

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLAB – BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière Science Biologique

**Option : Microbiologie**

**Thème**

# Etude du profil de résistance des bactéries isolées à partir des sous-produits des stations d'épuration

Présenté par :

Date de soutenance : 13/07/2022

- M<sup>lle</sup> BENNAI Insaf
- M<sup>lle</sup> TEBTOUB Selma

Devant le jury :

Mme BOKRETA S.	MCB	Université de Blida 1	Présidente
Mme TOBAL S.	MAA	Université de Blida 1	Examinatrice
Mme HAMAIDI F.	Professeure	Université de Blida 1	Promotrice
Mr BOUTEKFA Y.	Doctorant	Université de Blida 1	Co-promoteur

Année Universitaire : 2021-2022

## **Remerciements**

*Au commencement, nous remercions Allah le Tout Puissant qui nous a donné tant d'énergie, de courage, de volonté et de patience pour accomplir ce modeste travail.*

*Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les membres du jury,*

*Madame BOKRETA.S d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire*

*Madame TOBAL.S qui a accepté de nous examiner et de nous juger.*

*Nous tenons à remercier spécialement notre promotrice Madame HAMAIDI.F qui fut la première à nous faire découvrir le sujet qui a guidé notre mémoire.*

*Nous exprimons notre reconnaissance à notre Co-promoteur Monsieur BOUTEKFA.Y qui nous a apporté son soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.*

*Nous gratifions d'une mention spéciale le laboratoire AMAWAZ Lab pour son équipement de pointe dont l'animation est assurée par Monsieur RALEMI .M Nous ne pouvons pas oublier sa directrice MEDDAD.N pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*On remercie le laboratoire d'Hygiène de Blida et toutes personnes qui nous ont aidées de près ou de loin durant notre stage*

## ***Dédicace***

*Grace à Dieu le Tout Puissant qui me permet de dédier ce travail...*

*A mon père qui est toujours présent quand j'ai besoin de lui. Il est toujours à mes côtés avec ses encouragements, ses conseils et son soutien moral*

*A ma mère qui est toujours derrière moi. Avec ses encouragements, elle me pousse toujours vers l'avant.*

*Rien ne peut remplacer ce qu'ils font pour moi. Que Dieu les protège.*

*A ma grand-mère Fatiha " ربي يرحمها " et ma grand-mère Habiba qui m'ont toujours dit "Une prière de bonté toujours derrière et devant toi "*

*A mes sœurs Assia , Zakia , Soumeya , mon frère Mohammed Amine ,mes beaux frères Bilel et Ishak ,mes nièces Sirine et Sarah ,mes neveux Yacine et Ahmed et mon oncle Nabil pour leurs encouragements et leurs soutiens.*

*Leur présence dans ma vie me donne toujours le courage d'atteindre mes objectifs.*

*A mon binôme Insaf avec qui j'ai partagé des moments de rire et de fatigue durant cette année. Que Dieu te protège.*

*A mes amies Asma et Aicha pour leur présence dans ma vie.*

*Et à toute la promotion de microbiologie 2022.*

***Selma***

## ***Dédicace***

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant qui m'a aidé et m'a donné le courage pour mener à terme ce modeste travail.*

*Avec plaisir je dédie ce travail*

*À mes très chers parents*

*Pour leur soutien, leur patience et leur encouragement durant tout mon parcours, qui ont toujours été là pour moi*

*Jamais je n'y serai arrivée sans eux, que Dieu les protège*

*À mes chères sœurs*

*Sana, Amina, Asma et Naima qui ont été toujours à mes côtés avec leur soutien moral, leur compréhension et leur grande tendresse*

*À mon cher frère Mohamed et sa femme Khadidja*

*À mes neveux et nièces*

*À mon cher binôme Selma*

*Source de motivation et d'encouragement, je lui souhaite plus de succès et de bonheur dans sa vie*

*À mes meilleurs amies*

*Aicha et Asma avec qui j'ai partagé ensemble des bons et émotionnels moments durant nos études et lors de la réalisation de ce travail.*

*À toute ma famille, mes amies et toute personne que j'aime*

*À toute la promotion de microbiologie 2022*

***Insaf***

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Différentes boues selon l'état physique .....	5
<b>Tableau II</b> : Autres micro-organismes présents dans les boues résiduaires.....	7
<b>Tableau III</b> : Classification des <i>Entérobactériaceae</i> par tribus .....	8
<b>Tableau IV</b> : Caractéristiques des principales bactéries.....	10
<b>Tableau V</b> : Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
<b>Tableau VI</b> : Principales résistances naturelles chez les Entérobactéries .....	15
<b>Tableau VII</b> : Mécanismes de résistances naturelles chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
<b>Tableau VIII</b> : Résistance par production de $\beta$ -lactamases de classe A, B et D.....	19
<b>Tableau IX</b> : Caractéristiques techniques des trois stations .....	22
<b>Tableau X</b> : Informations sur les échantillons des boues .....	24
<b>Tableau XI</b> : Conditions de réalisation de l'antibiogramme .....	32
<b>Tableau XII</b> : Résultats de l'identification d' <i>Escherichia coli</i> .....	37
<b>Tableau XIII</b> : Résultats de l'identification de <i>Klebsiella</i> .....	38
<b>Tableau XIV</b> : Résultats de l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>Tableau XV</b> : Résultats de l'identification de <i>Citrobacter</i> .....	40
<b>Tableau XVI</b> : Résultats de l'identification de <i>Providencia-Morganella</i> .....	41
<b>Tableau XVII</b> : Résultats de l'identification d' <i>Enterobacter</i> .....	43
<b>Tableau XVIII</b> : Résultats de l'identification de <i>Proteus</i> .....	44
<b>Tableau XIX</b> : Résultats de l'identification de <i>Pantaoe spp</i> .....	45
<b>Tableau XX</b> : Résultats de l'identification de <i>Serratia</i> .....	47
<b>Tableau XXI</b> : Résultats de l'identification de <i>Leclercia-Pleisomonas</i> .....	48
<b>Tableau XXII</b> : Espèces d'Entérobactéries et de <i>Pseudomonas</i> isolées à partir des boues résiduaires.....	49
<b>Tableau XXIII</b> : Autres bactéries isolées à partir des boues résiduaires .....	49
<b>Tableau XXIV</b> : Nombre de souches isolées des boues résiduaires dans chaque STEPs .....	53

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Mécanismes d'action d'antibiotiques.....	14
<b>Figure 2</b> : Différente étapes de traitement des boues (Filière boues) .....	23
<b>Figure 3</b> : Echantillons des boues .....	24
<b>Figure 4</b> : Organigramme du protocole expérimental réalisé dans cette étude.....	25
<b>Figure 5</b> : Répartition des bactéries isolées des boues résiduaires dans les trois stations .....	50
<b>Figure 6</b> : Fréquence des bactéries isolées par saison... ..	51
<b>Figure 7</b> : Répartition des Entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon les STEPs.....	52
<b>Figure 8</b> : Taux de résistance des Entérobactéries aux différents antibiotiques testés .....	55
<b>Figure 9</b> : Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez <i>Citrobacter youngae</i> .....	56
<b>Figure 10</b> : Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez <i>Enterobacter</i> .....	56
<b>Figure 11</b> : Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ....	57
<b>Figure 12</b> : Taux de résistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux différents antibiotiques testés .....	57
<b>Figure 13</b> : Résultats du test de double disque chez Entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
<b>Figure 14</b> : Production de $\beta$ -lactamases chez les Entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	59
<b>Figure 15</b> : Image de synergie (BLSE) observé chez 2 souches d'Enterobactéries .....	60
<b>Figure 16</b> : Résultats d'Entérobactéries et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Test à la cloxacilline) .....	61
<b>Figure 17</b> : Résultat du test à la cloxacilline chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
<b>Figure 18</b> : Résultat du test à la cloxacilline d'Enterobactéries avec une image de synergie...	62

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADH** : Arginine dihydrolase

**AMC** : Amoxicilline+ Acide clavulanique

**Amp** : Ampicilline

**API**: Analytical profile index

**ARN**: Acide ribonucléique

**ATCC**: American Type Culture Collection

**ATM** : Aztréonam

**BGT** : Bouillon glucosé tamponné

**BLSE** : Beta-lactamases à spectre étendu

**BMR** : Bactérie Multi-résistante

**CAZ** : Céftazidime

**CHN** : Céphalosporinase hyperproduite

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CTX** : Céfotaxime

**C3G** : Céphalosporines de troisième génération

**DO** : Densité optique

**ETM** : Eléments Tracs Métalliques

**H<sub>2</sub>S** : Hydrogène sulfuré

**LDC** : Lysine décarboxylase

**LPS** : Lipopolysaccharide

**McF** : Mac Farland

**MES** : Matière en suspension

**mm** : millimètre

**MH** : Mueller Hinton

**MS** : Matière solide

**ODC**: Ornithine décarboxylase

**ONPG:** Ortho-Nitro-Phenyl pyrano-Galactoside

**PLP :** Protéine liant pénicilline

**RM :** Rouge de Méthyle

**Sec :** seconde

**STEP :** Station d'épuration

**TDA :** Tryptophane désaminase

**TSA :** Gélose trypticase soja

**TSI :** Triple Sugar Iron

**UFC :** Unité Formant Colonie

**VP :** Voges-Proskauer

## Résumé

Dix-huit échantillons de boues ont été prélevés à raison de 6 échantillons par station durant une période de quatre mois (Mars 2022- Juin 2022). D'après les résultats obtenus, le nombre total de bactéries isolées dans les trois STEP était de 113 bactéries, 90 entérobactéries, 16 *Pseudomonas aeruginosa* et 7 souches appartenant à d'autres groupes ; La répartition est comme suit : 27 (30%) Entérobactéries et 3 (19%) *Pseudomonas aeruginosa* dans la station de Ben chaabane, 24 (27%) Entérobactéries et 5 (31%) *Pseudomonas aeruginosa* dans la station de Baraki et 39(43%) Entérobactéries et 8 (50%) *Pseudomonas aeruginosa* dans la station de Béni Mered.

L'étude de profil de résistance aux antibiotiques a montré un taux élevé de résistance chez les Entérobactéries vis-à-vis des antibiotiques suivants : AMP, AMC, CZ, CIP, une faible résistance à la CX et un taux élevé de sensibilité aux antibiotiques testés AT, CX, AK, CTX, C, SXT, CN, IPM, NA.

Concernant les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats ont montré un taux élevé 94% de résistance aux TCC et CAZ, une faible résistance aux PIP et IMP et un taux équivalent de résistance et de sensibilité soit 50% pour les TIC et 50% pour les AZ.

De même, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont marqué des taux élevés de sensibilité aux antibiotiques suivant : AK et TOB avec un taux de 100%, CN (75%), CIP (69%) et LEV (81%).

Le test de détection de BLSE a permis de mettre en évidence un taux de 26% d'Entérobactéries et un taux de 81% de *Pseudomonas aeruginosa* productrices de  $\beta$ -lactamases. Le test à la Cloxacilline nous a montré un taux de 100% pour *Pseudomonas aeruginosa* et un taux de 50% pour les Entérobactéries productrices de céphalosporinase de haut niveau (CHN).

**Mots clés** : Station d'épuration, boues résiduelles, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, ATB

## Abstract

Eighteen sludge samples were collected at a rate of 6 samples per station during a period of four months (March 2022 - June 2022). According to the results obtained, the total number of bacteria isolated from the three WWTPs was 113 bacteria, 90 Enterobacteria, 16 *Pseudomonas aeruginosa* and 7 strains belonging to other groups. The distribution is as follows: 27(30%) Enterobacteria and 3(19%) *Pseudomonas aeruginosa* in the station of Ben Chaabane, 24 (27%) Enterobacteria and 5 (31%) *Pseudomonas aeruginosa* in the station of Baraki and 39 (43%) Enterobacteria and 8 (50%) *Pseudomonas aeruginosa* in Béni Mered station.

The study of antibiotic resistance profile showed a high rate of resistance in Enterobacteria towards the following antibiotics: AMP, AMC, CZ, CIP, a low resistance to CX and a high rate of sensitivity to the tested antibiotics AT, CX, AK,CTX, C, SXT, CN, IPM, NA.

Concerning the *Pseudomonas aeruginosa* strains, the results showed a high rate of resistance 94% to TCC and CAZ, a low resistance to PIP and IMP and an equivalent rate of resistance and sensitivity, 50% for TIC and 50% for AZ. Similarly, the strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed high rates of sensitivity to the following antibiotics: AK and TOB with a rate of 100%, CN (75%), CIP (69%) and LEV (81%).

The ESBL detection test showed a rate of 26% for Enterobacteria and 81% for *Pseudomonas aeruginosa* producing  $\beta$ - lactamases. The Cloxacillin test showed a rate of 100% for *Pseudomonas aeruginosa* and a rate of 50% for Enterobacteria producing cephalosporinase(CHN).

**Key words:** Wastewater treatment plant, Wastewater sludge, Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, ATB.

## ملخص

تم أخذ ثمانية عشر عينة من الحمأة بمعدل 6 عينات لكل محطة على مدى أربعة أشهر (مارس 2022 - يونيو 2022). وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، بلغ العدد الإجمالي للبكتيريا المعزولة في محطات معالجة مياه الصرف الصحي الثلاثة 113 نوعاً من البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 16, Entérobactéries 90 و 7 سلالات تنتمي إلى مجموعات أخرى.

التوزيع كالتالي : 27 (30%) Entérobactéries و 3 (19%) *Pseudomonas aeruginosa* في محطة بن شعبان، و 24 (27%) Entérobactéries و 5 (31%) *Pseudomonas aeruginosa* في محطة بريقي، و 39 (43%) Entérobactéries و 8 (50%) *Pseudomonas aeruginosa* في محطة بني مراد.

أظهرت دراسة ملف مقاومة المضادات الحيوية ارتفاع معدل المقاومة في Entérobactéries ضد المضادات الحيوية التالية: AMP و AMC و CZ و CIP و مقاومة منخفضة لـ CX ومعدل مرتفع من حساسية المضادات الحيوية التي تم اختبارها (AT ، CX ، AK ، CTX ، C ، SXT ، CN ، IPM ، NA).

بالنسبة لسلالات *Pseudomonas aeruginosa*، فقد أظهرت النتائج وجود معدل مقاومة عالية (94%) لـ TCC و CAZ، مقاومة منخفضة لـ PIP و IMP ومعدل مقاومة وحساسية مكافئة ، أي 50% لـ TIC و 50% لـ AZ.

وبالمثل، سجلت سلالات *Pseudomonas aeruginosa* معدلات حساسية عالية المضادات الحيوية التالي: AK و TOB بنسبة 100% (75% CN ، 69%) CIP، (81%) LEV.

كشف اختبار كشف BLSE عن نسبة 26% من Entérobactéries ونسبة 81% من *Pseudomonas aeruginosa* المنتجة- $\beta$ -lactamase. أظهر اختبار Cloxacilline نسبة *Pseudomonas aeruginosa* 100% ومعدل Entérobactéries 50% المنتجة Céphalosporinase مستوى عالي

**الكلمات المفتاحية :** محطة معالجة مياه الصرف الصحي ، حمأة مياه الصرف الصحي ، Entérobactéries ، *Pseudomonas aeruginosa* ، مقاومة المضادات الحيوية.

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION

1

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I. GENERALITES SUR LES BOUES RESIDUAIRE

I .1.Définition d'une boue résiduaire ou d'épuration

3

I .2.Types de boues

3

I.2.1. Selon l'origine

3

I .2.2.Selon l'état physique

4

I .3.Composition des boues

5

### CHAPITRE II. PRINCIPALE BACTERIES PRESENTES DANS LES BOUES

II .1.*Enterobacteriaceae*

8

II .1.1.Classification

8

II .1.2.Habitat

9

II .1.3.Caractères biologiques

9

II.1.3.1. Caractères morphologiques

9

II.1.3.2. Caractères cultureux

9

II.1.3.3. Caractères biochimiques et antigéniques

9

II .2.*Pseudomonas aeruginosa*

11

II.2.1. Classification

11

II.2.2. Habitat

11

II.2.3. Caractères biologiques

12

II.2.3.1. Caractères morphologiques

12

II.2.3.2. Caractères cultureux

12

II .2.3.3.Caractères biochimiques et antigéniques	13
<b>CHAPITRE III. ANTIBIORESISTANCE ET ANTIBIOTIQUES</b>	
<b>III .1. Résistances des <i>Entérobactéries</i> aux Antibiotiques</b>	<b>15</b>
<b>III.1.1. Résistance Naturelle</b>	<b>15</b>
<b>III.1.2. Résistance Acquisée</b>	<b>15</b>
III.1.2.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines	15
III.1.2.2. Résistance aux aminosides	16
III .1.2.3.Résistance aux quinolones	17
III.1.2.4. Résistance aux fosfomycine	17
III.1.2.5. Résistance aux chloramphénicols	17
III.1.2.6. Résistance aux sulfamides et au triméthoprim	17
III.1.2.7. Résistance à la colistine	17
III.1.2.8. Résistance aux carbapénèmes	17
<b>III .2. Résistances de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques</b>	<b>18</b>
<b>III.2.1. Résistance Naturelles</b>	<b>18</b>
<b>III.2.2. Résistance Acquisée</b>	<b>19</b>
III.2.2.1 Résistance acquise aux $\beta$ -lactamines	19
III.2.2.2. Résistance aux aminosides	20
III.2.2.3. Résistance acquise aux fluoroquinolones	21
III.2.2.4. Résistance acquise à la fosfomycine	21
III.2.2.5. Résistance acquise à la colistine	21

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **I.MATERIEL ET METHODES**

<b>I.1. Présentation des stations</b>	<b>22</b>
<b>I.2. Matériel</b>	<b>24</b>
<b>I .3.Méthodes</b>	<b>24</b>
I.3.1. Mode de prélèvements	24
I.3.2. Dilution et enrichissement	26
I.3.3. Isolement et purification	26
I.3.4. Examen macroscopique	26
I.3.5. Examen microscopique	26
I.3.5.1. Coloration de Gram	26

I.3.6. Tests biochimiques	<b>27</b>
I.3.6.1. Galerie classique	<b>27</b>
I.3.6.2. Galerie miniaturisée (Api 20E)	<b>31</b>
I.3.7. Antibiogramme	<b>31</b>
I.3.7.1. Antibiogramme par diffusion des disques	<b>32</b>
I.3.7.2. Test de synergie	<b>34</b>
I.3.7.3. Test du double disque	<b>34</b>
I.3.7.4. Test à la Cloxacilline	<b>35</b>
<b>II. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
II.1. Résultats de l'identification bactérienne	<b>36</b>
II.2. Répartition des bactéries isolées selon les stations d'épurations	<b>50</b>
II.3. Fréquence des bactéries isolées par saison	<b>50</b>
II.4. Fréquences des bactéries isolées des boues résiduaires prélevées des trois STEPs	<b>51</b>
II .5. Répartition de l'ensemble des espèces d' <i>Enterobacteriaceae</i> et de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans chaque site	<b>52</b>
II.6. Antibiorésistance	<b>54</b>
II .6.1. Antibiorésistance chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	<b>54</b>
II.6.2. Antibiorésistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>56</b>
II.7. Test de double disque	<b>58</b>
II.8. Test de synergie	<b>60</b>
II.9. Test à la cloxacilline	<b>60</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# *Introduction*

L'utilisation massive des antibiotiques et leur excrétion par les humains et les animaux a conduit à une dissémination à grande échelle de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement (**Stachurova et al., 2022 ; Reinthaler et al., 2002**). Par ailleurs, la dissémination de souches résistantes, voire multirésistantes, et l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance, notamment les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi, posent de sérieux problèmes au monde médical actuel (**Khaldi et al., 2015**).

Etant le réceptacle des bactéries et des antibiotiques, les stations d'épuration (STEP) sont considérées comme les principales sources de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance aux antibiotiques libérés dans l'environnement. La plupart des antibiotiques administrés à l'homme sont utilisés dans les foyers et finissent par se retrouver dans les eaux usées et les boues (**Karkman et al., 2018**).

Ces boues d'épuration sont le sous-produit organique du traitement des eaux usées. Leur composition est constituée principalement de matières organiques, d'oligo-éléments et de nutriments (éléments fertilisant) (**Romanos et al., 2019**).

Le danger sanitaire le plus important pour les boues d'épuration concerne le large éventail de micro-organismes pathogènes qu'ils contiennent. Parmi les bactéries identifiées, on retrouve *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp* et de nombreux autres isolats appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (**Stachurova et al., 2022 ; Bouki et al., 2013**).

Le développement et la persistance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries dépendent non seulement des antibiotiques mais aussi de la présence des gènes de résistance (**Zwenger et Gillock, 2009**).

La demande croissante de réutilisation des boues d'épuration comme engrais pour la fertilisation des sols présente un risque de propagation de la résistance aux antibiotiques à l'homme à travers la chaîne alimentaire. (**Mazanek et Stepniak, 2021 ; Feng et al., 2016 ; Holzel et al., 2010**).

