique .....	31
6.2.1. La coloration de Gram .....	32

6.3. Examen liés aux caractères biochimiques .....	32
6.3.1. La galerie Api 20E.....	33
6.3.2. La galerie API 20 NE.....	34
6.3.3. Recherche des cytochromes oxydases.....	35
6.3.4. La galerie biochimique classique .....	35
7. Détermination de la CMI du chlore des bactéries isolées .....	41
8. Antibiogramme par diffusion des disques .....	43

## **Chapitre VI : Résultats et discussion**

I. Résultats .....	45
1. Caractères morphologiques et coloration de Gram .....	45
2. Résultats de l'identification biochimique .....	46
3. Evaluation de l'antibiorésistance.....	49
3.1. L'hirondelle de fenêtre .....	49
3.2. L'hirondelle rustique .....	51
4. Détermination de la CMI du chlore des souches identifiées .....	56
II. Discussion .....	57
Conclusion.....	59

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص



## Liste des abréviations :

**+** : Caractère positif

**-** : Caractère négatif

**%** : Pourcent

**°** : Degré

**°C** : Degré Celsius

**µL** : microlitre

**ADH** : Arginine dihydrolase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMX**: Amoxicilline

**API**: Analytical profile index

**ASR**: anaérobies sulfite-réducteurs

**BN** : Bouillon nutritive

**C**: Chloramphénicol

**CIT** : Citrate

**CL<sup>-</sup>** : ion chlorure

**CLO<sup>-</sup>** : Hypochlorite

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**cm** : Centimètre

**CN**: Céfalexine

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone,

**D.O** : Densité optique

**e<sup>-</sup>** : Electron

**E** : Est

**ex** : Exemple

**Fig** : Figure

**g** : Gramme

**GEL** : Gélatinase

**GN** : Gélose nutritive

**GLU** : Glucose

**h** : Heur

**H<sub>2</sub>O** : Eau

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**HClO** : Acide hypochloreux

**H<sub>2</sub>** : [Dihydrogène](#)

**H<sup>+</sup>** : Proton

**H<sub>2</sub>S** : Sulfure d'hydrogène

**I** : Intermédiaire

**IND** : Indole

**Km<sup>2</sup>** : Kilomètre carré

**LDC** : Lysine décarboxylase

**LPO** : Ligue pour la Protection des Oiseaux|

**LPS** : lipopolysaccharides

**m** : Mètre

**MF**: McFarland

**mg**: Milligramme

**mg/l:** Milligramme par litre

**MH:** Mueller Hinton

**min :** Minute

**ml :** Millilitre

**MLS :** Macrolides-Lincosamides- Streptogramines

**mm :** Millimètre

**N :** Nord

**nm :** Nanomètre

**NaCl :** Chlorure de sodium

**NaClO :** hypochlorite de sodium

**NO<sub>3</sub> :** Nitrate

**ODC :** Ornithine décarboxylase

**OIE :** Organisation internationale des épizooties

**OMS :** Organisation mondiale de santé

**ONPG:** Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside

**PAC :** Acide phényl acétique

**pH :** *Potentiel hydrogène*

**PNPG :** Para-nitrophényl-βD-galactopyranosidase

**R :** Résistante

**RM :** Rouge de méthyle

**SS:** Salmonella-Shigella

**S:** Sensible

**spp:** Espèce

**T** : Témoin

**Tab** : Tableau

**TDA** : Tryptophane désaminase

**TE**: Tétracycline

**TSI**: Triple sugar iron

**URE**: Urease

**VF** : Viande Foie

**VP** : Voges-Proskauer

## Liste des figures :

Figure :	Page :
<b>Figure 1</b> : Caractéristiques morphologiques d'un juvénile et d'un adulte	3
<b>Figure 2</b> : Description d'Hirondelle rustique	4
<b>Figure 3</b> : deux juvéniles d'Hirondelle rustique	4
<b>Figure 4</b> : Répartition de l'Hirondelle de fenêtre	5
<b>Figure 5</b> : Répartition de l'Hirondelle rustique	5
<b>Figure 6</b> : Hirondelle et une libellule	6
<b>Figure 7</b> : Nid de l'hirondelle de fenêtre en forme de sphère	9
<b>Figure 8</b> : Le nid d'Hirondelle rustique	9
<b>Figure 9</b> : Le cycle annuel des hirondelles rustique et de fenêtre	11
<b>Figure 10</b> : L'activité désinfectante de l' $\text{HClO}$ et le $\text{ClO}^-$	13
<b>Figure 11</b> : Mode d'action des antibiotiques	16
<b>Figure 12</b> : Structure de la paroi des bactéries Gram –	17
<b>Figure 23</b> : Structure de la paroi des bactéries Gram +	17
<b>Figure 14</b> : Structure de la membrane cytoplasmique	18
<b>Figure 15</b> : Stratégies de résistance aux antibiotiques	20
<b>Figure 16</b> : Situation géographique de la zone d'étude	22
<b>Figure 17</b> : Localisation des sites de prélèvements de fientes (des Hirondelle de fenêtre à gauche et des Hirondelle rustique à droite)	22
<b>Figure 18</b> : Schéma de la démarche de l'analyse bactériologique	23
<b>Figure 19</b> : méthode de détermination de la CMI des souches isolées	42

<b>Figure 20:</b> Aspect des colonies sur gélose nutritive, gélose Hektoen et gélose SS	45
<b>Figure 21 :</b> Aspect des colonies sur gélose MacConkey et gélose Chapman	46
<b>Figure 22:</b> Profil biochimique de la souche <i>Escherichia coli 1</i>	47
<b>Figure 23 :</b> Profil biochimique de la souche <i>Enterobacter amnigenus 2</i>	47
<b>Figure 24 :</b> Profil biochimique de la souche <i>Serratia fonticola</i>	47
<b>Figure 25:</b> Profil biochimique de la souche <i>Pseudomonas luteola</i>	47
<b>Figure 26:</b> Résultat de quelques galeries biochimiques classiques ( <i>Citobacter koseri</i> à gauche et <i>Enterobacter gergoviae</i> à droite).	48
<b>Figure 27 :</b> Taux de résistance d' <i>Escherichia coli 1</i>	49
<b>Figure 28:</b> Taux de résistance de <i>Citrobacter koseri</i>	50
<b>Figure 29:</b> Taux de résistance de <i>Pantoea spp 4</i>	50
<b>Figure 30 :</b> Taux de résistance <i>Staphylococcus aureus</i>	51
<b>Figure 31 :</b> Taux de résistance de <i>Serratia marcescens</i>	52
<b>Figure 32:</b> Taux de résistance de <i>Serratia fonticola</i>	52
<b>Figure 33 :</b> Taux de résistance d' <i>Enterobacter gergoviae</i>	53
<b>Figure 34 :</b> Taux de résistance d' <i>Enterobacter amnigenus 2</i>	54
<b>Figure 35:</b> Taux de résistance de <i>Citrobacter koseri</i>	54
<b>Figure 36:</b> Taux de résistance d' <i>Citrobacter freundii</i>	55
<b>Figure 37:</b> Taux de résistance de la souche <i>Pseudomonas luteola</i>	56
<b>Figure 38:</b> Résultat de la CMI des souches testées	56

## Liste des tableaux :

Tableau	Page
<b>Tableau 01 :</b> Spectre d'activité du chlore aux différents micro-organismes	12
<b>Tableau 02:</b> La couleur des colonies isolées à partir des géloses SS et Hektoen	25
<b>Tableau 03:</b> Caractères macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées	45
<b>Tableau 04:</b> Résultats de l'identification par la galerie API 20 E, API 20 NE et la galerie classique	46
<b>Tableau 05 :</b> Résultats des Staphylocoques	48
<b>Tableau 06:</b> Résultat de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> 1	49
<b>Tableau 07:</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter koseri</i>	49
<b>Tableau 08 :</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Pantoea spp</i> 4	50
<b>Tableau 09:</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	51
<b>Tableau 10 :</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Serratia marcescens</i>	51
<b>Tableau 11:</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Serratia fonticola</i>	52
<b>Tableau 12:</b> Résultat de l'antibiogramme d' <i>Enterobacter gergoviae</i>	53
<b>Tableau 13:</b> Résultat de l'antibiogramme d' <i>Enterobacter amnigenus</i> 2	53
<b>Tableau 14 :</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter koseri</i>	54
<b>Tableau 15 :</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Citrobacter freundii</i>	55
<b>Tableau 16:</b> Résultat de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas luteola</i>	55
<b>Tableau 17:</b> Lecture de l'API 20 E	Annexe 2
<b>Tableau 18 :</b> Lecture de l'API 20NE	Annexe 2
<b>Tableau 19:</b> Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour <i>Enterobacteriaceae</i> .	Annexe 4
<b>Tableau 20 :</b> Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour <i>Staphylococcus spp.</i>	Annexe 4

# Introduction





Les hirondelles sont des espèces à fortes valeurs symboliques et connues de tous comme annonciatrices du printemps [3].

Pour migrer et parcourir des centaines, voire des milliers de kilomètres, un oiseau a besoin de carburant. Il fait des réserves de graisses avant de partir, mais bien souvent, durant le parcours, il est préférable de faire des pauses pour les reconstituer partiellement, pour se reposer [5].

Une fois installés dans leur aire de nidification, les oiseaux migrateurs ajustent au mieux leur date de ponte et leur fécondité à la périodicité et à l'abondance de ressources trophiques (Perrins 1965) de telle sorte que les oisillons sont présent au nid au moment du maximum de disponibilité alimentaire (Lack 1954, Drent et Daan 1980, Martin 1987). Ce qui maximise leur chance de survie et leur recrutement ultérieur (Lack 1947, 1968).

De point de vue nutritionnel les hirondelles sont des oiseaux insectivores qui attrapent ses proies au vol après des courses poursuites acharnées. Le régime alimentaire de cette espèce est très diversifié où le couple nourrit les oisillons durant la période d'élevage (21j) de Diptères, d'Hyménoptères, de Lépidoptères et de Coléoptères, (Moller 1994).

L'écosystème digestif contient des nombres considérables de bactéries phylogénétiquement et physiologiquement différents. Se sont des espèces individuelles, ou assemblés dans différent micro habitats et niches métaboliques, sur la muqueuse et dans la couche du mucus, aussi bien que dans la lumière intestinale (Chouder, 2006).

La microflore varie en fonction des facteurs liés à l'hôte : l'âge de l'animal, son environnement, le stress et l'alimentation (Gabriel et *al.*, 2003 ; Savage, 1989).

Ce présent manuscrit qui a pour objectifs :

- D'étudier la bactériologie des fientes de deux espèces d'Hirondelles : l'Hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) et l'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*),
- Évaluer la résistance des bactéries isolées aux antibiotiques
- Contrôler le niveau de résistance de ces bactéries au chlore (eau de javel) ; en adaptant un protocole expérimentale visé pour la détermination de la CMI (Concentration minimale Inhibitrice) du chlore de ces souches en fonction des paramètres ayant une

influence sur le contact entre le chlore et les bactéries (dose du chlore, temps de contact...)

Afin de réaliser cette étude et atteindre nos objectifs, nous avons structuré notre démarche en chapitres interdépendants :

- Le premier expose une description d'Hirondelle de fenêtre et d'Hirondelle rustique.
- Le deuxième explique la résistance bactérienne au chlore et aux antibiotiques.
- Le troisième expose la méthodologie suivie pour l'élaboration de ce travail.
- Le quatrième mentionne sous forme de graphiques tous les résultats obtenus.

# Etude bibliographique



# Chapitre 1

Les Hirondelles de fenêtre et rustique appartiennent à la famille des Hirundinidae et à l'ordre des Passériformes [3].

## 1. Description morphologique :

- **L'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica* L. 1758)**

L'Hirondelle de fenêtre est l'une des plus petites hirondelles; elle mesure entre 13,5 et 15 cm de long (Singer 2008) et possède une envergure de 28 cm (Géroutet 1998). Il n'existe pas de dimorphisme sexuel chez cette espèce mais il est possible de différencier les adultes, des juvéniles (Sériot & Alvès 2002, Peterson et al. 2006). Les adultes possèdent un croupion blanc ainsi que le ventre, le haut de la poitrine et les pattes ; le dos, les ailes et la queue sont noirs avec des reflets bleus (figure 1 droit) (Peterson et al. 2006, Singer 2008).



**Figure 1 :** Caractéristiques morphologiques d'un juvénile à gauche et d'un adulte à droite.

La queue est courte et échancrée mais sans filet (Peterson et al. 2006). Les juvéniles contrairement aux adultes ont le dos brun-noir sans reflet bleu (figure 1 gauche) (Peterson et al. 2006, Singer 2008). Le vol de l'hirondelle de fenêtre est moins rapide et accidenté que pour les autres hirondelles mais elle vole à plus haute altitude que les autres (Géroutet 1998). Elle se déplace rarement sur le sol car elle a des difficultés à s'y mouvoir (Géroutet 1998).

- **L'Hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) (Linné, 1758)**

L'Hirondelle rustique se caractérise par une silhouette gracieuse et élancée, des ailes longues, triangulaires et effilées, un cou peu prononcé et une queue nettement échancrée. L'adulte possède un plumage contrasté. Le dessus est bleu-noir uniforme aux reflets métalliques et le dessous du corps va du blanchâtre au roussâtre. Le front et la gorge sont rouge foncé (caractères difficiles à distinguer en vol et de loin). Un collier bleu noir forme une bande pectorale qui tranche nettement avec la poitrine allant du blanchâtre au roussâtre. La queue nettement fourchue présente des rectrices externes très allongées appelées « filets » qui mesurent jusqu'à 70 mm chez le mâle et 34 mm au maximum chez la femelle. Le dessus de la queue est marqué d'une rangée de petites taches blanches à proximité de l'échancrure, bien visibles lorsque l'oiseau étale ses rectrices. Le bec et les pattes de faible taille sont noirs.



**Figure 2 :** Description d'Hirondelle rustique [10].

La femelle présente un plumage moins coloré aux reflets bleus moins prononcés que chez le mâle.

Le jeune est encore plus terne avec le dessus moins brillant, le front et la gorge jaune pâle, roussâtre ou rose brunâtre et les filets caudaux courts, voire absents au moment de la sortie du nid.



**Figure 3 :** deux juvéniles d'Hirondelle rustique [2].

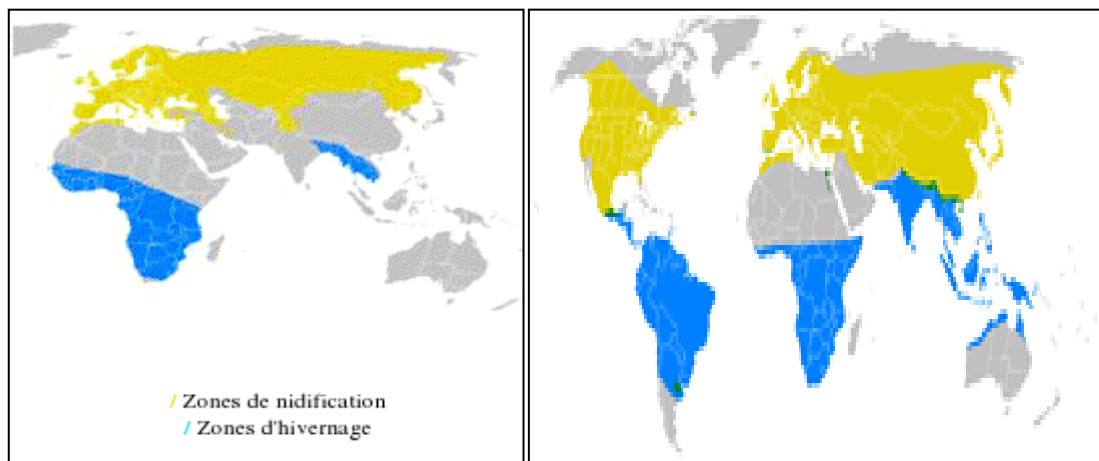
Longueur totale du corps : 17-19 cm. Poids : 18 à 20 g (extrêmes 13-28 g).

## 2. Répartition géographique

L'Hirondelle de fenêtre est présente en Europe et en Asie mais elle n'est pas observée sur le continent Américain (Géroudet 1998).

