

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ 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 de l'activité antimicrobienne de quelques
champignons isolés des boues résiduaires**

Présenté par :

Date de soutenance : 03/07/2023 À 09h30

- M^{lle} Sardou Sara

- Mr Achour Zin El Abidine

- M^{lle} Kalla Imene

Devant le jury :

Mme ZEROUTI K.

MCB

Université de Blida 1

Présidente

Mme BOKRETA S.

MCB

Université de Blida 1

Examinatrice

Mme HAMAI DI F.

Professeure

Université de Blida 1

Promotrice

Mr BOUTEKFA Y.

Doctorant

Université de Blida 1

Co-promoteur

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciements

Tout d'abord, 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 tenons à remercier et exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice Professeure **HAMAIDI.F** pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa rigueur, ses précieux conseils et le dévouement manifesté malgré toutes ses nombreuses occupations.

Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à notre Co-promoteur Monsieur **BOUTEKFA.Y**, Nous sommes tellement reconnaissants du temps et des efforts que vous avez consacrés à l'élaboration de ce travail et à nous aider à surmonter les défis.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les membres du jury, Madame **ZEROUTI.K (MCB à l'université de Blida 1)** d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et Madame **BOKRETA.S (MCB à l'université de Blida 1)** qui a accepté d'évaluer et examiner notre mémoire.

Nous adressons également nos remerciements à tous nos enseignants pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué tout au long de notre parcours académique.

Nous remercions Monsieur **DJAMEL TEFFAHI** et toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de Blida.

Finalement, nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dedication

First of all, I want to dedicate this work to God for giving me the strength, health and patience to make it happen.

*To my **Mum** and **Dad** for giving me the best environment and the means to study, also pushing me along the way. I hope God will protect them.*

To my grandmas, for always giving me the word of wisdom and prayers to make me inspired and always feel loved and taken care of spiritually

*To my grandpa **Hamdi Moussa** who left us, I wish God would protect his soul.*

*To my brother **Wassime**, aunts, and cousins and all my family for always giving me words of encouragement.*

*To my friends **Youcef, Rayane, Sonia, Merwa**, for always giving me kind words and wishing me the best of luck, I wish them all the best in life.*

*To **Sara**, I don't have the words to explain how much I appreciate you as a person and how much I'm proud of you. We had amazing experiences, memories and fun, making this amazing work happen. I wish you all the best in your future life.*

To all my friends and the new ones I made along with this work.

Zin El Abibine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, fruit de mes études

A

Mes chers parents qui m'ont soutenus jusqu'à la fin de mes études, qui m'ont aidé et entouré d'amour avec fierté.

Ma sœur et mon frère m'ont toujours encouragé et aidé dans tous les obstacles que j'ai eu, qui ont toujours éclairé mon chemin.

Mes amies et collègues

Toute la promotion de microbiologie

Kalla Imene

DEDICATIONS

I would like to express my heartfelt gratitude to the following individuals:

First and foremost, I want to honor the memory of my beloved **grandmother**. Although I am deeply saddened by your absence on this special day, I know you wished to witness it. Your absence has left a profound void in my heart, RIP.

To **my dear parents**, thank you for believing in me, for being my pillars of strength, for instilling in me the value of self-reliance and for never imposing limits on my pursuit of happiness and success. I am truly blessed to have parents like you.

To my sisters, **Youya** and **Anfel**, and my cherished family members, particularly **Uncle Mohammed**, **Merouane**, and **Aunt Imene**. Your love, support, and constant presence in my life have been invaluable.

I extend my deepest appreciation to **Ammou Khaled**, **Tata**, **Louiza**, **Yasmine**, **Nor**, and **Karima** for the profound impact you have had on both my mother and me. Your support and the sense of belonging you have shown to us are beyond words. I hold you all dear to my heart.

A special dedication goes to my sisters of the heart, my best friends **Rym** and **Lina**. I don't know how my life would have been without you. Thank you for being an integral part of my journey.

To **Imene**, I am grateful for your presence and support whenever I have needed you. Your companionship through both joyful and challenging times has been a true blessing in my life.

To **Zinou**, I really wish I had met you sooner. Your unique presence has added a special touch to my university experience, and I am so grateful for that.

To **Marwa**, despite all the ups and downs I know how much love and respect we hold for one another; **Rayane**, **Raounak**, **Ines**, **Ibtissem**, **Imene**, **Meriem**... the moments we have shared together have been the highlight of my life, Thank you all.

Sara with love.

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux champignons présents dans les boues résiduaires.....	03
Tableau II : Exemples de quelques champignons à activité antimicrobienne.....	05
Tableau III : Mécanismes d'action des métabolites secondaires sur les bactéries.....	05
Tableau IV : Mécanismes de résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques... ..	10
Tableau V : Quelques mécanismes de résistance de <i>Bacillus</i> aux antibiotiques... ..	12
Tableau VI : Caractéristiques des échantillons des boues... ..	14
Tableau VII : Aspects macroscopique et microscopique des champignons isolés des boues résiduaires collectés dans les trois STEPs... ..	20
Tableau VIII : Répartition des champignons selon les STEPs.....	24
Tableau IX : Antibiogramme de <i>Bacillus</i>	29
Tableau X: Phénotype de résistance et l'indice de Mar chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	30
Tableau XI : Phénotype de résistance et l'indice de Mar chez <i>Acinetobacter</i>	31
Tableau XII : Phénotype de résistance et l'indice de Mar chez <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> et <i>Aeromonas</i>	31
Tableau XIII: Résultats de l'identification des bactéries... ..	32
Tableau XIV: Résultats de l'identification des BMR.....	35

Liste des figures

Figure 01: Échantillons de boues.....	13
Figure 02: Organigramme du protocole expérimental.....	14
Figure 03: Méthode des disques d'antibiotiques... ..	17
Figure 04: Répartition des bactéries selon les stations... ..	25
Figure 05: Taux de résistance des Entérobactéries aux différents antibiotiques... ..	26
Figure 06: Taux de résistance chez <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques testés.....	27
Figure 07: Taux de résistance chez <i>Enterococcus</i> aux différents antibiotiques testés... ..	28
Figure 08: Résultats de l'antibiogramme.....	28

Liste des abréviations

AK: Amikacine

Ala: Alanine

AMC: Amoxicilline + acide clavulanique

AME: Acides modifiant les aminosides

AMP: Ampicilline

AT: Aztreonam

AZ: Aztreoname

BEA: Bile-esculine-azoture

BGT: Bouillon glucosé tamponné

BHIB: Bouillon cœur-cervelle

BLSE: Béta-lactamases à spectre élargi

BMH : Bouillon Muller Hinton

BMR : Bactéries multirésistantes

C: Chloramphénicol

CAT: Chloramphénicol acétyl transférase

CAZ: Ceftazidime

CHL: Chloramphénicol

CIP: Ciprofloxacine

CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CN : Gentamicine

COT: Cotrimoxazole

CTR: Ceftriaxone

CTX: Céfotaxime

CX: Cefoxitine

CZ: Céfazoline

E: Erythromycine

EBLSE: Entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi

ETP: Ertapénèmes

FOX: Céfoxitine

GEN: Gentamicine

GN: Gélose nutritive

GN: Gentamicine

IM : Indice de MAR

IMP: Imipénème

IONPs: Iron oxide nanoparticles

LAC: Lactate

LEV: Lévofoxacine

LPS: Lipopolysaccharide

MAR: Multiple antibiotic resistance

MCR: Résistance mobilisée à la colistine

MEVAG: Milieu pour l'Étude de la Voie d'Attaque des Glucides

MH: Mueller Hinton

N: Azote

NA: Acide nalidixique

OMS: Organisation mondiale de la santé

OXA: Oxacilline

P: Phosphore

PBP: Penicillin-binding proteins

PDA: Potato dextrose agar

PDB: Potato dextrose broth

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines

PRI: Pristinamycine

RIP: Rifampicine

RM : Rouge de méthyle

ST300: Streptomycine à haut niveau 300µg

STEP: Station d'épuration des eaux usées

SXT: Triméthoprim – sulfaméthoxazole

TCC: Ticarcilline + Acide Clavulanique

TE: Tétracyclines

TEI: Teicoplanine

TIC: Ticarcilline

TDA : tryptophane désaminase

TSA : gélose Tryptone-Soja

UFC: Unité formant colonie

VAN: Vancomycine

VP : Voges-Proskauer

Résumé

La nécessité de la découverte de nouvelles molécules d'antibiotiques face à l'augmentation de la résistance bactérienne est un défi important pour la santé publique.

Dix-huit échantillons de boues résiduaires ont été prélevés à raison de 6 échantillons par station durant une période allant du mois de Février 2023 au mois de Juin 2023. D'après les résultats obtenus, le nombre des bactéries isolées dans les trois STEPs (STEP de Baraki, STEP de Beni Mered et la STEP de Boufarik) était de 93 bactéries; 40 souches se sont avérées multirésistantes aux antibiotiques

61 souches fongiques ont été isolées appartenant à quatre (4) genres : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Rhizoctonia*.

10 souches de fungi ont été sélectionnées pour l'étude de l'activité antibactérienne sur les bactéries multirésistantes. L'activité a été testée par la méthode de diffusion en disques de fungi et la méthode de puits après fermentation et filtration. Tous les champignons testés ont montré une activité antibactérienne sur les BMR avec des halos d'inhibition d'un diamètre compris entre 7 et 34 mm.