Au cours de la dernière décennie, le nombre d'études portant sur la résistance aux antibiotiques n'a cessé de croître, soulignant l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude de la dissémination de l'antibiorésistance via les STEPs. C'est dans ce contexte que cette étude a été réalisée ; les objectifs que nous nous sommes fixés sont :

- Isolement et l'identification des bactéries présentes dans les boues résiduairees considérées comme des sous-produits des STEPs,
- Etude du profil de résistance des bactéries isolées vis-à-vis des antibiotiques

*Partie*  
*Bibliographique*

## **I. GENERALITES SUR LES BOUES RESIDUAIRES**

### **I.1. Définition d'une boue résiduaire ou d'épuration**

Les boues d'épuration sont les principaux sous-produits issus de l'assainissement des effluents liquides domestiques ou industriels dans les stations d'épuration (**Zuloaga et al., 2012**). Elles sont définies par le Comité Européen de Normalisation (CEN) comme «un mélange d'eau et de matières solides, séparé par des procédés naturels ou artificiels des divers types d'eau qui le contiennent, dont le résultat est une eau purifiée libérée dans l'environnement naturel et un résidu principal qui est la boue ».

Elles sont constituées de matières minérales et organiques sous forme dissoute ou sous forme de matière en suspension (**Bachelart, 2021**). Leurs caractéristiques varient selon la variabilité de la composition des eaux usées arrivant à la station d'épuration et des traitements qui sont effectués (**Tosoni, 2015**).

Les boues d'épuration présentent un intérêt et peuvent être utilisées comme sources d'énergie (digestion anaérobie, traitement thermique), dans les domaines agricoles (traitées et utilisées à terre comme engrais et amendement du sol), ou encore comme source d'extraction de composés valorisables (récupération du phosphore) (**Fijalkowski et al., 2017**).

### **I.2. Types de boues**

Selon **Derouiche (2011)**, l'appellation des différents types de boues résulte de la combinaison de plusieurs critères :

- La nature de l'effluent (urbain, laiterie, abattoir, papeterie...),
- Le traitement des eaux usées (primaire, physico-chimique, biologique),
- Le procédé de stabilisation (aérobie, anaérobie, chaulage, compostage),
- L'état physique des boues (liquide, pâteuse, solide...),
- Le type de matériel de déshydratation (filtre-presse, centrifugation, table d'égouttage...)

#### **I.2.1. Selon l'origine**

En fonction des différentes phases d'épuration des eaux usées, on obtient des boues présentant des caractéristiques différentes.

### **Boues primaires**

Les boues primaires sont les boues extraites du traitement primaire. Elles sont issues de la décantation des particules en suspension présentes dans les eaux usées une fois les prétraitements sont effectués. Les décanteurs primaires permettent d'éliminer environ 60% des particules en suspension avant d'aller au traitement secondaire. Ces boues ne sont pas stabilisées (forte teneur en matière organique) et généralement très fermentescibles (**Tosoni, 2015**).

### **Boues secondaires**

Les boues secondaires également appelées boues biologiques sont issues du traitement secondaire qui consiste sur deux étapes successives : traitement biologique et la clarification. Le traitement biologique consiste à un réacteur aéré dans lequel les microorganismes épurateurs assimilent les éléments nutritifs (matières organiques biodégradable et composé azotés) présents dans l'eau à traiter, ainsi que ces microorganismes peuvent être en culture libre (boues activées) ou en culture fixée (lits bactériens, disque biologique). L'aération amène l'oxygène nécessaire pour les métabolismes aérobies et les boues extraites sont essentiellement composées de résidus de bactéries cultivées pour digérer la charge polluante (**Tosoni, 2015**).

### **Boues physico-chimiques ou boues tertiaires**

Elles sont le résultat d'un traitement physico-chimique. Les matières organiques particulaires ou colloïdales contenues dans les eaux usées qui ne pouvaient pas être neutralisées pendant le traitement primaire se sont agglomérées par addition d'un réactif coagulant. 90 % de MES peuvent ainsi être captées. Les boues obtenues renferment une partie importante de sels minéraux issus des eaux brutes et de l'agent coagulant (**Tosoni, 2015**).

### **Boues mixtes**

Le terme « boues mixtes » fait référence au mélange des boues biologiques et boues primaires (**Bachelart, 2021**). Leur aptitude à la concentration par rapport aux boues biologiques est améliorée lors d'ajouts de boues primaires (**Canler et Perret, 2013**).

## **I.2.2. Selon l'état physique**

Le tableau suivant résume les différentes caractéristiques selon le type des boues (**Tableau I**):

**Tableau I :** Différentes boues selon l'état physique

Type des boues	Caractéristiques
<b>Les boues liquides</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Issues de l'épaississement des boues biologiques par voie gravitaire ou mécanique (Siccité 1-10 % MS).</li><li>• Elles sont très fréquentes sur les stations de très faible capacité et en zone rurale.</li></ul>
<b>Les boues pâteuses</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Proviennent des boues liquides déshydratées mécaniquement (siccité 10-30% MS).</li><li>• Ces boues pâteuses sont produites dans des stations de taille moyenne.</li></ul>
<b>Les boues solides chaulées</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Boues avec adjonction de chaux, appelée aussi boue chaulée, (siccité supérieure à 30 %).</li><li>• Elles proviennent des stations de moyenne ou grande taille et représentent plus de 30 % des tonnages de boues évacuées.</li></ul>
<b>Les boues séchées</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Boues séchées (siccité supérieure à 60 - 90 %) : Elles sont peu fréquentes.</li><li>• Sont plus faciles à stocker que les boues solides chaulées.</li></ul>

(Canler et Perret, 2013)

### **I .3.Composition des boues**

Les boues résiduaires sont un mélange hétérogène composé d'eau, matières organiques, Eléments Tracs Métalliques (ETM), Composés Tracs Organiques (CTO) et les micro-organismes. C'est un milieu complexe et vivant et dont la proportion de chaque composé dépend de l'origine, du type et de l'âge de la boue (Thiene, 2018).

#### **Matière organiques**

La concentration de la matière organique au niveau des boues est environ 50 à70% (Rorat et al., 2019).Elle est principalement formée de protéines, de lipides (6 à 19% de la matière organique), de fibres, de polysaccharides et d'acides aminés (jusqu'à 33% de matière organique). La proportion de ces composées varie selon la durée et le type de traitement subi par la boue (Thiene, 2018).

#### **Composants minérales**

Les boues résiduaires contiennent des quantités appréciables d'éléments minéraux fertilisants tels que l'azote, le potassium, le calcium et le soufre qui sont nécessaires pour la

croissance des végétaux. Ces boues, ont la capacité de combler une partie ou la totalité des besoins des végétaux (**Benoudjit, 2016**).

### ✚ Eléments traces métalliques (ETM)

La présence des ETM dans les boues résiduaire génèrent une inquiétude lorsqu'il est question d'épandre ces boues sur des sols destinés à produire des aliments pour l'homme et les animaux. Ils sont naturellement présents à des faibles concentrations mais au-delà ils deviennent toxiques. Ces ETM présentent un risque éco-toxicologie parce qu'ils ne sont pas biodégradables. Parmi ces éléments on distingue : Arsenic, Zinc, Cuivre, Chrome, Cadmium, Plomb et Mercure (**Baize, 2015**).

### ✚ Les composés traces organiques (CTO)

Parmi les substances les plus fréquentes sont : les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques(HAP), les Composés Traces Organiques (CTO), Pesticides et Nitrates. Ces éléments à forte dose peuvent devenir toxiques pour les microorganismes responsables de la fertilité des sols (**Benoudjit, 2016**).

### ✚ Microorganismes

En raison de la forte teneur en matière organique, les boues d'épurations contiennent divers types de micro-organismes qui jouent un rôle important dans le processus d'épuration. On distingue quatre types de micro-organismes : Bactéries, virus, champignons et parasites.

La concentration ainsi que le type de ces derniers dépendent du type de station d'épuration, de la source des eaux usées et de certains facteurs environnementaux. Une forte proportion de ces micro-organismes provient de matières fécales humaines ou animales (**Rorat et al., 2019**).

Parmi les bactéries les plus fréquentes sont : *Escherichia coli/ Pseudomonas aeruginosa/Bacillus / Enterobacter /Proteus/ Citrobacter/ Vibrion/ Salmonella* .

Les autres micro-organismes sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau II**).

**Tableau II:** Différentes micro-organismes présents dans les boues résiduaires

<b>Groupe</b>	<b>Genre</b>
<b>Virus</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Adénovirus</i></li><li>• <i>Rotavirus</i></li><li>• <i>Poliovirus</i></li><li>• <i>Virus de l'hépatite A</i></li><li>• <i>Herpèse</i></li><li>• <i>Coronavirus</i></li></ul>
<b>Parasites</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nématodes</li><li>• Cestodes</li><li>• Œufs d'helminthes (<i>Ascaris, Trichuris, Toxocara</i>)</li></ul>
<b>Protozoaires</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kystes de protozoaires</li><li>• <i>Cryptosporidium</i></li><li>• <i>Giardia</i></li><li>• <i>Entamoeba</i></li></ul>
<b>Champignons</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Trichophyton</i> sp</li></ul>

(Rorat et al., 2019)

## II. PRINCIPALES BACTERIES PRESENTES DANS LES BOUES

### II .1. *Enterobacteriaceae*

Les *Enterobacteriaceae* constituent l'une des plus importantes familles des bactéries .Il est l'un des groupes le mieux connus et le plus étudié de part leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques et leur grand intérêt dans la recherche (Akel, 2014).

#### II .1.1. Classification

La famille des Entérobactéries comprend de nombreux genres et espèces (130 espèces) (Tableau III).

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Gamma proteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Enterobacteriales</i>
<b>Famille</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>

(Dembelle, 2019)

**Tableau III:** Classification des *Enterobacteriaceae* par tribus

<b>Tribus</b>	<b>Espèces</b>
<i>Klebsiellae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia odorifera</i>
	<i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i>
	<i>Citrobacter koseri</i> <i>Hafnia alvei</i>
	<i>Yersinia</i>
<i>Proteae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia stuartii</i>

(Denis et al., 2016)

## **II .1.2.Habitat**

De par leur dénomination, leur localisation principale est le tube digestif de l'homme ou des animaux. Les Entérobactéries sont très répandues dans la nature en raison de la contamination de l'environnement par les matières fécales animales et des eaux d'égout (Kansaye, 2020).

## **II .1.3.Caractères biologiques**

### **II .1.3.1.Caractères morphologiques**

Les Entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles à Gram négatif, courts (1- 6 µm), immobiles ou mobiles par ciliature péritriche, non sporulés. Elles possèdent des fimbriae ou des pili chez la plupart des espèces pathogènes pour l'homme (Tidrarine, 2019).

### **II .1.3.2. Caractères cultureux**

Ce sont des micro-organismes facilement cultivables, elles poussent dans des milieux ordinaires (Bouillon ou gélose nutritif) pendant 18 à 24h à 37°C et la température peut atteindre 40°C. Ce sont des germes mésophiles et neutrophiles (PH optimum ≈ 5,5-8).

Les Entérobactéries donnent plusieurs formes de colonies, on distingue :

- **Formes smooth** : colonies rondes, lisses, bombées, blanches voire translucides, brillantes et humides. Leur diamètre est entre 2 à 4 mm
- **Formes rugueuses** : colonies vieilles, rugueuses, sèches, contours plats irréguliers et de teinte mate. Ce type de colonie s'observe lorsque les souches ayant subi plusieurs repiquages
- **Formes muqueuses** : colonies grosses plus de 10mm, plus ou moins confluentes (*Klebsiella spp*)
- **Envahissement de la gélose** : formation d'un tapis uniforme (Akel, 2014).

### **II .1.3.3.Caractères biochimiques et antigéniques**

Les Entérobactéries sont des Gram négatif, oxydase négative, aéro-anaérobies facultatifs, catalase positive (sauf *Shigella dysenteriae* serovar 1). Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz. Elles ont la capacité de réduire les nitrates en nitrite (sauf quelques espèces d'*Erwinia*) (Leghmizi et al., 2005).

Quant à leurs caractères antigéniques, les Entérobactéries possèdent plusieurs types d'antigènes différents : Antigènes O (antigène de la paroi), Antigènes H (antigènes flagellaires), Antigènes K (antigène capsulaire), Antigène de Kunin ou *Enterobacteriaceae* Common Antigen (ECA) constitué d'un glycophospholipide spécifique des entérobactéries et l'antigène d'adhésine (pili, fimbriae) (Denis et al., 2016).

Les caractères biochimiques des genres les plus fréquemment rencontrés sont résumés dans le **Tableau XXV (voir Annexe)**. Le tableau ci-dessous présente les principales bactéries et leurs caractéristiques.

**Tableau IV : Caractéristiques des principales bactéries**

Bactéries	Caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	-Bacille de 2 à 3µm de long, elle a la capacité de se développer rapidement dans des conditions de croissance optimales. - La présence d' <i>E.coli</i> dans les eaux d'environnement est considérée comme un indicateur de pollution fécale récente (Jang et al., 2017) - <i>E .coli</i> fait partie de la flore intestinale commensale. Elle se retrouve également sur les sols des établissements de soins (Muller, 2022)
<i>Shigella</i>	-C'est une bactérie strictement humaine et ne fait pas partie de la flore intestinale normale. -Elle peut survivre longtemps dans le milieu externe : 10-11 jours dans les matières fécales, 8 jours sur les vêtements des malades et 2 – 3 jours dans l'eau (A-Goro, 2021).
<i>Citrobacter</i>	-Ce sont des saprophytes répandus dans l'environnement et sur la nourriture végétale. -Elle est présente dans le tube digestif de l'homme (Denis et al., 2016).
<i>Klebsiella</i>	-C'est un germe très répandu dans la nature (l'eau, le sol, la poussière). -Commensale du tube digestif. -Les bactéries du genre <i>Klebsiella</i> se distinguent par leur immobilité constante et leur groupement en diplo-bacilles généralement encapsulés. (Achmour, 2012).
<i>Proteus</i> <i>Providencia</i>	Le groupe <i>Proteus</i> – <i>Providencia</i> se distingue essentiellement par les deux caractères suivants : ○ Présence d'un tryptophane désaminase

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Envahissement constant de la gélose nutritive</li> </ul> <p>On les retrouve au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. (Achmour, 2012)</p>
<i>Enterobacter</i>	<p>Ce sont des entérobactéries VP positive (production d'acétoïne) , mobiles , non sporulé.</p> <p>Présents dans l'environnement ainsi que dans le tube digestif de l'homme et des animaux (Fadil, 2016)</p>

## II .2. *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui fait partie de la sous-classe Gamma des protéobactéries. Il comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Mezaache, 2012). *Pseudomonas aeruginosa* constitue l'espèce type la plus importante et la plus pathogène du genre *Pseudomonas*. Elle représente 90% des bactéries isolé en clinique humaine (Nyaledome, 2016).

### II .2.1 .Classification

La classification est présentée dans le tableau suivant :

**Tableau V:** Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*.

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Prokaryota</i>
<b>Division</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Gamma Proteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pseudomonadales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pseudomonadaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

(Elrouini, 2018)

### II .2.2. Habitat

Il s'agit d'un micro-organisme ubiquitaire qui se retrouve dans de multiples niches écologiques et qui vit normalement comme saprophyte dans les habitats aquatiques et dans le

sol en raison de sa polyvalence métabolique (possède une très large versatilité nutritionnelle). *P. aeruginosa* peut coloniser les plantes, les animaux et les humains. (Botelho et al, 2019).

### **II.2.3.Caractère bactériologiques**

#### **II .2.3.1. Caractères morphologiques**

*P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, mesure 1 à 3µm de longueur et de 0,5 à 1µm de largeur. Non sporulés, non capsulé mais parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée slime qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie. Elle est très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche (Solbi, 2013).

#### **II .2.3.2.Caractère culturaux**

*P.aeruginosa* est une bactérie mésophile, hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Elle peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteurs tels que la Cétrimide (Dembele, 2019). Autres milieux peuvent être utilisés pour la recherche et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* tels que le Milieu King A et King B qui favorisent la production des pigments (pyocyanine sur le milieu King A et pyoverdine sur le milieu King B) (Habbi et al., 2020).

Elle est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 20 à 42°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. Par ailleurs, elle peut survivre à des variations de pH allant de 5,6 à 9 avec un pH optimal de 7,2 (Tijani, 2019) (Ryan et George, 2004).

Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur aromatique caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (Lhajoui, 2016).

- La pyocyanine : Pigment bleu, soluble dans l'eau et le chloroforme, caractéristique du *P. aeruginosa* qui est la seule espèce à le produire (composé fortement polaire, de nature phénazinique).
- La pyoverdine : Pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau insoluble dans le chloroforme.
- D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire : La pyomélanine brune et la pyorubine rouge.

Trois types de colonies peuvent être observés de manière isolée (Denis et al., 2016) :

- Colonies la « large » : isolées, grandes, avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier.
- Colonies S « small » : Petites, mates, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier.
- Colonies M « muqueuses » : Bombées, opaques, visqueuses, parfois coulantes.

### **II.2.3.3. Caractères biochimiques et antigéniques**

*P.aeruginosa* est une bactérie aérobie strict caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, tandis que certaines souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose) (Ryan et George, 2004) .

*P.aeruginosa* possède : une oxydase, une catalase, une nitrate-réductase, un métabolisme oxydatif des sucres appréciable sur milieu MEVAG et une arginine-dihydrolase (Elrouini, 2018).

*Pseudomonas aeruginosa* possède deux types d'antigènes :

L'antigène somatique O (Constituant de la paroi) : thermostable, qui est le composant polysaccharidique long du LPS, dont la longueur peut varier d'un à plusieurs centaines de sucres. Il joue un rôle important dans le pouvoir pathogène et dans l'immunité.

Il existe 17 antigènes lipopolysaccharidiques O différents. Cette variabilité est à la base du système de classification intraspécifique, connu sous le nom de sérotypage O, qui classe les souches en fonction de l'antigène O spécifique présenté à la surface des cellules (Habbi et al., 2020 ; Huszczyński et al., 2019 ; Elmeskini, 2011) .

Les sérotypes les plus fréquents sont : O:3, O:6, O:1, O:11. Certains sérotypes sont plus fréquemment impliqués dans des épidémies hospitalières et s'avèrent plus résistants aux antibiotiques : O:11, O:12. (Elmeskini, 2011)

- L'antigène flagellaire H : protéique, permet la détermination de nombreux sérotypes

(Habbi et al., 2020).

### III. ANTIBIORESISTANCE et ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des médicaments puissants utilisés dans le traitement des infections bactériennes. L'utilisation inappropriée de ces médicaments favorise la propagation de la résistance aux antibiotiques pour la plupart des bactéries. Cette résistance est définie par la capacité d'un microorganisme de résister aux effets des antibiotiques (Botelho et al., 2019).

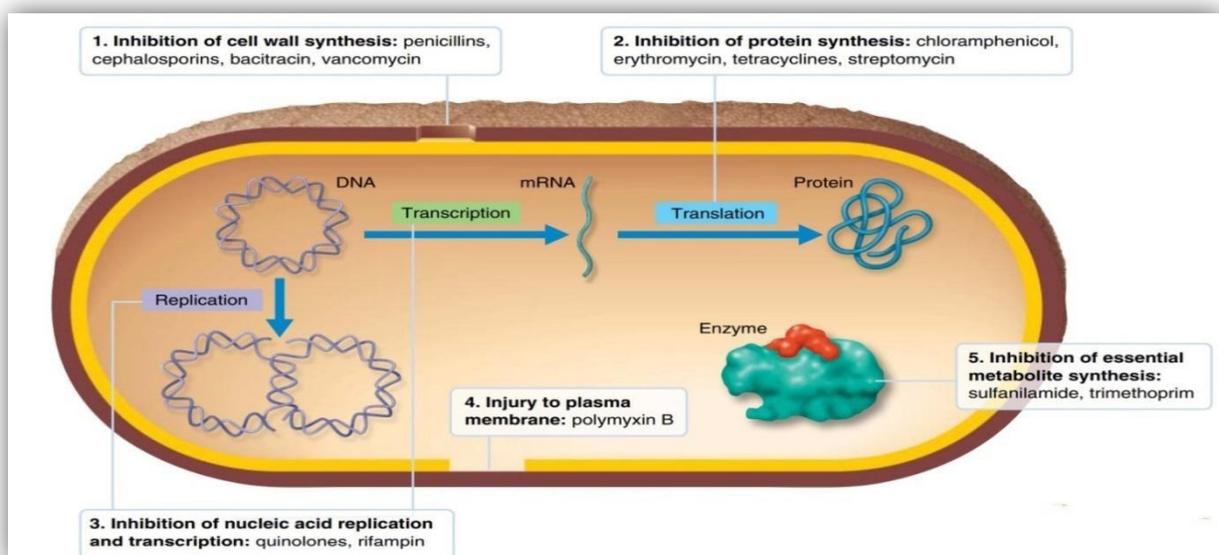
La résistance aux antibiotiques peut être soit :

➤ **Résistance Intrinsèque (naturelle)**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Elle est stable et se transmet à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) (Veysièrre, 2019).

➤ **Résistance Acquise**

On parle de résistance acquise lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes (Veysièrre, 2019). Les bactéries peuvent acquérir une résistance aux antibiotiques, soit par des changements mutationnels qui peuvent entraîner une réduction de l'absorption d'antibiotiques ou modifications des cibles antibiotiques, soit par acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal de gènes (Panga et al., 2019).



**Figure 1 : Mécanismes d'action d'antibiotiques (Tortora et al., 2018)**

### III .1. Résistance des *Enterobacteriaceae* aux Antibiotiques

#### III.1.1.Résistance naturelle

Les Entérobactéries sont naturellement résistantes aux nombreux antibiotiques par différents mécanismes. Le tableau ci-dessous résume les différents mécanismes de résistance naturelle.