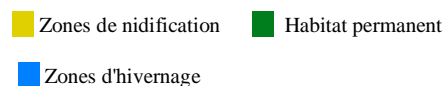
L'Hirondelle rustique est un oiseau migrateur et cosmopolite. Elle se reproduit dans tout le Paléarctique ; c'est à dire l'Amérique du Nord, l'Europe, l'Asie centrale et l'Afrique du Nord, excepté dans l'Antarctique, les Toundras et les déserts (Cramp 1994, Møller 1994).

La sous espèce nicheuse en Algérie *Hirundo rustica rustica* se reproduit également en Europe, en Asie et en Afrique du Nord ; puis migre vers ses quartiers d'hivernage situés plus au Sud (Cramp 1994).



**Figure 4:** Répartition de l'Hirondelle de fenêtre [9]

**Figure 5 :** Répartition de l'Hirondelle rustique [8]



## 3. Régime alimentaire

L'Hirondelle est strictement insectivore. Elle se nourrit essentiellement d'insectes aériens, en particulier des Diptères qu'elle capture en vol [20].

En général, pour l'Hirondelle rustique les vols de chasse sont observés du ras du sol ou de l'eau jusqu'à 7-8 mètres de hauteur, mais par beau temps, les vols de chasse se font aussi plus haut, jusqu'à 200-300 m. Son régime alimentaire comprend également des

Hémiptères, des Coléoptères, des Hyménoptères, des Lépidoptères et des Odonates. Accessoirement des chenilles, des araignées ou des fourmis sont consommées à terre ou contre des murs [20].



**Figure 6 :** Une hirondelle mangeant une libellule [20]

#### **4. Ecologie :**

- **L’Hirondelle de fenêtre :**

A l’origine, l’Hirondelle de fenêtre nichait sur les parois rocheuses des montagnes ou des falaises côtières mais à ce jour il est rare de l’observer à ces endroits (Verheyen 1947, Singer 2008). Elle préfère plutôt les villes et les villages où elle construit son nid sur les bâtiments et dans certains cas à l’intérieur de ceux-ci (Neuray 1982, Van Der Elst 1985). L’emplacement d’une colonie dépend de la distance d’espaces verts ou de bois et de la distance d’un point d’eau par rapport à la colonie (Walravens & Langhendries 1985). Ces deux caractéristiques sont importantes car elles conditionnent la présence d’insectes en abondance quelque soit le temps (Walravens & Langhendries 1985). En effet lorsqu’il fait pluvieux, elle chasse au niveau des étangs ou des cours d’eau où les insectes y sont plus nombreux et lors de période plus chaude, elle chasse au dessus des bois et à plus haute altitude (Walravens & Langhendries 1985). L’autre raison de l’importance de ces caractéristiques est la présence de boues nécessaires pour construire son nid (Walraven & Langhendries 1985).

- **L’Hirondelle rustique**

L’Hirondelle rustique fréquente principalement les zones rurales, en particulier les régions herbagères (Evans *et al.*, 2007). Elle occupe également les villages, plus rarement les



grandes agglomérations comportant suffisamment d'espaces verts et les zones de monocultures céréalières. Les densités d'hirondelles les plus importantes se situent généralement dans les fermes et les hameaux où se pratique encore l'élevage extensif. L'installation préférentielle dans les fermes en activité n'est pas uniquement favorisée par la présence du bétail, mais également par l'architecture des bâtiments d'élevage (Vansteenwegen, 1988) et leur accessibilité. Dans tous les cas, son abondance est liée à la présence d'habitats riches en insectes aériens (prairies naturelles, haies, bois, mares, étangs,...) (Jarry *in* Rocamora & Yeatman-Berthelot, 1999).

En migration, les plus grandes concentrations d'hirondelles sont observées dans des zones humides, surtout sur des plans d'eau.

## 5. Comportements :

Les premiers migrateurs printaniers peuvent être observés dès la mi-février, mais c'est à la fin de mars que débute réellement la migration. Le retour des oiseaux culmine entre le 15 avril et le début de mai, puis diminue progressivement laissant des retardataires jusqu'au début juin (Dubois et *al.*, 2000).

A partir de juillet, se forment des rassemblements, constituant des dortoirs comptant souvent plusieurs milliers d'oiseaux. Les départs en migration commencent timidement début août et les passages atteignent leur maximum entre le 15 et le 30 septembre, puis diminuent nettement en octobre. Les dernières hirondelles sont observées en novembre, plus rarement en décembre (Dubois et *al.*, 2000).

L'activité essentiellement diurne de l'espèce est consacrée en priorité aux vols alimentaires afin de couvrir les besoins de base et d'assurer l'élevage des nichées.

Douée de facultés étonnantes et chasseur aérien performant, l'Hirondelle rustique a néanmoins besoin de perchoirs pour satisfaire ses activités de confort (toilette, repos...). Elle se pose ou se déplace rarement à terre, exclusivement lors de la collecte de boue pour la construction du nid, pour se réchauffer au soleil ou plus rarement pour picorer des insectes.

Fidèles au site de reproduction, les couples, souvent unis pour la vie, s'affairent dès leur retour à la restauration de leur nid ou à la construction d'un nouveau nid, dont l'emplacement sera choisi au préalable par le mâle (Jarry *in* Yeatman-Berthelot & Jarry, 1994). La fidélité des couples n'est pas systématique, à tel point que les partenaires peuvent changer au cours d'une même saison. La fidélité au site de reproduction souffre également de nombreuses exceptions (Saino *et al.*, 2002 ; Vansteenwegen, 1988) et concerne les mâles, très rarement les femelles, qui se sont reproduits au moins une fois dans celui-ci. Le mâle s'active aussi à défendre son territoire et à courtiser la femelle par d'incessantes parades. Le temps consacré à cette activité est d'autant plus important lorsque plusieurs couples nichent dans le même local.

Contrairement à d'autres hirondelles, la rustique niche rarement en colonie importante (le plus souvent, moins de 10 nids). Le nid est construit de préférence dans des bâtiments traditionnels d'élevage, mais également dans des garages, granges, greniers, buanderies,....

## 6. Reproduction :

Ce sont les mâles qui arrivent les premiers dans l'aire de nidification, les femelles les rejoignent plus tard et les trouvent déjà prêts pour la reproduction. La parade sexuelle commence par l'attraction de la femelle dans un territoire où le mâle effectue des mouvements de la queue et pousse des chants de parade [12].

- **L'Hirondelle de fenêtre**

Une fois la femelle attirée dans le territoire, la reproduction débute et les deux parents commencent à maçonner son nid en forme de coupe, qui assemblent des boulettes de terre humide (généralement de l'argile), de fins graviers et des fétus de paille. L'intérieur est tapissé de plumes. Accolé à son surplomb, le nid est presque entièrement fermé, les parents ne laissant subsister qu'un simple trou d'envol. La construction du nid dure en moyenne 10,4 jours (contre 3,5 jours s'il s'agit simplement de restaurer un ancien nid) [12].

L'Hirondelle de fenêtre est très fidèle à son site de nidification, elle y revient chaque année (7 à 12 % des couples réutilisent même le nid occupé l'année précédente). Elle effectue

2 couvées, l'une fin mai-début juin, l'autre en juillet (ou même en août). Les 4 ou 5 œufs blanc pur (dimensions : 18,5 x 13 millimètres) sont couvés à tour de rôle par le mâle et la femelle, pendant 15 à 16 jours. Les jeunes séjournent au nid pendant une durée allant de 3 semaines à 1 mois. Ils peuvent ensuite aider leurs parents lors de l'élevage de la nichée suivante. Dès la fin du mois d'août, et jusqu'au début d'octobre, les jeunes puis les adultes se rassemblent sur les fils électriques, annonçant ainsi l'imminence de leur départ pour l'Afrique [12].



**Figure 7:** Nid de l'Hirondelle de fenêtre en forme de sphère [20].

- **Hirondelle rustique :**

Une fois la femelle attirée dans le territoire, la reproduction débute et le couple commence à bâtir son nid en forme d'une demi-coupe constituée de boulettes de vases et de boue incluant des graviers très fins, le tout étant cimenté grâce à la salive qui donne plus de solidité au nid. Le nid est tapissé de nombreux crins, de brins d'herbes, de radicelles et le tout est recouvert de plumes (Al-Rawy et George 1966, Cramp 1988). Le nid peut être réutilisé durant de nombreuses années. Il est construit au ras du plafond sur une hauteur de 2 à 5 m du sol, la durée de la construction du nid est d'environ 8 jours (Cramp 1994).



**Figure 8 :** Le nid d'Hirondelle rustique  
(Photo prise par Tabouche Khalida)

Après la construction du nid, la femelle commence à pondre les œufs au rythme d'un œuf par jour tôt le matin (Cramp 1988). La ponte commence en moyenne 16 jours après la formation du couple (Møller 1994). Le poids moyen de l'œuf est de 1.9 g pour une dimension moyenne de 19.7mm x 13.6mm (Cramp 1988). Une femelle pond de 4 à 6 œufs blanc tachetés de roux et les couve seule durant 14 à 16 jours (Perrins et Cuisin 1987), ne les quittant que pour aller s'alimenter, car le mâle ne la nourrit pas pendant la durée de l'incubation.

Après l'éclosion, les pulli sont nourris par les deux parents, ils grandissent et quittent le nid au bout de 20 jours (Cramp 1988). L'envol se fait sur une durée de 2 jours (Møller 1994).

Une deuxième ponte est effectuée chez les couples les plus précoces, rarement une troisième. Les jeunes des premières nichées effectuent leur erratisme juvénile dès le mois de juin et sont rejoint par les adultes aux bords des étangs qui servent de dortoirs durant le mois d'août avant leur migration (L.P.O. 2002).

Après la période de nidification et avant la migration, il est temps de remplacer les plumes usées par de nouvelles plus résistantes : c'est la mue ! La mue se terminera juste avant le retour de la migration.

## **7. Statut juridique:**

Espèces intégralement protégées [13].

## 8. Le cycle annuel des Hirondelles rustique et de fenêtre :

### Printemps : Période de nidification

Au début du printemps, les hirondelles arrivent chez nous et elles se rapprochent des constructions humaines qui constituent des supports artificiels où elles bâtissent leur nid.



A gauche, deux nids d'Hirondelles de fenêtre construits sur le rebord d'une fenêtre et à droite, un nid d'Hirondelle rustique construit à l'intérieur d'un garage.



### Été : Emancipation des jeunes

Après être restés environ 3 semaines au nid,

les jeunes s'envolent mais les parents continuent de les nourrir.

### Fin d'été : Le Rassemblement

A la fin de la période de reproduction, les hirondelles se rassemblent afin de se préparer au long voyage vers leur site d'hivernage. Il n'est pas rare de les observer en groupe sur les fils électriques.



### Automne : Migration post-nuptiale

Les hirondelles quittent leur site de reproduction pour regagner l'Afrique. Durant ce long voyage, elles rencontrent de nombreux obstacles comme la traversée du Sahara ou le passage de montagnes

### Hiver : Hivernage

Les hirondelles passent l'hiver en Afrique où elles trouveront la nourriture nécessaire à leur survie (insectes volants).

### Début du printemps : Migration pré-nuptiale

Les hirondelles quittent l'Afrique pour rejoindre leur site de reproduction.

**Figure 9** : Le cycle annuel des Hirondelles rustique et de fenêtre [4].

# Chapitre II

## 1. Le chlore :

La capacité des micro-organismes à s'adapter de façon très rapide à leur environnement, en développant une résistance aux éléments extérieurs agressifs tel que les désinfectants est aujourd'hui bien connu [14].

L'intérêt de leur étude est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue de souches résistantes aux différents désinfectants [14].

Parmi les désinfectants les plus utilisés on peut citer le chlore qui est un désinfectant capable d'inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase, fongistase), ou d'avoir une action létale (bactéricide, fongicide, sporicide), ces deux modes d'action sont obtenus en fonction de la dose et le temps de contact [7].

### 1.1. Spectre d'activité du chlore sur les micro-organismes :

Les dérivés chlorés ont un spectre d'activité étendu: bactéries (formes végétatives et sporulées), champignons, virus, spores. (Tab.1) [6].

**Tableau 1 : Spectre d'activité du chlore aux différents micro-organismes [6].**

	Spectre d'activité							
HALOGÉNÉS CHLORÉS (eau de Javel)	Gram+	Gram-	Mycobactéries	Levures	Moisissures	Virus nu	Virus Enveloppés	Spores
	+++	++	+	+	+	+	+	+

### 1.2. Les principales cibles du chlore :

Les organismes qu'on cherche à éliminer ne réagissent pas tous de la même façon aux désinfectants qu'on utilise. Ces réactions sont les résultats des caractéristiques physiologiques et morphologiques propres à chaque type d'organisme. [14]

L'action du chlore résulte de l'oxydation des structures des microorganismes. En fonction de la dose appliquée, le traitement entraîne soit des lésions réversibles (inhibition, blessures), soit des lésions irréversibles causant de fait la mort cellulaire [19].

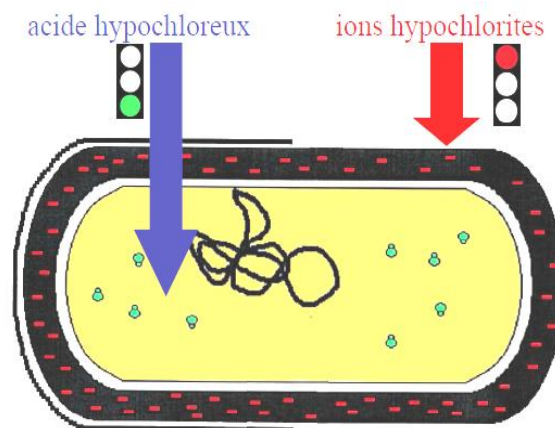
Cette oxydation entraîne un changement de perméabilité et inhibe le transport des nutriments [19].

### 1.3 Action bactéricide du chlore :

L'eau de javel est utilisée comme désinfectant pour ces propriétés microbicides mais comment fonctionne-t-elle ?

Le  $\text{NaClO}$  se dissocie dans l'eau et donne le  $\text{HClO}$  (acide hypochloreux) et le  $\text{ClO}^-$  (hypochlorite) (Castel O, 2010).

L'acide hypochloreux est un composé non chargé tandis que l'hypochlorite est chargé négativement c'est pour cela le  $\text{HClO}$  est 100 fois plus bactéricide que l'ion hypochlorite (Castel O, 2010).



**Figure 10** : L'activité désinfectante de l' $\text{HClO}$  et le  $\text{ClO}^-$  (Castel O, 2010)

Le chlore actif libre présent dans la solution agira de 2 façons : par un caractère oxydant général et par l'action immédiate et spécifique de chloration des fonctions aminées des protéines. Donc suivant la concentration en acide hypochloreux et le temps de contact avec les microorganismes, l'action pourra être majoritairement inhibitrice ou destructrice ou une combinaison des deux mais à la fin le résultat est le même un dysfonctionnement du microorganisme (Haddad et *al.*, 2010).

Généralement l'action de l'eau de Javel est décrite en cinq étapes [14] :

- ✓ Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.
- ✓ Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation.
- ✓ Sortie des composés de faible poids moléculaire du cytoplasme (lyse cellulaire).

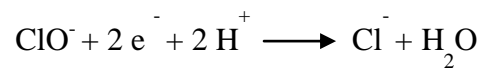


- ✓ Dégradation des protéines et des acides nucléique.

L'action la plus évidente de l'efficacité destructrice de ce produit est l'éclatement des microorganismes [14].

### 1.3.1. Oxydation par $\text{ClO}^-$ :

Le  $\text{ClO}^-$  est un oxydant qui sera à la base de réaction d'oxydation :

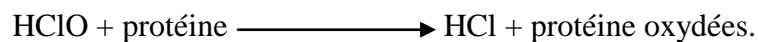


Son action microbicide est liée à la capacité d'arraché des électrons à la membrane des microorganismes et de fragilisé leur structure, par exemple en présence de protéine de la membrane des bactéries,  $\text{ClO}^-$  va oxydée et rendra inactif cette protéine (Haddad et *al.*, 2010).

### 1.3.2. L'oxydation par $\text{HClO}$ des fonctions aminées des protéines membranaires :

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant : il va agir sur de nombreux réducteurs cellulaires comme les acides aminés des protéines, les lipides...

L'acide hypochloreux diffus à travers la paroi des bactéries, l' $\text{HClO}$  détruit notamment les protéines capsulaires (Haddad et *al.*, 2010).



## 1.4. Paramètres qui influencent sur le contact entre le chlore et les bactéries :

Dès leurs premiers travaux plusieurs auteurs ont pris conscience du rôle du milieu environnant et de divers facteurs sur la détermination de l'activité des désinfectants [7].