Rhizoctonia sp. a montré une activité importante sur 97% de l'ensemble des BMR testées, *Trichoderma* sur 62% à 75%, les souches d'*Aspergillus* sur 47% à 67%, par contre une activité faible a été signalée chez les champignons du genre *Penicillium* (sur 35% des BMR.)

Mots clés : Boues résiduaires, Fungi, Résistance bactérienne, Activité antibactérienne, BMR.

Abstract

The need for the discovery of new antibiotic molecules in the face of increasing bacterial resistance is a significant challenge for public health.

Eighteen samples of sewage sludge were collected, with 6 samples per station, during a period ranging from February 2023 to June 2023. According to the results obtained, the number of isolated bacteria in the three sewage treatment plants (STPs) of Baraki, Beni Mered and Boufarik was 93 bacteria; 40 strains were found to be multidrug-resistant.

61 fungal strains were isolated belonging to four (4) genera: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Rhizoctonia*.

10 fungal strains were selected for the study of antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria. The activity was tested using the fungal disc diffusion method and the well method after fermentation and filtration. All tested fungi showed antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria, with inhibition zones ranging from 7 to 34 mm in diameter.

Rhizoctonia sp. showed significant activity against 97% of all tested multidrug-resistant bacteria, *Trichoderma* against 62% to 75%, *Aspergillus* strains against 47% to 67%, while lower activity was reported for *Penicillium* fungi (against 35% of multidrug-resistant bacteria).

Keywords: Residual sludge, Fungi, Bacterial resistance, Antibacterial activity, MDR.

ملخص

تمثل الحاجة إلى اكتشاف جزيئات جديدة للمضادات الحيوية في مواجهة زيادة مقاومة البكتيريا تحديًا كبيرًا للصحة العامة.

تم جمع 18 عينة من الحمأة، بمعدل 6 عينات لكل محطة، خلال فترة تتراوح بين فبراير 2023 وجوان 2023. وفقًا

للنتائج التي تم الحصول عليها، كان عدد البكتيريا المعزولة في محطات معالجة مياه الصرف الصحي الثلاث بني مراد، بوفاريك وبراقي 93 بكتيريا بحيث 40 سلالة هي سلالات مقاومة لمختلف المضادات الحيوية.

تم عزل 61 سلالة فطرية تنتمي إلى أربعة أجناس (4): *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia*.

Penicillium.

تم اختيار عشر سلالات فطرية لدراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضد البكتيريا المقاومة لمختلف المضادات الحيوية. تم اختبار النشاط باستخدام طريقة انتشار القرص الفطري وطريقة البئر بعد التخمير والترشيح. أظهرت جميع الفطريات التي تم اختبارها نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد البكتيريا المقاومة لمختلف المضادات الحيوية، مع مناطق تثبيط يتراوح قطرها من 7 إلى 34 ملم.

Rhizoctonia sp. أظهر نشاطًا كبيرًا على 97% من جميع البكتيريا المقاومة لمختلف المضادات الحيوية التي تم اختبارها، *Trichoderma* على 62% إلى 75%، سلالات *Aspergillus* مقابل 47% إلى 67%، بينما لاحظنا نشاط أقل لفطريات *Penicillium* (مقابل 35% من البكتيريا المقاومة لمختلف المضادات الحيوية).

الكلمات المفتاحية: الحمأة، الفطريات، المقاومة البكتيرية، النشاط المضاد للبكتيريا، البكتيريا المقاومة لمختلف

المضادات الحيوية.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION 01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BOUES RÉSIDUAIRES

I.1 Définition d'une boue résiduaire ou d'épuration 02
I.2 Composition des boues..... 02

CHAPITRE II. BIODIVERSITÉ, DESCRIPTION et ACTIVITÉS DES CHAMPIGNONS DANS LES BOUES RÉSIDUAIRES

II.1 Biodiversité 02
 A. Le genre *Aspergillus* 02
 B. Le genre *Penicillium* 03
 C. Le genre *Trichoderma* 03
 D. Le genre *Rhizoctonia* 04
II.2 Activité antimicrobienne et mécanismes d'action des métabolites secondaires fongiques sur les bactéries..... 04

CHAPITRE III. PRINCIPALES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS LES BOUES RÉSIDUAIRES

III.1 Entérobactéries 06
III.2 *Aeromonas*..... 06
III.3 *Pseudomonas aeruginosa*..... 06
III.4 *Enterococcus* 07
III.5 *Bacillus*..... 08

CHAPITRE IV. ANTIBIORESISTANCE et ANTIBIOTIQUES

IV.1	Résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux Antibiotiques	08
IV.1.1	Résistance aux β -lactamines	08
IV.1.2	Résistance aux aminosides	09
IV.1.3	Résistance aux quinolones.....	09
IV.1.4	Résistance aux sulfamides et au triméthoprim.....	09
IV.1.5	Résistance à la colistine.....	09
IV.1.6	Résistance aux chloramphénicol.....	09
IV.2	Résistance de <i>Aeromonas</i> aux antibiotiques	09
IV.2.1	Résistance aux β -lactamines.....	09
IV.2.2	Résistance à la colistine.....	10
IV.2.3	Résistance aux quinolones.....	10
IV.3	Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	10
IV.4	Résistance des <i>Enterococcus</i> aux antibiotiques.....	11
IV.4.1	Résistance aux β -lactamines.....	11
IV.4.2	Résistance aux glycopéptides	11
IV.4.3	Résistance aux aminoglycosides	11
IV.4.4	Résistance aux streptogramine/lincosamides	11
IV.4.5	Résistances aux tétracyclines/glycylcyclines	12
IV.4.6	Résistance aux quinolones.....	12
IV.5	Résistance de <i>Bacillus</i> aux antibiotiques	12

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

I.1	Matériel.....	13
I.1.1	Matériel biologique	13
I.1.2	Matériel non biologique	13
I.2	Méthodes	13
I.2.1	Mode de prélèvement	13
I.2.2	Isolement et purification des champignons.....	15
I.2.3	observation macroscopique et microscopique des champignons.....	15
I.2.4	Isolement et purification des bactéries.....	15
I.2.5	Antibiogramme	16
I.2.6	Détermination de la CMI sur milieu liquide pour le genre <i>Bacillus</i>	17
I.2.7	Sélection des bactéries multi résistantes par le calcul de l'indice de MAR ...	18
I.2.8	Identification biochimique par galerie Api	19
I.2.9	Fermentation et récupération du filtrat de culture	19
I.2.10	Test de confrontation champignons-bactéries	19
I.2.10.1	Méthode de diffusion de disque.....	19
I.2.10.2	Méthode des puits.....	19

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1 Résultats de l'identification des fungi	20
II.2 Répartition et fréquence des champignons isolés dans les STEPs	24
II.3 Résultats de l'identification des bactéries	26
II.4 Résultats de l'antibiorésistance	25
II.4.1 Antibioresistance chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	25
II.4.2 Antibioresistance chez <i>Pseudomonas</i>	26
II.4.3 Antibioresistance chez <i>Aeromonas</i>	27
II.4.4 Antibioresistance chez les <i>Enterococcus</i>	27
II.4.5 Antibioresistance chez les <i>Bacillus</i>	29
II.5 Identification biochimique par galeries Api	32
II.6 Résultats de l'activité antibactérienne des extraits fongiques isolés vis à vis des bactéries multirésistantes	35
Conclusion.	36

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Le spectre actif des antibiotiques diminue au profit de la résistance bactérienne car leur utilisation excessive tant chez l'homme que chez l'animal est discutable (**Frédéric Moal, 2023**), ce qui constitue une menace importante pour la santé publique. Des études antérieures ont montré que de nombreuses bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance ont été détectés dans les boues des stations d'épuration des eaux usées 'STEPS' (**Galler et al., 2018 ; Hultman et al., 2018 ; Karkman et al., 2018**).

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928 et face à la baisse de l'activité des antibiotiques suite à l'apparition de BMR, la recherche de nouveaux agents antibactériens a été déclenchée, parmi eux les champignons qui produisent une grande variété de métabolites bioactifs, ce qui fait d'eux une riche source à la base de divers types de produits pharmaceutiques (**Al-Fakih et al., 2019**).

En raison de leur capacité à biosynthétiser des métabolites secondaires bioactifs et de leurs diverses activités biologiques tels que les effets antibactériens, antioxydants ... , ces champignons sont importants en médecine humaine et sont devenus une source importante de nouveaux métabolites secondaires bioactifs potentiellement utiles dans plusieurs domaines (**Jouda et al., 2016 et Sadrati et al., 2013**). Le nombre d'études sur la pharmacorésistance ne cesse de croître, soulignant l'intérêt scientifique d'étudier de nouvelles molécules bioactives comme alternative aux antibiotiques actuelles.

Les boues résiduelles sous-produites générées par les activités humaines dans les STEPS peuvent présenter un danger potentiel pour l'homme et son environnement. Néanmoins, certains microorganismes qui les composent dont les champignons peuvent présenter un réservoir sous-exploré pour de nouvelles ressources biologiques destinées à être exploitées dans les secteurs pharmaceutiques, industriels et agricoles.

Dans le cadre de notre projet de fin d'étude de master qui s'insère dans la thématique de 'l'équipe 2' du laboratoire Biotechnologies, Environnement et santé, l'objectif principal de cette étude préliminaire est d'isoler et d'identifier les souches de champignons actives isolées à partir de divers échantillons de boues résiduelles dans trois STEPs contre les bactéries multirésistantes.