**Tableau VI:** Principales résistances naturelles chez les Entérobactéries

Antibiotiques	Bactéries	Mécanismes
Colistine	<i>Proteus, Providencia, Morganella, Serratia</i>	Diminution de l'affinité des polymyxine aux LPS ( <b>Jayol, 2018</b> ).
β –lactamines	Groupe 2 <i>klebsiella pneumoniae</i> <i>klebsiella oxytoca</i> <i>Citrobacter koseri</i>	Production de pénicillinase de bas niveau
	Groupe 3 <i>Enterobacter/Citrobacter</i>	Production de céphalosporinase de bas Niveau
	Groupe 4 <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Serratiafonticola</i>	Production de pénicillinase de bas niveau + céphalosporinase de bas niveau
	Groupe 5 <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus penneri</i>	Production de céphalosporinase inductible ( <b>Mhaya, 2019</b> ).
Pénicilline G,V,M Macrolides Rifampicine Glycopeptide	Tous les <i>Entérobactéries</i>	La membrane externe forme une barrière hydrophile compacte aux antibiotiques hydrophobes et de haut poids moléculaire ( <b>Vallée et al., 2018</b> ).

#### III.1.2.Résistance acquise

##### III.1.2.1.Résistance aux β- lactamines

Quatre principaux mécanismes de résistances aux β- lactamines :

➤ **La diminution de la perméabilité membranaire**

Ce mécanisme de résistance se fait grâce à une altération des porines par une mutation. Cette mutation se traduit soit par une modification structurale d'une porine, soit par une diminution quantitative des porines (**Oueslati, 2019**).

➤ **L'excrétion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux**

Les Entérobactéries Possèdent différents canaux protéiques qui sont impliqués dans le transport d'une grande variété de composés. La résistance par efflux est souvent couplée à une diminution de perméabilité membranaire. L'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance de haut niveau (Gadou, 2019).

➤ **La modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP)**

Suite à une mutation dans les gènes qui codent pour les PLP, des modifications vont apparaître. On distingue : soit une modification de la conformation des PLPs , soit une diminution d'une PLP de forte affinité, ou une hyperproduction d'une PLP de faible affinité . Ces modifications vont entraîner une perte d'affinité entre les PLPs et les  $\beta$ - lactamines (Oueslati, 2019).

➤ **Production de  $\beta$ - lactamases**

Les  $\beta$ - lactamases sont des enzymes produites par les entérobactéries qui se lient aux  $\beta$ - lactamines et entraînent une ouverture dans le cycle du  $\beta$ -lactame. Il existe une grande variété de  $\beta$ - lactamases dont les  $\beta$ - lactamases à spectre étendu peuvent hydrolysés les pénicillines et les céphalosporines (Nys, 2021).

### **III .1.2.2.Résistances aux aminosides**

➤ **Inactivation enzymatique**

Trois classes d'enzymes peuvent inactiver les aminosides : Les nucléotidyltransférases ou adénylyltransférase , les acétyltransférases et les phosphotransférases (Bouaziz, 2019).

Ces enzymes vont prendre comme cible les groupements aminés et les groupements hydroxyles des aminosides (Gadou, 2019).

➤ **Réduction de l'accumulation intra-cytoplasmique**

La présence du système d'efflux au niveau des Entérobactéries va entraîner une diminution de l'accumulation des aminosides à l'intérieur de la cellule.(Gadou, 2019).

➤ **Modification de la cible**

Elle se fait par une mutation dans l'ARN ribosomal 16S (Gadou, 2019).

### **III .1.2.3.Résistance aux quinolones**

Le mécanisme le plus connu est une mutation chromosomique dans les gènes codent leur cibles intracellulaires (les Topoisomérase de types 2). Ces mutations vont entraîner une perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible, une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme et une diminution de sa pénétration transmembranaire (**Pantel, 2015**).

### **III .1.2.4.Résistances aux fosfomycine**

Il se fait par une modification des systèmes de transport suite à une mutation chromosomique (**Brahimi, 2013**).

### **III .1.2.5.Résistance aux chloramphénicol**

La résistance est enzymatique. Elle est basée sur l'inactivation du chloramphénicol par les chloramphénicol Acétyl Transférases (**Pantel, 2015**).

### **III .1.2.6.Résistance aux sulfamides et au triméthoprim**

Le mécanisme est basé sur la modification de la cible de l'antibiotique. Cette résistance est principalement causée par une mutation au niveau des gènes codent pour la DFHR (DiHydroFolate Réductase) et DHPS (DiHydroPtéroate Synthétase), ce qui va entraîner la perte d'affinité (**Pantel, 2015**).

### **III .1.2.7.Résistance à la colistine**

La colistine est un antibiotique qui interagit sur les groupements phosphate des lipopolysaccharides(LPS) qui sont présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

Le mécanisme de résistance se fait grâce au gène *mcr-1* qui code pour une enzyme. Celle-ci modifie la charge portée par une région des LPS qui devient moins sensible à la colistine. Il y a aussi d'autre mécanisme de résistance grâce aux gènes *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr4* (**Madec, 2017**).

### **III .1.2.8.Résistance aux carbapénèmes**

La résistance des Entérobactéries aux carbapénèmes se fait grâce à plusieurs mécanismes. Parmi ces mécanismes, on distingue la production d'une enzyme dénommée carbapénémase

qui va entraîner l'inactivation de l'antibiotique. Ce mécanisme est effectué grâce aux gènes situés sur un plasmide (Boivin *et al.*, 2016).

### III .2.Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

#### III.2.1.Résistances naturelles

*P. aeruginosa* présente une résistance intrinsèque à divers agents antimicrobiens en raison de sa membrane externe à faible perméabilité de même que d'autres mécanismes soient également responsables, notamment le système d'efflux qui expulse l'antibiotique hors de la cellule bactérienne et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique (Pachori *et al.*, 2019).

*P. aeruginosa* résiste naturellement aux : Bêtalactamines, les aminosides et autres antibiotiques tels que : les macrolides, les tétracyclines, la rifampicine, le chloramphénicol, les sulfamides les glycopeptides, et aux quinolones (Solbi, 2013). Le tableau suivant résume les mécanismes de résistance naturelle :

**Tableau VII : Mécanismes de résistances naturelles chez *Pseudomonas aeruginosa***

Antibiotiques	Mécanismes de résistances
<b>β-lactamines</b>	Elle est liée à plusieurs mécanismes : <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Production de Céphalosporinases naturelles de type chromosomique : Cette céphalosporinase naturelle induit une résistance à l'amoxiciline, à l'acide clavulanique et particulièrement à la céfalotine et à la cefoxitine.</li><li>➤ Faible perméabilité membranaire aux β-lactamines, due à la taille insuffisante des porines.</li><li>➤ Système d'efflux membranaire MexAB-OprM, capable d'exporter les antibiotiques en dehors de la cellule. Cette pompe à efflux est composée de trois protéines, MexA, MexB et OprM, incorporées dans les membranes internes et externes de la paroi bactérienne.</li></ul>
<b>Aminosides</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> est naturellement résistante à la kanamycine, la néomycine et la spectinomycine via la production d'une phosphotransférase.</li></ul>

(Elrouini, 2018)

### III.2. 2. Résistance acquise

#### III .2.2.1. Résistance acquise aux $\beta$ -lactamines

##### A. Résistances enzymatiques

##### ➤ Résistance par production de $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou métallo-enzymes (classe B) dont les substrats sont des  $\beta$ -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte d'activité antibiotique) intervient durant l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame. (Dembelle, 2019).

**Tableau VIII:** Résistance par production de  $\beta$ -lactamases de classe A, B et D

<b><math>\beta</math>-lactamases</b>	<b>Mécanismes de résistances</b>
<b><math>\beta</math>-lactamases de classe A</b> (Les pénicillinases et les $\beta$ -lactamases à spectre étendu)	➤ Pénicillinases : Parmi les pénicillinases on a le PSE-1 : c'est un enzyme spécifique des <i>Pseudomonas</i> . Ces pénicillinases vont hydrolyser les carboxypénicillines, les uréidopénicillines et la cefsulodine .
	➤ Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) : Ce sont des enzymes récemment apparues à la suite des mutations des pénicillinases. Elles sont plasmidiques donc transférables et sensibles à l'action des inhibiteurs enzymatiques. Elles induisent une résistance à toutes les bêtalactamines, à l'exception de l'imipénème.
<b><math>\beta</math>-lactamases de classe B</b>	Les enzymes de ce groupe sont également connues sous le nom de carbapénémase. Ce sont des métalloprotéines chromosomiques ou plasmidiques conférant une résistance aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam.
<b><math>\beta</math>-lactamases de classe D</b>	Les oxacillinases sont des pénicillinases plasmidiques entraînent une résistance supplémentaire aux uréidopénicillines (pipéracilline, ticarcilline)et à la cefsulodine.

(Dembelle, 2019 ; Elmeskini, 2011)

➤ **Résistance par hyperproduction de la céphalosporine AmpC :**

Presque toutes les souches de *P. aeruginosa* produisent une  $\beta$ -lactamase à large spectre, dénommée AmpC (classe C de Ambler) (Jeannot et Plésiat, 2015). Une mutation chromosomique de la cephalosporinase naturelle aboutissant à la résistance de toutes les  $\beta$ -lactamines, les carbapénèmes restent actifs et les inhibiteurs de Bêta lactamases sont peu ou pas efficaces (Habbi et al., 2020).

**B. Résistance non enzymatique**

➤ **Mutation de la porine D2**

Le principal mécanisme par lequel *P. aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années. Cette perte de porine est en effet responsable d'une augmentation de la CMI, rendant la souche intermédiaire ou résistante aux carbapénèmes (Grall et al., 2011).

➤ **Acquisition par mutations de systèmes d'efflux actif**

Les mutations aboutissent à la surproduction des pompes transmembranaires permettent d'expulser l'antibiotique hors de la bactérie, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique. Certaines souches ne sont résistantes qu'à la ticarcilline, et la plupart des souches restent sensibles à la pipéracilline et à la ceftazidime (Elmeskini, 2011).

**III .2.2.2.Résistance aux Aminosides**

Il existe 2 mécanismes différents de résistance aux aminosides :

➤ **Enzymes modifiant les aminoglycosides**

Le mécanisme le plus fréquent est la production d'enzymes stéréo-spécifiques capables de modifier des fonctions (NH<sub>2</sub> ou OH) bien précises sur les molécules d'aminoside, empêchant ces dernières de se fixer sur le ribosome. Trois classes d'enzymes ont été décrites, à savoir les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-O-nucléotidyl transférases (ANT) et les aminosides-O-phosphotransférases (APH) (Mérens et al., 2011).

Ces enzymes peuvent inactiver chimiquement différentes molécules d'aminoglycoside par de nombreuses modifications différentes : phosphorylation, acétylation et adénylation (Cottalorda, 2020).

➤ **Faible perméabilité de la membrane externe**

*P. aeruginosa* possède plusieurs pompes d'efflux qui expulsent les médicaments avec d'autres substances hors de la cellule bactérienne (**Pachori et al., 2019**).

**III.2.2.3. Résistance acquise aux fluoroquinolones**

Les mécanismes les plus répandus favorisant la résistance à la fluoroquinolone chez *P. aeruginosa* impliquent des mutations dans les régions déterminant la résistance aux quinolones (QRDR), telles que (*gyrA* et *gyrB*) dans l'ADN gyrase et (*parC* et *parE*) dans la topoisomérase IV, ainsi qu'une surexpression du système d'efflux (**Zhao et al., 2020**).

Des mutations dans les gènes codants pour les pompes à efflux entraînant une diminution de l'expression des porines de la membrane externe (Troubles de la perméabilité) (**Yang et al., 2015**).

**III.2.2.4. Résistance acquise à la fosfomycine**

Elle est fréquente chez 70 à 80% des souches. Les mécanismes de résistances existants sont : Défaut de transport de l'antibiotique, Enzymes inactivatrices, Glutathion transférase, hydrolase (**Elmeskini, 2011**).

**III.2.2.5. Résistance acquise à la colistine**

Les mécanismes de résistance à la colistine n'ont pas été complètement compris, mais il existe plusieurs mécanismes possibles. En général, les deux principaux mécanismes de résistance à la colistine chez *P. aeruginosa* sont les mutations et l'adaptation (**Reza Goli et al., 2016**). Ces mutations vont modifier la composition de sa membrane externe de façon à la rendre imperméable à cet antibiotique (**Mérens et al., 2011**).

- Modification de LPS par l'ajout de groupements cationiques à la surface du lipopolysaccharide est médié par le gène *eptA*. Cet ajout de groupements peut être dû à des mutations chromosomiques mais aussi à l'acquisition de gènes portés par des plasmides.
- Régulation par les systèmes à deux composants (*PmrAB*, *ParRS*, *CprRS*) pour s'adapter à l'environnement (faible concentration en  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) (**Jayol, 2018**).

# *Partie expérimentale*

# *Matériel et Méthodes*

## I. MATERIEL ET METHODES

L'étude est réalisée au niveau du laboratoire AMAWAZ Lab à Béni Mered et au laboratoire d'hygiène de Blida, durant une période allant du mois de Mars jusqu'au mois de Juin 2022.

Les prélèvements sont effectués à partir des boues de trois stations d'épuration qui sont : la station de Baraki, la station de Béni Mered et la station de Ben Chaabane.

### I.1. Présentation des stations

Dans cette étude, les stations d'épuration sont situées sur l'axe Alger-Blida. La première station de Baraki est située à environ 18km au sud-est d'Alger et à 35km au nord-est de Blida. La deuxième se trouve à Boufarik (Ben Chaabane), au nord de la wilaya de Blida et la troisième est à proximité de l'oued Béni aza (Béni Mered). Les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau IX** : Caractéristiques techniques des trois stations

	<b>Station de Ben Chaabane</b>	<b>Station de Baraki</b>	<b>Station de Béni Mered</b>
<b>Types d'effluents traités</b>	Eaux usées domestiques et industriels	Eaux résiduaires urbaines	Eaux usées domestiques et industriels
<b>Types de traitement</b>	Boues activées à moyenne charge	Boues activées à moyenne charge	Boues activées
<b>Capacité nominale</b>	375 000 Eq/hab	1800 000 Eq/hab	383 000 Eq /hab
<b>Débit journalier</b>	60 000 m <sup>3</sup> /j	300 000 m <sup>3</sup> /j	39 500 m <sup>3</sup> /j
<b>Débit horaire moyen</b>	2 500 m <sup>3</sup> /h	12 450 m <sup>3</sup> /h	1 647 m <sup>3</sup> /h
<b>Débit horaire pointe temps sec</b>	4 000 m <sup>3</sup> /h	19 200 m <sup>3</sup> /h	3 310 m <sup>3</sup> /h

(Veolia, 2017)

Dans ces stations, il existe deux filières : la filière eau et la filière boues. La figure suivante (Figure 2) résume les principales étapes de traitement des boues résiduaires :

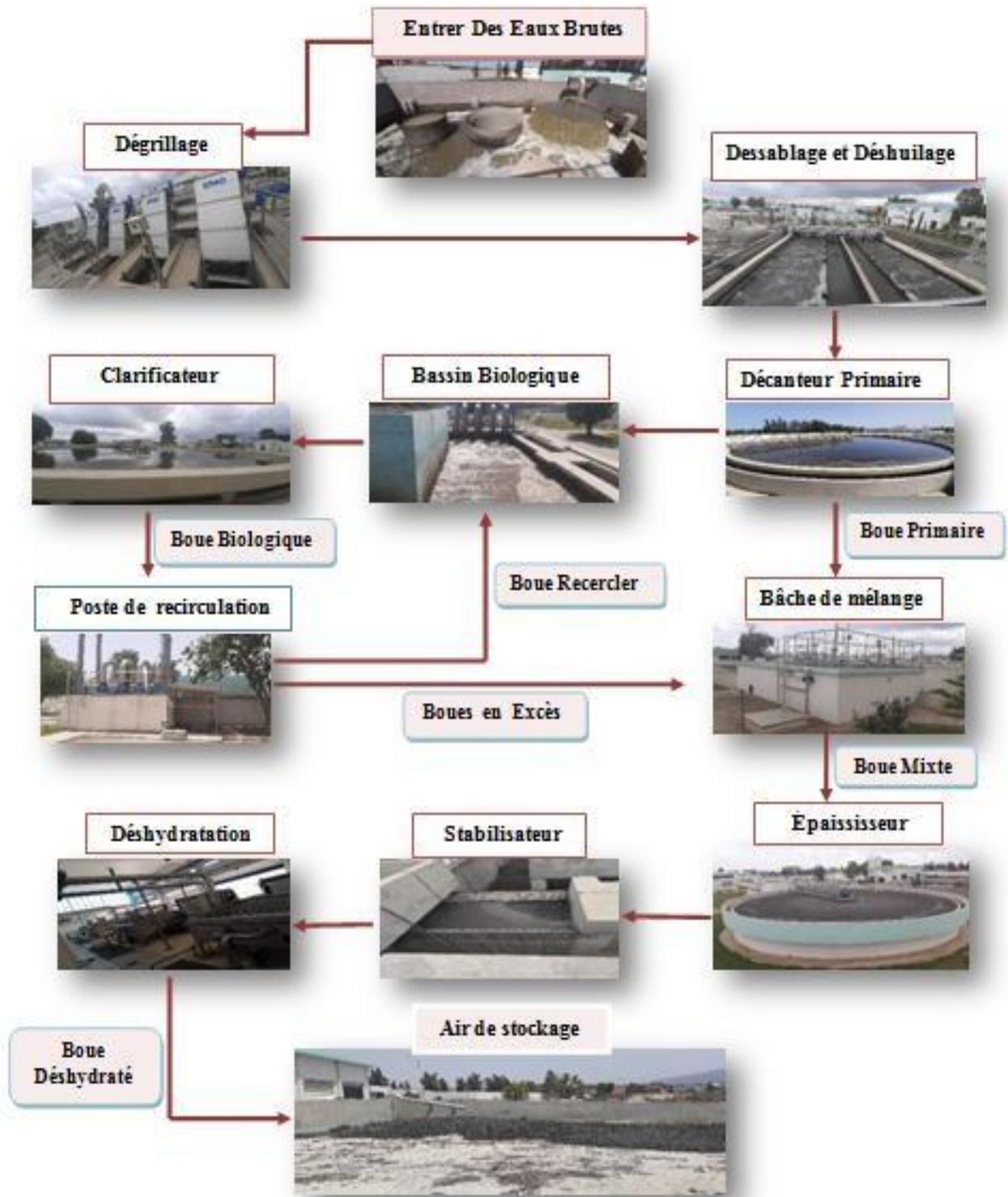


Figure 2 : Différente étapes de traitement des boues (Filière boues)

## I.2. Matériel

### ➤ Matériel Biologique

Représenté par les prélèvements des boues résiduaires, souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922.

### ➤ Matériel non Biologique

Représenté principalement par des milieux de culture, des réactifs et des appareillages (voir annexe).

## I.3. Méthodes

### I.3.1. Mode de prélèvement

Au total, 18 échantillons de boues ont été prélevés à raison de 6 échantillons par station. Nous avons prélevé les échantillons de boues d'une façon aléatoire à partir de l'aire de stockage des trois stations (**Figure 3**) (**Tableau X**).



**Figure 3 :** Echantillons de boues (Photo originale)

**Tableau X :** Informations sur les échantillons des boues

	<b>Station Ben Chaabane</b>	<b>Station Baraki</b>	<b>Station Béni Mered</b>
<b>Echantillonnage</b>	Deux échantillons par mois (Mars, Avril, Mai)		
<b>Durée de séjour des boues de chaque station</b>	1 à 2 ans	Des mois	3 jours
<b>Consistance</b>	Boue Sèche	Boue pâteuse	Boue Humide
<b>Quantité prélevé</b>	500 g pour chaque échantillon		

La figure suivante (**Figure 4**) résume le Protocole expérimental réalisé dans cette étude.