Diverses tentatives ont abordé l'étude des lois de la désinfection, mais il est vite apparu qu'aucune loi générale ne pouvait être établie : non seulement le chlore à une entité particulière et une action spécifique, mais encore, toute association avec d'autre substances (actives ou non) et toute modification de paramètre expérimentale modifie la loi régissant de l'activité du chlore [7].

Néanmoins, un certain nombre de données a été établi, qui doit être connues de l'expérimentateur pour une bonne interprétation d'un essai [7]. Les facteurs les plus importants qui influent sur l'activité du chlore sont :

#### 1.4.1. Le type de bactéries :

Les bactéries Gram (+) et Gram (-) résistent à un pourcentage différent et d'une manière différente selon la structure de chaque une (Haddad et *al.*, 2010).

#### 1.4.2. Age des bactéries :

Un jeune microorganisme est plus facile à être détruit que les plus vieux. Chez les bactéries le vieillissement donne l'avantage à développer une couche de polysaccharide au-dessus de la paroi des cellules, qui les rendent plus résistantes au chlore (Haddad et *al.*, 2010).

#### 1.4.3. La dose du chlore et le temps de contact :

La concentration du chlore a été considérée comme le facteur le plus important qui affecte son efficacité (Haddad et *al.*, 2010).

Si la concentration est faible les microorganismes en la chance de s'échapper ou de produire des moyens de lutte contre la désinfection et donc avoir une résistance.

Le temps de contact entre le chlore et les microorganismes est aussi un facteur important car c'est la durée nécessaire pour obtenir une réduction très importante du nombre de germes [14].

## 2. Les antibiotiques :

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes [18] :

- Activité antibactérienne
- Activité en milieu organique
- Une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme

Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte [18].

## 2.1 Mode d'action :

Les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie [18].

Ils agissent au niveau de la :

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Acides nucléiques [18].

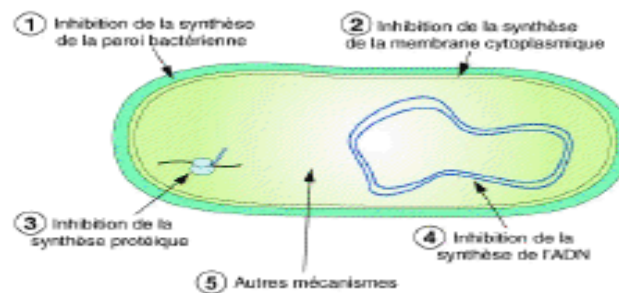


Figure 11 : Mode d'action des antibiotiques [1].

## 2.2 Classification selon le mode d'action :

- Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane :  $\beta$  lactamines, glycopeptides et fosfomycine [18].
- Inhibiteurs de la synthèse des protéines : Aminosides, Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS), Tétracyclines, Phénicolés [18].
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires : Polymixines [18].
- Inhibiteurs des acides nucléiques : Quinolones et Fluoroquinolones, Rifamycines, Nitrofuranes, Novobiocine et Nitro-imidazoles [18].
- Inhibiteurs de la synthèse des folates : Sulfamides, Trimethoprim et association [18].

### 3. La résistance des bactéries à l'action du chlore et des antibiotiques :

#### 3.1. Les mécanismes de résistance bactérienne :

On distingue deux types de résistance bactérienne aux antimicrobiens : la résistance intrinsèque ou naturelle et la résistance acquise [7].

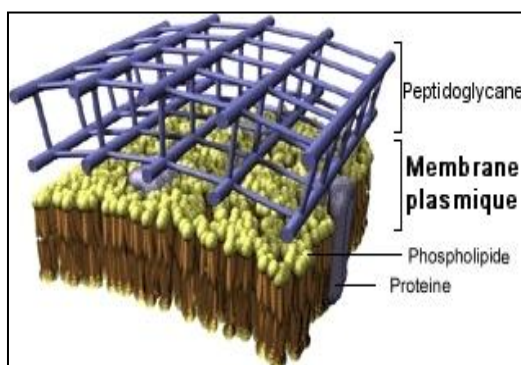
##### 3.1.1. La résistance naturelle :

La résistance naturelle, appelée aussi résistance intrinsèque, est une caractéristique propre d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Portée par les chromosomes, elle est stable, et transmise à la descendance. Elle constitue un caractère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries [17].

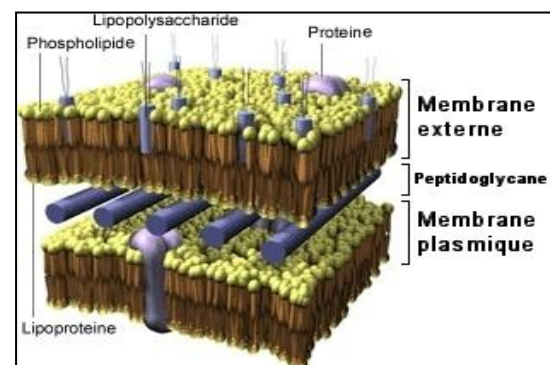
##### ❖ Mécanisme de résistance intrinsèque :

##### ✓ La paroi cellulaire :

La composition de la paroi cellulaire est l'élément majeur de la résistance. En effet, la majorité des désinfectants exercent leur action essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc traverser la paroi. Chez les souches devenues résistantes, ces mécanismes de passage sont altérés [6].



**Figure 12 :** Structure de la paroi des bactéries Gram+ [21]



**Figure 13 :** structure de la paroi des bactéries Gram - [21]

Si on compare les figures (12) et (13), on est en mesure de constater que cette paroi est beaucoup plus épaisse chez les bactéries Gram+, 20-80nm (ex *Staphylococcus aureus*), que les bactéries Gram-, 10-15 nm (ex : *Escherichia coli*) [14].

Par contre, la composition de la paroi des bactéries Gram- est beaucoup plus complexe que celle des bactéries Gram+. Cette complexité rend la paroi imperméable à la plus part des substances, à l'exception de celles qui pénètrent par les porines [14].

La composition de la paroi des Gram+ est protéique (peptidoglycanes) que lipidique (lipopolysaccharides LPS) ceci facilite leur halogénéation par le chlore [14].

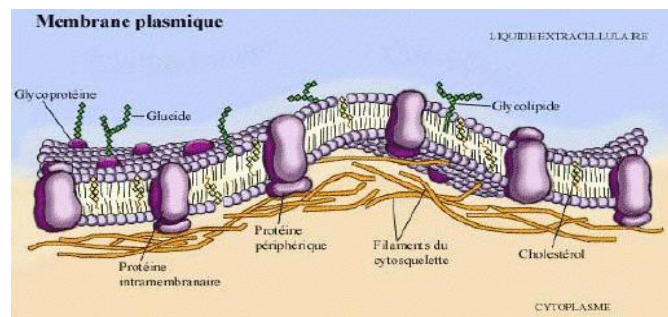
Donc, on peut dire que les bactéries Gram- sont plus réfractaires au chlore que les bactéries Gram+ [14].

#### ✓ La membrane cytoplasmique :

Les microorganismes « bactéries, mycoplasmes, champignons » sont entourés d'une membrane cytoplasmique. Cette membrane est une enveloppe qui délimite physiquement l'organisme par rapport au milieu extérieur elle joue un rôle important dans les échanges moléculaire entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule en plus de jouer un rôle de protection [14].

Cette membrane est principalement composée d'une double couche lipidique, incrustée de protéines. Cette bicouche de lipides ainsi que les protéines diffèrent selon les organismes [14].

La bicouche lipidique (phospholipides) présente, au centre de la membrane, une zone hydrophobe (qui n'aime pas l'eau) et en périphérie une partie hydrophile (qui aime l'eau) (Fig. 14) [14].



**Figure 14 :** Structure de la membrane cytoplasmique [23]

### 3.1.2. La résistance acquise :

La résistance acquise ne concerne que certaines souches bactériennes au sein d'une espèce donnée. Variable dans le temps et dans l'espace, elle se propage de façon importante. Elle est portée par le chromosome, les plasmides, ou des éléments génétiques mobiles, permettant ainsi une transmission verticale à la descendance mais aussi une transmission horizontale, parfois entre espèces différentes. Elle détermine le phénotype de résistance des bactéries et constitue un caractère épidémiologique. Elle s'acquière soit par mutation sur un chromosome, soit par l'acquisition de gènes extra-chromosomiques [17].

#### - La résistance chromosomique :

La résistance chromosomique est rare. Elle survient de façon spontanée. Elle est stable, et transmise à la descendance, car portée sur le chromosome. Elle est spécifique à un antibiotique donné ou à une famille d'antibiotique [17].

#### - La résistance par acquisition de gènes :

Elle se caractérise par l'acquisition par une bactérie d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance en recevant des gènes qui peuvent être d'origine [17] :

- extra-chromosomique : le support de cette information peut être un plasmide ou un transposon, acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction (par le biais d'un bactériophage) ;
- chromosomique : il s'agit du phénomène de transformation du génome de la bactérie, dans lequel s'est intégré le fragment de chromosome d'une autre bactérie, qui a été préalablement lysée.

Par exemple la mutation ou l'acquisition d'éléments génétiques (plasmide, transposant, intégrons, ADN nu) par conjugaison ou transformation conduisant ensuite à un rejet de désinfectant hors de la cellule (pompe à efflux) [6].

Ces modifications permettant aux microorganismes de s'adapter et peuvent s'opérer à différents niveaux [17] :

- production de nouvelles enzymes résistants.
- Modification de la structure de la paroi de la cellule.

- Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- Changement dans la structure interne de la cellule.

### 3.2. Types et niveaux de résistance aux antibiotiques :

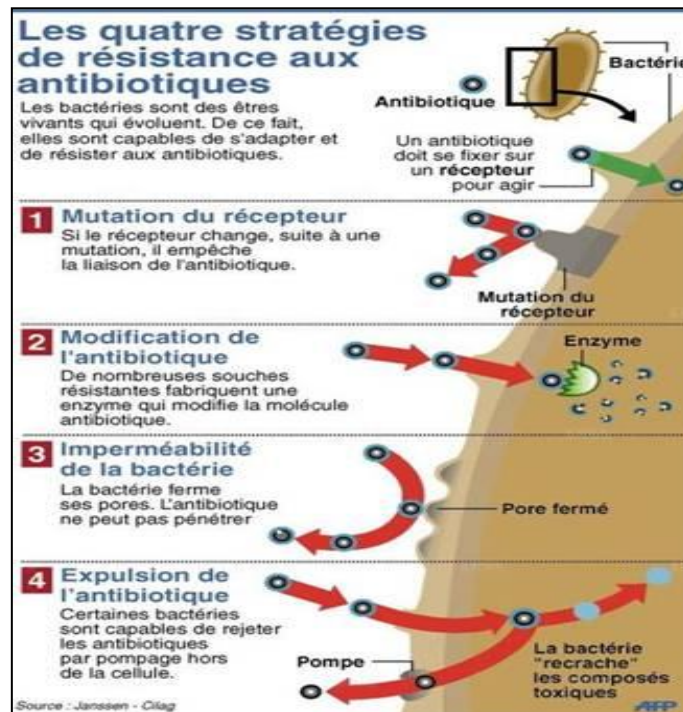


Figure 15 : Stratégies de résistance aux antibiotiques [22]

#### ❖ Mutation de la cible de l'antibiotique :

Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise de la cellule (paroi, ribosome...). Une mutation peut engendrer une modification du site de fixation, empêchant ainsi la liaison de l'antibiotique [22].

#### ❖ Modification de l'antibiotique :

De nombreuses souches résistantes fabriquent une substance (une enzyme) qui modifie ou qui fend la molécule et la rend ainsi inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux antibiotiques de la famille des pénicillines et des céphalosporines [22].

**❖ Réduction de la perméabilité membranaire :**

La bactérie « ferme » les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment des canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent le nombre de porines [22].

**❖ Efflux des antibiotiques :**

Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par pompage actif hors de la cellule, qui « rejette » les composés toxiques au dehors [22].

Certaines bactéries peuvent être porteuses de plusieurs facteurs de résistance, contre plusieurs antibiotiques, et même contre plusieurs classes d'antibiotiques: on parle alors de bactéries multi résistantes [22].



# Etude expérimentale

# Chapitre III

## 1. Description de la zone d'étude :

Notre étude a été réalisée dans la région de Guelma qui est située au Nord - Est de l'Algérie à 60 Kilomètres au sud de la Méditerranée ( $36^{\circ} 27' 43''$  N,  $7^{\circ} 25' 33''$  E) et élevée par 279 mètres au niveau de la mer [11].

Elle regroupe une population de 494. 079 habitants en 2009 dont 25 % sont concentrés au niveau du Chef-lieu de wilaya et s'étend sur une superficie de 3.686,84 Km<sup>2</sup> (D.P.A.T, 2008).



175000 m

**Figure 16:** Situation géographique de la zone d'étude [11].

## 2. Choix de site de prélèvement :

Les sites de prélèvements ont été choisis selon l'accessibilité et le regroupement des nids.



100 m



100 m

**Figure 17 :** Localisation des sites de prélèvements de fientes (des Hirondelle de fenêtre à gauche et des Hirondelle rustique à droite) (Source : Google Earth ,2013).

### 3. Le protocole expérimental :

Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de l'Université de Guelma, sur une période de 4 mois allant de Février à Mai 2013.

Le protocole expérimental et les différentes étapes suivies sont présentés dans la figure ci-après (Fig.18).

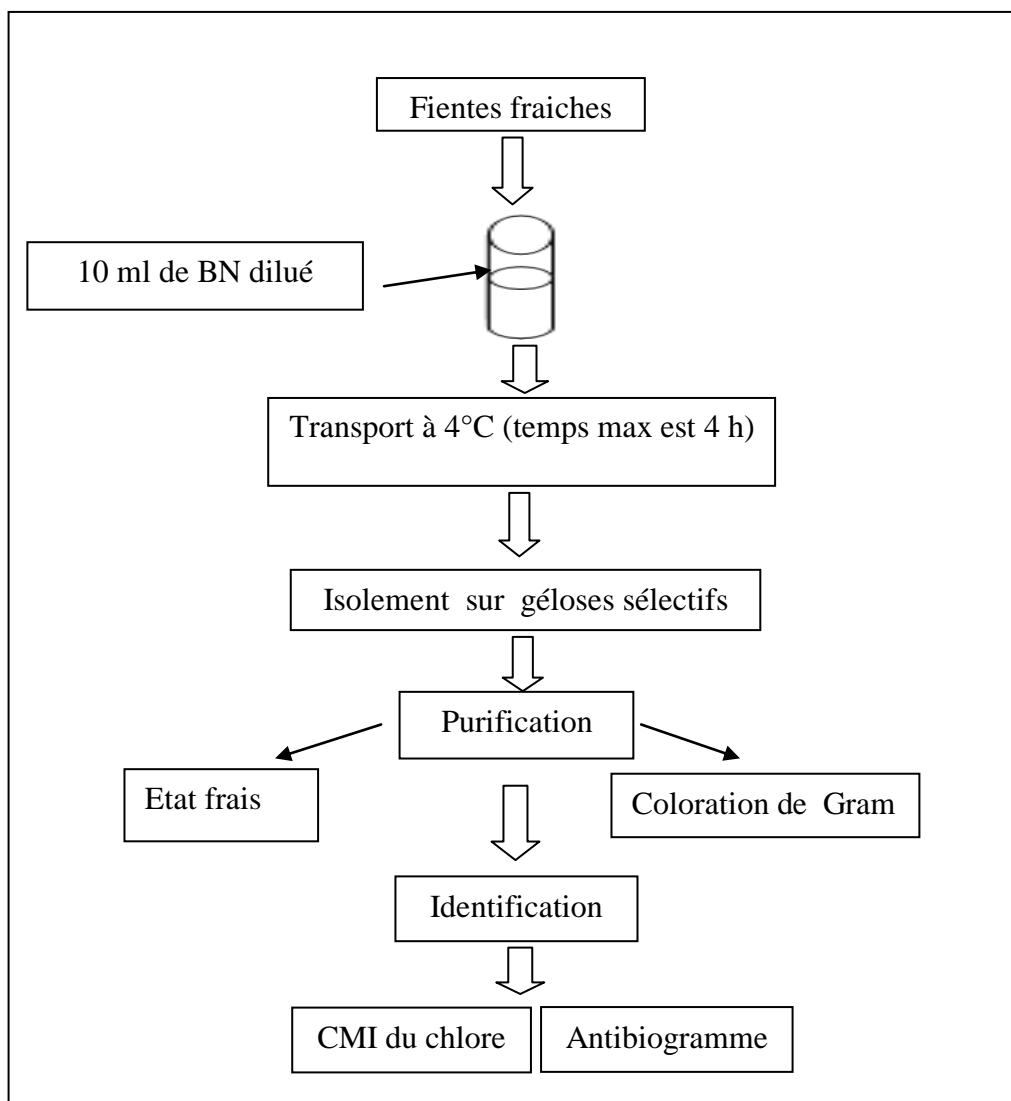


Figure 18 : Schéma de la démarche de l'analyse bactériologique

### 4. Méthode de prélèvement :

Chaque fiente a été prélevée dans des conditions d'asepsie (comme ci indiqué dans les recommandations de l'organisation internationale des épizooties (OIE)) et transportée dans des tubes de 10 ml de bouillon nutritif dilué.