Pour cela, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Caractérisation et description des bactéries générées des boues résiduelles et évaluation de la résistance et la sensibilité des isolats aux antibiotiques.
- Isolement, purification et identification des souches fongiques et évaluation de leur activité antibactérienne.

Partie Bibliographique

I. GENERALITES SUR LES BOUES RÉSIDUAIRES

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

Les boues sont des résidus solides, semi-solides ou liquides sont composées de matières inorganiques et organiques sous forme dissoute ou en suspension (**Bachelart, 2021 ; Regitano et al., 2022**). Leurs propriétés dépendent de la variabilité de la composition des eaux usées arrivant à la station d'épuration et du traitement effectué (**Tosoni, 2015**).

Les boues d'épuration présentent un intérêt et peuvent être utilisées dans le domaine agricole ou comme source d'énergie ou source d'extraction de composés valorisables (**Fijalkowski et al., 2017**).

I.2 Composition des boues

Les boues résiduaires sont un résidu organique, contenant une biomasse microbienne élevée ainsi que des teneurs élevées en matière organique, éléments fertilisants (N et P...), éléments traces métalliques, éléments traces organiques (**Regitano et al., 2022 ; Amir, 2005**).

La composition convenable des boues dépend principalement des effets saisonniers, du système de traitement adopté, ainsi que de leur source (domestique, industrielle ou un mélange des deux) (**Regitano et al., 2022 ; Singh et al., 2004 ; Jarde et al., 2003**).

Les boues résiduaires renferment une forte proportion de micro-organismes comme des virus, des bactéries pathogènes, des parasites et des champignons, provenant de matières fécales humaines ou animales (**Sahlström et al., 2004**).

II. BIODIVERSITÉ, DESCRIPTION et ACTIVITÉS DES CHAMPIGNONS DANS LES BOUES RÉSIDUAIRES

II.1 Biodiversité

Le tableau I résume les principaux champignons retrouvés dans les boues résiduaires. Nous décrivons certaines espèces :

A. Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* font partie du phylum des *Ascomycota*, de l'ordre *Eurotiales* et de la famille des *Aspergillaceae* (**Houbraken et al., 2020**). Ce sont des champignons ubiquitaires, cosmopolites et saprophytes. Certaines espèces sont impliquées dans des pathologies humaines (**Wang, 2012**).

Tableau I: Principaux champignons présents dans les boues résiduaires

Familles	Espèces
<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus tubingensis</i>
<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium albocoremium, P.expansum, P.crustosum, P.verrucosum, P.olsonii, Talaromyces flavus, Talaromyces spp.</i>
<i>Hypocreaceae</i>	<i>Trichoderma asperellum, Trichoderma citrinoviride, Trichoderma harzianum, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma virens</i>
<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium fujikuroi, Fusarium oxysporum</i>
<i>Trichosporonaceae</i>	<i>Apiotrichum domesticum, Apiotrichum montevidense, Apiotrichum laibachii</i>
<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Rhodotorula glutinis, Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor spp., Rhizopus oryzae</i>
<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
<i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria spp.</i>

(Buratti et al., 2022)

Ce genre regroupe des champignons filamenteux, caractérisés par la formation de têtes aspergillaires. Ils peuvent se reproduire selon deux modes : reproduction sexuée et reproduction asexuée (Imbert, 2020). Ils peuvent produire une variété de métabolites secondaires bioactifs à activité antibactérienne (Xu et al., 2017 ; Racahada et al., 2010) antivirales (He et al., 2013) et antifongiques (Cazar et al., 2005).

B. Le genre *Penicillium*

Les *Penicillium* sont des Ascomycètes appartenant à l'ordre des *Eurotiales*, classe *Euascmycètes* et à la famille des *Trichocomaceae* (Visagie et al., 2014). Ils sont constitués de conidiophores ramifiés avec à leurs extrémités des phialides sont insérés soit directement sur les conidiophores (monoverticillés), soit sur une rangée de métules (biverticillés) ou bien par l'intermédiaire de deux rangées successives de métules (triverticillés) (Le, 2020).

Ils sont connus pour être de potentielles sources de composés bioactifs avec des activités antibactériennes (Lucas et al., 2007) et antifongiques (Nicoletti et al., 2007).

C. Le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* appartient à la classe des *Sordariomycètes*, famille des *Hypocraceae* et à la division des Ascomycètes (Ben Amira, 2018).

Ils sont formés par des petits conidiophores simples ou ramifiés apparaissent sur des hyphes cloisonnés hyalins, sur lesquels sont insérés des petites phialides en forme de quille,

renflées, seules ou groupées par trois. Au sommet des phialides se trouve un amas de conidies de 2,5 à 3µm de diamètres qui peuvent être échinulées, lisses ou globuleuses (**Richter et al., 1999**).

Ce sont des moisissures présents dans une grande variété d'habitats y compris le sol (**Huerga et al., 2023**), l'eau (**Rocha et al., 2012**), l'air (**Madsen et al., 2007**), le corps humain (**Kredics et al., 2003**) et dans la matière organique en décomposition (**Blaszczyk et al., 2011**).

Les champignons du genre *Trichoderma* produisent une variété de métabolites secondaires qui ont de diverses activités biologiques considérés comme des composés principaux pour le développement de produits à intérêt pharmacologique (**Bai et al., 2022**), à activité antibactérienne (**Xiao et al., 2021**), antifongique (**Rahman et al., 2023 ; Rukachaisirikul et al., 2019**) et antivirale (**Li et al., 2019 ; Yamamoto et al., 2012**).

D. Le genre *Rhizoctonia*

Selon **Ajayi-Oyetunde et al., (2017)**, le genre *Rhizoctonia* appartient au phylum *Basidiomycota*, classe *Agaricomycetes*, ordre *Cantharellales* et à la famille *Ceratobasidiaceae*.

C'est un genre qui regroupe des champignons filamenteux hétérogènes qui partagent plusieurs caractéristiques communes dans leurs états anamorphes et ne produisent pas de spores asexuées. Ils sont présents dans le sol, principalement associés aux racines et sont généralement des agents phytopathogènes importants sur le plan économique (**García et al., 2006**).

Ils sont capables de produire plusieurs métabolites secondaires à intérêt pharmacologique qui ont plusieurs activités antimicrobiennes (**Sonawane et al., 2021; Liang et al., 2015**).

II.2 Activité antimicrobienne et mécanismes d'action des métabolites secondaires fongiques sur les bactéries

Les champignons sont de potentielles sources de composés bioactifs avec des activités antioxydantes, immunosuppressives, antiprolifératives, anti-inflammatoires (**Zhang et al., 2012**) et antimicrobiennes (**Gustavo et al., 2012**).

Le tableau suivant récapitule l'activité antimicrobienne de certains champignons :

Tableau II : Exemples de quelques champignons à activité antimicrobienne.

Champignons	Microorganismes	Métabolites bioactifs	Sources
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Genkwanine...	(Sonawane et al., 2021)
<i>Penicillium spp.</i>	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Iron oxide nanoparticles (IONPs)	(Zakariya et al., 2022)
<i>Xylaria sp.</i>	<i>S.aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Aeromonas hydrophyla</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Candida albicans</i>	Coumarine (7-amino-4-methyl coumarin)	(liu et al., 2008)
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>V. parahemolyticus</i>	Alcaloïdes Polyketides	(Xu et al., 2017)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	Trichodermine (4b-acetoxy-12, 13-epoxytrichothec-9-ene).	(Leylaie et Zafari, 2018)
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>P.aeruginosa</i> résistants aux carbapénèmes et <i>Enterococcus faecium</i> multirésistants	Chromone Pyrrole alcaloïde	(Liao et al., 2023)

Par différents mécanismes d'action qui varient en fonction du type de métabolite et de la bactérie ciblée, les métabolites secondaires produits par les champignons peuvent avoir des effets nocifs sur les cellules bactériennes (**Voir Tableau III**).

Tableau III : Mécanismes d'action des métabolites secondaires sur les bactéries

Métabolites	Mécanismes d'action	Sources
Polykétides	-Inhibition de la synthèse protéique en se liant à la sous unité ribosomale 50S.	Risdian et al., 2019.
Nanoparticules métalliques NPs	-Inhibition de la synthèse de la membrane/paroi cellulaire. -Inhibition des enzymes. -Production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques. -Perturbation de la transduction d'énergie.	Shaikh et al., 2019.
Alcaloïdes	-Perturbation de la membrane et la paroi cellulaire. -Inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques. -Inhibition du métabolisme bactérien.	Yan et al., 2021.
Coumarine	-Destruction de la membrane cellulaire. -Inhibition du surenroulement de l'ADN bactérien.	Han et al., 2021 Feng et al., 2020

III. PRINCIPALES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS LES BOUES RÉSIDUAIRES

III.1 Entérobactéries

Cette famille contient plus de 30 genres et 130 espèces, les plus fréquentes sont : *Klebsiella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* et *Serratia*.

Ce sont des bacilles à Gram négatif, d'une longueur courte (1 à 6 µm), dépourvues de spores, immobiles ou mobiles selon l'espèce par une ciliature péritriche. Elles peuvent avoir des fimbriae ou des pilis ce qui les rend pathogènes. Ce sont des germes non exigeants faciles à cultiver. Ils poussent sur des milieux ordinaires de gélose ou bouillon nutritif de 18h à 24 h à 37 °C jusqu'à 40 °C, en aérobie ou anaérobie (Tidrarine, 2019).

Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives et à oxydase négative. Elles possèdent une nitrate réductase et elles ont la capacité de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz (Leghmizi et al., 2005).