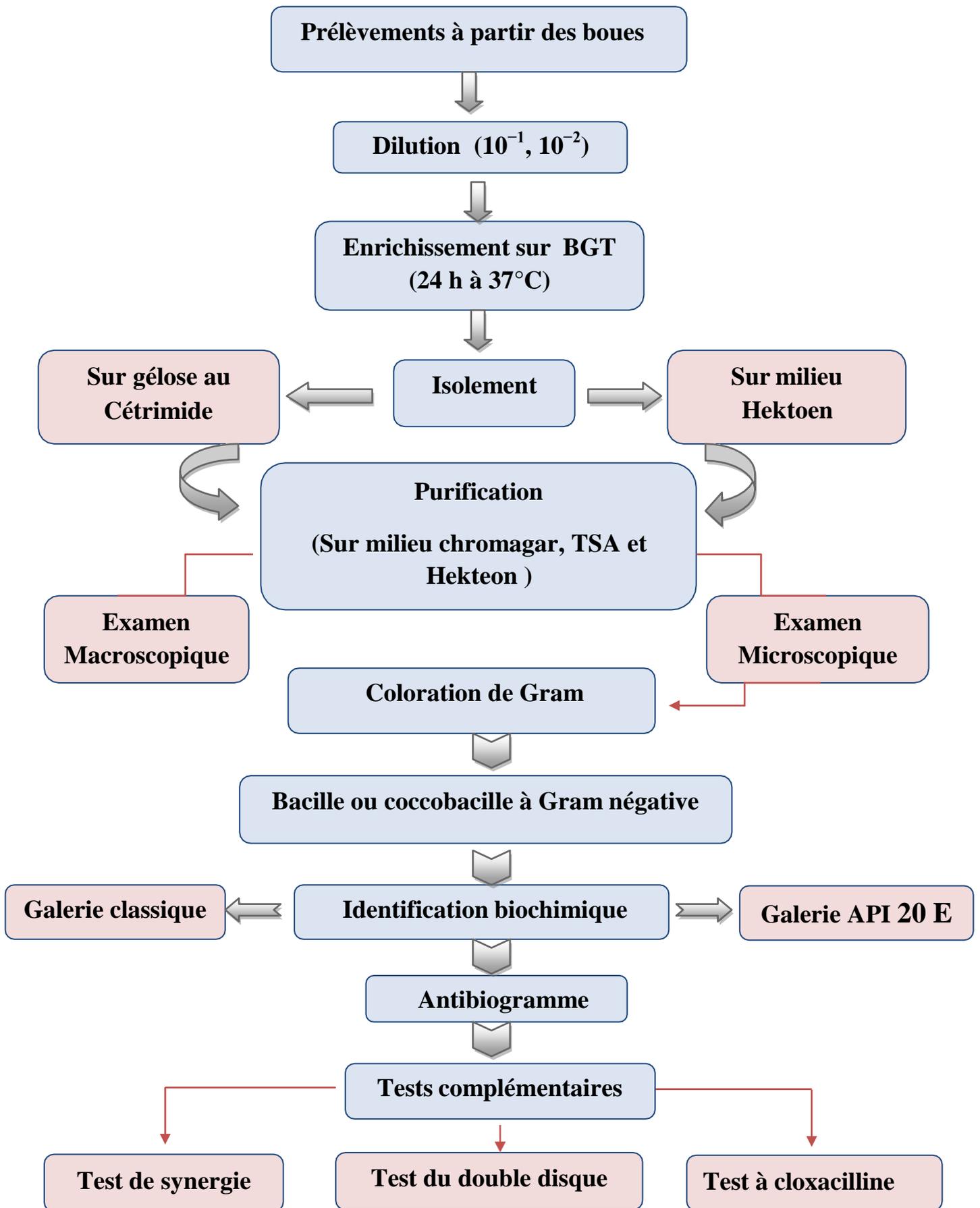


Figure 4 : Organigramme du protocole expérimental réalisé dans cette étude

### **I .3.2.Dilution et Enrichissement**

- On prépare une solution mère contenant 10g de boue prélevée dans 90 ml d'eau distillée stérile.
- À l'aide d'une pipette graduée, on prend 18 ml d'eau physiologique dans un tube stérile et on rajoute 2 ml de la solution mère préparée.
- À partir de la suspension diluée précédemment, on prend 2 ml de la suspension dans 15 ml de bouillon BGT. On l'incube à 37°C pendant 24 h.

### **I .3.3.Isolement et Purification**

L'isolement est effectué sur deux milieux de culture : la gélose Hektoen (*Enterobacteriaceae*) et la gélose au Cétrimide (*Pseudomonas*).

À l'aide d'une pipette Pasteur, on prend une goutte de la suspension bactérienne sur le milieu de culture et on ensemence la surface de la gélose par la méthode de cadrant.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, on sélectionne les colonies pures pour les identifier. Les colonies apparues non pures vont subir une purification.

La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le milieu Hektoen, TSA et Chromagar jusqu'à l'obtention d'isolats purs.

### **I .3.4.Examen macroscopique**

L'examen macroscopique se fait à l'œil nu dans le but de déterminer la couleur, l'aspect et la forme des colonies bactériennes.

### **I .3.5.Examen microscopique**

#### **I .3.5.1.Coloration de Gram**

Elle permet de différencier entre les Gram + et les Gram - selon les propriétés de la paroi bactérienne. Sur une lame :

- On met une goutte d'eau distillée puis on ajoute une colonie bactérienne et l'en homogénéise
- On fait passer la lame sur la flamme du Bec afin de fixer la suspension bactérienne
- Après séchage, on recouvre la lame avec du violet de Gentiane (pendant 1min)
- On rince avec l'eau distillée

- On ajoute le Lugol (pendant 1min)
- On rince avec l'eau distillée
- On trempe la lame dans l'alcool (Décoloration) pendant 30sec
- On rince avec l'eau distillée
- On recouvre la lame par la fuschine (pendant 30sec)
- On rince avec l'eau distillée puis on la laisse sécher
- On met une goutte de l'huile d'immersion puis on observe sous microscope (Objectif X100)

❖ **Lecture**

Coloration rose : bactéries Gram – / Coloration bleu-violet : bactéries Gram +

**Tests biochimiques**

**I.3.6.1. Galerie classique**

 **Test d'oxydase**

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence l'enzyme Phénylène diamine oxydase

Sur une lame, on dépose un disque d'oxydase et on imbibe le disque par l'eau physiologique. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on prélève une colonie bactérienne et on la gratte sur le disque.

❖ **Lecture : Immédiate**

Coloration de disque en violet : oxydase + / Disque incolore : oxydase –.

 **Test de catalase**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) formé comme sous produit de processus métaboliques.

Sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), ensuite à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné, on prélève une colonie bactérienne isolée du germe à étudier et on la dépose sur la goutte d'eau oxygénée.

### ❖ **Lecture** : Immédiate

Dégagement de bulles d'aire : catalase + / Absence de bulles d'aire : catalase –

### ✚ **Triple Sugar Iron (TSI)**

Permet de mettre en évidence la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S.

On prépare la suspension bactérienne en eau distillée stérile à partir d'une colonie isolée suspecte. Ensuite, on ensemence le culot par piqûre centrale et la pente par stries et on incube à 37°C pendant 24 h, avec bouchon desserré.

### ❖ **Lecture**

- Fermentation du glucose : le culot devient jaune.
- Fermentation du saccharose et /ou lactose : la pente devienne jaune.
- Production de gaz : production des bulles d'aires ou bien décollement de la gélose.
- Production H<sub>2</sub>S : noircissement du milieu.

### ✚ **Citrate de Simmons**

Ce test détermine la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme une seule source de carbone.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on ensemence la pente par série de stries longitudinales à partir d'une suspension bactérienne en eau distillée stérile et on incube à 37°C pendant 24 h.

### ❖ **Lecture**

- Citrate de Simmons positif : virage de couleur en bleu.
- Citrate de Simmons négatif : pas de virage de couleur.

### ✚ **Urée Tryptophane ou Urée Indole**

Le milieu Urée Indole permet la mise en évidence de l'uréase, du tryptophane désaminase et de la production d'indole

On met quelque goutte de la suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune et pure dans le milieu urée indole et on incube à 37°C pendant 24 h.

### ❖ Lecture

#### **Pour l'uréase**

- Le milieu vire au rouge violacé : uréase positive
- La coloration du milieu reste inchangée : uréase négative

#### **Pour l'indole** : après addition de réactif kovacs

- Formation d'anneau rouge : indole positive
- Absence d'anneau rouge : indole négative

#### **Pour le TDA** : après addition de 1 à 2 gouttes de TDA

- Coloration brune rouge : TDA positif
- Coloration jaune orangée : TDA négatif

### **ONPG (Ortho-Nitro-Phenyl pyrano-Galactoside)**

Le test d'ONPG est utilisé pour la recherche de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, présente chez les bactéries lactose négatif.

A partir de 1 ml de la suspension bactérienne (colonie bactérienne + eau physiologique) on rajoute un disque d'ONPG prêt à l'emploi et on incube à 37°C pendant 24 h.

### ❖ Lecture

Milieu jaune : ONPG + / Milieu reste incolore : ONPG –

### **Bouillon Clark et Lubs**

Il permet de différencier les *Enterobacteriaceae* avec les réactions au Rouge de Méthyle (RM) et de Voges-Proskauer (VP).

A partir d'une suspension bactérienne et à l'aide d'une pipette Pasteur, on met quelques gouttes de la suspension dans le bouillon Clark et Lubs. On l'incube à 37°C pendant 24h.

### ❖ Lecture

Après 24h, on divise le volume dans deux tubes stériles :

Dans le premier tube, on met quelques gouttes du réactif RM :

- Coloration rouge : RM+ / Coloration jaune : RM –

Dans le deuxième tube, on met quelques gouttes du réactif VP1 et VP2 et on attend quelques minutes pour faire la lecture.

- Anneau rouge : VP+ / Absence de l'anneau : VP –

### ✚ Mannitol mobilité

Il permet l'étude de la fermentation du mannitol ainsi que l'observation de la mobilité des bactéries.

À l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève quelque goutte de la suspension bactérienne de la souche à tester et on fait une piqure centrale. On incube à 37°C pendant 24 h.

### ❖ Lecture

- Coloration jaune-orange : Mannitol + / Coloration rouge : Mannitol –
- Présence de diffusion autour de la piqure : Mobilité + / Absence de diffusion : Mobilité –

### ✚ LDC, ODC et ADH

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae* des *Pseudomonadacea* est souvent facilité par la recherche de la lysine-décarboxylase (LDC), de l'ornithine-décarboxylase (ODC) et de l'arginine-dihydrolase (ADH).

À l'aide d'une pipette Pasteur, on met quelques gouttes de la suspension bactérienne de la souche à tester dans les trois tubes d'LDC, ODC et d'ADH. On les incube à 37°C pendant 24h.

### ➤ Lecture

Couleur violet : Résultats +      Couleur jaune : Résultats –

### **I .3.6.2. Galerie miniaturisée (Api 20 E)**

La galerie Api est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelle, elle comprend 20 tests biochimiques qui permettent l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les *Enterobacteriaceae*. Pour cela, nous avons suivi les étapes suivantes :

- ❖ **Préparation de la galerie** : On réunit le fond et le couvercle de la boîte d'incubation et on remplit les alvéoles avec de l'eau distillée pour créer une atmosphère humide, ensuite on dépose stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- ❖ **Préparation de l'inoculum** : On prélève une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé et on la met dans un tube d'eau distillée stérile pour réaliser une suspension bactérienne de 0.5 Mc Farland.
- ❖ **Inoculation de la galerie** : On introduit la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, on pose le point de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
  - Pour les tests CIT, VP, GEL on remplit tube et cupule.
  - Pour les autres tests, on remplit uniquement les tubes.
  - Pour les tests LDC, ODC, ADH, H<sub>2</sub>S et Urée, on crée une anaérobiose en remplissant leurs cupules par l'huile de vaseline.
  - On referme la boîte et on incube à 37°C pendant 24 h.
  
- ❖ **Lecture** : Figure 19 (voir annexe)

### **I.3. 7. Antibiogramme**

L'antibiogramme est une technique in vitro qui a pour objectif de tester la sensibilité d'une souche bactérienne par rapport à un ou plusieurs antibiotiques. La méthode utilisée dans notre étude est la technique de diffusion sur milieu gélosé. Nous avons utilisé la méthode de standardisation de l'antibiogramme préconisées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et recommandées par l'OMS.

Les conditions de la réalisation de l'antibiogramme est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XI :** Conditions de réalisation de l'antibiogramme

<b>Milieu de culture</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Doit permettre la croissance de nombreuses bactéries.</li><li>- Ne doit pas contenir d'inhibiteurs des antibiotiques.</li><li>- La teneur en calcium et en magnésium doit être contrôlée.</li><li>- Le PH doit être compris entre 7.2 et 7.4.</li><li>- Le milieu retenu pour la plupart des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton (Il doit être coulé en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm et doivent être séchées avant l'emploi).</li></ul>
<b>Incubation</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie.</li></ul>
<b>Inoculum</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- La suspension bactérienne doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure.</li><li>- En Algérie, l'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibré à 0.5McF ou a une D.O de 0.08 à 0.10 lue à 625nm contenant environ 108 bactéries par ml.</li></ul>

(Rahal et al., 2020)

### **I .3.7.1.Antibiogramme par diffusion des disques**

Dans cette étude, le choix des antibiotiques utilisés a été réalisé selon la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8ème édition 2020. La liste des antibiotiques testés sur les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* est présentée dans le Tableau XXVI (voir annexe).

#### **❖ Préparation de l'inoculum**

- À partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur le milieu Mueller-Hinton, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml de l'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Et on homogénéise la suspension bactérienne.

### ❖ **Inoculation**

- On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- On l'essore en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas en stries serrées.
- On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois, sans nous oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. On finit l'inoculation en passant l'écouvillon sur le périphérique de la gélose.
- Dans le cas où on inocule plusieurs boîtes de pétri, il faut qu'on recharge l'écouvillon à chaque fois.

### ❖ **Application des disques d'antibiotiques**

- On dépose les disques d'antibiotique (pas plus de 6 disques) sur la boîte (90 mm).
- On presse chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile (on évite de déplacer les disques après application).

### ❖ **Lecture**

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle (les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de pétri fermée)
- On compare les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Et on classe la bactérie dans l'une des catégories : Résistant (R), Sensible (S) ou Intermédiaire (I).

### **I .3.7.2. Test de synergie**

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inactivées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Acide clavulanique, sulbactam et tazobactam), Le test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases et un disque de C3G ou un monobactame.

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10  $\mu$ g) à 30mm centre à centre d'un disque de CTX (30 $\mu$ g) ou CAZ (30 $\mu$ g) ou ATM (30 $\mu$ g).

On incube à 37°C pendant 16 à 18 h.

- ❖ **Lecture :** La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie entre les disques : AMC et CTX, AMC et CAZ, AMC et ATM.

### **I .3.7.3. Test du double disque**

Ce test devra être fait systématiquement devant l'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G (CAZ ou CTX).

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme :

- On dépose un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CAZ) à une distance de 30mm (centre à centre).
- On laisse les antibiotiques diffuser pendant une heure, à température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut.
- Après une heure d'incubation, on ôte le disque d'AMC et on le remplace par un disque de CTX ou CAZ.
- On incube la boîte à 35°C pendant 16 à 18h.

#### ❖ **Lecture et Interprétation**

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G (CTX ou CAZ), appliqué après diffusion du disque AMC est  $\geq 5$ mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G (CTX ou CAZ).

#### **I.3.7.4. Test à la Cloxacilline**

La Cloxacilline, ajoutée au milieu pour l'antibiogramme (MH), inhibe in vitro les CHN et révélera les autres mécanismes de résistance (pénicillinases et BLSE).

L'antibiogramme pour les  $\beta$ -lactamines sera réalisé simultanément sur MH et sur MH additionné de cloxacilline.

Le contrôle de qualité sera réalisé avec la souche *E.coli ATCC 2592*.

##### **❖ Lecture**

Le test à la cloxacilline est interprété en comparant l'antibiogramme réalisé sur MH additionné de cloxacilline avec celui réalisé sur MH sans cloxacilline.

CHN positif se traduit par l'augmentation des diamètres d'inhibition.

##### **❖ Interprétation**

L'inhibition de la CHN entraîne :

L'apparition des phénotypes sauvages de l'Entérobactérie ou l'apparition d'autres mécanismes de résistance acquise tels que :

- Production de BLSE
- Production de pénicillinase
- Imperméabilité.

## *Résultats et discussion*

## **II. RESULTATS ET DISCUSSION**

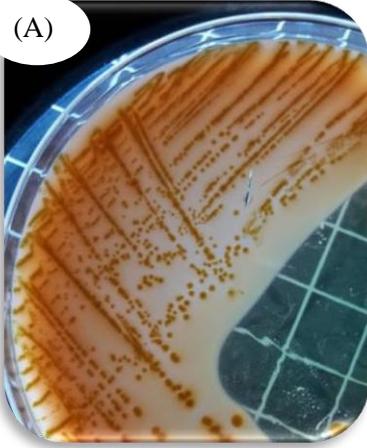
Du mois de Mars 2022 jusqu'au mois de Juin 2022, un total de 18 échantillons de boues résiduaires (6 échantillons/station) ont été prélevés à partir de trois STEPs différentes, il s'agit de la : STEP de Béni Mered , STEP de Baraki et celle de Ben Chaabane .

Après culture, isolement et identification, nous avons obtenu les résultats suivants :

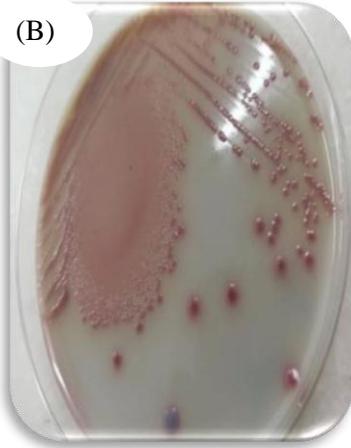
### **II .1. Résultats de l'identification bactérienne**

Les résultats obtenus après culture, isolement et identification biochimique par la galerie classique et la galerie API 20 E sont présentés par les tableaux numérotés de **XII– XXI**. Toutes les photos sont originales.

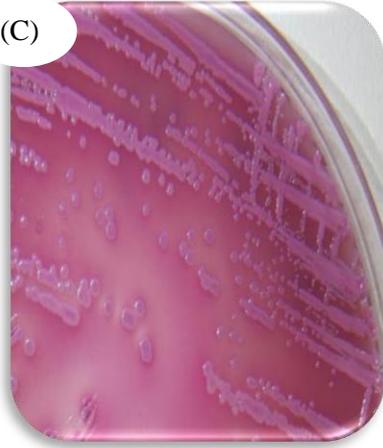
Tableau XII : Résultats de l'identification d'*Escherichia coli*



(A)



(B)



(C)

**Culture**

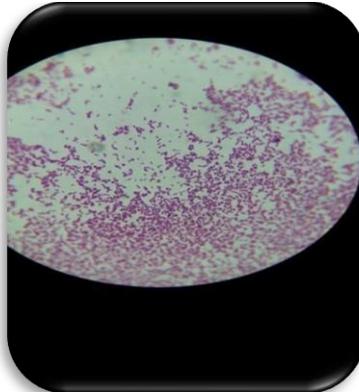
**Sur Hekteon** : colonies orange, petite, arrondie avec un aspect d'œuf sur plat

**Sur Mac Conkey** : Colonies rose, mates, arrondies avec un centre bombé

**Sur Chromagar** : Colonies roses pale, rondes, brillantes

---

**Coloration de Gram (10X100) : Coccobacille, Gram négatif**



**TSI**

Lactose /saccharose: +

Glucose: +

H2S: -

Gaz : +



---

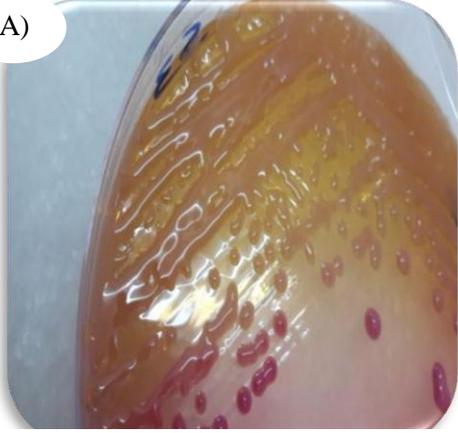
**Galerie API 20 E**



+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

**Tableau XIII : Résultats de l'identification de *Klebsiella***

(A)



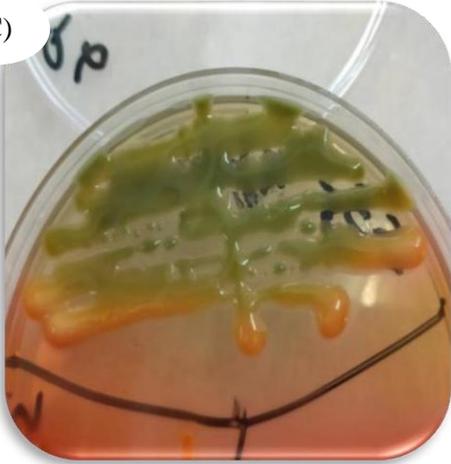
**Sur Mac conkey** : Colonies rondes, muqueuse (gluante), de couleur brune, brillantes

(B)



**Sur Chromagar** : colonies de couleur bleu, brillantes

(C)

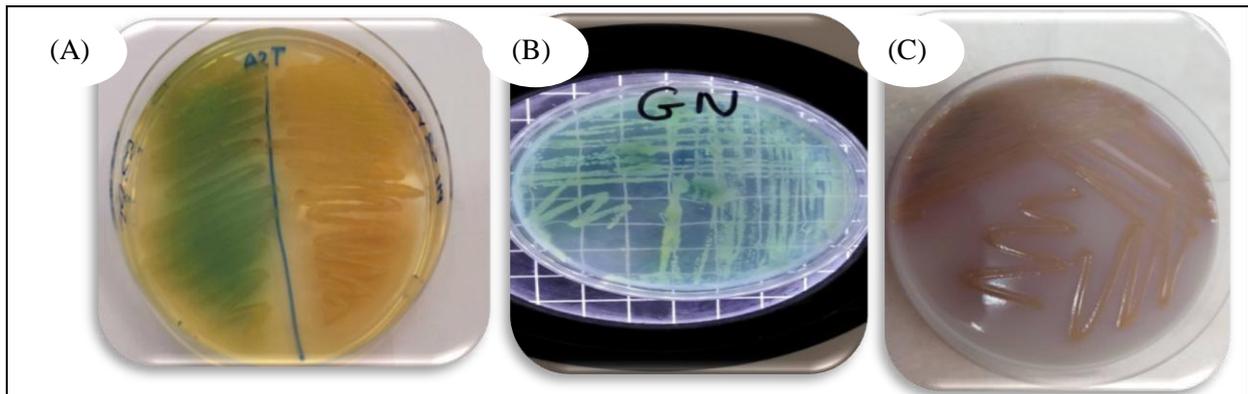


**Sur Hekteon** : Colonies muqueuses de couleur vert –orange

**Galerie Api 20 E**

																			
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

Tableau XIV : Résultats de l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*