Les échantillons sont transportés dans une glacière (4°C) et le temps maximum de transport est de 4 h avant d'êtreensemencé sur des géloses appropriées à chaque genre bactérien recherché.

#### **4.1. Recommandations de l'O.I.E pour la réalisation du prélèvement :**

Le prélèvement des fientes doit s'effectuer avec une méthode correcte afin d'éviter tout risque de contamination, pour cela un certain nombre de recommandation proposés par l'O.I.E sont à suivre :

-Les échantillons peuvent être prélevés directement à partir de l'animal ou de l'environnement pour de multiples raisons telles que : le diagnostic d'une maladie, la surveillance du statut sanitaire ou l'établissement d'un certificat sanitaire.

- Les échantillons collectés doivent être appropriés aux buts de l'analyse et suffisants en nombre et quantité pour permettre un résultat statistiquement valide.

- Les échantillons doivent être prélevés avec soin afin de ne pas perturber l'animal ou provoquer des lésions.

- Certains échantillons doivent être prélevés de manière aseptique et un soin doit être porté pour empêcher les contaminations croisées entre les échantillons.

- Le prélèvement doit être conditionné avec soin, identifié et expédié au laboratoire par le moyen le plus rapide, avec un contrôle approprié de la température.

- L'opérateur et ses aides doivent également être à l'abri de tout risque.

-Lorsque du matériel biologique est prélevé, que ce soit sur animal vivant ou mort, le risque de zoonose doit être pris en compte afin d'éviter des infections humaines (Rahal et *al.*, 2011).

#### **5. Analyses bactériologiques :**

Le travail se pratique sur une paillasse conforme à la réglementation, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, autour de la flamme d'un bec Bunsen pour assurer la fiabilité des manipulations et éviter le risque de compromettre les résultats d'études (Delarras, 2007).

## 5.1. Recherche bactérienne et isolement :

### 5.1.1. Recherche de *Salmonella* :

Le genre *Salmonella* est l'un des 32 genres de la famille des Enterobacteriaceae. Il est phylogénétiquement proche des genres *Escherichia* et *Hafnia* et phénotypiquement proche des genres *Citrobacter* et *Hafnia* (Federighi, 2005). Les salmonelles sont des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, mobiles pour la plupart avec des flagelles péritriches, ne fermentent pas le lactose, mais fermentent le glucose avec production de gaz et de H<sub>2</sub>S (Labres et al., 2008 ; Carbone et al., 1988 ; Pechère et al., 1982).

#### Technique :

- **Pré enrichissement :**

- Ensemencer un milieu eau péptonée tamponnée avec 1 ml de solution mère.
- Incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Enrichissement :**

- Ensemencer un milieu Sélénite - Cystéiné avec 1 ml du premier milieu.
- Incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures (Bensouilah et al., 2012).
- Repiquer par isolement les géloses Hektoen et SS avec 0.1 ml du tube d'enrichissement.
- L'incubation se fait donc à 37°C pendant 24 h (Bensouilah et al., 2012).

#### Lecture :

Les colonies lactose négatif incolores, transparentes ou vert à bleu vert, avec ou sans centre noir sont des colonies présomptif de salmonelles et des shigelles (Tab .02).

**Tableau 02 : La couleur des colonies isolées à partir des géloses SS et Hektoen (Rodier et al., 2009)**

Gélose	La couleur des colonies	Espèces
Gélose SS	Rouges	<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , et autres coliformes tels <i>E. coli</i>
	Incolores, centre noir	<i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S <sup>+</sup> , <i>Proteus vulgaris</i> et <i>mirabilis</i>
	Incolores transparentes	<i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> ; <i>Shigella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Hafnia Alkalescens</i> , <i>Morganella morganii</i> ;
	Colonies à centre orangé	<i>Proteus rettgeri</i> , <i>Providencia</i>
	Rouges, centre noir	<i>Citrobacter freundii</i> (en réalité seul le centre noir est visible d'où confusion avec <i>Salmonella</i> ),

		<i>Salmonella arizona</i> (même remarque).
<b>Gélose Hektoen</b>	Jaune saumon	<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> .
	Jaune saumon, centre noir	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
	Bleues ou vertes, centre noir	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>
	Bleuâtres ou vertes	<i>Shigella</i> , <i>Providentia</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus rettgeri</i> , <i>Salmonella</i> à H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> .

### 5.1.2. Recherche des *Yersinia* :

#### Technique :

- Tenter un enrichissement durant 10 jours à basse température (4°C) en milieu eau peptonée tamponnée.
- A partir du milieu liquide d'enrichissement on va lancer un isolement sur des milieux sélectifs contenant des sels biliaires (Mac Conkey et Hektoen).
- Les boîtes seront incubées à 25 °C pendant 48 heures (Denis et *al.*, 2007) .

#### Lecture :

Les colonies lactose négatif sont des colonies suspectes (Denis et *al.*, 2007) .

### 5.1.3. Recherche des *Pseudomonas* :

Le genre des *Pseudomonas* est fait de bacilles Gram négatif, droit et fins, aux extrémités arrondies, mobiles (à ciliature polaire), aérobies stricts, oxydase positive et se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies (Carbonnelle et *al.*, 1988) .

#### Technique :

A partir du prélèvement, il est recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures

#### Lecture :

Considérer comme suspectes :

- les colonies présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu vert et une fluorescence sous ultra-violet à 254 nm.
- les colonies muqueuses, grisâtres, pigmentées ou non.

- *Pseudomonas aeruginosa* produit typiquement à la fois la pyocyanine et la pyoverdine [15].

Les colonies isolées doivent subir les essais de confirmation suivants :

- Recherche de l'oxydase,
- Isolement sur les milieux King A et King B et une incubation à 37°C pendant 1 à 4 jours [15].

**Lecture :**

- Production de pyocyanine sur milieu de King A.
- Production de pyoverdine sur milieu de King B [15].

**5.1.4. Recherche de Vibrions :**

Les *vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, assez courts, d'une longueur comprise entre 1,4 et 2,6 µm, très mobiles grâce à une ciliature polaire, le plus souvent monotriche (Denis et al., 2007). Ils sont aéro-anaérobies facultatifs (Le Minor et Veron, 1989) et possédant une oxydase et fermentant le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S (Labres et al., 2008).

**Technique :**

- Ensemencer 1 ml de milieu d'enrichissement eau peptonée alcaline;
- Incuber pendant 3 heures à 37 °C ;
- Prélever 0.5 à 1 ml de milieu en surface, transférer dans un 2<sup>ème</sup> milieu d'enrichissement ;
- Incuber pendant 6 heures à 37 °C.
- Prélever une anse de milieu en surface du 2<sup>ème</sup> milieu d'enrichissement ; réisoler sur un milieu sélectif GNAB.
- Incuber pendant 18 heures à 37 °C (Marchal et al., 1982).

**Lecture :**

- Les colonies jaunes autrement dit saccharose positive sont des colonies suspectes.



### 5.1.5. Recherche des spores de bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) se présentent sous forme de bactéries Gram+, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose Viande Foie (VF) en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies (Rejsek, 2002).

#### Technique :

- Prendre environ 5 ml de la solution mère de l'échantillon à analyser dans un tube stérile, qui sera par la suite soumis à un chauffage de l'ordre de 80 °C pendant 8 à 10 minutes.
- Après chauffage, refroidir immédiatement le tube en question, sous l'eau de robinet.
- Couler environ 15 ml de gélose VF, fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène.
- Laisser solidifier sur la paillasse pendant 30 minutes environ, puis incuber à 37°C pendant 24 à 48 h (Lebres, 2006).

#### Lecture :

Considérer comme résultat positif d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir (Rejsek, 2002).

### 5.1.6. Recherche des Streptocoques :

Les streptocoques sont des cocci Gram positifs, sphériques à ovoïdes, formant des chainettes. Ils sont anaérobies aérotolestants, immobiles, non sporulés, catalase négatif. Ils comprennent des groupes A, B, C et D (Haddad et *al.*, 2010).

#### - Test présomptif :

- ✓ Faire inoculer un tube de bouillon Rothe avec l'inoculum.
- ✓ Bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- ✓ Incuber se fait à 37°C pendant 24 h (Haddad et *al.*, 2010) .

#### Lecture :

- Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

**- Teste confirmatif :**

Le test de confirmation est basé sur la confirmation des Streptocoques fécaux éventuellement présents dans le test de présomption.

Les tubes de Rothe trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée dans des tubes contenant le milieu Eva litsky (Haddad et *al.*, 2010) .

Bien mélanger le milieu et l'inoculum (Haddad et *al.*, 2010) .

**Lecture :**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- un trouble microbien.
- une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes (Haddad et *al.*, 2010) .

**5.1.7. Recherche des Staphylocoques :**

Les staphylocoques font partie de la famille des *Micrococcaceae*, se sont des coques à Gram<sup>+</sup>, immobiles, non capsulés, groupés en amas plans irréguliers (sur milieu solide) : catalase + , Aérobies facultatifs (Carbonnelle et *al.*, 1988).

Parmi les espèces les plus répandus on peut citer : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus. Saprophyticus* (Avril et *al.*, 1992).

**A. Test présomptif :**

- ✓ ensemer un milieu Chapman.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 24 à 48 h (Denis et *al.*, 2007) .

**Lecture :**

Après 24 heures d'incubation, les staphylocoques apparaissent sous forme des colonies jaune palle, arrondi semi-bombée (Denis et *al.*, 2007).

**B. Test confirmatif :****❖ Mise en évidence d'une catalase****Principe :**

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène (Carbonnelle et *al.*, 1988).

**Technique :**

- ✓ Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée.
- ✓ Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

**Lecture :**

- Un dégagement de bulles de gaz : catalase positive.
- Aucun dégagement gazeux : catalase négative.

**❖ Recherche d'une staphylocoagulase****Principe :**

La coagulase libre (exo-enzyme) est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus*. Cette enzyme est capable in vitro de coaguler le plasma de lapin (Bensouilah et al., 2012).

**Technique :**

- Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma oxalaté + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon coeur cerveau de la souche à étudier.
- Placer le mélange à 37°C.
- Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures (Bensouilah et al., 2012).

**Lecture :**

- Coagulation du plasma : Coagulase positif.
- Pas de coagulation du plasma : Coagulase négatif.

**5.1.8 Ensemencement :**

Le travail d'ensemencement des microorganismes se pratique sur une paillasse conforme à la réglementation autour de la flamme d'un bec Bunsen (Delarras, 2007). Il consiste à déposer dans un milieu neuf des germes prélevés d'un milieu de culture mère.

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, les méthodes d'ensemencement diffèrent. Pour l'ensemencement des milieux solides en boîtes de Pétri, nous avons utilisé la méthode des quadrants qui permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange (Delarras, 2007).

Un isolement est effectué à l'aide d'une anse de platine, une pipette Pasteur stérile (Denis et al., 2007). Ainsi par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées.

### **5.1.9. Repiquage :**

Une fois que les colonies ont poussées, nous avons les repiquées sur un nouveau milieu en vue de les purifier avant tout test biochimique d'identification.

## **6. Identification :**

### **6.1. Examen macroscopique :**

Pour les examens macroscopiques des bactéries communes, aérobies strictes et anaérobies facultatives, l'observation des colonies a été faite à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire.

Dans les conditions données, chaque espèce bactérienne développe une colonie de taille, de forme, de couleur et de consistance caractéristiques (Singleton, 1999).

L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température d'incubation (Singleton, 1999).

Pour chaque type des colonies distinctes nous avons noté les caractéristiques suivantes ; la taille, la forme, l'élévation, la transparence, l'aspect de surface, la consistance et la pigmentation.

### **6.2. Examen microscopique**

Au cours d'analyses microbiologiques, on peut observer des bactéries vivantes ou tuées et colorées, le plus souvent à l'aide d'un microscope optique.

L'examen des bactéries fixées et colorées sur des frottis permet de mieux observer les détails morphologiques des cellules bactériennes et orienter l'identification (Delarras, 2007).

### 6.2.1. La coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie (Denis et *al.*, 2007), elle permet de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts, mais certaines bactéries peuvent présenter un Gram variable, cette coloration permet en général d'apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification (Delarras, 2007).

Le protocole est le suivant :

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure ;
- Recouvrir le frottis de violet de Gentiane ; laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 seconde ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la safranine pendant 10 à 30 seconde ; rincer à l'eau distillée. La safranine peut être remplacée par de la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 (Delarras, 2007), 30 seconde à 1 minute (Denis et *al.*, 2007).
- Sécher entre deux feuilles papier filtre (Denis et *al.*, 2007) puis au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.
- Observer au microscope à l'objectif x100 à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries Gram positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatif sont colorées en rose (Delarras, 2007).

### 6.3. Examens liés aux caractères biochimiques

L'identification des différentes bactéries isolées a été réalisée grâce à :

- La galerie biochimique classique pour certains bacilles à Gram négatif, oxydase négatif.
- La galerie biochimique standardisée et miniaturisée Système API 20 E (BioMérieux) pour certains bacilles à Gram négatif, oxydase négatif.
- La galerie biochimique standardisée et miniaturisée Système API 20 NE (BioMérieux) pour certains bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux, oxydase positif.

### 6.3.1 La galerie Api 20E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés.

#### - Principe :

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Delarras, 2007).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Delarras, 2007).

#### - Technique :

##### **Préparation de la galerie :**

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

##### **Préparation de l'inoculum :**

- Utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile.
- A l'aide d'une pipette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homo-généisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

##### **Inoculation de la galerie :**

- Remplir tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.

- Incuber à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 heures.

- **Lecture :**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (voir annexe 2).
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
  - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive.
  - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif Kovacs. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
  - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive.

### 6.3.2. La galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation (Delarras, 2007).

- **Technique :**

#### Préparation de l'inoculum

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl à 85% Medium (2ml) ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 McFarland (Bensouilah et al., 2012).

#### Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests  $\text{NO}_3$  à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200  $\mu\text{l}$  de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC.

- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE).
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures ( $\pm 2$  heures).

- **Lecture de la galerie :**

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (voir annexe 2).

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs.

### 6.3.3. Recherche des cytochromes oxydases

**Principe :**

Le test de l'oxydase met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. Ce test met en évidence la présence de cytochrome c dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c (Bensouilah et *al.*, 2012).

**Technique :**

- Déposer, sur la lame, un disque d'oxydase
- Mettre une goutte d'eau distillée.
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie et y déposer sur le disque.

**Lecture :**

- Coloration violette : oxydase positive.
- Aucune coloration : oxydase négative

### 6.3.4 La galerie biochimique classique :

- **Test ONPG**

Ce test est pratiqué pour toute bactérie lactose négatif en 24 h (Delarras, 2003). Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG. Incuber 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le virage de couleur du milieu au jaune : un test positif, milieu reste incolore : test négatif (Euzéby, 2007).



- **Test Uréase**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu (le rouge de phénol est l'indicateur de pH) (Euzéby, 2007).

**Technique :**

- Ensemencer un milieu urée tryptophane avec une suspension bactérienne.
- Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

**Lecture :**

- Uréase positive : le milieu présente une coloration rouge violacée.
- Uréase négative : le milieu persiste orange.

- **Test TDA**

**Principe :**

Le tryptophane désaminase désamine le tryptophane pour donner de l'acide indolepyruvique. En présence de perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indolepyruvique donne un composé de couleur brune foncée (Euzéby, 2007).