Les entérobactéries font partie de la flore commensale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Elles peuvent se retrouver dans le sol et dans l'eau à la suite d'une contamination fécale (Kansaye, 2020).

III.2 *Aeromonas*

Ce genre comprend des bactéries à Gram négatif, de forme bacille ou coccobacille de 1 à 3.5 µm, non sporulées, encapsulées, mobiles et à extrémité non arrondie (Anurag et al., 2023). Elles possèdent un grand pouvoir pathogène et ont la capacité de développer une résistance aux antibiotiques (Lamy, 2022). Faciles à cultiver, elles poussent dans des géloses trypticase soja, Drigalski, Mac Conkey et encore Hektoen. L'aspect de la colonie ressemble à celui des entérobactéries souvent muqueuses (Lamy, 2022).

Les *Aeromonas* sont des anaérobies facultatifs, à oxydase et catalase positive, mésophiles, capables de dégrader le nitrate en nitrites. Elles ont une résistance importante aux quelques facteurs vibriostatiques O/129 (2,4-Diamino-6,7-di-iso-propylpteridine phosphate) et ont la capacité de fermenter le glucose (Fernandez-Bravo et Figueras, 2020).

Ces germes sont trouvés principalement dans les eaux douces mais peuvent vivre dans les eaux usées, les boues, le sol, les aliments et les animaux à sang chaud et froid (Anurag et al., 2023 ; Lamy, 2022).

III.3 *Pseudomonas aeruginosa*

C'est un bacille à Gram négatif, en forme de bâtonnet, dépourvu de capsule. Il est mobile grâce à une ciliature polaire monotriche (Hafiane et Ravaoarino, 2008).

Mésophiles, capables de se développer à des températures de +4°C à 45°C avec une meilleure croissance entre 30 à 37 °C (Saussereau, 2013 ; Khalilzadeh, 2009).

La culture se fait sur des milieux ordinaires ou sur des milieux sélectifs tels que le Cétrimide additionné (Dembele, 2019). Les milieux King A et King B peuvent mettre en évidence *Pseudomonas aeruginosa* en favorisant la production de pigments (pyocyanine et pyoverdine) (Habbi et al., 2020).

Pseudomonas sont des aérobies stricts avec un métabolisme oxydatif, non fermentatif, ils possèdent une nitrate réductase et utilisent l'oxygène comme un accepteur final d'électrons (Ryan et George, 2004).

Il est à oxydase et catalase positive, avec une capacité de dégrader des sucres appréciables sur le milieu MEVAG (milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) et possède une arginine dihydrolase (Elrouini, 2018).

Très répandue dans l'environnement, cette bactérie colonise les animaux, les humains ainsi que les plantes (Botelho et al., 2019).

III.4 *Enterococcus*

Les *Enterococcus* sont des Gram positif avec une forme ovoïde ou sphérique, arrangés en paires ou en chaînettes, dépourvus de spores. Certaines espèces sont mobiles (Schleifer et Kilpper-Balz, 1984).

Les espèces les plus incriminées cliniquement sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* à cause de leur capacité à développer une résistance aux antibiotiques et leurs caractéristiques (Gracia-Solache et Rice, 2019).

Selon UK SMI (2014), le milieu de culture le plus adapté aux *Enterococcus* est la gélose au sang de cheval, formant des colonies de 1 à 2 µm blanches ou gris-blanc d'une apparence humide, alpha ou bêta hémolytiques ou non hémolytique.

Les espèces qui ont un intérêt médical sont exigeantes et poussent sur des milieux sélectifs qui contiennent des sels biliaires, de l'azide de sodium, des antibiotiques et des sels d'esculines ou de tétrazolium (Gracia- Solache et Rice, 2019).

Ces microorganismes sont des anaérobies facultatifs, chimioorganotrophes, à catalase négative et à cytochrome non complet (Lebreton et al., 2014); et avec un métabolisme homofermentatif (Švec et Franz, 2014).

Les entérocoques ont la capacité de s'adapter à des conditions difficiles, ils se retrouvent dans différents environnements (Gracia-Solache et Rice, 2019).

III.5 *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente une partie importante de la flore microbienne de différents écosystèmes, il renferme plusieurs espèces jouant un rôle important dans les cycles biologiques de carbone et de l'azote. Certaines espèces sont pathogènes pour les animaux et l'homme (Todar, 2003).

C'est une bactérie en forme de bâtonnet droit, Gram positif mobiles par des flagelles (Ludwig, 2010), Elle est caractérisée par la formation des endospores (Vos et al., 2011).

Ces microorganismes peuvent pousser sur des milieux simples ou enrichies comme la gélose nutritive ou la gélose sanguine (Pichinoty et al., 1984).

Les *Bacillus* sont des aéro-anaérobies facultatifs, microaérophiles, chimioorganotrophes, certaines sont chimiolithotrophes (Vos et al., 2011) et à catalase et oxydase positive (Harirchi et al., 2022).

Ils peuvent résister à un large éventail de températures basses (-2 au 20°C) à élevées (plus que 50 jusqu'à 70°C) (Harirchi et al., 2022).

IV. ANTIBIORÉSISTANCE et ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques ont permis de réduire la mortalité et la morbidité. Cependant, l'abus de ces antimicrobiens et leur utilisation accrue ont conduit à l'émergence de certaines formes de résistance chez les souches microbiennes qui contrecarrent les effets des antibiotiques (Bouyahya et al., 2017).

IV.1 Résistance des *Enterobacteriaceae* aux Antibiotiques

Les Entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance à différents antibiotiques.

IV.1.1 Résistance aux β -lactamines

D'après Robin et al. (2012), les entérobactéries possèdent une résistance aux β -lactamines. Cette résistance peut être naturelle par la production de céphalosporinases, pénicillinase et la production des bêta-lactamases à spectre étendu BLSE, ou acquise par la diminution de la perméabilité membranaire dues à des mutations au niveau des porines (Kumar et Schweizer, 2005) à travers les systèmes d'efflux qui expulsent les β -lactamines hors de la cellule (Gadou, 2019), ou encore par la modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) et production de β -lactamases (Faure, 2010).

IV.1.2 Résistance aux aminosides

Elle se manifeste soit par:

- Des systèmes d'efflux membranaire actifs qui réduisent l'accumulation des aminosides dans les cellules, dont certains sont exprimés de manière constitutive,
- Ou acquises par mutation (**Durante-Mangoni et al., 2009 ; Wang et al., 2001**), modification de la cible ribosomale par les méthylases d'ARNr 16S à médiation plasmidique (**Zhou et al., 2016**), ou par les enzymes-modifiant les aminosides (AME) (**Tani et Arlet, 2014**).

IV.1.3 Résistance aux quinolones

Selon **Pantel (2015)**, le mécanisme le plus connu est une mutation chromosomique dans les gènes qui codent pour les cibles intracellulaires des quinolones (les topoisomérases de types 2). Ces mutations augmentent la clairance extracytoplasmique et diminuent la pénétration transmembranaire.

IV.1.4 Résistance aux sulfamides et au triméthoprime

Elle se manifeste par altération d'une enzyme cible, généralement à médiation plasmidique (**Sköld, 2000**).

IV.1.5 Résistance à la colistine

Cette résistance se fait par plusieurs mécanismes tels que la modification post-traductionnelle des LPS qui empêche la colistine de se lier à la surface bactérienne et de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour exercer son activité bactéricide (**Jeannot et al., 2017**).

IV.1.6 Résistance aux chloramphénicol

Cette résistance est enzymatique, basée sur l'inactivation du chloramphénicol par le chloramphénicol acétyltransférases (**Pantel, 2015**).

IV.2 Résistance de *Aeromonas* aux antibiotiques

IV.2.1 Résistance aux β -lactamines

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont naturellement résistantes aux β -lactamines par la production inductible des enzymes β -lactamases d'origine chromosomique (céphalosporinases, pénicillinases de classe D, metallo-carbapénémases et β -lactamases à spectre étendu EBLSE (**Fernández-Bravo et al., 2020 ; Tekedar et al., 2019 ; Wu et al., 2011**).

IV.2.2 Résistance à la colistine

L'acquisition des gènes de résistance par certaines souches, tels que les gènes *mcr* qui codent pour les protéines MCR, qui à leurs tours modifient la charge des LPS, ce qui empêche par conséquent l'interaction de la colistine avec les LPS et leur confèrent une résistance à cet antibiotique (Aghapour et al., 2019 ; Trebosc et al., 2019 ; Eichhorn et al., 2018).

IV.2.3 Résistance aux quinolones

Certaines souches de *Aeromonas hydrophila* résistent aux quinolones suite à des mutations chromosomiques au niveau des gènes *gyrA* et *parC* qui codent pour les enzymes cibles ADN gyrase (ADN *gyr*) et topoisomérase IV (Alcaide et al., 2010).