**Culture**

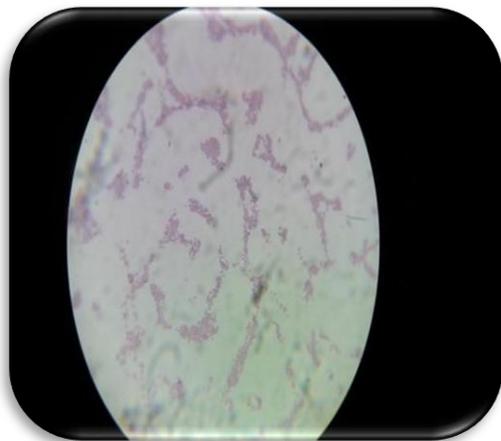
**Sur TSA** Colonies vertes brunes avec un aspect muqueux

**Sur Chromagar** Colonies de couleur brune

**Sur gélose nutritive** : Colonies de couleur bleu-vert, à bord irrégulier, bombée présentant des reflets métalliques.

**Odeur** : florale caractéristique d'acacia

**Coloration de Gram (10X100)** : Bacille, Gram négatif



**TSI**

Lactose /saccharose: -

Glucose: -

H<sub>2</sub>S: -

Gaz : -

Oxydase +

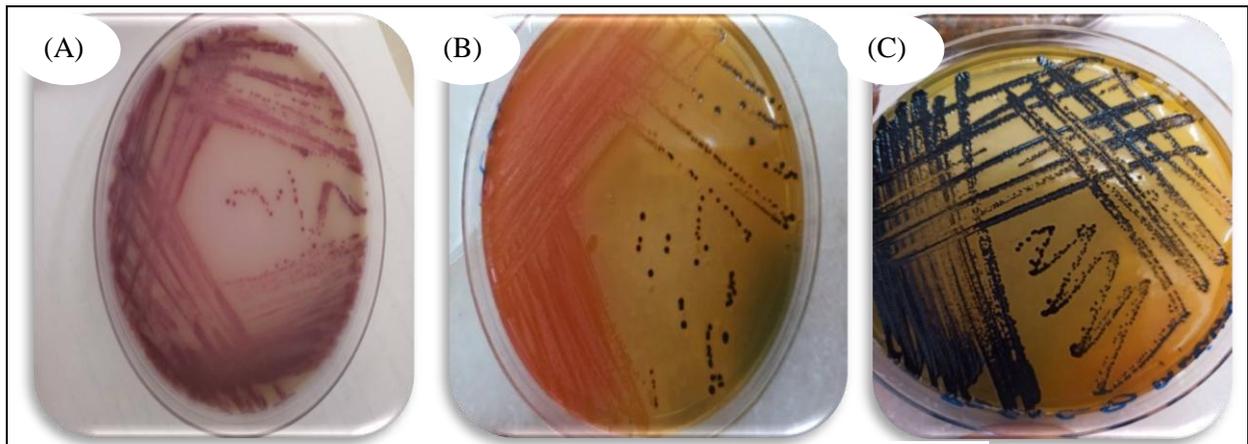


**Galerie API 20<sup>E</sup>**



(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

**Tableau XV:** Résultats de l'identification de *Citrobacter*

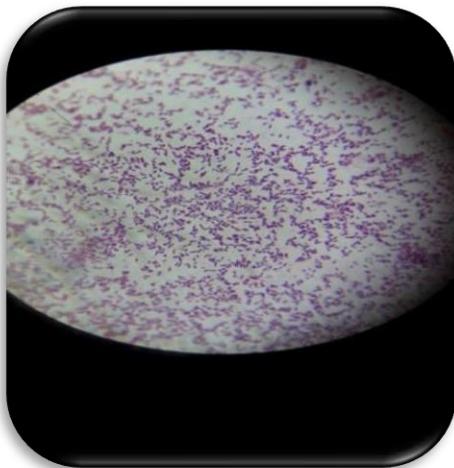


**Culture**

**Sur Hekton :** Colonies rondes, orange à centre noir, brillantes

**Sur Chromagar :** Colonies de couleur violette

**Coloration de Gram (10X100) :** Bacille, Gram négatif



**TSI**

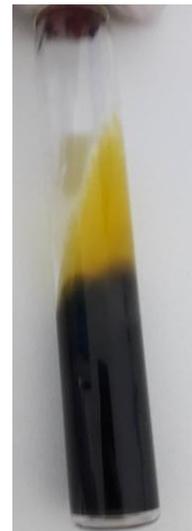
Lactose /Saccharose+

Glucose –

H<sub>2</sub>S+

Gaz –

Catalase +

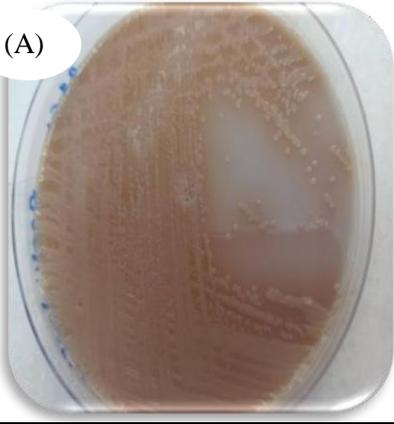
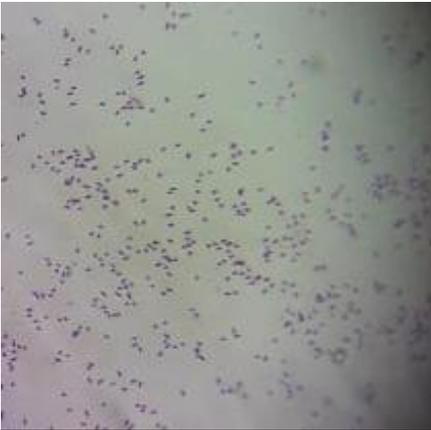
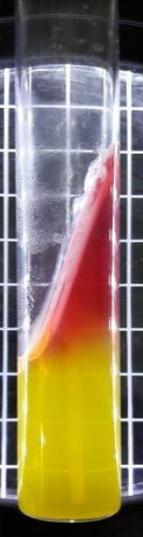


**Galerie Api 20<sup>E</sup>**



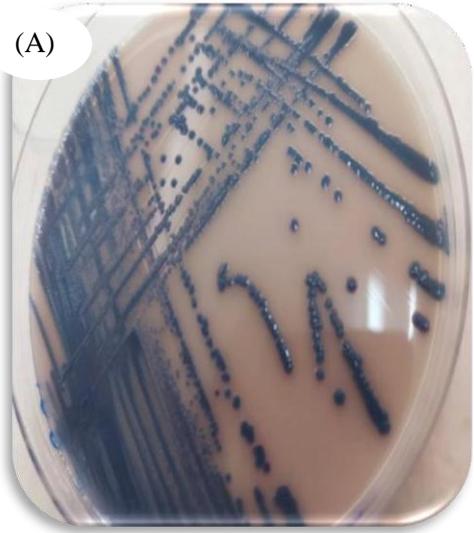
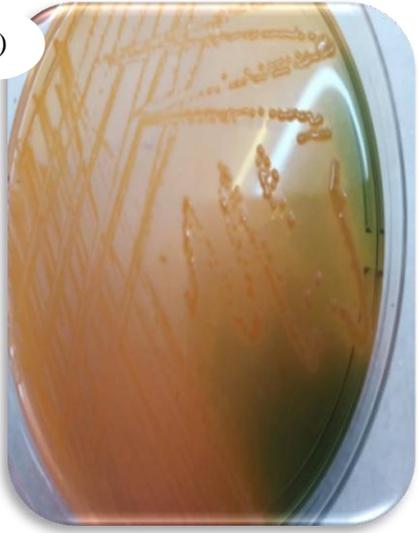
(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

**Tableau XVI :** Résultats de l'identification de *Providencia - Morganella*

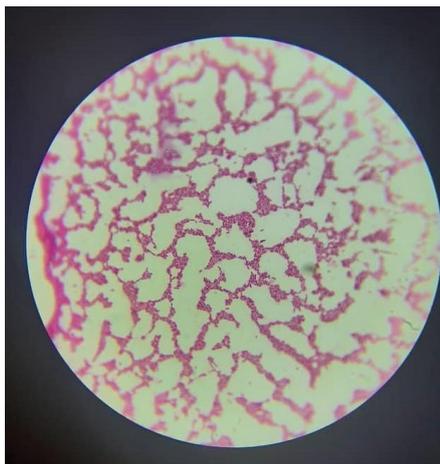
 <p>(A)</p>	<p align="center"><b>Culture</b></p> <p><b>Sur Hekteon :</b> Petites colonies de couleur orange /verte avec un centre foncé, rondes, brillantes</p> <p><b>Sur Chromagar :</b> Petites colonies bombées blanches, brillantes avec un reflet brun</p>	 <p>(B)</p>																																								
<p><b>Coloration de Gram (10X100) :</b> Coccobacille, Gram négatif</p> 		 <p align="center"><b>TSI</b></p> <p>Lactose /saccharose -</p> <p>Glucose +</p> <p>H2S -</p> <p>Gaz -</p>																																								
<p><b>Galerie Api 20 E</b></p>  <table border="1" data-bbox="193 1489 1401 1630"> <tr> <td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(+)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td><td>(-)</td> </tr> <tr> <td>ONPG</td><td>ADH</td><td>LDC</td><td>ODC</td><td>CIT</td><td>H2S</td><td>URE</td><td>TDA</td><td>IND</td><td>VP</td><td>GEL</td><td>GLU</td><td>MAN</td><td>INO</td><td>SOR</td><td>RHA</td><td>SAC</td><td>MEL</td><td>AMY</td><td>ARA</td> </tr> </table>			(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)																							
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA																							

<b>Identification <i>Morganella</i></b>			
<b>ADH -</b> 	<b>LDC -</b> 	<b>ODC +</b> 	<b>Citrate -</b> 
<b>TDA +</b> 	<b>Urée +</b> 	<b>Indole +</b> 	<b>VP -</b> 
<b>ONPG -</b>		<b>H2S -</b>	

**Tableau XVII:** Résultats de l'identification d'*Enterobacter*

 <p>(A)</p>	<p><b>Culture</b></p> <p><b>Sur Hekteon</b></p> <p>Colonies arrondies de couleur orange, brillantes, muqueuse</p> <p><b>Sur Chromagar</b></p> <p>Colonies rondes, de couleur bleu, bombé, brillantes</p>	 <p>(B)</p>
--	--	---

**Coloration de Gram (10X100) :** Bacille, Gram négatif



**TSI**

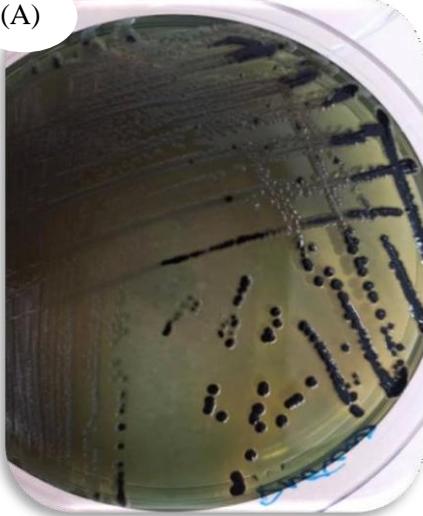
Lactose /saccharose +/-  
 Glucose +  
 H<sub>2</sub>S -  
 Gaz +



**Galerie Api 20<sup>E</sup>**

																			
(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

**Tableau XVIII : Résultats de l'identification de *Proteus***

(A) 

**Culture**

**Sur Hekteon**

Colonies vertes à centre noire, bombées, brillantes, muqueuses,

**Sur Chromagar**

Petites colonies bombées blanches, brillantes avec un reflet brun

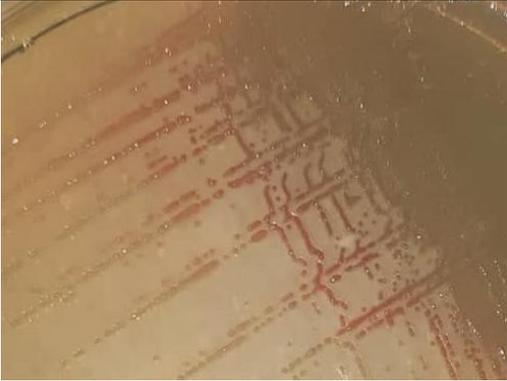
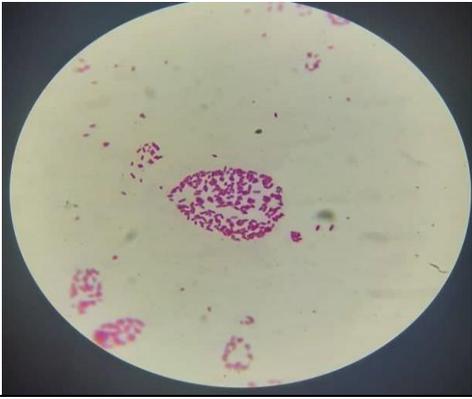
(B) 

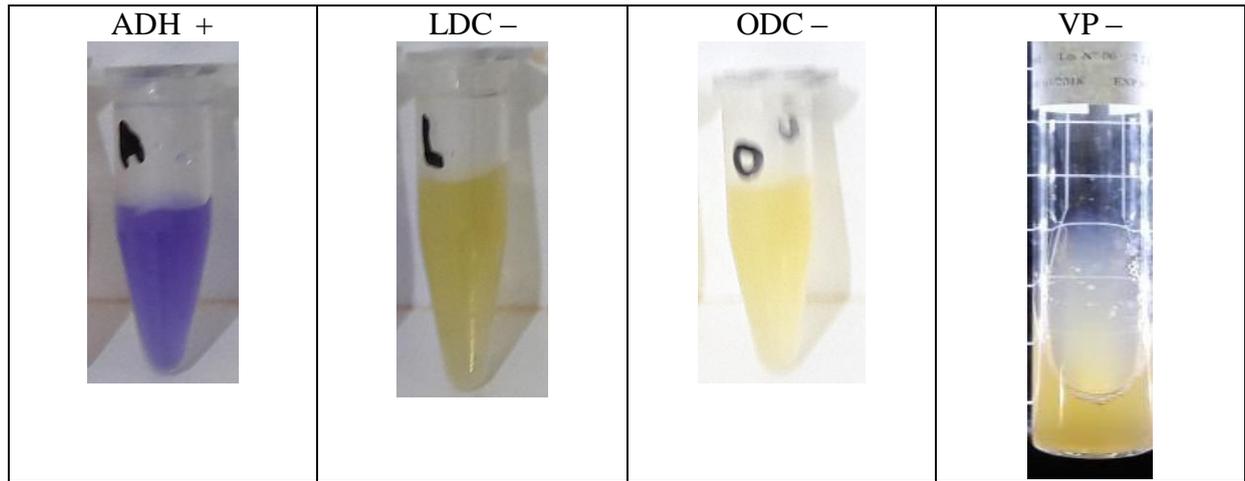
**Galerie Api 20 E**



-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H2S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>	<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

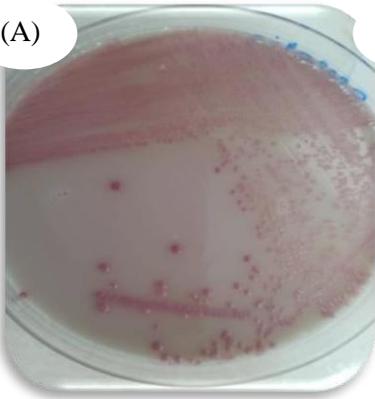
**Tableau XIX : Résultats de l'identification de *Pantoea* spp**

		<b>Culture</b> Sur gélose Hektoon : Petites colonies de couleur vertes/oranges.	
<b>Coloration de Gram (10X100) : Bacille, Gram négatif</b>			
		<b>TSI</b> Lactose /saccharose + Glucose + H2S - Gaz +	
<b>ONPG +</b>		<b>TDA -</b>	<b>Citrate -</b>
<b>Urée -</b> 	<b>Indole +</b> 		

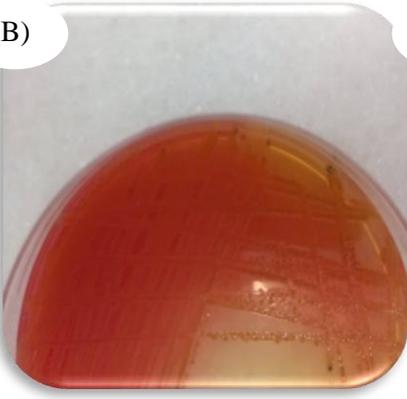


**Tableau XX : Résultats de l'identification de *Serratia***

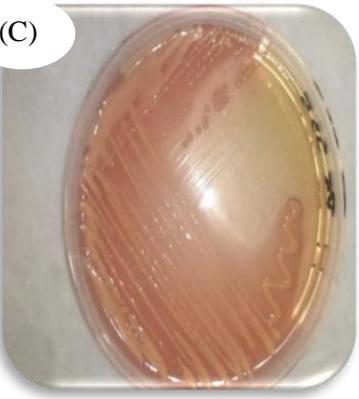
(A)



(B)



(C)



**Culture**

**Sur Hekteon :** Colonies de couleur orange/rouge

**Sur Chromagar :** Colonies rondes de couleur rose

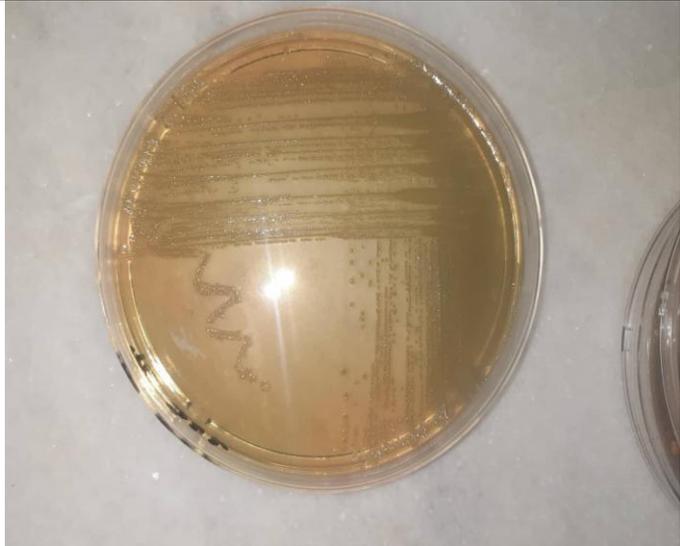
---

**Galerie Api 20 E**



(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H2S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>	<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

**Tableau XXI :** Résultats de l'identification de *Leclercia - Plesiomonas*

		<p><b>Culture</b></p> <p>Colonies brillantes de couleur verte</p>	
		<p><b>Identification <i>Leclercia</i></b></p>	
<p>Lactose/Saccharose –                  Glucose +                  Gaz +                  H<sub>2</sub>S –                  Citrate –                  LDC –                  ODC –                  ADH –</p>		<p>Urée –                  Indole +                  TDA –                  VP –                  RM+                  ONPG –</p>	
<p><b>Identification <i>Plesiomonas</i></b></p>			
<p>Citrate –                  Urée –                  Indole –                  TDA –                  VP+                  RM+</p>		<p>LDC +                  ODC+                  ADH+                  Lactose/Saccharose -                  Glucose +                  H<sub>2</sub>S-                  Gaz –                  ONPG+</p>	

Au total, nous avons identifié 90 germes appartenant aux Entérobactéries, 16 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et 7 germes appartenant à d'autres familles (**Tableau XXII /XXIII**)

**Tableau XXII:** Espèces d'Entérobactéries et de *Pseudomonas* isolées à partir des boues résiduaires

<b>Genre</b>	<b>Espèces</b>
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Escherichia hermani</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae spp</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
	<i>Enterobacter sakazaki</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Citrobacter koseri</i>
	<i>Citrobacter youngae</i>
	<i>Citrobacter farmeri</i>
<i>Proteus</i>	<i>Proteus penneri</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Pleisiomonas</i>	<i>Pleisiomonas shigelloides</i>
<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea spp</i>
<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
	<i>Serratia fonticola</i>
	<i>Serratia rubidaea</i>
	<i>Serratia odorefera</i>
	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Providencia</i>	<i>Providencia stuartii</i>
	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Morganella</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Leclercia</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>

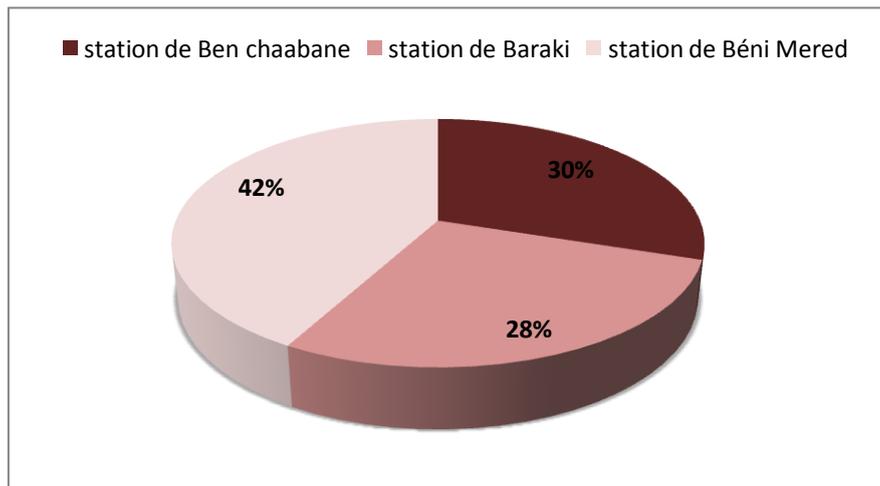
**Tableau XXIII:** Autres bactéries isolées à partir des boues résiduaires

<b>Genre</b>	<b>Espèces</b>
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Flavimonas</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>
<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>

## II.2. Répartition des bactéries isolées selon les stations d'épuration

Les résultats montrent clairement la forte charge microbienne des échantillons des boues résiduaire prélevés.