**Technique :**

Ensemencer un milieu urée tryptophane avec une suspension bactérienne et incuber 18 à 24 heures à 37 °C (Euzéby, 2007).

Ajouter une goutte d'une solution acide de perchlorure de fer (réactif TDA) : apparition d'un précipité brun foncé : TDA positif, absence de précipité : TDA négatif (Delarras, 2007).

- **Test Indole**

**Principe :**

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du paradiméthyl aminobenzaldéhyde pour donner un anneau rouge (Euzéby, 2007).

**Technique :**

- Ensemencer un milieu urée tryptophane ou eau peptonée exempte d'indole avec une suspension bactérienne.
- Incuber 18 à 24 heures à 37 °C.

**Lecture :**

Ajouter une goutte du réactif de Kovacs

- Réaction positive : formation d'un anneau rouge en surface.
- Réaction négative : apparition d'un anneau Jaune.

- **Test VP**

**Principe :**

Les réactions de Voges-Proskauer (VP) permettent l'étude des dérivés de l'acide pyruvique qui est un intermédiaire clef du métabolisme des glucides. La fermentation du glucose par certaines entérobactéries produit de l'acide pyruvique, qui sera ensuite transformé en acétoïne puis en 2,3-butanediol ; cette fermentation est dite butanediolique (Delarras, 2007).

**Technique :**

- Ensemencer un milieu Clark et Lubs avec une suspension bactérienne.
- Incuber 24 h à 37°C.
- Prélever 1 ml du milieu et le transvaser dans un tube stérile.
- Ajouter à cette culture 0,5 ml de VP I et 0,5 ml de VP II.
- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.
- Attendre 10 min à 30 min.

**Lecture :**

- Apparition d'une coloration rouge : test positif.
- Le milieu persiste jaune : test négatif.

- **Test RM**

**Principe :**

La fermentation du glucose par certaines entérobactéries produit de l'acide pyruvique (pyruvate), puis des acides (acides lactique, succinique, acétique et formique) et parfois des

produits divers (éthanol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) ; cette fermentation est appelée fermentation acides mixtes (Delarras, 2007).

**Technique :**

- Ensemencer un milieu Clark et Lubs avec une suspension bactérienne.
- Incuber 24 h à 37°C.
- Prélever 1 ml du milieu et le transvaser dans un tube stérile.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. la lecture est immédiate.

**Lecture :**

Virage de couleur de milieu au rouge : test positif, milieu reste jaune : test négatif.

- **Recherche d'une nitrate réductase**

**Principe :**

Certaines bactéries peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons des composés minéraux riches en oxygène. C'est le cas en particulier des nitrates qui sont alors réduits en nitrites. La réduction peut aller au-delà du stade nitrites et conduire à la formation d'azote, gazeux (Bensouilah et al., 2012).

La recherche d'une nitrate-réductase se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Les nitrites en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rose ou rouge en présence d'acide parasulfanilique et d'alpha-naphtylamine (Bensouilah et al., 2012).

Toutefois, comme certaines bactéries réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites, toute réaction apparaissant négative doit être contrôlée pour constater la présence ou la disparition des nitrates contenus à l'origine dans le milieu. Dans ce but, on ajoute au milieu de la poudre de zinc. Le zinc est un agent réducteur capable de réduire en quelques minutes les nitrates en nitrites (Bensouilah et al., 2012).

Si la réaction est véritablement négative, les nitrates toujours présents dans le milieu sont réduits en nitrites sous l'action du zinc et une coloration rose ou rouge apparaît.

Si la réaction est faussement négative, les nitrates ont été réduits par les bactéries en azote gazeux (Bensouilah et al., 2012).

Le milieu ne contient plus de nitrates et lorsque la poudre de zinc est ajoutée, la teinte du milieu n'est pas modifiée (Bensouilah et al., 2012).

**Technique :**

- Ensemencer un bouillon nitrate avec une suspension bactérienne.
- Incuber 24 h à 37°C.

- Ajouter une ou deux gouttes de NIT I puis une ou deux gouttes de NIT II.

**Lecture :**

- Apparition en quelques secondes d'une coloration rose ou rouge : réaction positive.
- Absence de coloration : ajouter la poudre de zinc ;
- Apparition en cinq minutes d'une coloration rose ou rouge : réaction négative.
- Absence de coloration : réaction positive.

- **Test TSI**

**Principe :**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène (Delarras, 2007).

**Technique :**

- Ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux (Delarras, 2007).

**Lecture :**

- Fermentation de glucose :
  - Culot rouge : glucose non fermenté
  - Culot jaune : glucose fermenté
- Fermentation du lactose et/ou du saccharose :
  - Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
  - Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)
    - Production de gaz : Apparition de gaz dans le culot.
    - Formation d'H<sub>2</sub>S : Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

- **Utilisation du citrate**

**Principe :**

Certaines bactéries sont capables d'assimiler le citrate, c'est à dire capables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent un citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate (Delarras, 2007).

De telles bactéries sont capables de croître sur un milieu synthétique, le milieu au citrate de Simmons, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium. Ce milieu contient également des sels d'ammonium comme unique source d'azote et du bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Initialement, le pH du milieu est de 7,0 et, à un tel pH, le bleu de bromothymol a une teinte verte (Delarras, 2007).

La croissance sur le milieu au citrate de Simmons s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu (bleu outre-mer) du bleu de bromothymol.

**Technique :**

Ensemencer le milieu au citrate de Simmons à partir d'une culture prélevée sur un milieu gélosé et incubé 24 h à 37°C. Le test citrate est dit positif lorsque la couleur du milieu vire au bleu. Présence d'une coloration verte : réaction négative (Delarras, 2007).

- **Mannitol Mobilité**

**Principe :**

Le milieu Mannitol Mobilité permet d'orienter l'identification des entérobactéries par la mise en évidence de certaines de leurs caractéristiques métaboliques :

- ✓ Fermentation du mannitol
- ✓ Etude de la motilité.

La fermentation du mannitol induit une acidification qui provoque une coloration jaune du milieu. Changement de couleur de l'indicateur de pH : Rouge de phénol.

La motilité est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (capacité des bactéries à envahir l'ensemble de ce milieu faiblement gélosé).

**Technique :**

- Ensemencer le milieu Mannitol Mobilité par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu à partir d'une culture pure.
- Incuber pendant 24 heures à 37°C.

**Lecture :**

- Le milieu prend une coloration jaune : mannitol (+).
- Le milieu reste rouge translucide : mannitol (-).
- Les bactéries mobiles envahissent le milieu en donnant un trouble homogène.
- Les bactéries immobiles donnent une culture limitée à la piqûre d'ensemencement.

## 7. Détermination de la CMI du chlore des bactéries isolées :

Les bactéries ne sont pas influencées de la même façon par le chlore. Ces réactions sont en fonction des caractéristiques physiologiques et morphologiques propres à chaque type bactérien (Haddad et *al.*, 2010).

De plus le contact entre le chlore et les microorganismes est influencé beaucoup plus par la dose du chlore utilisé et le temps de contact (Haddad et *al.*, 2010).

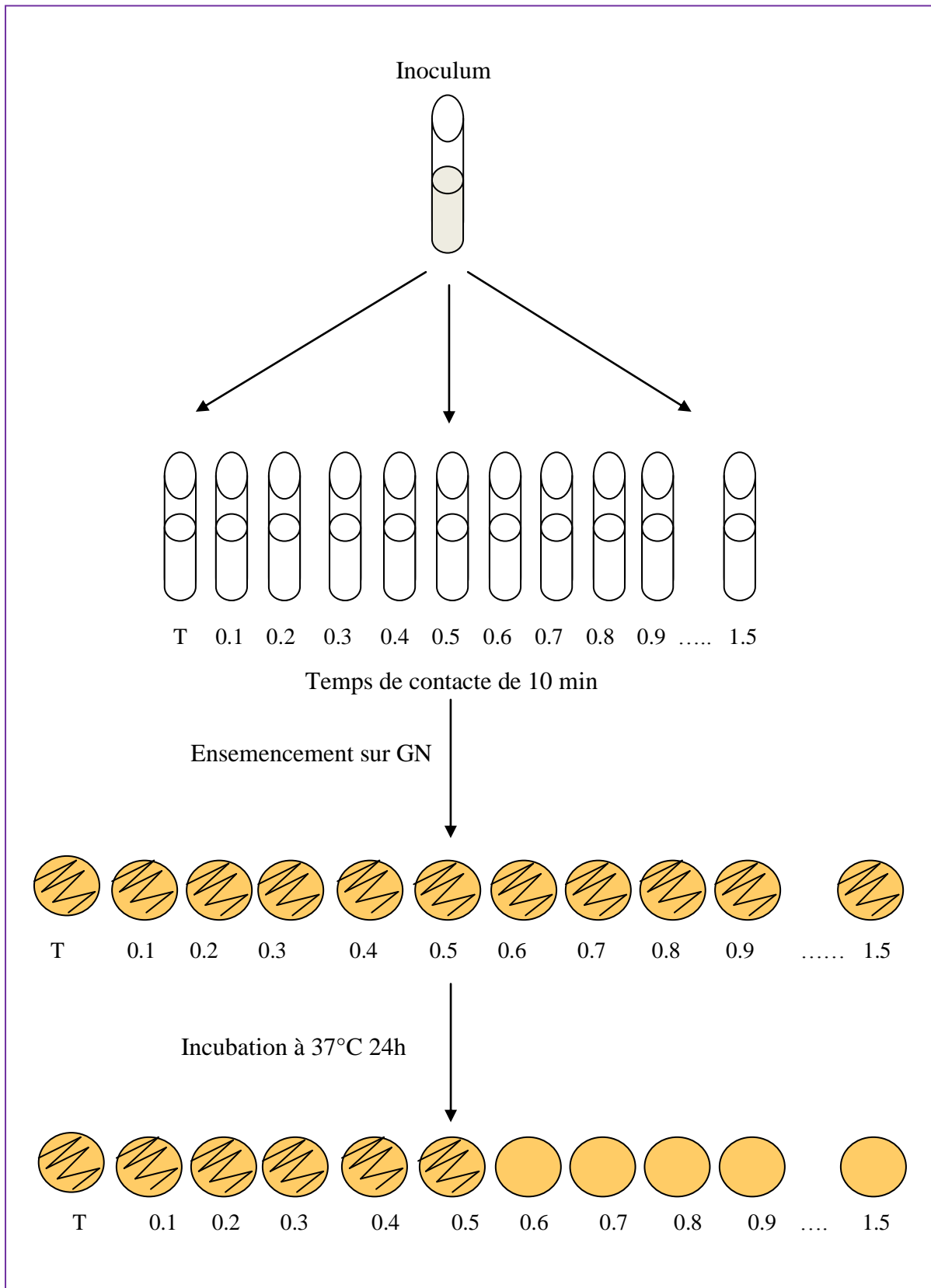
Pour déterminer le niveau de résistance de chacun des bactéries isolée, il faut déterminer leur CMI (Haddad et *al.*, 2010).

### Mode opératoire :

La détermination de la CMI est basée sur la mise en contact des microorganismes avec des concentrations croissantes du chlore (de 0,1 à 1,5 mg/l) selon le protocole suivant (Haddad et *al.*, 2010) :

- Préparation de dilution de 1/10 de l'eau de javel (Voir annexe 3) .
- Pour chaque microorganisme préparer :
  - Une série de 16 tubes : 1 tube témoin (sans eau de javel) et les autres tubes contenant les concentrations d'une eau de javel de 0,1 à 1,5 mg/l successivement.
  - Les tubes sont remplis avec 10ml d'eau distillée stérile au paravent.
  - Après 5 minutes, on met dans chaque tube des séries 1 ml de l'inoculum après une légère agitation.
  - Les tubes sont laissés pour un temps de contact bien déterminé selon le but de l'expérience.
  - on ensemence quelques gouttes de chaque tube dans une boîte de Pétri contenant un milieu ordinaire.
  - Incuber à 37°C pendant 24h.

**Lecture** : on va suivre les boîtes positives jusqu'à la boîte où il n'y a plus de pousser.



**Figure 19 :** Méthode de détermination de la CMI des souches isolées (Haddad et *al.*, 2010)

## 8. Antibiogramme par diffusion des disques :

Nous avons utilisé la méthode de Kirby-Bauer (recommandée par l'OMS) qui est basée sur la diffusion de substances antibiotiques imprégnées sur des disques en papier préalablement séchés qui doivent être déposés à la surface de la gélose.

Les disques appliqués sur l'agar absorbent une quantité d'eau suffisante pour dissoudre l'antibiotique qui diffuse ainsi progressivement dans le milieu, suivant les lois physiques de diffusion des molécules à travers un gel. Il se forme ainsi un gradient de concentration de l'antibiotique autour de chaque disque. Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des germes ensemencés à la surface de l'agar intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient plus rapidement que la diffusion de l'antibiotique ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée.

### ❖ Milieu pour antibiogramme :

- Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi (Rahal et *al.*, 2011).

### ❖ Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum. (Rahal et *al.*, 2008).



**❖ Ensemencement :**

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (Rahal et *al.*, 2011).

**❖ Choix et disposition des disques d'antibiotiques :**

- Choix d'antibiotiques est fait selon le genre de la bactérie.
- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application (Rahal et *al.*, 2011).

**❖ Incubation :**

- L'incubation se fait à 35°C pendant 18 heures (Rahal et *al.*, 2011).

**❖ Lecture :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (voir annexe 4).
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I (Rahal et *al.*, 2011).

# Chapitre IV

## I. Résultats :

### 1. Caractères morphologiques et coloration de Gram :

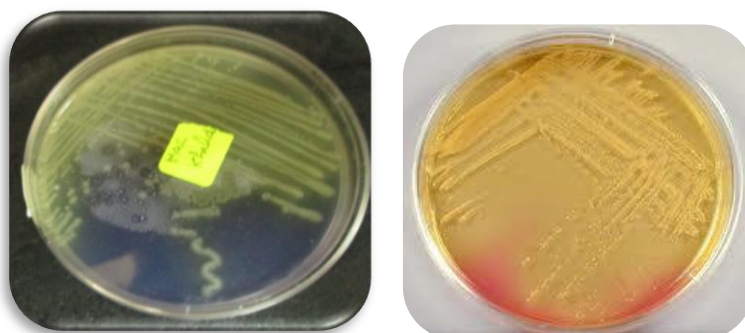
Le repiquage utilisé à fin de purifier les souches isolées nous a permis de distinguer les caractères des colonies sur leurs milieux (Tab.03).

**Tableau 03 :** Caractères macroscopiques et microscopiques des colonies bactériennes isolées

Milieux de culture	Observation macroscopique	Observation microscopique
Gélose nutritive	- Colonies rondes, lisses, plates, blanches (Fig.20 )	- Bacilles à Gram -
SS	- Colonies roses, rondes, ombiliquées (Fig. 20)	- Bacilles à Gram -
MacConkey +pourpre de bromocrésol	- Grandes colonies jaunes, rondes, bombées, à contour irrégulier (Fig. 21)	- Bacilles à Gram - - Coccobacilles à Gram -
Hektoen	-Colonies rouges, rondes, lisses, à contour régulier (Fig. 20) -Colonie orange avec centre noir	- Bacilles à Gram - - Coccobacilles à Gram -
Chapman	-Colonies petites, ronde, bombées, lisses, à contour régulier, jaune doré avec virage de la couleur du milieu entourant les colonies au jaune (Fig.21)	-Cocci en amas, Gram +



**Figure 20:** Aspect des colonies sur gélose nutritive, gélose Hektoen et gélose SS (respectivement de gauche à droite)



**Figure 21 :** Aspect des colonies sur gélose MacConkey et gélose Chapman (respectivement de gauche à droite)

## 2. Résultats de l'identification biochimique :

L'étude biochimique nous a permis d'identifier 8 espèces bactériennes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et une qui n'appartient pas à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas luteola*) (Tab.04)

Les méthodes effectuées pour la recherche des staphylocoques et streptocoques nous ont permis d'identifier *Staphylococcus aureus* chez l'hirondelle de fenêtre et *streptocoque* spp chez les deux espèces d'hirondelles.