IV.3 Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Il résiste à une variété d'antibiotiques par des mécanismes classés en : mécanismes de résistance intrinsèques, acquises et adaptatifs (par la formation du biofilm et les cellules persistantes qui représentent 1% des cellules du biofilm, à croissance lente et à métabolisme inactif menant à une tolérance aux antibiotiques) (Zheng et al., 2019). Le tableau suivant résume certains mécanismes :

Tableau IV: Mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques

Antibiotiques	Mécanismes de résistance intrinsèque	Mécanismes de résistance acquise
β -lactamines	<ul style="list-style-type: none"> - Faible perméabilité membranaire aux β-lactamines (Zheng et al., 2019). - Système d'efflux membranaire Mex AB-OprM et Mex CD-OprJ, expulsant les β-lactamines hors de la cellule (Okamoto et al., 2002; Masuda et al., 2000). - Production des enzymes β-lactamases codées par le gène <i>ampC</i> et β-lactamases à spectre étendu qui donnent une résistance aux pénicillines, céphalosporines et aztréonam (Rawat et Nair, 2010 ; Wright, 2005). 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutations menant à une hyperproduction des β-lactamases et surexpression de pompe à efflux MexCD-OprJ (Mandsberg et al., 2009). - Mutations au niveau des régulateurs de transcriptions <i>mexR</i>, <i>nalB</i>, <i>nalC</i> ou <i>nalD</i>, menant à une résistance aux β-lactamines par une surexpression des pompes MexAB-OprM (Braz et al., 2016 ; Tian et al., 2016 ; Srikumar et al., 2000 ; Saito et al., 1999) . - Mutations au niveau du gène <i>mexZ</i> menant à une surexpression de MexXY-OprM (Baum et al., 2009). - Acquisition des gènes de résistance tels que les gènes codant pour la production des β-lactamases (Hong et al., 2016).
Aminosides	<ul style="list-style-type: none"> - Faible perméabilité membranaire aux aminoglycosides (Zheng et al., 2019) . - Système d'efflux membranaire Mex XY-OprM (Hocquet et al., 2003). - Enzymes modifiant les aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutations au niveau du gène <i>mexZ</i> menant à une surexpression de MexXY-OprM (Guenard et al., 2014). - Mutations au niveau des ribosomes (El'Garch et al., 2007).

	(Ramirez et Tolmasky, 2010).	- Acquisition des gènes de résistance (Bonomo et Szabo, 2006)
Quinolones	- Système d'efflux membranaire Mex EF-OprN et MexAB-OprM (Dupont et al., 2005) .	- Mutations au niveau des régulateurs de transcriptions mexR, nalB, nalC ou nalD, menant à une résistance aux quinolones (Braz et al., 2016 ; Tian et al., 2016 ; Srikumar et al., 2000 ; Saito et al., 1999) . - Mutations au niveau du gène <i>mexZ</i> menant à une surexpression de MexXY–OprM (Guenard et al., 2014).

IV.4 Résistance des *Enterococcus* aux antibiotiques

Les *Enterococcus* développent plusieurs stratégies et mécanismes de défense contre les antibiotiques :

IV.4.1 Résistance aux β -lactamines

La résistance est d'origine intrinsèque, par des mutations au sein des gènes spécifiques à l'espèce, *pbp5*, codant pour PBP qui est une protéine liant la pénicilline impliquée dans la synthèse de la paroi. Ces mutations mènent à la diminution de l'affinité des PBP aux pénicillines et aux céphalosporines (Sifaoui et al., 2001).

IV.4.2 Résistance aux glycopéptides

La résistance est due au changement dans les acides aminés terminaux du précurseur du peptidoglycane de D-Ala-D-Ala (Courvalin, 2006).

La résistance de haut niveau est due au changement du pentapeptide terminal en D-Ala-D-Lac ce qui résulte la réduction d'affinité de la vancomycine avec le précurseur du peptidoglycane. Les gènes responsables de la résistance à la vancomycine sont: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* et *vanN* (Miller et al., 2015).

IV.4.3 Résistance aux aminoglycosides

C'est une résistance intrinsèque manifestée par deux phénomènes, le premier est la perméabilité cellulaire qui donne une mauvaise absorption de l'antibiotique, et le second phénomène consiste à l'inactivation et à la modification enzymatique de l'antibiotique (Costa et al., 1993).

IV.4.4 Résistance aux streptogramine/lincosamides

C'est une résistance intrinsèque, un gène *lsa* (contre lincosamide et streptogramine), qui code pour une protéine avec un motif de cassette se lie à l'ATP des protéines transporteuses donc la résistance est par un système d'efflux (Singh et al., 2002).

IV.4.5 Résistances aux tétracyclines/glycylcyclines

Deux stratégies principales : la première est l'utilisation des pompes à efflux pour extérioriser l'antibiotique, ces pompes sont codées par les gènes *tetK* et *tetL*, transmis par des plasmides (Chopra et Roberts, 2001).

La deuxième stratégie est la protection ribosomique par les gènes *tetM*, *tetO* et *tetS* (Bentorcha et al., 1991 ; Pepper et al., 1987). Ces gènes codent pour une protéine ayant une structure similaire aux facteurs d'allongement bactérien (Chopra et Roberts, 2001).

IV.4.6 Résistance aux quinolones

Les *Enterococcus* peuvent acquérir une résistance par différentes stratégies:

- Chez *E.faecium* et *E.faecalis*, elle se fait par des mutations dans les gènes cibles *gyr* et *parC* (Lopez et al., 2011; Yasufuku et al., 2011).
- Systèmes d'efflux.
- Protection de la gyrase de l'ADN par une protéine codée par le gène *qnr* qui va diminuer la liaison et la formation du complexe quinolone- gyrase (Tran et al., 2005).

IV.5 Résistance de *Bacillus* aux antibiotiques

Le tableau suivant montre les différents mécanismes naturels ou acquis pour développer une résistance aux différents antibiotiques chez *Bacillus*.

Tableau V : Quelques mécanismes de résistance de *Bacillus* aux antibiotiques.

Antibiotiques	Mécanismes de résistance
β-lactamines	-Enzymatique par les β-lactamases et pénicillase, qui clivent et inactivent la liaison amide du cycle β-lactame des antibiotiques (Fluit et al., 2001).
Vancomycine	-L'altération de la cible de l'antibiotique (Courvalin, 2006).
Ciprofloxacine	-L'efflux de l'antibiotique hors de la cellule. - Une mutation ciblée des gènes codant pour l'ADN gyrase (<i>Gyr</i>) et la topoisomérase IV (Fluit et al., 2001).
Tétracycline	-L'efflux actif; La modification de la cible et la modification enzymatique de l'antibiotique (Chopra et Roberts 2001.; Fluit et al., 2001).
Rifampicine	-La production d'un ARN polymérase doté d'une sous-unité β différente mais fonctionnelle qui n'est plus reconnue par l'antibiotique (Telenti et al., 1993).
Chloramphénicol	-Enzymatique médiée par l'intermédiaire du gène chloramphenicol acétyltransférase (CAT) (Fluit et al., 2001).
L'érythromycine	-La modification de la cible, l'efflux actif et l'inactivation de l'antibiotique (avec des éléments conjugatifs) (Pechère, 2001).

Partie Expérimentale

Matériel & Méthodes

I. MATERIEL ET METHODES

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida durant une période allant du mois de février 2023 jusqu'au mois de Juin 2023. Les prélèvements ont concerné des boues résiduairees provenant de trois STEPs (Beni Mered, Baraki et Boufarik) situées sur l'axe Alger-Blida.

I.1 Matériel

I.1.1 Matériel Biologique

Représenté par les prélèvements des boues résiduairees et des souches de référence *Escherichia coli* ATCC 25922.

I.1.2 Matériel non biologique

Représenté principalement par des milieux de culture, réactifs et appareillages (voir annexe n°02).

I.2 Méthodes

I.2.1 Mode de prélèvement

18 échantillons de boues (**Figure 01, Tableau VI**) ont été prélevés de façon aléatoire à partir de l'aire de stockage à raison de 6 échantillons par station. Sur les 18 échantillons, nous avons recherché les bactéries dans neuf prélèvements (à raison de trois échantillons/station).



Figure 01 : Échantillons de boues (Photos originales)

Tableau VI: Caractéristiques des échantillons des boues

Stations	B. Mered	Boufarik	Baraki
Echantillonnage	Deux échantillons par mois (Février, Mars, Avril)		
Durée de séjour des boues dans les stations	De 5 à 20 jours		
Consistance	Pâteuse		
Quantité prélevée	500 g		

La **figure 02** résume les principales étapes du protocole expérimental réalisé au cours de cette étude.