47 bactéries avec un taux de 42% ont été isolées de la station de Béni Mered. Dans la STEP de Ben Chaabane , 34 bactéries avec un taux de 30% est signalé , alors que dans la STEP de Baraki , 32 bactéries ont été isolées représentées par un taux de 28% (**Figure 5**)



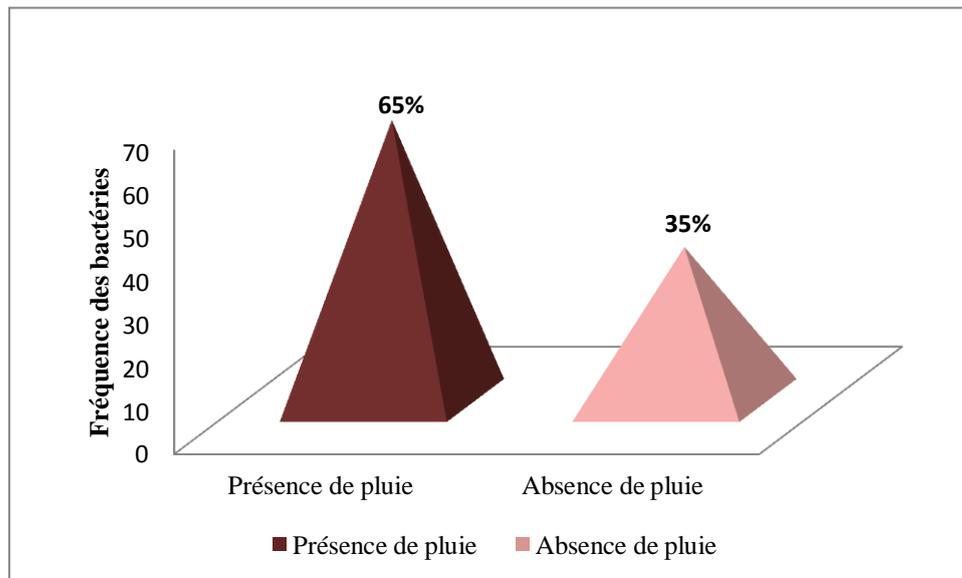
**Figure 5** : Répartition des bactéries isolées des boues résiduaire dans les trois stations

D'après les informations obtenues dans les cahiers de charge des différentes stations, la texture humide de la boue prélevée est à l'origine du taux élevé trouvé dans la station de Béni Mered. L'âge de la boue ne dépasse pas une semaine. Dans les stations de Ben Chaabane et celle de Baraki, on remarque qu'elles présentent un taux de présence des bactéries assez proches probablement du soit à la texture pâteuse et ou /sèche de la boue soit à son âge.

## II. 3. Fréquence des bactéries isolées par saison

La **Figure 6** montre que les bactéries isolées pendant la saison de pluies (Mars, Avril) sont représentées par un taux de 65% alors qu'au mois de Mai, le taux était de 35%.

En l'absence de littérature, nous supposons que cela est dû à la saison et aux variations climatiques. Les saisons à pluviométries élevées ont un impact direct sur la texture et la consistance des boues qui deviennent plus humides favorisant ainsi la prolifération de certaines bactéries.



**Figure 6:** Fréquence des bactéries isolées par saison

#### **II.4. Fréquence des bactéries isolées des boues résiduaires prélevées des trois STEPs**

Les boues d'épuration représentent d'importants réservoirs de bactéries, ce qui représente un danger pour l'environnement et la santé publique si elles sont utilisées sans traitement (**Hosain et al., 2021**).

La fréquence des souches identifiées est variable selon le site de prélèvement. Le taux des Entérobactéries dans les boues des trois STEPs est comme suit : la station de Baraki avec un taux de 27% soit 24/90, la station de Ben Chaabane avec un taux de 30% soit 27/90 et la station de Béni Mered avec un taux de 43% (39/90).

Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, les taux dans les boues dans les trois STEPs sont comme suit : la station de Ben Chaabane avec un taux de 19% soit 3/16, la station de Baraki avec un taux de 31% soit 5/16 et la station de Béni Mered avec un taux de 50% soit 8/16.

Les autres bactéries obtenues présentent les pourcentages suivants : 57% (4/7), 43% (3/7) et 0% dans les stations Ben Chaabane, Baraki et Béni Mered respectivement. (**Figure 7**)

Ces résultats montrent que la station de Béni Mered présente les taux les plus élevés probablement due à l'âge très jeune des boues prélevées (Voir Tableau X : Informations sur les échantillons des boues).

47 isolats bactériens ont été collectés à partir d'échantillons de boues de la ville de Dhaka (Bangladesh) notamment les Entérobactéries avec un nombre de n=41. Pour

*Pseudomonas*, un nombre de n=7 représentait par une seule souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été retrouvé (Aminul et al., 2017).

En revanche, une autre étude menée par Slekovec et al., (2012) ont constaté une concentration plus importante de *P. aeruginosa* dans les boues produites par la station d'épuration de Besançon (France) ( $2,956 \cdot 10^6$  UFC/kg).

Alors que dans les travaux de Huang et al., (2019), d'autres familles bactériennes étaient les plus dominantes dans les boues avec un taux de 76% représentées par les Actinobactéries (44%) et les Protéobactéries (32%) contrairement aux résultats obtenus dans cette étude.

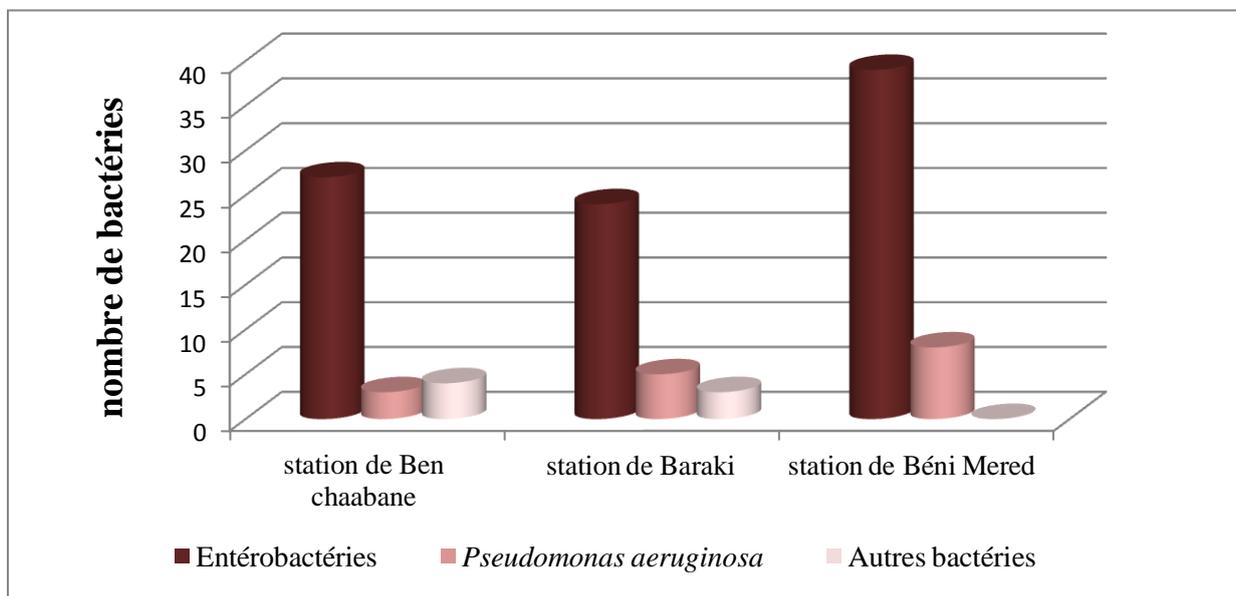


Figure 7: Répartition des Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* selon les STEPs

## II.5. Répartition de l'ensemble des espèces d'*Enterobacteriaceae* et de *Pseudomonas aeruginosa* dans chaque site

Le tableau suivant résume le nombre de germes identifiés dans les boues pour chacune des STEPs.

**Tableau XXIV** : Nombre de souches isolées des boues résiduaires dans chaque STEPs

Souches identifiées	STEP Béni Mered	STEP Ben Chaabane	STEP Baraki
<i>Escherichia coli</i>	6	3	1
<i>Escherichia hermani</i>	2	/	/
<i>Klebsiella terrigena</i>	/	1	/
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	1	1
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae spp</i>	1	/	/
<i>Enterobacter amnigenus</i>	/	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	/	1	3
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	/	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	/	/
<i>Enterobacter sakazaki</i>	/	/	1
<i>Citrobacter freundii</i>	3	2	4
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1	/
<i>Citrobacter youngae</i>	2	4	3
<i>Citrobacter farmeri</i>	1	/	/
<i>Proteus mirabilis</i>	/	1	/
<i>Proteus penneri</i>	/	1	/
<i>Proteus vulgaris</i>	3	1	1
<i>Pleisiomonas shigelloides</i>	1	2	/
<i>Pantoae spp</i>	/	2	1
<i>Serratia odorefera</i>	10	1	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	/	/	1
<i>Serratia fonticola</i>	/	1	/
<i>Serratia ficaria</i>	1	/	/
<i>Serratia rubidaea</i>	/	/	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	3	5
<i>Providencia stuartii</i>	/	2	/
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	/	1
<i>Morganella morganii</i>	/	1	/
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	/	/	2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	/	2	2
<i>Aeromonas salmonicida</i>	/	/	1
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	/	1	/
<i>Shewanella putrefaciens</i>	/	1	/

### II.6. Antibiorésistance

L'application massive et anarchique des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a conduit à la dissémination à grande échelle de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement (**Reinthalier et al., 2003**).

Toutes les souches identifiées ont été testées vis-à-vis de 19 molécules d'antibiotiques, appartenant à 6 familles différentes dont 8  $\beta$ -lactamines, 3 aminosides, 1 phénicolé, 2 fluoroquinolones, 1 quinolone et 1 diaminopyrimidines + sulfamides (Voir **Tableau XXVI** annexe).

#### II .6.1.Antibiorésistance chez les *Enterobacteriaceae*

Les résultats de l'antibiogramme des Entérobactéries (**Figures de 8 à10**), nous ont montré des taux élevés de résistance aux antibiotiques suivant : Ampicilline (AMP) 80%, Amoxicilline+Acide clavulanique (AMC) 73%, Céfazoline (CZ) 73% et Ciprofloxacine (CIP) 67% . Une moindre résistance vis-à-vis de la céfoxitine est détectée 44%.

Concernant la sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques, les résultats obtenus nous ont montré des taux élevés de sensibilité aux antibiotiques suivant : Aztreonam (AT) 83% , Cefoxitine (CX) 56% , Amikacine (AK) 92% , Cefotaxime (CTX) 73% , Chloramphenicol (C ) 89% ,Thriméthoprimine+sulfaméthoxazole(SXT) 71% , Gentamicine(CN) 66% , Imipènème (IPM) 86% et l'Acide nalidixique (NA)77% .

Selon les résultats, les taux de résistance des souches d'Entérobactéries sont de 67% pour CIP et 34% pour CN.

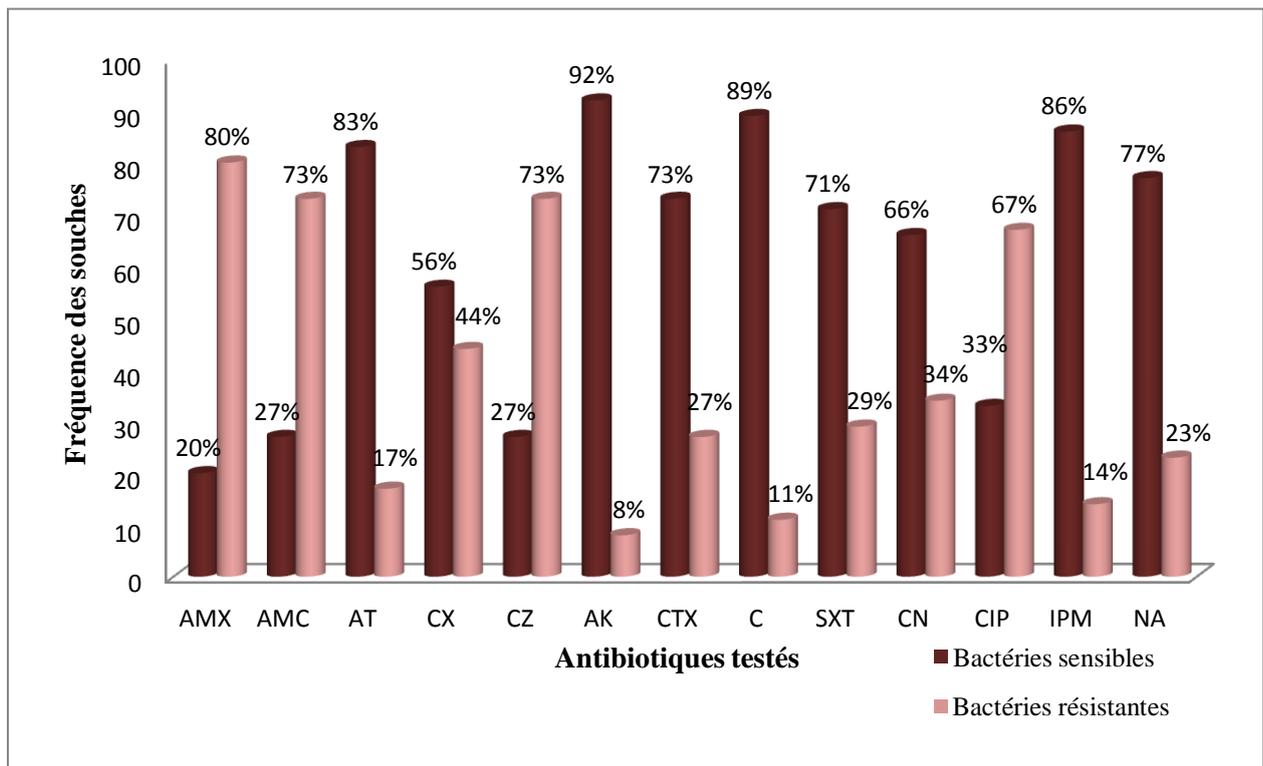
**Galler et al, (2018)** ont obtenu 56,3% de résistance au CIP, 34,4% au CN, 75% de résistance à l'Acide nalidixique (Na), 0% à l'amikacine et 0% à la gentamicine.

Parmi les Entérobactéries résistantes aux antibiotiques, *Escherichia coli* résistent à plusieurs antibiotiques telle que : Ampicilline, Ciprofloxacine (**Aminul et al, 2017**)

Selon une étude menée par **Mazanek et Stepniak, (2021)** , le taux de résistance des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* à l'Ampicilline(AMX) était 68,2% et le taux de sensibilité était de 18,2%. Le taux de résistance à l'AMC était de 36,6%. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus dans cette étude.

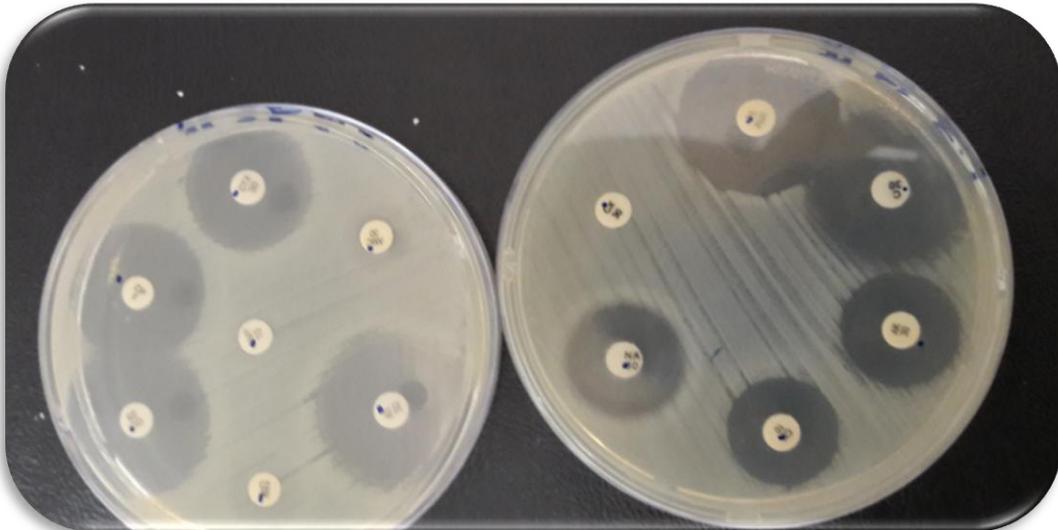
Les travaux de **Markowicz et al, (2021)** sur les boues dans le sud de la Pologne ont montré que le gène de résistance à l'ampicilline est souvent trouvé dans les boues d'épuration, ce qui explique ce taux élevé de résistance à l'ampicilline retrouvé dans cette étude.

**Malaho et al, (2018)** ont montré que les bactéries isolées des boues à partir des STEPs de la ville de Kakamega ont enregistré le plus grand nombre de résistance. Ce qui signifie que les boues sont parmi les meilleurs sites de sélection pour la résistance aux antibiotiques.

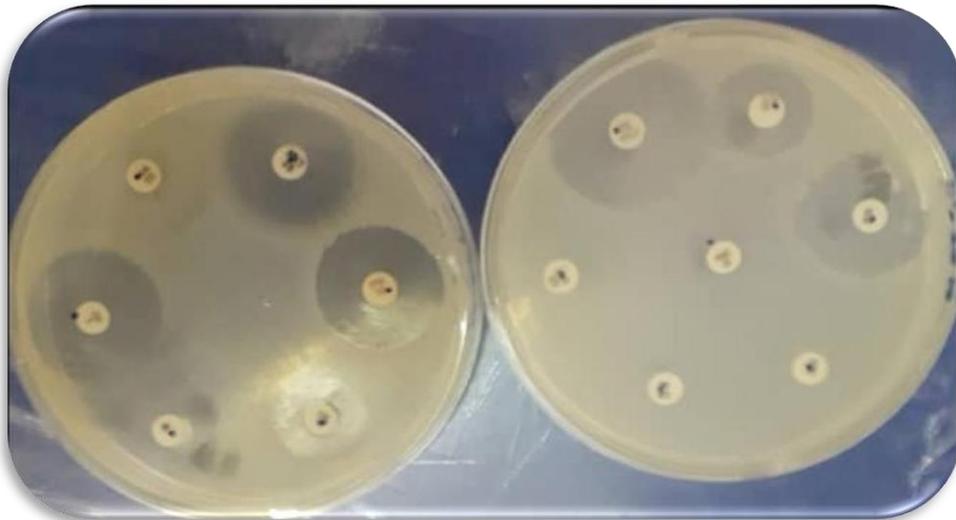


**Figure 8 :** Taux de résistance des Entérobactéries aux différents antibiotiques testés

Les photos suivantes montrent les zones d'inhibitions vis-à-vis des antibiotiques de quelques espèces concernées par cette étude.



**Figure 9** : Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez *Citrobacter youngae* (photo originale)



**Figure 10**: Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez *Enterobacter* (photo originale)

### **II .6.2.Antibiorésistance chez *Pseudomonas aeruginosa***

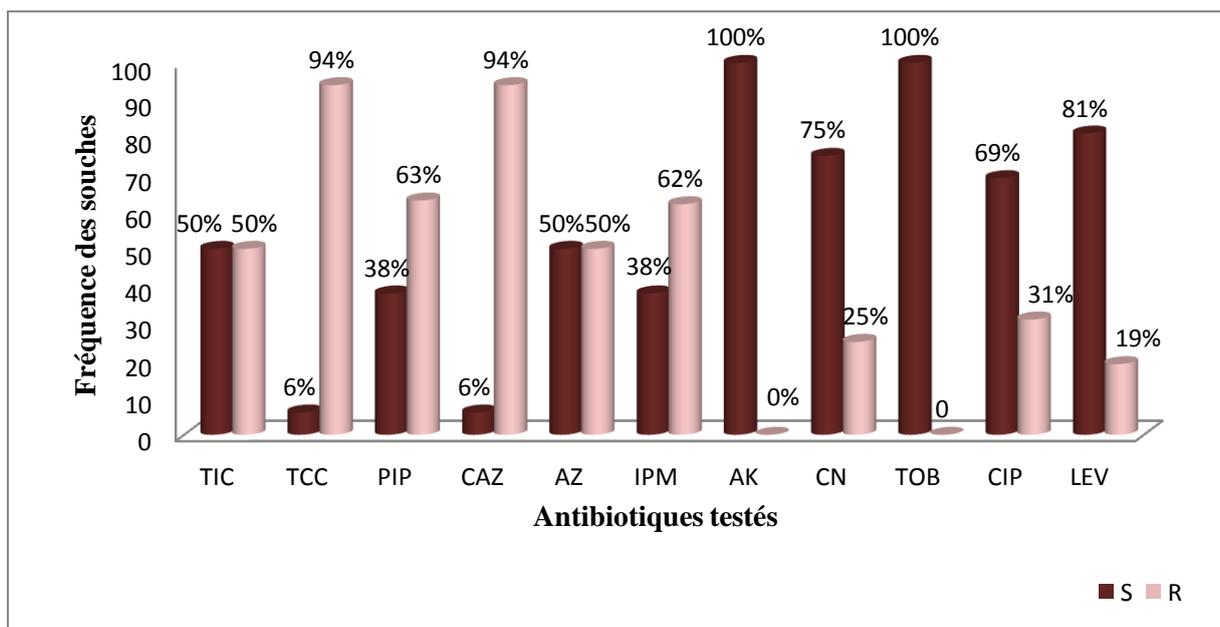
D'après les résultats de l'antibiogramme réalisé (**Figures 11 et 12**), nous avons constaté que les souches obtenues de *Pseudomonas aeruginosa* sont très résistantes à la Ticarciline + Acide Clavulanique (TCC) et à la Céfotazidime (CAZ) avec un taux de 94%.