**Tableau 04:** Résultats de l'identification par la galerie API 20 E, API 20 NE et la galerie classique

	Espèce bactérienne identifiée	Espèce d'Hirondelle
API 20 E et galerie classique	<i>Citrobacter koseri</i> (Fig.26)	Hirondelle de fenêtre
	<i>Escherichia coli</i> 1 (Fig.22)	
	<i>Pantoea</i> spp 4	
	<i>Enterobacter amnigenus</i> 2 (Fig.23)	Hirondelle rustique
	<i>Serratia fonticola</i> (Fig.24)	
	<i>Serratia marcesens</i>	
	<i>Citrobacter koseri</i> (Fig.26)	
	<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Enterobacter gergoviae</i> (Fig.26 )		
API 20 NE	<i>Pseudomonas luteola</i> (Fig.25)	Hirondelle rustique



Figure 22: Profil biochimique de la souche *Escherichia coli 1*

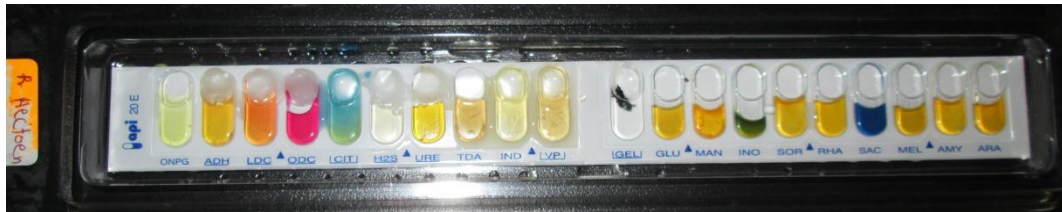


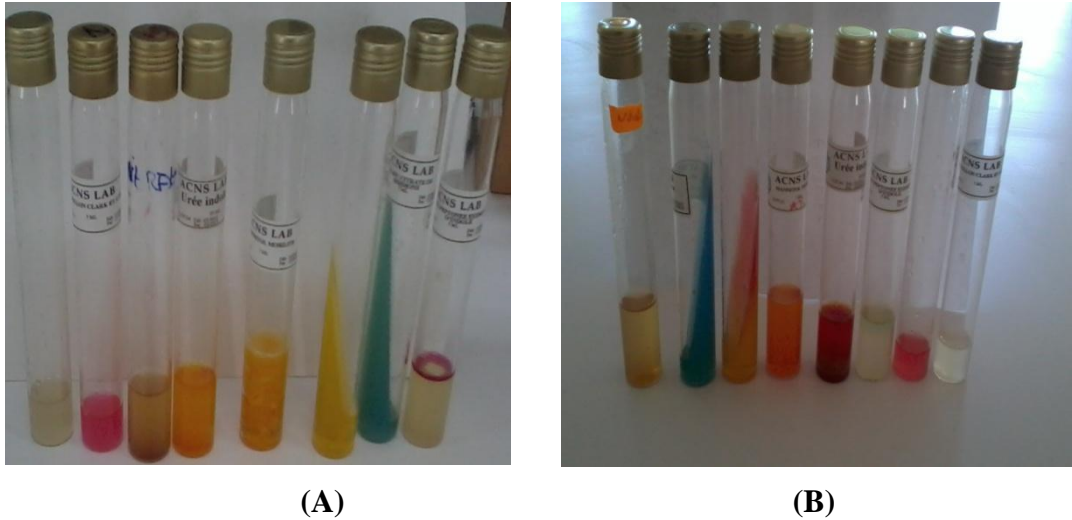
Figure 23 : Profil biochimique de la souche *Enterobacter amnigenus 2*



Figure 24 : Profil biochimique de la souche *Serratia fonticola*



Figure 25: Profil biochimique de la souche *Pseudomonas luteola*



**Figure 26:** Résultat de quelques galeries biochimiques classiques.

(A) : *Citobacter koseri* , (B): *Enterobacter gergoviae*.

▪ **Résultats de la recherche des staphylocoques :**

On a pu identifier :

*Staphylococcus aureus* chez l'hirondelle de fenêtre.

**Tableau 05 : Résultats des Staphylocoques**

	Mannitol	Catalase	Oxydase	Staphylocoagulase
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+

▪ **Résultat de la recherche des Streptocoques :**

On a pu confirmer la présence d'Entérocoques chez les deux espèces d'Hirondelles.

▪ **Résultats de la recherche des *Vibrio*, *Yersinia* et des *Clostridium* :**

Les résultats de la recherche des *Vibrio* , *Yersinia* et des *Clostridium* sont négatifs pour les deux prélèvements d'Hirondelle de fenêtre et d'Hirondelle rustique.

### 3. Evaluation de l'antibiorésistance :

#### 3.1. L'hirondelle de fenêtre :

- *E.coli 1* :

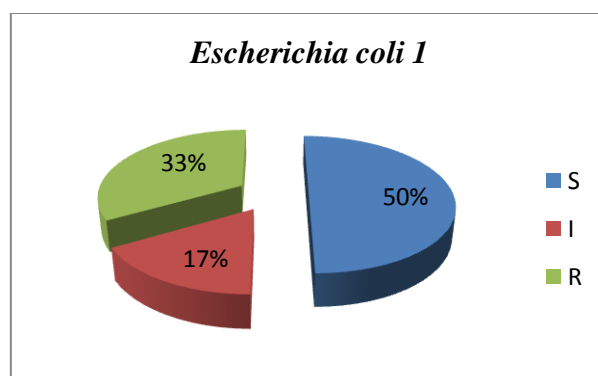
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 06: Résultat de l'antibiogramme d'*Escherichia coli 1***

Disque d'antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	29	7	15	24	19
Catégorie clinique	R	S	R	I	S	S

*R* : résistante *I* : intermédiaire *S* : sensible

Le graphe ci-après présente le taux de résistance de la souche *E.coli 1* (fig.27)



**Figure 27 : Taux de résistance d'*Escherichia coli 1***

- *Citrobacter koseri*

Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 07: Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter koseri***

Disque d'antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	27	7	18	30	19
Catégorie clinique	R	S	R	I	S	S

*R* : résistante *I* : intermédiaire *S* : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Citrobacter koseri* (fig.28)

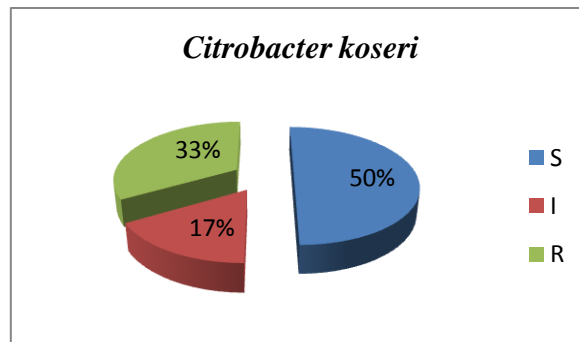


Figure 28: Taux de résistance de *Citrobacter koseri*

▪ *Pantoea spp 4*

Le tableau ci-après montre le résultat de l’antibiogramme.

Tableau 08 : Résultat de l’antibiogramme de *Pantoea spp 4*

Disque d’antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d’inhibition en mm	7	23	7	18	30	21
Catégorie clinique	R	S	R	I	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Pantoea spp 4* (fig.29)

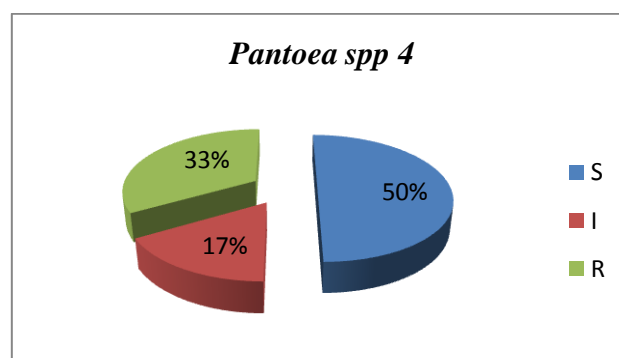


Figure 29: Taux de résistance de *Pantoea spp 4*



- *Staphylococcus aureus* :

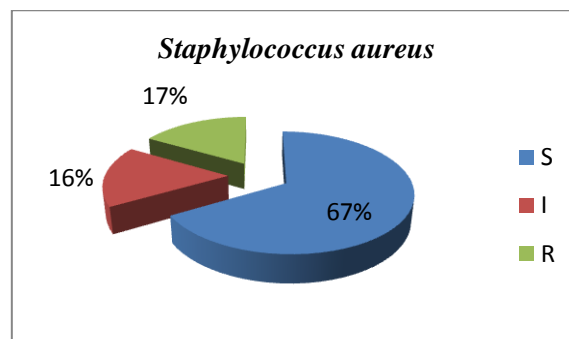
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 09: Résultat de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus***

Disque d'antibiotique	Va	C	L	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	22	29	23	27	7	27
Catégorie clinique	S	S	S	S	R	I

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présente le taux de résistance de la souche *Staphylococcus aureus* (fig.30)



**Figure 30 :** Taux de résistance de *Staphylococcus aureus*

### 3.2 L'hirondelle rustique :

- *Serratia marcescens*

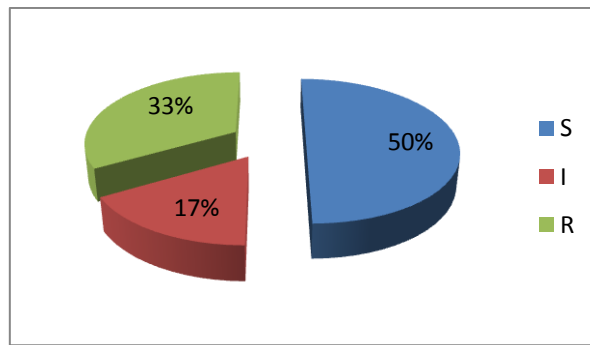
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 10 : Résultat de l'antibiogramme de *Serratia marcescens***

Disque d'antibiotique	AMX	GM	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	20	9	12	30	19
Catégorie clinique	R	S	R	I	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Serratia marcescens* (fig.31)



**Figure 31 :** Taux de résistance de *Serratia marcescens*

▪ *Serratia fonticola*

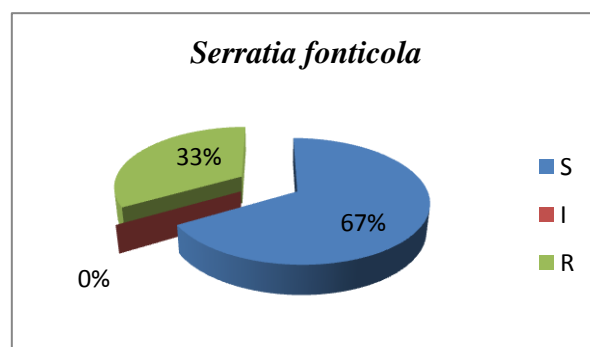
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 11: Résultat de l'antibiogramme de *Serratia fonticola***

Disque d'antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	30	7	22	30	24
Catégorie clinique	R	S	R	S	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Serratia fonticola* (fig.32)



**Figure 32:** Taux de résistance de *Serratia fonticola*

- *Enterobacter gergoviae*

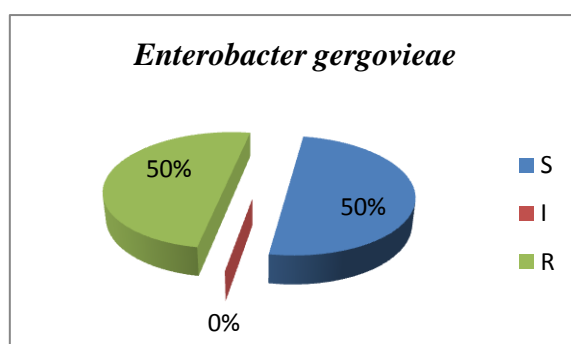
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 12: Résultat de l'antibiogramme d'*Enterobacter gergoviae***

Disque d'antibiotique	P	GM	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	19	7	9	30	24
Catégorie clinique	R	S	R	R	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présente le taux de résistance de la souche *Enterobacter gergoviae* (fig.33)



**Figure 33:** Taux de résistance d'*Enterobacter gergoviae*

- *Enterobacter amnigenus 2*

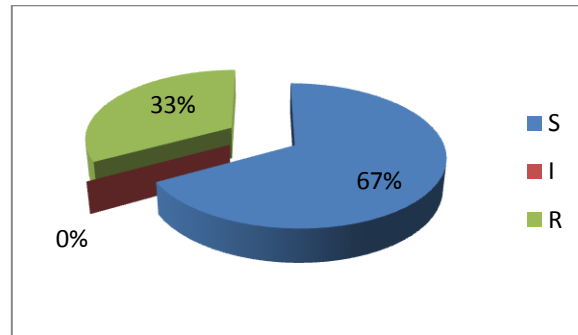
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 13: Résultat de l'antibiogramme d'*Enterobacter amnigenus 2***

Disque d'antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	29	7	20	30	20
Catégorie clinique	R	S	R	S	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Enterobacter amnigenus 2* (fig.34)



**Figure 34 :** Taux de résistance d'*Enterobacter amnigenus 2*

▪ *Citrobacter koseri*

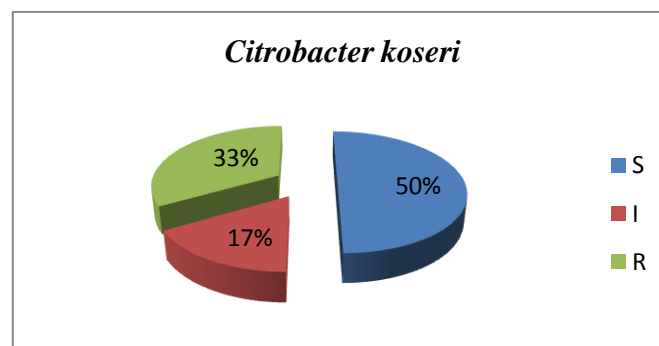
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 14 :** Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter koseri*

Disque d'antibiotique	CN	C	E	TE	SSS	RA
Diamètre d'inhibition en mm	7	27	7	18	30	19
Catégorie clinique	R	S	R	I	S	S

R : résistante I : intermédiaire S : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Citrobacter koseri* (fig.35)



**Figure 35:** Taux de résistance de *Citrobacter koseri*

- *Citrobacter freundii*

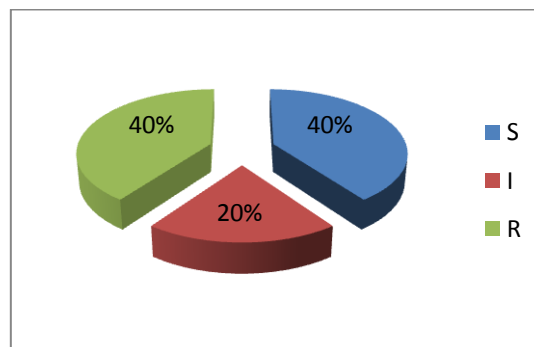
Le tableau ci-après montre le résultat de l'antibiogramme.