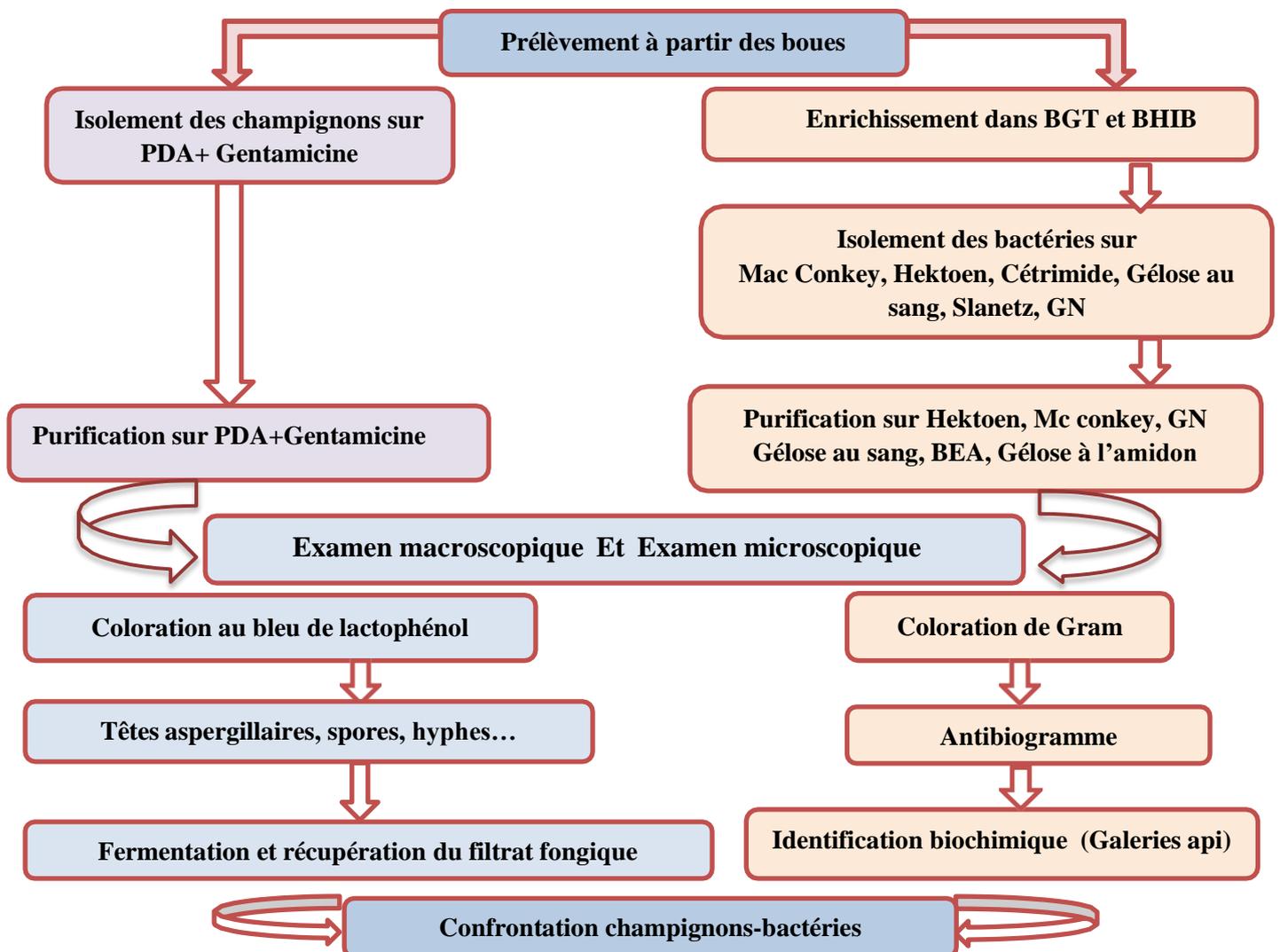


Figure 02 : Organigramme du protocole expérimental

I.2.2 Isolement et purification des champignons

L'isolement est effectué sur le milieu de culture PDA+Gentamicine à partir de la solution mère de l'échantillon des boues résiduelles, on prend une goutte à l'aide d'une pipette pasteur, on la dépose sur le milieu de culture et on ensemence la surface de la gélose par la méthode de cadrans. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C et à 30°C pendant 5 à 7 jours. Après incubation, un repiquage est effectué par le prélèvement de fragments mycéliens. Ces derniers sont déposés chacun au centre du milieu de culture PDA + Gentamicine, les boîtes sont ensuite incubées à (25 à 30°C) pendant 5 à 7 jours. Le repiquage a été effectué plusieurs fois jusqu'à l'obtention des souches pures.

I.2.3 Observation macroscopique et microscopique des champignons

L'identification des genres fongiques a été basé sur les critères morphologiques macroscopique (aspect, couleur 'recto et verso' et la vitesse de croissance) et microscopiques (l'aspect du mycélium, les spores, la présence et l'absence des têtes aspergillaires et les chlamydospores). L'identification a été basée sur les clés de détermination décrites dans le cahier de formation 'Bioforma-Les moisissures d'intérêt médical numéro 25, 2002'.

❖ Coloration au bleu de lactophénol

Cette coloration permet de mettre en évidence les structures microscopiques fongiques. Sur une lame, on dépose un petit échantillon de culture fongique prélevé à l'aide d'une anse stérile, puis on ajoute une à deux gouttes de lactophénol sur l'échantillon et on homogénéise, on recouvre par une lamelle et on observe sous microscope optique (Objectif 10x40).

I.2.4 Isolement et purification des bactéries

On prépare des dilutions à partir de la solution mère contenant des boues et de l'eau distillée, puis on prend 2 ml de la suspension dans 15 ml de bouillon BGT ou BHIB. On l'incube à 37°C pendant 24 h.

L'isolement est effectué à partir des dilutions et des enrichissements sur les milieux de culture suivants: milieu Hektoen et Mac Conkey (*Enterobacteriaceae*), la gélose Cétrimide (*Pseudomonas*), la gélose nutritive (*Bacillus*), milieu Slanetz (*Enterococcus*) et la gélose au sang (*Aeromonas*).

À partir de la suspension bactérienne, on ensemence la surface du milieu de culture par la méthode des quadrants. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, on sélectionne les colonies pures.

I.2.5 Antibiogramme

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été étudiée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH) (**Rahal et al., 2020**) et les critères de lecture et d'interprétation ont été ceux préconisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) et recommandée par l'OMS.

La liste des antibiotiques testés sur les bactéries est présentée dans le Tableau (**voir annexe n°4**).

Des boîtes de gélose Mueller Hinton sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une culture jeune et pure avec une suspension calibrée à 0.5McF ou à une D.O de 0.08 à 0.10 lue à 625nm contenant environ 10^8 bactéries par ml (**Figure 03**).

Dans cette étude, le choix des antibiotiques utilisés a été réalisé selon lastandardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8^{ème} édition (2020).

❖ 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.

❖ Ensemencement

- On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- On 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 à 60°C à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- On finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur le périphérique de la gélose.

- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut qu'on recharge l'écouvillon à chaque fois.

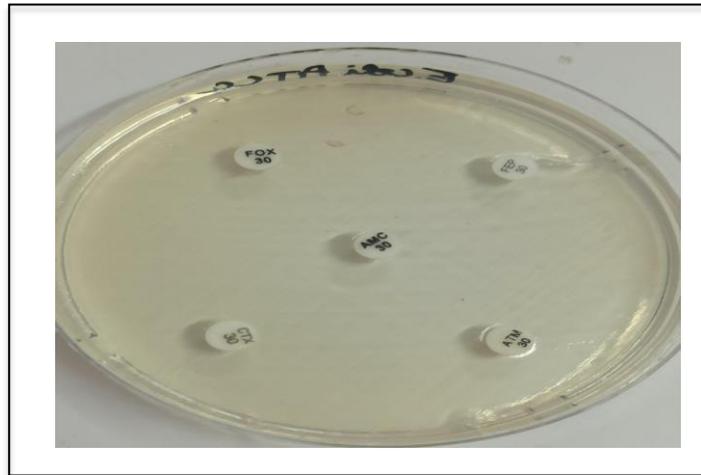


Figure 03 : Méthode des disques d'antibiotiques (Photo originale)

❖ Application des disques d'antibiotiques

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

❖ Lecture

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition et on compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes. On classe la bactérie dans l'une des catégories : Résistant (R), Sensible (S) ou Intermédiaire (I).

I.2.6 Détermination de la CMI sur milieu liquide pour le genre *Bacillus*

I.2.7 Sélection des bactéries multirésistantes par le calcul de l'indice de MAR

L'indice de MAR est ensuite calculé pour déterminer les souches multirésistantes, par la formule suivante : Indice MAR = a/b, dont 'a' est le nombre d'antibiotiques auxquels la souche présente une résistance et 'b' est le nombre total d'antibiotiques testés contre elle (Blasco *et al.*, 2008). Si l'indice de MAR est supérieur ou égale à 0.45 la bactérie est considérée comme multirésistante.

I.2.8 Identification biochimique par galeries API

Suite aux études macroscopique et microscopique, l'identification a été réalisée par les galeries miniaturisées API 20 E et API NE (Bio-Mérieux, France) (**Voir Annexe n°3**).

I.2.9 Fermentation et récupération du filtrat de culture

I.2.10 Test de confrontation champignons-bactéries

I.2.10.1 Méthode de diffusion en disque

I.2.10.2 Méthode des puits

Résultats & Discussion

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Du mois de février 2023 jusqu'au mois de Juin 2023, un total de 18 échantillons de boues résiduaires (6 échantillons/station) ont été prélevés à partir de trois STEPs différentes.