Elles présentent une résistance moindre vis-à-vis de la Pipéracilline (PIP) 63% et de l'Imipénème (IMP) à 62% et un taux de résistance et de sensibilité de 50% pour la Ticarcilline (TIC) et L'Aztreonam (AZ).

Par contre les souches sont très sensibles par rapport à l'Amikacine (AK) et à la Tobramycine (TOB) avec un taux de 100%. Elles sont également sensibles à la Gentamicine (CN) 75%, à la Ciprofloxacine (CIP) 69% et à la Lévofloxacine (LEV) 81%.



**Figure 11 :** Zones d'inhibitions des antibiotiques testés chez *Pseudomonas aeruginosa* (photo originale)



**Figure 12 :** Taux de résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* aux différents antibiotiques testés

Les taux de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux (TIC) et (AZ) avec un taux de 50% se rapprochent de l'étude faite par **Luczkiewicz et al., (2015)** réalisé au nord de la Pologne qui ont trouvé un taux de 54.8% de résistance chez (AZ) et un taux de 63.7% chez (TIC).

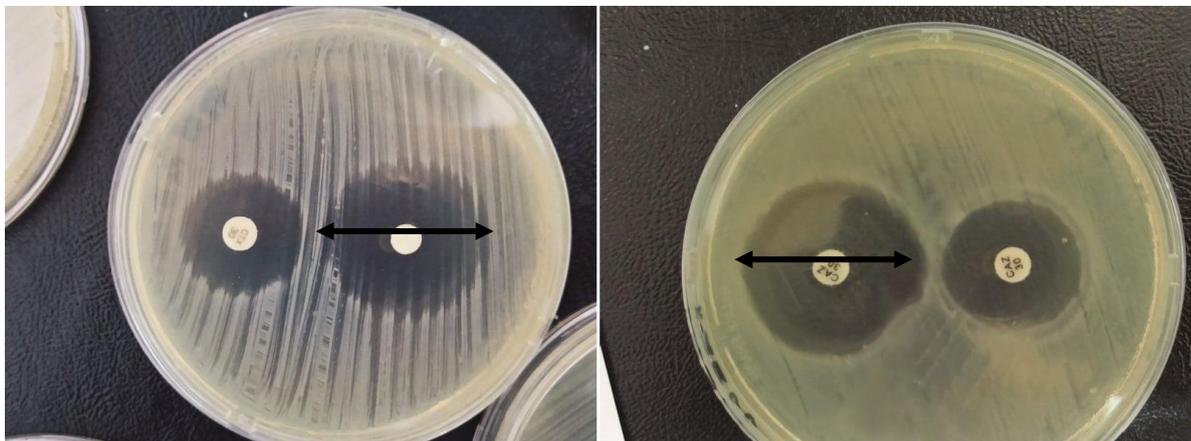
Selon une autre étude menée par **Emencheta et al., (2021)**, toutes les souches isolées de *P. aeruginosa* (100%) étaient sensibles à la Ciprofloxacine (CIP) et la délétion de la protéine de la membrane externe a été associée à une résistance accrue à l'imipénème.

La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* résulte principalement de mutations chromosomiques, mais peut également être acquise par transfert horizontal de gène (gène de résistance) (**Slekovec et al., 2012**).

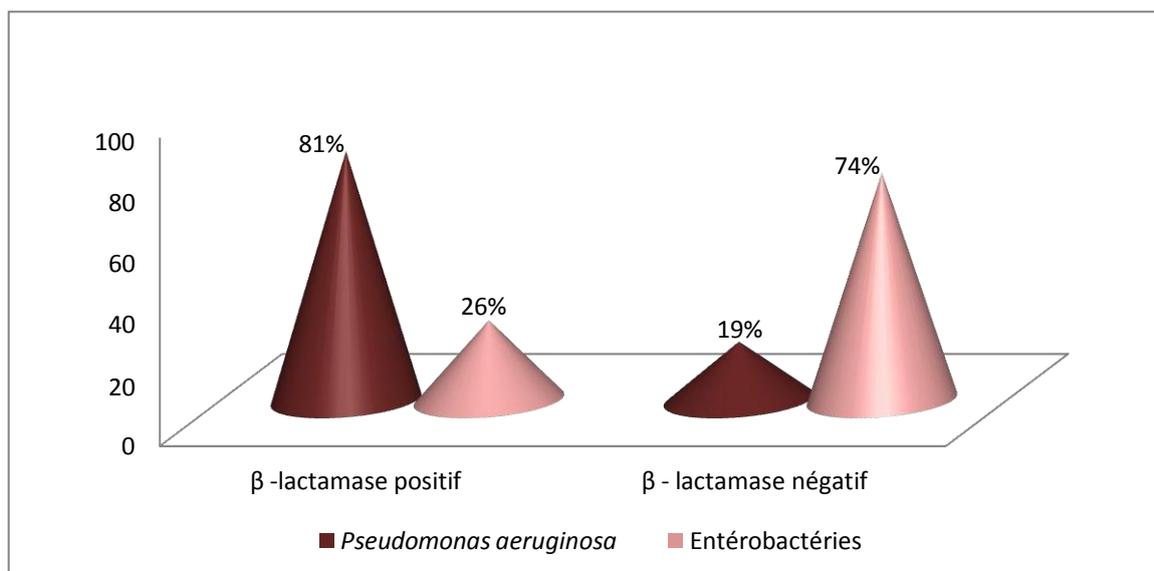
### II .7. Test de double disque :

Les bêta-lactamases sont des enzymes bactériennes qui confèrent une résistance aux bêta-lactamines dans les micro-organismes. Les bactéries productrices de bêta-lactamases ont été trouvées dans de nombreux échantillons d'eaux usées et des boues. Ces enzymes bactériennes hydrolysent plusieurs classes d'antibiotiques, dont les céphalosporines, les carbapénèmes et la pénicilline (**Zielinski et al., 2019**).

Les résultats du test de double disque (**Figures 13 et 14**) ont montré que les souches d'Entérobactéries présentent un taux réduit par rapport à la production de bêta-lactamases caractérisé par 26%. D'autre part, un taux plus élevé de 81 % a été observé chez les souches productrices de bêta-lactamase chez *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 13 :** Résultats du test de double disque chez Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* (photo originale)



**Figure 14** : Production de β-lactamases chez les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*

Selon la standardisation 2020, la production de β-lactamases est positive lorsque les diamètres d'inhibition entre (AMC+CTX) et CTX chez les Entérobactérie et (TCC +CAZ) et le CAZ chez *Pseudomonas aeruginosa* sont  $\geq 5$ mm.

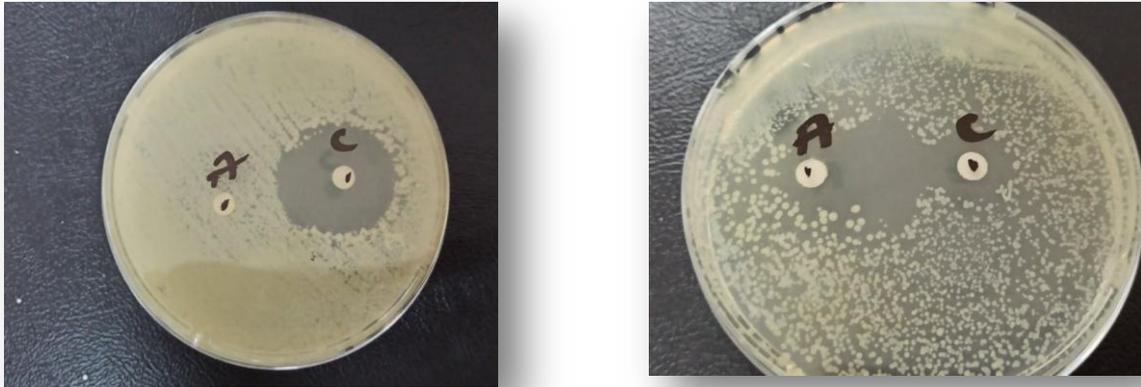
D'après l'étude d'Ojer-Usoz et al., (2014) réalisée dans le Nord de l'Espagne, les résultats obtenus montrent une forte prévalence des Entérobactéries productrices de BLSE dans les effluents des stations d'épuration. 100% des STEPs analysées ont montré la présence d'Entérobactéries productrices de BLSE dans un ou plusieurs échantillons tout au long de l'étude (58,4 % d'échantillons étaient d'effluents positifs) contrairement aux résultats obtenus dans cette étude.

Nos résultats sur la production des bêta-lactamases chez *Pseudomonas aeruginosa* se rapprochent de ceux d'Oliveira et al., (2018) qui ont observé que 22 des 27 isolats de *P. aeruginosa* étaient positifs avec au taux de 81% pour l'AmpC β-lactamase inductible, selon le test phénotypique (antagonisme avec IPM et CAZ).

Les gènes bêta-lactamases sont assez présents et ils sont rejetés avec les effluents traités dans l'environnement. Les stations d'épuration des eaux usées sont un maillon très important dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. Les méthodes mécaniques et biologiques de traitement des eaux usées dans les stations d'épuration n'éliminent pas complètement les gènes de résistance des eaux usées. (Zielinski et al., 2019).

## II .8. Test de synergie :

Le phénotype BLSE a été observé chez quelques souches d'Entérobactéries. Ce phénotype est confirmé par l'apparition d'une image de synergie (Bouchon de champagne) entre les deux antibiotiques (CTX –AMC) (**Figure 15**).



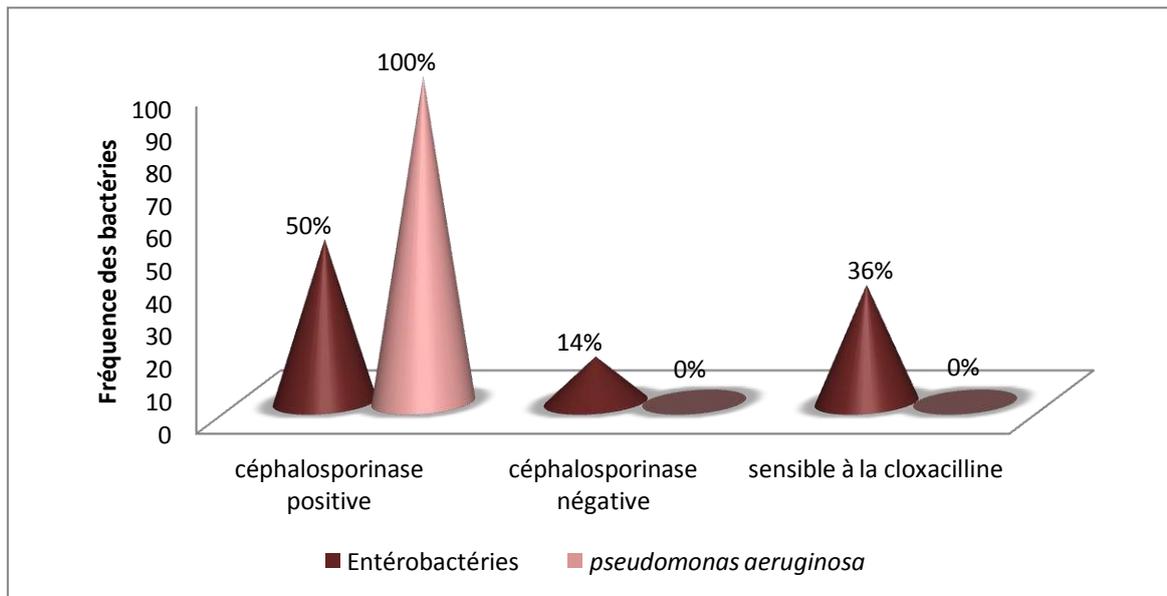
**Figure 15** : Image de synergie (BLSE) observé chez 2 souches d'Entérobactéries  
(photooriginale)

## II .9. Test à la cloxacilline

Après comparaison entre les zones d'inhibition (AMC/CTX/CAZ) dans l'antibiogramme et celle du test à la cloxacilline, nous constatons que la présence d'une augmentation des zones dans le test à la cloxacilline signifie qu'il ya une production de céphalosporinase de haut niveau.

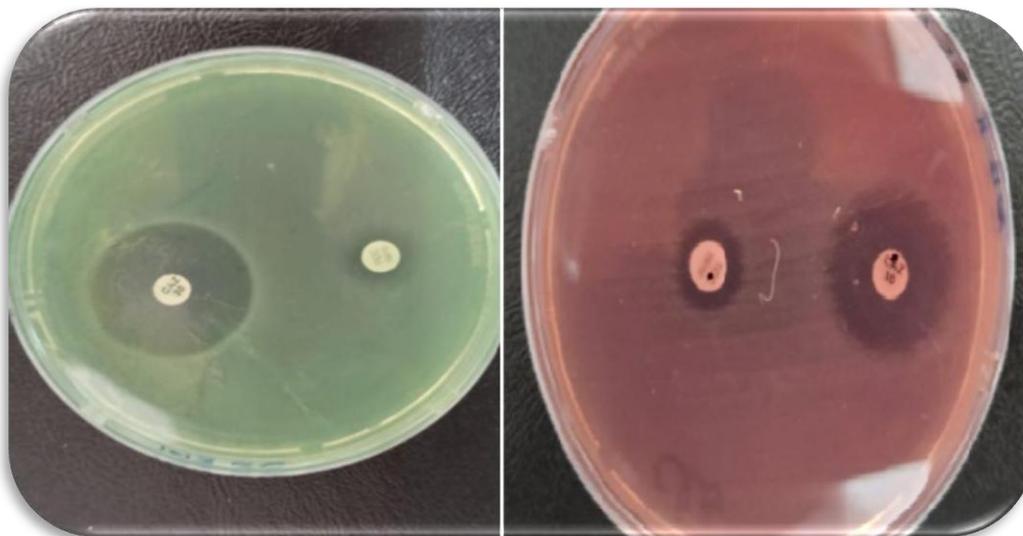
Les résultats du test à la cloxacilline (**Figures 16 à 18**), nous ont montré:

- Un taux de 100% de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de céphalosporinase de haut niveau
- Un taux de 0% de *Pseudomonas aeruginosa* non-productrice de céphalosporinase
- Un taux de 50% d'*Enterobacteriaceae* productrice de céphalosporinase de haut niveau
- Un taux de 14% d'*Enterobacteriaceae* non-productrice de céphalosporinase
- Un taux de 36% d'*Enterobacteriaceae* sensible à la cloxacilline
- Un taux de 0% de *Pseudomonas aeruginosa* sensible à la cloxacilline



**Figure 16** : Résultats d'Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* (Test à la cloxacilline)

Les résultats d'Ojer-Usoz et al. (2013), ont montré des niveaux élevés de résistance (>96%) aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime). Ce taux de résistance diffère de celui de notre étude (50%).



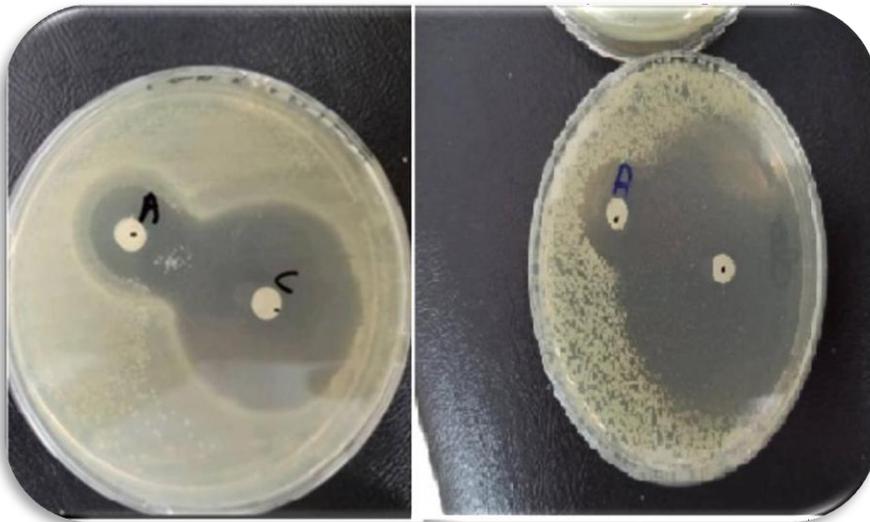
**Figure17** : Résultat du test à la cloxacilline chez *Pseudomonas aeruginosa* (photo originale)

Selon les résultats de Luczkiewicz et al., (2015) obtenus à partir des eaux usées (dans la baie de Puck en Pologne), le taux de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à la ceftazidime (chéphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération ) était de 17,4 (4 /23). En revanche, le taux

de résistance à la ceftazidime obtenue dans notre étude était de 100% pour les 16 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après la standardisation des tests de sensibilité des antibiotiques à l'échelle nationale, les Entérobactéries peuvent obtenir des résultats sans avoir des cultures. Cela est dû à la concentration élevée de la cloxacilline additionnée au milieu. Ce dernier explique le taux obtenu dans notre étude (36%). Une CMI est recommandée dans ce cas.

L'inhibition de la céphalosporinase par la cloxacilline a permis l'apparition d'une image de synergie (**Figure18**)



**Figure18** : Résultat du test à la cloxacilline d'Enterobactéries avec une image de synergie (Photo originale)

*Conclusion*

L'antibiothérapie a permis de faire grandement reculer la mortalité liée aux maladies infectieuses bactériennes et à contribuer à la préservation de la santé. La face négative de ce progrès sanitaire est l'apparition croissante de bactéries multirésistantes du fait d'une utilisation massive et répétée de ces molécules. Ces BMR peuvent se retrouver dans les eaux usées puis dans les boues résiduaires et peuvent constituer un réservoir ou un chemin de micro-organismes qui peuvent atteindre l'homme par la chaîne alimentaire (agriculture) ou tout autre activité.

Cette étude nous a permis d'établir la prévalence des *Enterobacteriaceae* et de *Pseudomonas aeruginosa* dans les boues résiduaires de trois stations d'épuration ainsi que leur profil d'antibiorésistance.

Les résultats obtenus ont démontré l'intérêt de ce type d'étude, avec un nombre important des germes isolés (113 bactéries) dans les trois stations étudiées. Le taux de présence des Entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que les autres bactéries était de : 80%, 14%, 6% respectivement. Ce taux était plus important dans la station de Béni Mered(42%), puis celle de Ben Chaabane(30%) et en dernier la STEP de Baraki(28%).

La saison a également contribué à montrer que les taux les plus élevés de la présence des bactéries étaient notés durant la saison hivernale par rapport au mois de Mai. Le nombre des bactéries obtenu est de 73 bactéries alors qu'au mois de mai, le nombre est de 40 bactéries.

La résistance à certains antibiotiques des germes isolés s'est révélée très élevée. Cela, peut s'agir de la présence des gènes de résistance aux antibiotiques et à leur transfert entre les bactéries présentes dans les boues ou à travers des mutations. Les souches des Entérobactéries étaient résistantes à l'AMP avec un taux de 80% et à l'AMC et CAZ avec un taux de 73%. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, 94% des souches étaient résistantes aux TCC et CAZ, 63% au PIP et 62% au IPM.

Concernant la sensibilité des bactéries aux antibiotiques la totalité des souches des Entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* étaient très sensibles à l'AK.

Pour les tests complémentaires, le phénotype BLSE a été observé beaucoup plus chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa* que chez les souches d'Entérobactéries, en

conséquence l'hyper production de céphalosporinase de 3<sup>ème</sup> génération est présente chez toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et par degré moindre chez les Entérobactéries.

Durant toute la période de notre expérimentation, nous avons rencontré plusieurs contraintes. Mais ces résultats prometteurs nous incitent à proposer des recommandations pour des précautions sanitaires ou des restrictions d'usage. Parmi ces recommandations, le changement de traitement actuel impliqué dans les stations d'épuration vu leur inefficacité et l'utilisation d'autres méthodes plus efficace. Ainsi un programme de surveillance bactériologique de la station d'épuration devrait être instauré afin d'évaluer la qualité des eaux en fin de processus d'épuration, ainsi que des boues d'épuration après traitement stabilisant mais avant épandage pour éviter toute sorte de propagation des contaminants lors de leur utilisation.

Malgré tous les traitements effectués au sein des stations d'épurations sur les boues d'épurations, des bactéries résistantes et des gènes de résistances aux antibiotiques sont éliminés à un niveau insuffisant ce qui pose un défi sur l'environnement et même pour la santé humaine si on utilise ces boues en agriculture.