**Tableau 15 : Résultat de l'antibiogramme de *Citrobacter freundii***

Disque d'antibiotique	C	CN	E	TE	RA
Diamètre d'inhibition en mm	25	7	8	22	13
Catégorie clinique	S	R	R	S	I

*R* : résistante *I* : intermédiaire *S* : sensible

Le graphe ci-après présente le taux de résistance de la souche *Citrobacter freundii* (fig.36)



**Figure 36:** Taux de résistance d'*Citrobacter freundii*

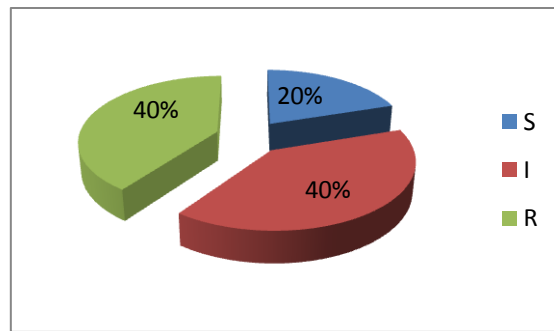
- *Pseudomonas luteola*

**Tableau 16: Résultat de l'antibiogramme de *Pseudomonas luteola***

Disque d'antibiotique	NTX	VA	E	TE	RA
Diamètre d'inhibition en mm	25	7	7	18	13
Catégorie clinique	S	R	R	I	I

*R* : résistante *I* : intermédiaire *S* : sensible

Le graphe ci-après présent le taux de résistance de la souche *Pseudomonas lutola* (fig.37)

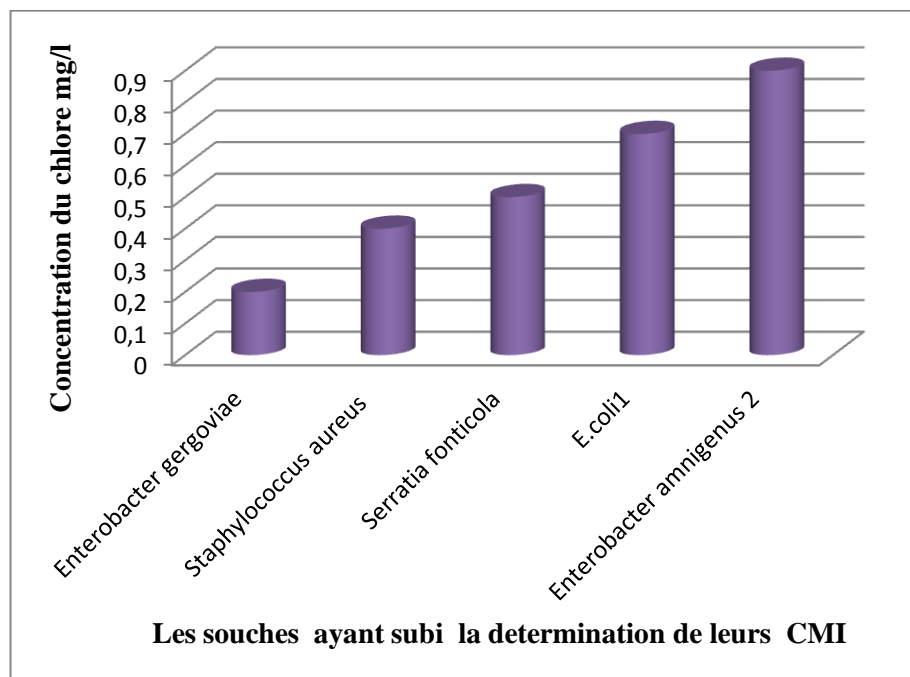


**Figure 37:** Taux de résistance de la souche *Pseudomonas luteola*

#### 4. Détermination de la CMI du chlore des souches identifiées :

On a fait la détermination de la CMI de 5 souches bactériennes seulement (*E.coli1* et *Staphylococcus aureus* pour l'Hirondelle de fenêtre et *Enterobacter amnigenus 2*, *Serratia fonticola* et *Enterobacter gergoviae* pour l'hirondelle rustique).

Les résultats de la détermination de la CMI de ces 5 souches pour un temps de contact de 10 min montrent que la souche *E.coli1* résiste à la concentration de 0,7 mg de chlore / litre d'eau distillée et pour *St. aureus* jusqu'au 0,4 mg/l. Pour *Enterobacter gergoviae*, *Serratia fonticola* et *Enterobacter amnigenus 2* résistent à 0,2 mg/l, 0,5 mg/l et 0,9 mg/l respectivement (Fig.38).



**Figure 38:** Résultat de la CMI des souches testées.

## II. Discussion :

La microflore intestinale est une composante majeure du tractus digestif, indispensable pour le maintien de l'homéostasie, ceci est dû au fait de la capacité métabolique des microorganismes anaérobies strictes ou certaines espèces anaérobies facultatifs (*E.coli*) d'une part et d'autre part l'intervention efficace et régulée de la flore autochtone dans la protection contre les germes pathogènes (effet barrière) (Chouder, 2006).

La flore du tube digestif des oiseaux a été considérée jusqu'à présent comme jouant un rôle mineur comparativement à celle du côlon des mammifères (Gabriel et al., 2005). La microflore varie en fonction des facteurs liés à l'hôte : l'âge de l'animal, son environnement, le stress et l'alimentation (Gabriel et al., 2003 ; Savage, 1989) et d'autres sont imputables aux interactions entre les différentes espèces microbiennes. L'un des principaux facteurs est l'aptitude de ces micro-organismes à coloniser les surfaces épithéliales (Savage, 1989). Elle entraîne des changements de la structure, du fonctionnement du tube digestif et des modifications de la digestion des aliments, ainsi qu'une augmentation des besoins énergétiques. La flore indigène a des conséquences sur la santé des oiseaux du fait de la production de différents métabolites. Ainsi, elle peut avoir un effet protecteur vis-à-vis des micro-organismes néfastes et elle est responsable en partie du développement du système immunitaire intestinal (Gabriel et al., 2003).

Les oiseaux de toutes les espèces sont fréquemment confrontés à des affections bactériennes. Très souvent, il s'agit simplement des bactéries habituelles du tube digestif, principalement les espèces appartenant à la famille des *Enterobactériaceae*, qualifiées de marqueurs d'un déséquilibre intestinal qui dans des conditions de stress, mauvaise hygiène ou antibiothérapie anarchique, prolifèrent, deviennent virulentes et finissent par déstabiliser l'écosystème digestif (Chouder, 2006).

Notre étude a été réalisée sur deux espèces d'Hirondelles, l'hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*) et l'hirondelle rustique (*Hirundo rustica*). Elle se limite exclusivement aux microorganismes bactériens présents dans les fientes.

En vue des moyens disponibles au laboratoire, nous nous sommes arrivés à identifier 8 espèces bactériennes appartenant à la famille des Entérobactéries.

Selon les espèces microbiennes, les Entérobactéries sont généralement des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. Ce caractère écologique n'est pas exclusif des Entérobactéries qui peuvent proliférer en abondance dans l'environnement (sol et eau) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques.

La peau, les fosses nasales et l'oropharynx des animaux sains sont fréquemment colonisés par les staphylocoques (Arnal, 2003). Certains d'entre eux sont pathogènes pour l'homme. Ils sont isolés particulièrement au cours des suppurations ; les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés (Avril et al., 1992).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de Kirby-Bauer (diffusion sur milieu solide) a révélé que 37,43% des souches isolées chez l'Hirondelle rustique sont résistantes, 13,43% présentent une résistance intermédiaire et 49,14% affichent une sensibilité apparente. Pour la seconde espèce, l'Hirondelle de fenêtre, 29% des souches sont résistantes aux différents antibiotiques utilisés, 16,75% présentent une résistance intermédiaire et 54,25% y sont sensibles.

L'expérience de la détermination de la concentration minimale inhibitrice du chlore nous montre que la dose du chlore d'une CMI bien définie est différente selon les espèces ce qui illustre l'histogramme de la figure (38).

D'après ces résultats :

- on confirme ce qui a déjà été cité dans le chapitre de la résistance bactérienne au chlore que les bactéries Gram négatif possédant une paroi complexe que celle des Gram positif et cette complexité rend la paroi imperméable à la plus part des substances, à l'exception de celles qui pénètrent par les porines sont plus résistantes au chlore que les bactéries Gram+ du fait que la composition de leurs paroi est protéique que lipidique ce qui facilite leur halogénéation par le chlore qui agit par l'oxydation des protéines membranaires.
- et qu'une concentration supérieure ou égale à 0,9 mg du chlore actif/litre est suffisante pour inhiber les bactéries isolées ce qui montre l'efficacité de l'eau de javel.



Conclusion

Notre étude nous a permis de faire le point sur la base des connaissances concernant l'analyse bactériologique des fientes de deux espèces d'Hirondelles : l'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*) et l'Hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) dans la région de Guelma.

Dans ce contexte, nous avons suivi divers protocoles de recherches afin d'isoler et d'identifier les espèces bactériennes présentes dans ces fientes et évaluer leurs résistance aux antibiotiques et au chlore.

Les tests d'identification effectués ont révélé que les espèces présentes sont relativement pathogènes pour l'être humain et l'animal.

La microflore isolée est variable en fonction de certains facteurs majeurs qui sont l'habitat et le régime alimentaire de l'oiseau. Ces derniers ont un grand effet sur la diversité de la microflore des espèces étudiées.

Nous pouvons déduire que les fientes des hirondelles sont un bio contaminant de l'environnement dont le réservoir pourrait être l'hirondelle.

# Références bibliographiques

**Bibliographie :**

**Arnal P. 2003.** « *Source et caractère entérotoxigène des Staphylocoques en élevage ovin laitier* ». Thèse doctorat, Toulouse, L'école Nationale Vétérinaire de Toulouse, 57 p.

**Avril J.L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H. 1992.** Bactériologie clinique. 2ème édition. Paris : Ellipses, 522 p.

**Bensouilah T., Kirati H., Touati H. 2012.** « *Microbiologie des fientes de quelques espèces aviaires nicheuses dans la région de Guelma* ». Mémoire de Master, Université de Guelma, 53 -59 p.

**Carbonelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., 1988.** Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. France. 251p.

**Castel O. 2010.** *Clostridium difficile* et utilisation de l'eau de Javel dans les établissements de soin. PDF. Ed. CHU de Poitiers CC lin, 18p.

**Chouder N. 2006.** « Contribution à l'étude des flores intestinales des poulets conventionnels sains ». Thèse doctorat, Université Mentouri Constantine, 190 p.

**Cramp S. 1994.** Hand book of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The Birds of the western palearctic. Oxford University Press, Oxford.

**Cramp, S.L., Simmons, K.E.L., Snow, D.W. & Perrins, C.M. 1998.** The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM. Version 1.0 for PC, Oxford University Press. London, UK.

**Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire. Paris : Editions TEC & DOC, 476 p.

**Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. 2007.** Bactériologie médicale. Paris: Masson, 594 p.

**Drent R.H. et Daan S. 1980.** The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. Ardea 68. p.p. 225-252.

**Dubois, P.J., Le Marechal, P., Oliosio, G. & Yesou, P. 2000.** Inventaire des oiseaux de France. Nathan/HER. Paris, France. 397 p.

**D.P.A.T. 2008.** Direction de la Planification et de l'Aménagement du Territoire. Rapport Interne, Monographie De La Wilaya De Guelma. 36 p.

**Euzeby J. 2007.** Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants. Document de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse , 20 p.

**Evans, K.L., Wilson, J.D. & Bradbury, R.B. (2007).** Effects of crop type and aerial invertebrate abundance on foraging barn swallows *Hirundo rustica*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 122 (2) : 267-273.

**Federighi M., 2005.** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12<sup>ème</sup> édition, éditions Cet R, 376 p.

**Gabriel I., Mallet S., Lessire M. 2003.** « La microflore digestive ». INRA, Station de Recherches Avicoles, 8 p.

**Gabriel I., Mallet S., Sibille P. 2005.** « La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal ». INRA, Productions Animales, Vol 18 : N° 5, p. 309-322.

**Géroudet P. 1998.** Les passereaux d'Europe tome 1 des coucous aux merles Delachaux et Niestlé, Paris, France, 199-207p.

**Haddad S., Reghis F., Samsar Z .2010.** « La chloration des eaux potables et émergence des bactéries résistantes au chlore » ». Mémoire de Master , Université de Guelma, 21 -29- 47 p.

**Lebres E. 2006.** Cours D'hygiène Et De Microbiologie Des Eaux (Manuel De Travaux Pratiques Des Eaux). Institut Pasteur d'Algérie, 60 p.

**Labres E., Mouffok F 2008.** Les cours national d'Hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratiques des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. Algérie ,53p.

**Lack D. 1947.** The significance of clutch size. *Ibis* 89. p.p. 302-352.

**Lack D. 1954.** The Naturel Regulation of Animal Numbers. Clarendon Press, Oxford.

**Lack D. 1968.** Ecological adaptations for breeding in birds. Methuen. London.

**Le minor L., Veron M., (1989).** Bactériologie Médicale. Flammarion Sciences, 845p.

**Marchal N., Bourdon J.L., Richard C. 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris: Doin Editeurs, 482 p.

**Martin T.E. 1987.** Food as limit on breeding birds : a life-history perspective. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18. p.p. 453-487.

**Moller A.P. 1994.** Sexual selection and the Barn Swallow .Oxford University PressSeries In ecology andevolution.New York,USA.

**Neuray P. 1982.** Une colonie d'Hirondelles de fenêtre (*Delichon urbica*) dans une étable, *Aves* 19/4 : 274

**Pechere J ; C., Acar J ., Grenier B . et Nihoul E ., ( 1982).** Reconnaître, comprendre et traité les infections. 4<sup>ème</sup> édition. Edisem ST-Hyacinthe. Québec . Canada. 509p.

**Perrin, Ch. & Cuisin, M. 1987.** Les oiseaux d'Europe. Delachaux et Niestlé : nouvelle génération des guides, 320 p.

**Peterson R. et al., 2006 .** Guide Peterson des oiseaux de France et d'Europe .Delachaux et Niestlé, paris, France.

**Rahal K., Benslimani A., Tali-maamar H., Missoum M., Abdoun A., Ammari H. 2008.** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. 5<sup>ème</sup> édition. Alger, 109 p.

**Rahal K., Benslimani A., Tali-maamar H., Missoum M., Abdoun A., Ammari H. 2011.** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS (Médecine Humaine et Vétérinaire). 6<sup>ème</sup> édition. Alger, 195 p.

**Rejesk F. 2002.** Analyse Des Eaux ; Aspects Réglementaires et Techniques. Paris : Sceren, 360 p.

**Rocamora G. et Yeatman-berthelot, D. 1999.** *Oiseaux menacés et à surveiller en France. Listes rouges et recherche de priorités. Populations. Tendances. Menaces. Conservation.* Société d'Etudes Ornithologiques de France et LPO. Paris 560 p.

**Rodier J., Legube B., Merlet N. 2009.** L'analyse de l'eau 9<sup>ème</sup> édition. Paris : Dunod, 1579 p.

**Savage D.C. 1989.** « L'écosystème digestif et sa colonisation ». Revue science technologie, organisation internationale des épizooties, Vol. 8 : N°2, p. 275-290.

**Saino N., Ambrosini R., Martinelli R., Møller A. 2002.** Mate fidelity, senescence in breeding performance and reproductive trade-offs in the barn swallow. *Journal of Animal Ecology*, 71, (2): 309 – 319.

**Sériot J.& Alvès D. 2002.** Les hirondelles .Delachaux et Niestlé, Paris, France.

**Singer D. 2008.** Quel est donc cet oiseau ? Nathan, Paris, France.

**Singleton P.1999.** Bactériologie 2<sup>ème</sup> cycle. 4<sup>ème</sup> édition. Paris: Dunod, 415 p.

**Van Der Elst D. 1985.** A propos de l'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*) en Wallonie et Brabant, Aves, 22/1 : 1-2.

**Vansteenwegen, Ch. 1988.** Choix de l'habitat, fidélité et répartition spatiale chez l'Hirondelle de cheminée. *Alauda*, 56 (4) : 350-364.

**Verheyen R. 1947.** Les passereaux de Belgique deuxième partie Patrimoine du musée royal d'histoire naturel de Belgique, Bruxelles, Belgique p 345-351.

**Walravens M. & Langhendries R. 1985.** Nidification de l'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*) dans le sud et l'est de la région bruxelloise. *Aves*, 22/1 : 3-34.