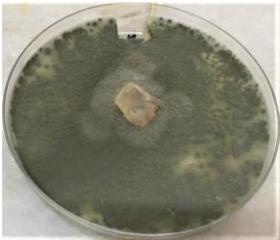
Nous avons recherché les champignons dans les 18 prélèvements. Par contre, pour la recherche des bactéries, nous nous sommes limités à 9 prélèvements (trois échantillons/STEP). Après culture, isolement et identification, nous avons obtenu les résultats suivants :

II.1 Résultats de l'identification des fungi

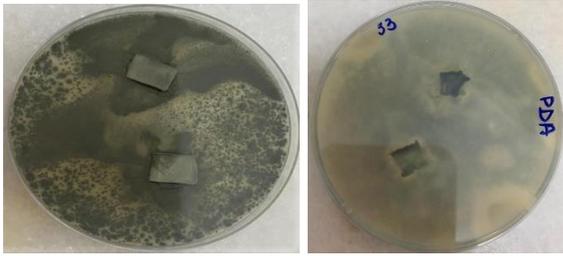
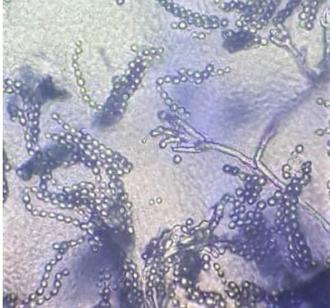
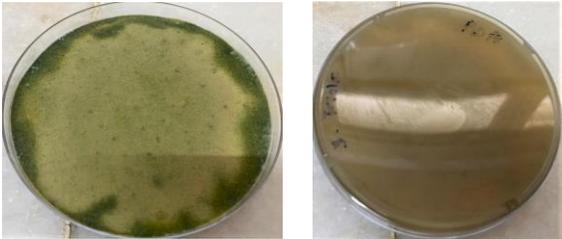
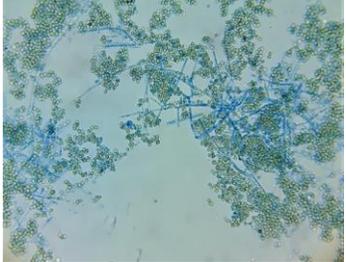
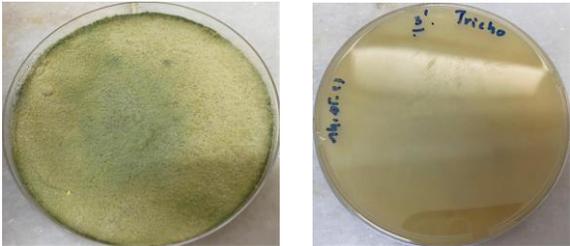
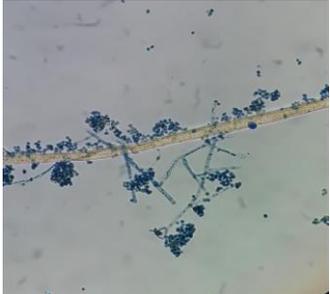
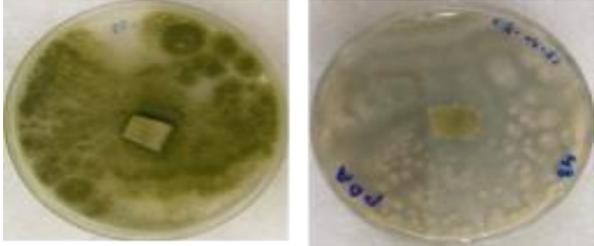
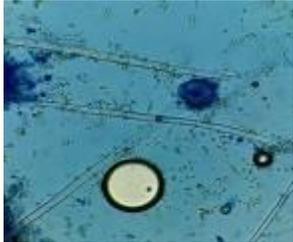
La comparaison de nos résultats de la caractérisation morphologique avec les clés d'identification ont permis de déterminer le genre de chaque isolat et de rapprocher à l'espèce pour d'autres cas. Parfois, l'identification phénotypique est insuffisante et l'étude des acides nucléiques s'avère très utile.

Les isolats fongiques caractérisés sont consignés dans le tableau suivant:

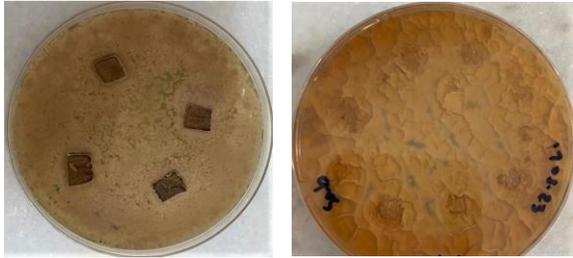
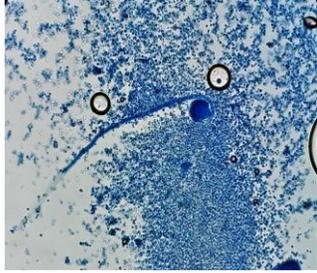
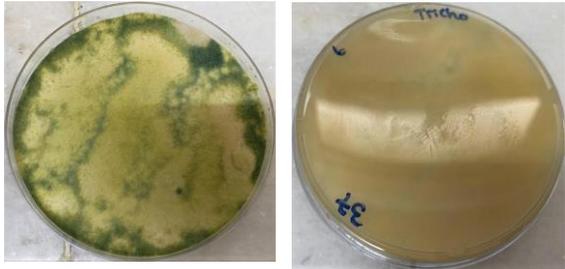
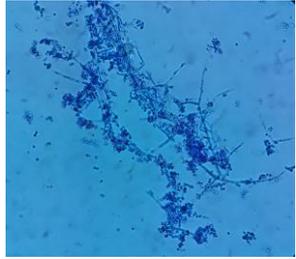
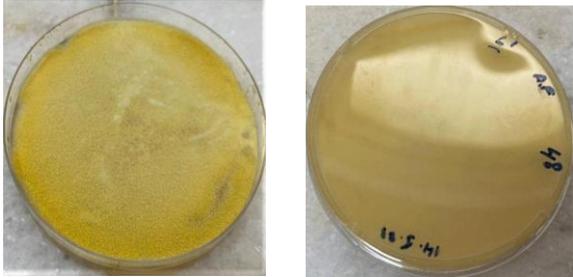
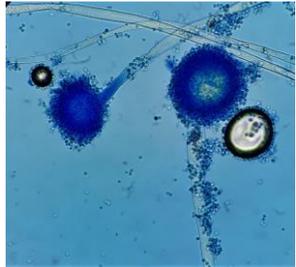
Tableau VII : Aspects macroscopique et microscopique des champignons isolés des boues résiduaires collectés dans les trois STEPs.

Champignon et son numéro	Aspect macroscopique	Aspect microscopique (GX400)
<p><i>Penicillium sp.</i> N°01</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <ul style="list-style-type: none"> - Recto: couleur bleu-gris à gris-vert, les colonies sont denses, poudreuses et duveteuses. - Verso: foncé. 	<div style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> - Aspect de pinceaux

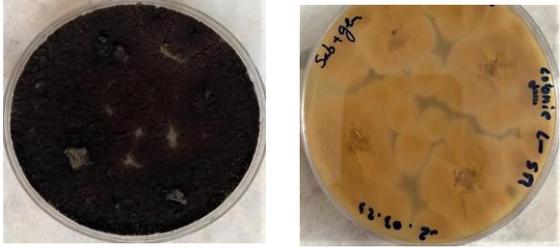
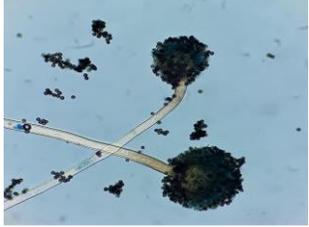
Partie expérimentale

<p><i>Penicillium</i> sp. N°02</p>	 <ul style="list-style-type: none"> - Recto: couleur bleu gris à gris-vert, colonies denses, poudreuses et duveteuses. - Verso: Foncé. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Présence de penicilles et des spores unicellulaires disposées en chaînes
<p><i>Trichoderma</i> sp. N°03</p>	 <ul style="list-style-type: none"> - Recto: Colonies laineuses, de couleur blanche au départ apres vert-jaune - Verso: Incolore. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Amas de conidies visualisés au sommet des phialides
<p><i>Trichoderma</i> sp. N°03'</p>	 <ul style="list-style-type: none"> - Recto: Colonies laineuses, de couleur blanche au départ apres vert-jaune - Verso: Incolore. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Amas de conidies visualisés au sommet des phialides
<p><i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> N°04</p>	 <ul style="list-style-type: none"> - Recto: colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune. - Verso: Incolore. 	 <ul style="list-style-type: none"> - Tête aspergillaire radiée. Spores globuleuses.

Partie expérimentale

<p><i>Aspergillus terreus</i> N°05</p>	 <p>- Recto: colonies duveteuses à poudreuses, de teinte beige à brune noisette ou cannelle. - Verso: jaune à brun orange.</p>	 <p>- Tête aspergillaire : bisériée, en colonne évasée (aspect d'éventail)</p>
<p><i>Trichoderma</i> <i>sp.</i> N°06</p>	 <p>- Recto: Colonies laineuses, de couleur blanche au départ après vert-jaune - Verso: Incolore.</p>	 <p>- Amas de conidies visualisés au sommet des phialides</p>
<p><i>Aspergillus flavus</i> N°06'</p>	 <p>- Recto: Colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes. - Verso: Incolore</p>	 <p>- Tête aspergillaire radiée. spores globuleuses</p>

Partie expérimentale

<p><i>Aspergillus niger</i> N°08</p>	 <p>- Recto: Colonies d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. - Verso: Incolore à jaune pâle.</p>	 <p>- Têtes aspergillaires bisériée radiée, noire à maturité</p>
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> N°09</p>	 <p>- Recto: Colonies blanches, puis bleu-vert, virant ensuite au vert-foncé à gris noirâtre. - Verso: Colour jaune-vert</p>	 <p>- Têtes aspergillaires unisériée, en colonne compacte, assez grande</p>

(Photos Originales)

II.2 Répartition et fréquence des champignons isolés dans les STEPs

Au total, nous avons identifié 61 souches de champignons. La répartition et la fréquence de ces souches sont présentées par le tableau suivant :

Tableau VIII : Répartition des champignons selon les STEPs

STEPs	AT	AFI	AN	AF	Tr	Pn	Rh	Total
Boufarik	07	07	02	04	05	02	01	28
Baraki	/	06	/	/	/	02	05	13
B.Mered	02	03	03	02	07	02	01	20
Total	09	16	05	06	12	06	07	61

AT: *Aspergillus terreus*, AF1: *Aspergillus flavus*, AF: *Aspergillus fumigatus*, Tr: *Trichoderma sp.*, Pn: *Penicillium sp.*, Rh: *Rhizoctonia sp.*

La diversité des champignons dans les stations d'épuration des eaux usées a été rapportée dans diverses études. Ils constituent l'une des communautés microbiennes les plus dominantes dans les stations d'épuration des eaux usées. Cette diversité taxonomique dépend de plusieurs facteurs tels que : la saison, le stade d'épuration, le climat et la qualité des eaux usées qui arrivent dans la station (Yang et al., 2020 ; Molina-Muñoz et al., 2009).