En perspective de cette étude, il serait intéressant de :

- Optimiser les méthodes d'identification par des méthodes moléculaires des bactéries isolées
- La recherche d'autres bactéries pathogènes présentes dans les boues
- La recherche des gènes de résistance par des méthodes génétiques.
- Effectuer des gammes de concentration minimales inhibitrices pour le test à la cloxacilline (CMI à la cloxacilline)
- La recherche d'autres  $\beta$ -lactamases et les carbapénémases.

## *Références bibliographiques*

**A**

- **Achkour, Z. (2012).** Emergence de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Thèse de doctorat, Université Mohamed V–Rabat, P:50.
- **A GORO, A. (2021).** Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à Bamako de janvier 2020 à juin 2020. Thèse de docteur en pharmacie. Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako 44.
- **AKEL, Z. (2014).** Profil épidémiologique des *Enterobactéries* productrices de carbapénemases isolées au CHU ibn- sina Rabat, Thèse de doctorat, Université *Mohammed V de Rabat*.
- **Aminul, I., Zillur, R., Shirajum, M., Md. Anisur, R., Andrew, C., Christine, M. G., Niyaz, A., Munirul, A., (2017).** Colistin resistant *Escherichia coli* carrying *mcr1* in urban sludge samples: Dhaka, Bangladesh. *Gut Pathogens*, volume 9.77, P2-3

**B**

- **Bachelart, J. (2021).** Etude de l'étape de fermentation d'un procédé de co-compostage de boues en STEU: diagnostic par mesures expérimentales et modélisation numérique, thèse de doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, P44.
- **Baize, D. (2015).** Impact of sewage sludge spreading on soil and ceop quality – Results from a French thorough survey. *Agriculturae Conspectus Scientificus(ACS)*, University of Zagreb, Vol:80. HALpp11.
- **Benoudjit, F. (2016).** Caractérisation et valorisation des boues issues d'un office d'assainissement. Cas ONA Boumerdès (STEP Boumerdès). Thèse de doctorat. Université M'Hamed bougara-boumerdes. P28-30
- **Boivin, S., Caux, C., Soucy, C., Allard, A. (2016).** Les Entérobactéries productrices de carbapénémases, *Science photo library*, Vol:16.
- **Botelho, J., Grosso, F., Peixe, L. (2019).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*-Mechanisms, epidemiology and evolution, *Drug resistance updates*, volume 44, P26
- **Brahimi, L. (2013),** Sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries isolées d'infections urinaires, Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V.

- **Bouaziz, A. (2019).** Etude phénotypique et moléculaire de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries isolées à partir des fientes de la cigogne blanche (*ciconiaciconia*) de la commune d'ElMadher wilaya de Batna. Thèse de doctorat, Université Batna 2, P:55
- **Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E. (2013).** Detection and fate of antibiotic-resistant bacteria in waste water treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ.Saf.*P1-9

### C

- **Canler, P., Perret, M., (2013).**La réduction de boues par voie biologique par le procédé MycET: Document de Synthèse, Centre de Lyon. 51p. P10.
- **Cottalorda, A. (2020).** Diversité phénotypique et moléculaire d'isolats urinaires de *Pseudomonas aeruginosa*, thèse de doctorat, Université de Rouen Normandie, P23

### D

- **Dembelle. M. (2020).**Profil de résistance aux antibiotiques des *Entérobactéries* isolées des urines au service de bactériologie de l'INSP de 2016 à 2018 .Thèse de doctorat, Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako, P:50,51
- **Dembelle, S. (2019).** Etude de la Résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* isolées en routine à l'INRSP de Bamako, thèse de doctorat, Université des Sciences des Techniques Et des Technologies de Bamako, P6-26-27-28
- **Denis, F., Ploy, M., Martin, C., Cattoir, V. (2012).** Bacilles à Gram négatives aérobies et aero-anaérobies (chap. 30), In *Bactériologie médicale (Techniques usuelle)*, Elsevier Masson, P:289-290.
- **Derouiche, F. (2011).** Contribution à l'étude des boues résiduaire comme amendement organiques pour les cultures maraichères, mémoire de magister, université d'Oran, P10.

### E

- **Elmeskini, K. (2011).**Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, Thèse de doctorat, *Université Mohammed V de Rabat*, P13-14-37-38
- **Elrouini, A. (2018).**Emergence de la résistance carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. thèse de doctorat, *Université Mohammed V de Rabat*, P7-10-36.

- **Emencheta, SC., Eze, CC., Attama, AA., Agbo, DE., Onuigbo, EB. (2021).** Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* phages from Residential Waste Waters. HealthSci J. 15No.10:897.

### F

- **Fadil, I. (2016).** Profil de résistance des Enterobactéries aux antibiotiques en milieu extra hospitalier dans la ville d'el jadida. Thèse de doctorat, Université Mohammed V-Rabat, P:100.
- **Feng, J., Bing, L., Liping, M., Yubo, W., Danping, H., Tong, Z. (2016).** Antibiotic Resistance Genes and Human Bacterial Pathogens :Co-occurrence, Removal, and Enrichment in Municipal Sewage Sludge Digesters, *Water Research*.39p
- **Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, MJ.(2017).** The presence of contaminations in sewage sludge e The current situation, *Journal of environmental management*, volume 203, P1126

### G

- **Gadou, V. (2019).** Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'abidjan, côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix houphou et boigny.p60
- **Galler, H., Feierl, G., Petternel, C., Reinthaler, F., Hass, D., Habib, J.,Kittinger, C.,Luxner, J., Zarfel, G.(2018).** Multiresistant bacteria isolated from activated sludge in austria. *International journal of environmental research and public health*.15,479,pp4
- **Grall, N., Andremont, A., Armand, L., (2011).** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse, *A review: journal des Anti-infectieux*, volume13, P 87-102

### H

- **Habbi, A., Bouacha, H., Djera, K., (2020).** Epidémiologie et résistance aux antibiotiques du *Pseudomonas aeruginosa* sur cinq ans (2015- 2019) au CHU NEDIR Mohamed de Tizi ousou, thèse de doctorat ,Université Mouloud Mammeri De Tizi Ouzou,P6-31

- **Holzel, C., Schwaiger, k., Harms, k., Kuchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Muller, C., Bauer, J. (2010).** Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria, Elsevier, vol 110, pp 318-326
- **Hossain, MS., Ali, S., Hossain, M., Uddin, SZ., Moniruzzaman, M., Islam, MR., Shohael, AM., Islam, MS., Ananya, TH., Rahman, MM., Rahman, MA., Worth, M., Mondal, D., Mahmud, ZH. (2021).** ESBL Producing *Escherichia coli* in Faecal Sludge Treatment Plants: An Invisible Threat to Public Health in Rohingya Camps, Cox's Bazar, Bangladesh, Front Public Health, volume 9, num: 783019.
- **Huang, K., Xia, H., Zhang, Y., Li, J., Cui, G., Li, F., Bai, W., Jiang, Y., Wu, N., (2019).** Elimination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria by earthworms during vermicomposting of dewatered sludge by metagenomic analysis, *Bioresource Technology*, volume 297, p 122451
- **Huszczynski, S., Lam, J., Khursigara, C., (2019)** .The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology, *Pathogens*, volume 9, P22

### J

- **Jang, J., Hur, HG., Sadowsky, MJ., Byappanahalli, MN., Yan, T., Ishii, S. (2017).** Environmental *Escherichia coli* : ecology and public health implications-a review, *Journal of Applied Microbiology*, P:1.
- **Jayol, A. (2018).** Résistance à la colistine chez les bacillus a Gram négatif .Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, P:18-20 HAL
- **Jeannot, k., Plésiat, P., (2015).** Épidémiologie de la résistance aux b-lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal des Anti-infectieux*, volume 18, pages 52-63

### K

- **Kansaya, C. (2020).** Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines des souches d'entérobactéries isolées de pus, d'hémoculture et de selles au CHU du point G. Thèse De doctorat, Université des sciences des techniques et des technologies de Bamako, P: 24.
- **Karkman, A., Do, T-T., Walsh, F., Virta, M-P-J. (2018).** Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220–228.
- **Khalidi, A., Tir Touil Meddah, A., Meddah, B. (2015).** Screening of the Multi-resistant Bacteria Isolated from Food, Clinical Infection and Environment Water : Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology & Case Reports*. 1

**L**

- **Leghmizi, A., Boulkemm, W., Bougherra, H. (2005).** Fréquences des entérobactéries dans les infections sur urinaires et entériques. Diplôme des études supérieures en biologie. Université de Jijel.
- **Lhajoui, S. (2016).** Les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients mucoviscidosiques, thèse de doctorat, *Université Mohammed V de Rabat*, P14
- **Luczkiewicz, A.,Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K.,Fudala-Ksiazek,S. (2015).**Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. Isolated from waste water and waste water impacted marine coastal zone,*Environ Sci Pollut Res*22:19823–19834

**M**

- **Madec, JY. (2017).** La résistance à la colistine :La résistance à la colistine en médecine vétérinaire. Les cahiers de la recherche. Santé, Environnement, HAL pp5
- **Mahaya, A. (2019).**Analyse de la résistance aux antibiotiques chez les Entérobactéries et étude d'une potentielle voir alternative aux traitements antibiotiques. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, P25.
- **Malaho, C., Wawire, S., Shivoga, W. (2018).**Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacteriaceae* recovered from wastewater, sludge and dumpsite environments in Kakamega town,Kenya. *African Journal of Microbiology Research*,Vol12(28),PP8
- **Markowicz,A.,Bondarczuk,K., Wiekiera,A., Sulowicz, S.(2021).**Is sewage sludge a valuable fertilizer A soil microbiome and resistome study under field conditions. *Journal of soils and sediments* (SpringerLink).,Vol21,2882-2895
- **Mérens, A., Delacour, H., Plésiat, P., Cavallo, JD., Jeannot, K. (2011).** *Pseudomonasaeruginosa* and antibioticresistance, francophone dans laboratoires, volume 41,num 435, P42-62

- **Mezaache, S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre, thèse de doctorat, Université Ferhat ABBAS Sétif, P6
- **Mazanek, E., Stępnia, L., (2021).** Analysis of migration of pathogenic drug-resistant bacteria to soils and groundwater after fertilization with sewage sludge. PLoS ONE, 16(12), P10:0256936.
- **Muller, M., Tainter, CR. (2022).** *Escherichia coli*. National Library of Medicine.

### N

- **Nyaledome ablavi, I. (2016).** Pseudomonas aeruginosa : Epidémiologie et état actuel des résistances à L'Hôpital militaire d'instruction Mohammed V, thèse de doctorat, Université Mohammed V– Rabat, P2
- **NYS, G. (2021).** Revue bibliographique des antibiorésistances portées par les entérobactéries isolées de reptiles et évaluation du profil de résistance d'*Escherichia coli* isolées de reptiles en Belgique , Travail de fin d'études en vue de l'obtention du grade de Médecin vétérinaire, p 10

### O

- **Oliveira, LG., Ferreira, LGR., Nascimento, AMA., Reis, MP., Dias, MF., Lima, WG., Paiva, MC. (2017).** Antibiotic resistance profile and occurrence of AmpC between *Pseudomonas*, *Water Sci Technol* (1), p108–114.
- **Oueslati, S. (2019).** Caractérisation moléculaire et biochimique des carbapénèmases les plus répandues chez les *Entérobactéries* associées à des infections sévères en vue de développer de nouveaux inhibiteurs. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay, P16
- **Ojer-Usoz, E., Gonzalez, D., Garcia-Jalon, I., Vitas, AI. (2014).** High dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants, *water research* 56, p37-47

### P

- **Pachori, P., Gothwal, R., Gandhi, P. (2019).** Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review, *Review: Genes and Diseases* : volume 6, P109-119

- **Pang, Z., Raudonis, R., Glick, BR., Lin, T-J., Cheng, Z. (2019).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : mechanisms and alternative therapeutic strategies, *biotechnologie advances*, volume37,P177-192
- **Pantel, A. (2015).** Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques, Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichiacoli*ST131, Thèse de doctorat, Université de Montpellier. HALP38-40

### R

- **Rahal, k., Benslimani, A., Tali maamar, H., (2020).** Standardisation des tests de la sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale. Edité avec la collaboration de L'OMS.
- **Reinthaler, FF., Posch, J.,Feierl, G., Wust, G., Hass, D., Ruckenbauer, G., Mascher,F., Marth, E.(2003).**Résistance aux antibiotiques d'E.coli dans les eaux usées et les boues. *Water research–Elsevier*. P1
- **Reza Goli, H., Reza Nahaei, M., Ahangarzadeh Rezae, M .,Hasani, A., Samadi Kafil, H., Aghazadeh, M. (2016).** Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran,*Volume 8 Number 1*,P62-69.
- **Romanos, D., Nemer, N., Khairallah, Y., Abi Saab, M-T. (2019).** Assessing the quality of sewage sludge as an agricultural soil amendment in Mediterranean habitats. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*.8 (Suppl 1):S377–S383.
- **Rorat, A., Courtois, P., Vandenbulcke, F., Lemiere, S., (2019),**Sanitary and environmental aspects of sewage sludge management ,Campus U Lille sciences and technologies ,University of Lille ,Elsevier
- **Ryan, K.J., George Ray, C. (2004).** *Pseudomonas* and Other Opportunistic Gram-negative Bacilli, In *Sherris Medical Microbiology: An Introduction To Infectious Disease*. 4th (ed). P385-390.

### S

- **Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., et al. (2012).** Tracking Down Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Wastewater Network. *PLoS ONE*, Volume7, P7
- **Solbi, S. (2013).** Effet de repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques, thèse de doctorat, université Mohammed V–Souissi, P6-15

- **Stachurová, T., Sýkorová, N., Semerád, J., Malachová, K. (2022).** Resistant Genes and Multidrug-Resistant Bacteria in Wastewater: A Study of Their Transfer to the Water Reservoir in the Czech Republic. *Life* 12 (2):147.

### T

- **Tidrarine, S., (2019).** Epidémiologie des Entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénèmes à l'HIT. Thèse de doctorat, Faculté de médecine et de pharmacie –marrakech, P : 56.
- **Tijani, N. (2019).**infection a *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie, thèse de doctorat, Université Mohammed V-Rabat, P34
- **Théine. O, (2018),** Rhéologie des boues résiduaires : Rôle de la thixotropie et de la composition sur les propriétés liquides et solides. Thèse de doctorat. Ecole doctorales des sciences pour l'ingénieur.
- **Tortora, G. J., Funke, B.R., Case, C.L. (2018).** Antimicrobial Drugs. In *Microbiology: an introduction*. 13th (ed). 558-596. Boston: Pearson.
- **Tosoni, J. (2015).** Rhéologie des matériaux pâteux : vers un continuum des régimes solide et liquide. Application aux boues résiduaires, thèse de doctorat, Université Blaise Pascal–clermont II, P39-40-41-43.

### V

- **Vallée, M., Bey, E., Le Goux, C., Cattoir, V., Gabroit, B.J. (2018).** Résistances bactériennes : que doit savoir l'urologue, Elsevier Masson pp2.
- **Véolia, 2017.**
- **Veyssiere, A.J. (2019).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communautaires. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, P:4142

### Y

- **Yang, X., Xing, B., Liang, C., Ye, Z., Zhang, Y. (2015).** Prevalence and fluoroquinolone resistance of *pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China, *Int J Clin Exp Med*, volume 8(1), 1386-1390

**Z**

- **Zhao, L., Wang, S., Li,X., He, X., Lingyan, J. (2020).** Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, volume 9:124
- **Zieliński, W., Buta, M., Hubeny, J., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Nowrotek, M., Plaza, G. (2019).** *Journal of Ecological Engineering* Volume 20., pages 80–86,
- **Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A. (2012).** Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, 736, 7–29.
- **Zwenger, S-R., Gillock, E-T. (2009).** Bacteria isolated from sewage influent resistant to ciprofloxacin, chloramphenicol and tetracycline. *Journal of Environmental Science and Health Part A44*, 123–129. doi:10.1080/1093452080

*Annexe*

**Matériel non biologiques**

- Lames
- Boîtes de Pétri
- Ecouvillon
- Pipette graduée
- Pipette Pasteur
- Anse de platine

**Appareillages**

- Etuve
- Autoclave
- Bain mari
- Microscope
- Plaque chauffante
- Balance
- Bec benzène

**Réactifs et colorants**

- Lugol / Fuschine / violet de gentien
- VP1 / VP2/RM
- Kovax / TDA

**Milieux de culture**

Milieu de culture	Composition
<b>BGT</b>	Peptone de caséine :20 Extrait de viande : 2 Extrait de levure : 1 Phosphate dipotassique : 3,4 Phosphate monopotassique :0,2 Glucose : 7,1 Ph : 7,1
<b>Hekton</b>	Bleu de bromothymol : 0,065g Gélose bactériologique : 14g Citrate d'ammonium ferrique : 1,5g Salicine : 2g Thiosulfate de sodium : 5g Extrait de levure : 3g Fuchsine acide 0,1g Sels biliaires n°3 : 9g Lactose : 12g Chlorure de sodium : 5g Saccharose : 12g Digestion enzymatique de viande : 12g
<b>Mueller Hinton</b>	Peptone de caséine acide(H) :17,5g Infusion de viande : 2 g Gélose bactériologique : 17g Amidon : 1,5g

<b>TSI</b>	Gélose bactériologique : 12g Glucose monohydrate : 1g Rouge de phénol : 0,025mg Thiosulfate de sodium : 0,3 Extrait de levure : 3g Citrate d'ammonium ferrique : 0,3 Extrait de viande : 3g Chlorure de sodium : 5g Saccharose : 10g Lactose monohydrate : 10g Mélange de digestion peptique de tissus animaux et de caséine pancréatique (1 :1) : 20
<b>Gélose nutritive</b>	Gélose bactériologique : 15 g Peptone : 5g Extrait de levure : 2 g Extrait de viande : 1g Chlorure de sodium : 5g
<b>Mac Conkey</b>	Peptone (digestion pancréatique de gélatine) : 17g Protéose peptone (viande de caséine) : 3g Lactose monohydraté : 10g Sels biliaires : 1,5g Chlorure de sodium : 5g Rouge neutre : 30mg Violet de cristal : 1mg Gélose : 13,5g Eau distillée : 1L Ph : 7.1+/-0,2
<b>TSA</b>	Digestion pancréatique de caséine : 15g Peptone de soja : 5g Chlorure de sodium : 5g Gélose : 15g
<b>Chromagar</b>	Chromopeptone : 16,1g Mélange chromogène : 1,3 Gélose : 15

**Tableau XXV** : Caractères biochimiques des genres les plus fréquemment rencontré

	Citrate	Mobilité	Glucose	Lactose	H2S	ONPG	Uréase	Indole	VP
<i>E.coli</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Citobacter</i>	D	+	+	+	d	+	-	D	-
<i>Klebsiella</i>	+	-	+	+	-	+	+	-/+	+
<i>salmonella</i>	+	+	+	-	+	D	-	-	-
<i>Proteus</i>	+/-	+	+	-	+/-	-	+	+/-	-
<i>Providencia</i>	-	+	+/-	-	-	-	+	+	-
<i>Shigella</i>	-	-	+	-	-	D	-	D	-

d:différent selon les souches D:différent selon les sous-souches de Salmonella

(Denis et al, 2012)

Tab. 2 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E.

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH	Arginine	Arginine dhydrolase	Lecture directe		
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase			
ODH	Ornithine	Ornithine décarboxylase			
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'o-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Figure 19 : Tableau de lecteur de la galerie API 20

**Tableau XXVI :** Liste des antibiotiques testé sur les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Entérobactérie</i>							
Famille	Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Diamètres critiques			
				R	I	S	
B-lactamines	Aminopénicilline	Amoxicilline + ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≤13	14-17	≥18
		Ampicilline	AMP	10µg	≤13	14-16	≥17
	Monobactame	Aztreonam	AT	30µg	≤17	18-20	≥21
	Carbapénème	Imipènème	IMP	10µg	≤19	20-22	≥23
	C1G	Céfazolin	CZ	30µg	≤19	20-22	≥23
	C2G	Cefoxitine	CX	30µg	≤14	15-17	≥18
	C3G	Céfotaxime	CTX	30µg	≤19	20-22	≥23
Aminosides	Amikacine	AK	30µg	≤14	15-16	≥17	
	Gentamicine	GN	10µg	≤12	13-14	≥15	
Phénicolés	Chloramphenicol	C	30µg	≤12	13-17	≥18	
Quinolones 1ère génération	Acide nalidixique	NA	30µg	≤13	14-18	≥19	
Fluoroquinolone	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤20	21-30	≥31	
Diaminopyrimidines + sulfamides	Thriméthoprime+ sulfaméthoxazole	COT	1.25/23.75 µg	≤10	11-15	≥16	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Famille	Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			
				R	I	S	
B-lactamine	Pénicillines	Pipéracilline	PIP	100µg	≤14	15-20	≥21
	Carboxypénicillines	Ticarcilline	TIC	75µg	≤15	16-23	≥24
		Ticarcilline + ac. clavulanique	TCC	75/10µg	≤15	16-23	≥24
	Monobactame	Aztréonam	AT	30µg	≤15	16-21	≥22
	Carbapénème C3G	Imipènème	IMP	10µg	≤15	16-18	≥19
Céftazidime		CAZ	30µg	≤14	15-17	≥18	
Aminosides	Amikacine	AK	30µg	≤14	15-16	≥17	
	Gentamicine	GN	10µg	≤12	13-14	≥15	
	Tobramycine	TOB	10µg	≤12	13-14	≥15	
Fluoroquinolone	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤18	19-24	≥25	
	Lévofloxacine	LEV	5µg	≤14	15-21	≥22	

(Rahal et al., 2020)