**Webographie :**

- [1] [www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net) (Consulté le 29 /12 /2012).
- [2] <http://betails-de-min-coin.over-blog.com/article-hirondelles-juveniles-82096845.html> (Consulté le 20 /12 /2012).
- [3] <http://files.biolovision.net/www.faune-paca.org/userfiles/FPP6VFweb1.pdf> (Consulté le 23 /12 /2012).
- [4] [www.bourgogne-nature.fr/.../bnj0-zoom-hirondelles\\_1358102490.p](http://www.bourgogne-nature.fr/.../bnj0-zoom-hirondelles_1358102490.p). (Consulté le 25 /12 /2012).
- [5] <http://www.cen-corse.org/travaux/170.pdf> (Consulté le 02 /02 /2013).
- [6] [www.cclinparisnord.org/Guides/guide\\_desinfectant.pdf](http://www.cclinparisnord.org/Guides/guide_desinfectant.pdf) (Consulté le 23 /02 /2013).
- [7] [http://eaubjectif.com/Eautarcie/3.Eau\\_de\\_pluie/D.Le\\_chlore\\_et\\_l%27eau.htm](http://eaubjectif.com/Eautarcie/3.Eau_de_pluie/D.Le_chlore_et_l%27eau.htm) (Consulté le 15 /04 /2013).
- [8] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Hirondelle\\_rustique](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hirondelle_rustique) (Consulté le 23 /03 /2013).
- [9] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Hirondelle de fenêtre](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hirondelle_de_fen%C3%AAtre) (Consulté le 23 /03 /2013).
- [10] <http://geek-bird.blogspot.com/search/label/Hirondelles> (Consulté le 23 /03 /2013).
- [11] [http://www.apiservices.com/articles/fr/analyse\\_mellisopalynologique\\_algerie.htm](http://www.apiservices.com/articles/fr/analyse_mellisopalynologique_algerie.htm) (Consulté le 14 /05 /2013).
- [12] [ile-de-france.lpo.fr/lpoidf/fiches\\_telechargement/hirondfen.pdf](http://ile-de-france.lpo.fr/lpoidf/fiches_telechargement/hirondfen.pdf)(Consulté le 1/04 /2013).
- [13] [inpn.mnhn.fr/docs/cahab/fiches/Hirondelle-rustique.pdf](http://inpn.mnhn.fr/docs/cahab/fiches/Hirondelle-rustique.pdf) (Consulté le 3 /04 /2013).
- [14] <http://www.lenntech.fr/resistance-antimicrobienne.htm> (Consulté le 3 /04 /2013).
- [15] <http://lycee-valin.fr/bgb/ftech/C1K.pdf>. (Consulté le 2 /04 /2013).
- [16] <http://lpomoselle.oiseaux.net/pdf/Plaquettes.pdf> (Consulté le 8 /04 /201).
- [17] <http://www.medqual.fr/pro/Marie/RESSOURCES%20ET%20INFORMATIONS/2-THERA/Antibiotique%20Resistance/824-MECANISME-R-ATB-2012.pdf> (Consulté le 2/04/2013).
- [18] [www.sante.dz/aarn/classification.pdf](http://www.sante.dz/aarn/classification.pdf) (Consulté le 23 /03 /2013).
- [19] <http://www.senat.fr/rap/102-215-2/102-215-261.html> (Consulté le 03 /05 /2013).
- [20] <http://stanselme-col.spip.ac-rouen.fr/IMG/pdf/tristan.pdf> (Consulté le 19 /03 /2013).
- [21] <http://stl-bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.htm> (Consulté le 23 /04 /2013).



[22] <http://tpe-resistance-antibiotique.e-monsite.com/pages/ii-bacteries-et-resistances.html>  
(Consulté le 10 /04/2013).

[23] [www2.ustboniface.ca/cusb/.../membrane-feuilles-etudiants-2.pdf](http://www2.ustboniface.ca/cusb/.../membrane-feuilles-etudiants-2.pdf) (Consulté le 23 /04 /2013).

# Annexes

## Annexe 1 : Milieux de culture et réactifs utilisés :

### a) Milieux de culture :

#### Gélose nutritive

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....5,0 g
- Extrait de viande.....1,0 g
- Extrait de levure.....2,0 g
- Chlorure de sodium .....5,0 g
- Agar agar bactériologique.....12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

#### Gélose CHAPMAN

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....5,0 g
- Peptone pepsique de viande.....5,0 g
- Extrait de viande.....1,0 g
- Mannitol.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....75,0 g
- Rouge de phénol.....25,0 mg
- Agar agar bactériologique.....15,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

#### Gélose GNAB : pH = 8.6

- Peptone ..... 10 g/l
- Extrait de viande ..... 3 g/l
- Chlorure de sodium ..... 5 g/l
- Bile de bœuf ..... 2 g/l
- Agar ..... 8.6 g/l
- Eau distillée ..... 1000 ml

## Gélose Hektoen

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande.....12,0 g
- Extrait autolytique de levure.....3,0 g
- Lactose.....12,0 g
- Saccharose.....12,0 g
- Salicine.....2,0 g
- Sels biliaires.....9,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Thiosulfate de sodium.....5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....1,5 g
- Bleu de bromothymol.....65 mg
- Fuchsine acide.....40 mg
- Agar agar bactériologique.....13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,6 \pm 0,2$ .

## Gélose viande-foie

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone viande-foie.....30,0 g
- Glucose.....2,0 g
- Amidon soluble.....2,0 g
- Sulfite de sodium.....2,5 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0,5 g
- Agar agar bactériologique.....11,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,6 \pm 0,2$ .

## Gélose SS

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pancréatique de viande.....5,0 g
- Extrait de viande.....5,0 g
- Lactose.....10,0 g

- Sels biliaires.....8,5 g
- Citrate de sodium.....10,0 g
- Thiosulfate de sodium.....8,5 g
  - Citrate ferrique ammoniacal.....1,0 g
  - Rouge neutre.....25,0 mg
  - Vert brillant.....0,33 mg
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

### **Gélose Mueller-Hinton**

Pour 1 litre de milieu :

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

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.

### **Milieu TSI**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....14,0 g
- Extrait autolytique de levure.....3,0 g
- Extrait de viande.....3,0 g
- Glucose.....1,0 g
- Lactose.....10,0 g
- Saccharose.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Thiosulfate de sodium.....0,3 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....0,3 g
- Rouge de phénol.....24,0 mg
- Agar agar bactériologique.....13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7, 4 ± 0,2.

### **Milieu citrate de Simmons**

Pour 1 litre de milieu :

- Citrate de sodium ..... 1,0 g
- Bleu de bromothymol ..... 0,08 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Sulfate de magnésium ..... 0,2 g
- Hydrogénophosphate de potassium ..... 1,0 g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium ..... 1,0 g
- Agar : 15 g.

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,1 \pm 0,2$ .

### **Milieu mannitol mobilité**

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysat trypsique de caséine ..... 10,0 g
- Mannitol ..... 7,5 g
- Rouge de phénol ..... 0,4 mg
- Nitrate de potassium ..... 1,0 g
- Agar ..... 3,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $7,6 \pm 0,2$ .

### **Milieu Urée-tryptophane**

Pour 1 litre de milieu :

- L-Tryptophane.....3,0 g
- Phosphate monopotasique .....1,0 g
- Phosphate dipotassique .....1,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Urée .....20,0 g
- Rouge de Phénol à 1% .....2,50 ml
- Alcool à 95%.....10,00 ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C :  $6.7 \pm 0.2$ .

### **Eau peptonée exempte d'indole**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

### **Milieu Clark et Lubs**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone tryptique de viande ..... 5.0 g
- Glucose ..... 5.0 g
- Phosphate bipotassique ..... 5.0 g

pH du milieu prêt-à- l'emploi à 25°C : 6.8 ± 0.2.

### **Bouillon nitrate**

Pour 1 litre de milieu :

- Infusion de cœur cervelle ..... 25.0 g
- Nitrate de sodium ..... 10.0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7.2 ± 0.2.

### **Bouillon nutritif**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone .....10,0 g
- Extrait de viande .....5,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

### **Bouillon sélénite-cystine**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....5,0 g
- Lactose.....4,0 g

- Phosphate disodique.....10,0 g
- Hydrogénosélénite de sodium.....4,0 g
- L-cystine.....10,0 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

### Milieu de Rothe S/C : pH = 6.8

Tryptone .....	20 g/l
Glucose .....	5 g/l
Chlorure de sodium .....	5 g/l
Phosphate bi potassique .....	2.7 g/l
Phosphate mono potassique .....	2.7 g/l
Acide de sodium .....	0.2g/l
Eau distillée .....	1000 ml

### b) Réactifs :

#### Réactif TDA

- Perchlorure de fer.....3.4 g
- Eau distillée.....100 ml

#### Réactifs de Voges Proskauer

##### VP 1

- Hydroxyde de potassium.....40 g
- Eau distillée.....100 ml

##### VP 2

- Alpha naphтол.....6 g
- Ethanol.....100 ml

#### Réactif Kovacs

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



### **Rouge de méthyle**

- Rouge de méthyle .....0.1 g
- Alcool éthylique à 95 % .....300 ml
- Eau distillée .....500 ml

### **Réactif de Griess pour les nitrites**

#### **NIT 1**

- Acide sulfalinique .....0.8 g
- Acide acétique 5 N .....100 ml

#### **NIT 2**

- N-N-diméthyl-1-naphtylamine .....0.6 g
- Acide acétique 5 N .....100 ml

### **c) Colorants :**

#### **Violet de gentiane**

- Violet de gentiane .....1 g
- Ethanol à 90 % .....10 ml
- Phénol .....2 g
- Eau distillée .....100 ml

#### **Lugol**

- Iode .....1 g
- Iodure de potassium .....2 g
- Eau distillée .....300 ml

#### **Fuschine**

- Fuschine basique .....1 g
- Alcool éthylique .....100 ml
- Phénol .....5 g
- Eau distillée .....100 ml

**Annexe 2 :**

**Tableau 17: Lecture de l'API 20 E**

Tests	Composants	QTE (mg/cup)	Réactifs/Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- $\beta$ -Dgalactopyranoside	0,223	$\beta$ -galactoside (Ortho NitroPhényl- $\beta$ DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge/orangé
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge/orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge/orangé
CIT	trisodium citrate	0,756	Utilisation du CITrate	vert pâle/ jaune	bleu-vert/bleu
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate	0,075	Production d'H <sub>2</sub> S	incolore / grisâtre	dépôt noir/fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	TryptophaneDésAminase	TDA/immédiat	
				jaune	Marron- rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	Production d'INDole	JAMES/ immédiat	
				incolore vert pâle/jaune	rose
VP	sodium pyruvate	1,9	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP1+VP2/10min	
				incolore/ rose pâle	rose/ orange
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase(GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation oxydation(GLUCose)	bleu/bleu-vert	jaune/ jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation/oxydation (MANitol)	bleu /bleu-vert	jaune
INO	Inositol	1,9	fermentation/oxydation (INOsitol)	bleu /bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation/oxydation (SORbitol)	bleu /bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation/oxydation (RHAmnose)	bleu /bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation/oxydation (SACcharose)	bleu /bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation/oxydation (MELibiose)	bleu /bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation/oxydation (AMYgdaline)	bleu /bleu-vert	jaune
ARA	L- arabinose	1,9	fermentation/oxydation (ARAbinose)	bleu /bleu-vert	jaune
OX			Cytochrome- Oxydase	incolore	Violet

**Tableau 18 : Lecture de l'API 20NE**

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1+NIT 2/ 5 mn	
			incoloré	Rose- rouge
		Réduction des nitrates en azote	ZN / 5mn	
			Rose	incoloré
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5mn	
			incoloré	Goutte rouge
GLU	Glucose Fermentation	Fermentation	Bleu à vert	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Orange/ rose/ rouge
URE	Urée	uréase	jaune	Orange/ rose/ rouge
ESC	Esculine	hydrolyse	jaune	Gris / marron /noir
GEL	Gélatine	hydrolyse	Pas de diffusion de pigment	Diffusion de pigment
PNPG	p-nitro-phényl-βDgalactopyranoside	B-galactosidase	incoloré	jaune
GLU	glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-pphenylène diamine			

### Annexe 3 :

- **Mesure du chlore actif :**

$$\begin{array}{l} 1^\circ \longrightarrow 3,17\text{g} \\ \text{Degré} \longrightarrow X \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1^\circ \\ \text{Degré} \end{array}} \right\} X (\text{chlore actif}) = \text{degré} \times 3,17$$

Un degré chlorométrique équivaut donc à 3,17 g de chlore actif par litre.

- **Préparation des concentrations croissantes du chlore :**

$$1^\circ \longrightarrow 3,17\text{g}$$

$$12^\circ \longrightarrow X = 38,04 \text{ g de chlore actif par litre.}$$

Donc :

1 litre d'eau de javel de 12° contient 38,04 g de chlore actif

$$\begin{array}{l} 1000 \text{ ml d'eau de javel} \longrightarrow 38040 \text{ mg de chlore actif} \\ X = ? \longrightarrow 1\text{mg} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1000 \text{ ml} \\ X = ? \end{array}} \right\} \boxed{X = 0,026 \text{ ml d'eau de javel}}$$

Pour avoir 0,026 ml d'eau de javel on dilue 2,6 ml d'eau de javel dans 100 ml d'eau distillée stérile. Donc 1ml de cette solution contient 1mg de chlore actif.

**Annexe 4 :**

**Tableau 19 : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Enterobacteriaceae*.**

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 23	< 23
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Amoxicilline	25 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 16
Céfalexine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14

**Tableau 20 : Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Staphylococcus spp.***

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 21	< 23
Tétracycline	30 UI	≤ 1	> 2	≥ 23	< 21
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12
Lincomycine	15µg	≤ 2	> 8	≥ 21	< 17
Vancomycine	30µg	≤ 4	> 8	≥ 17	-
Rifampicine	30 µg	≤ 0,06	> 0,5	≥ 29	< 24

# Résumé

Notre étude consiste à l'analyse bactériologique des fientes de deux hirondelles : l'Hirondelle rustique (*Hirundo rustica*) et l'Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbica*) dans le but de mettre en évidence les microorganismes bactériens qu'elles contiennent et évaluer leurs résistances aux antibiotiques et au chlore. Le travail a été réalisé au niveau de laboratoire de l'Université de Guelma, la technique utilisée est celle des cultures sur milieux sélectifs suivie par l'antibiogramme par diffusion des disques selon la méthode de Kirby-Bauer et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du chlore. La majorité des espèces identifiées appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. La présence de *Staphylococcus aureus* a été révélée uniquement chez l'Hirondelle de fenêtre et *Pseudomonas luteola* chez l'Hirondelle rustique. Toutes ces bactéries sont relativement pathogènes et assez résistantes aux antibiotiques et on a démontré qu'elles sont assez sensibles au chlore (eau de javel). Ceci nous amène à déclarer les fientes des hirondelles comme un bio contaminant de l'environnement. Les risques d'infection bactériennes sont bien vérifiés et présents dans notre site d'étude dont le réservoir et /ou vecteur pourrait être l'hirondelle. Mais l'utilisation du chlore comme un désinfectant nous rassure d'inhiber ces bactéries à des concentrations faibles qui ne dépassent pas 0,9 mg de chlore /l.

**Mots clé :** fientes, hirondelle de fenêtre, hirondelle rustique, résistance au chlore, bactéries, Guelma.

Our study is to bacteriological analysis droppings two swallows: the barn swallow ( *Hirundo rustica* ) and house martin ( *Delichon urbica* ) in order to highlight the bacterial microorganisms they contain and evaluate their resistance to antibiotics and chlorine. The work was done at the laboratory of the University of Guelma, the technique used is that of cultures on selective media followed by disk diffusion susceptibility method of Kirby-Bauer and the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of chlorine. The majority of identified species belong to the family Enterobacteriaceae. The presence of *Staphylococcus aureus* was revealed only in the House Martin and *Pseudomonas* in the Barn Swallow. All these bacteria are pathogenic and relatively quite resistant to antibiotics and has shown to be quite sensitive to chlorine (bleach). This brings us to declare droppings swallow as a bio environmental contaminant. Risks of bacterial infection are well checked and found in our study that the reservoir and / or vector could swallow site. But the use of chlorine as a disinfectant reassuring to inhibit these bacteria to low concentrations that do not exceed 0.9 mg chlorine /l.

**Keywords:** bird droppings, house martin, barn swallow, resistance to chlorine, bacteria, Guelma.



هذه الدراسة تتمثل في التحليل البكتيريولوجي لفضلات نوعين من طيور الخطاف هما: السنونو (*Hirundo rustica*) وخطاف الضواحي (*Delichon urbica*) بهدف تحديد مكوناتها البكتيرية وتقييم مدى مقاومتها للمضادات الحيوية والكلور. تم إنجاز هذا العمل في مختبر جامعة قلمة، واستخدمت تقنية الزرع في وسط اختياري حسب اختبار المضادات الحيوية عن طريق الأقراص بطريقة Kirby-Bauer وتحديد التركيز الأدنى المثبط للكلور (CMI). معظم الأنواع التي تم تحديدها تنتمي إلى عائلة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae. وتم الكشف عن وجود بكتيريا العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* فقط في فضلات خطاف الضواحي و بكتيريا الزائفة المصفرة *Pseudomonas luteola* في فضلات السنونو. كل هذه البكتيريا هي مسببة للأمراض ومقاومة للمضادات الحيوية كما أظهرنا أنها حساسة جدا للكلور (ماء جافيل). هذا يقودنا إلى القول بأن فضلات طيور الخطاف تعتبر ملوث حيوي للمحيط. ومخاطر الإصابة بالعدوى البكتيرية أكيدة في موقع الدراسة ومصدرها قد يكون طيور الخطاف. ولكن استخدام الكلور كمطهر يؤدي إلى تثبيط هذه البكتيريا عند التركيزات المنخفضة التي لا تتجاوز 0.9 ملغ كلور / لتر.

**الكلمات المفتاح:** فضلات، خطاف الضواحي، السنونو، المقاومة تجاه الكلور، البكتيريا، قلمة.