Dans une étude menée par Buratti et al., (2022), la diversité des fungi a été étudiée dans deux STEPs situées au nord de l'Italie, les ordres et les genres des champignons les plus rencontrés étaient: les Eurotiales (essentiellement *Aspergillus* et *Penicillium*), Trichosporonales (*Trichosporon sensu lato*), Saccharomycetales (*Geotrichum*) et Hypocreales (essentiellement *Fusarium* et *Trichoderma*).

Dans une autre étude menée par Wei et al., (2018), les genres fongiques les plus rencontrés dans 5 STEPs en Chine étaient : *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Candida*, *Malassezia*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*.

II.3 Résultats de l'identification des bactéries

Au total, nous avons isolé 93 souches bactériennes réparties comme suit : 68 souches appartenant aux *Enterobacteriaceae*, 06 souches de *Enterococcus*, une souche de *Acinetobacter*, 09 souches du genre *Pseudomonas*, 01 *Aeromonas* et 08 souches du genre *Bacillus*.

41 bactéries (soit 44%) ont été isolées dans la station de Baraki, 27 bactéries (29%) isolées de la station de Beni Mered et 25 bactéries (27%) dans la station de Boufarik (**Figure 08**).

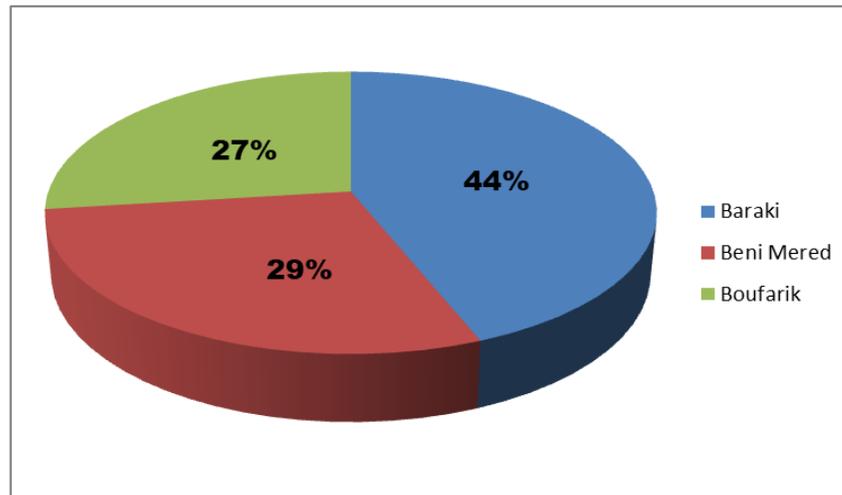


Figure 04 : Répartition des bactéries selon les stations

II.4 Résultats de l'antibiorésistance

Toutes les souches isolées et une souche *E. coli* ATCC 25922 ont été testées vis à vis de 32 molécules d'antibiotiques appartenant à 10 familles différentes (**Voir Annexe n°04**).

II.4.1 Antibiorésistances chez les *Enterobacteriaceae*

D'après les résultats obtenus de l'antibiogramme des entérobactéries (**Figure 09**), des taux importants de résistance aux antibiotiques ont été enregistrés : Ampicillines (AMP) 88%, Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC) 60%, Céfazoline (CZ) 97%, Cefoxitine (CX) 84% et Ciprofloxacine (CIP) 78% et au Céfotaxime (CTX) et à l'Acide nalidixique (NA) 59%

Des taux très élevés concernant la sensibilité des Entérobactéries aux antibiotiques suivants: Aztreonam (AT) 63% ,Imipénème (IMP) 69%, Chloramphénicol (C) 74%, Cotrimoxazole (COT) 56%, Amikacin (AK) 90% et de 41% au Céfotaxime (CTX) et à l'Acide nalidixique (NA). Par rapport à la souche *E.coli* ATCC 25922, elle est sensible à tous les antibiotiques testés.

Selon une étude réalisée par **Galler et al., (2018)**, le taux de résistance des entérobactéries est de 56,3% au CIP , NA de 75% et 0% à AK .

Les travaux menés par **Mahalo et al., (2018)** , ont trouvé que les bactéries les plus résistantes sont celles qui sont isolées des boues des STEPs de la ville de Kakamega. Donc les boues sont les meilleurs sites pour développer une résistance aux antibiotiques.

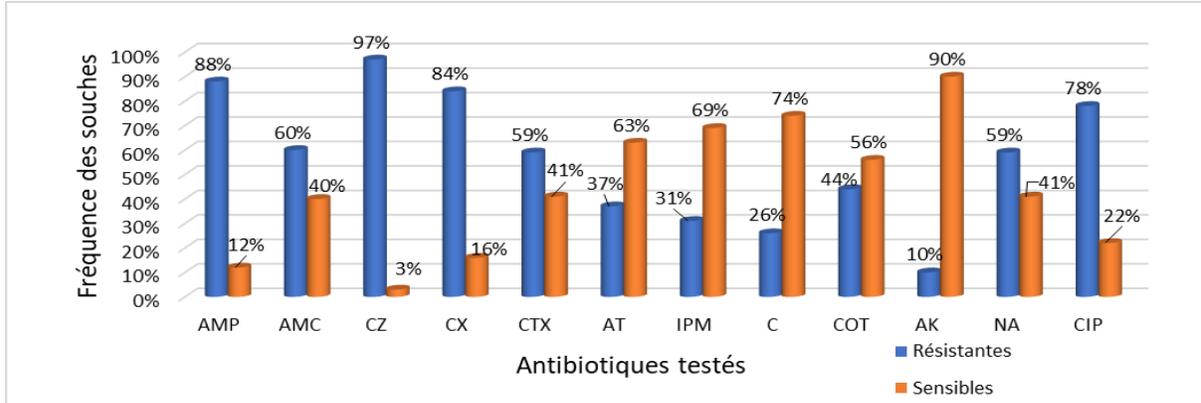


Figure 05 : Taux de résistance des Entérobactéries aux différents antibiotiques

II.4.2 Antibiorésistance des *Pseudomonas*

Les taux de résistance de *Pseudomonas* d'après les résultats obtenus de l'antibiogramme (**Figure 10**) sont très élevés par rapport au Ticarcilline + Acide Clavulanique (TCC) et Pipéracilline (PIP) avec un taux de 100% . Elles sont également résistantes à la Ticarcilline (TIC), Ceftazidime (CAZ) et (CTR) avec un taux 89% et à L'Aztreonam (AZ) 56%.

Concernant la sensibilité, des taux très élevés ont été obtenus: 89% pour l'Imipénème (IPM), Amikacine (AK), Ciprofloxacine (CIP), Lévofloxacine (LEV), 100% pour la Gentamicine (CN), Tobramycine (TOB), Netilmicin (NET) et 44% pour (AZ).

Dans une étude réalisée par **Luczkiewicz et al., (2015)** au nord de la Pologne , ils ont constaté que le taux de résistance des *Pseudomonas aeruginosa* à l'Aztreonam (AZ) était de 54,8% et 63,7% au Ticarcilline (TIC).

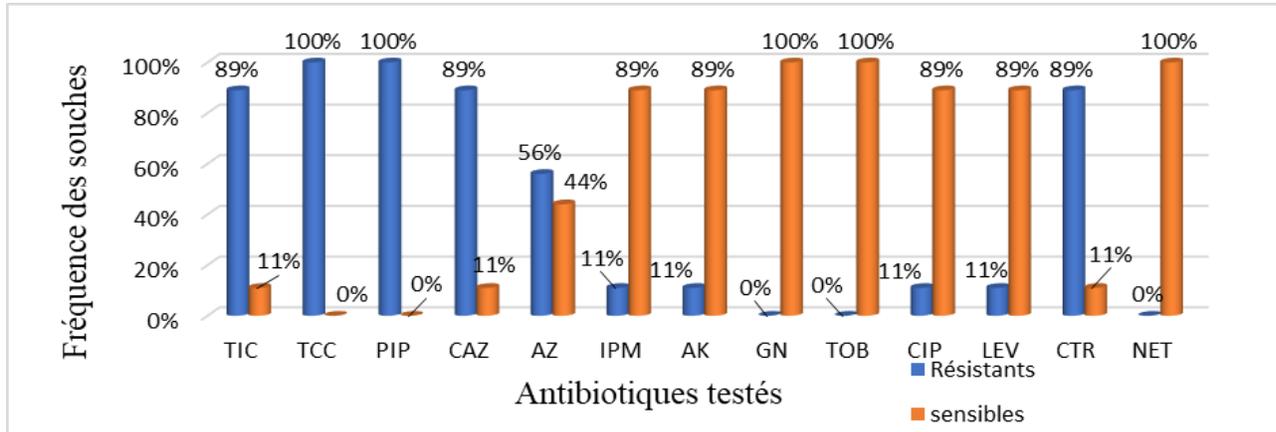


Figure 06: Taux de résistance chez *Pseudomonas* aux antibiotiques testés.

II.4.3 Antibiorésistance chez *Aeromonas*

Le profil de résistance de la souche est comme suit :

Elle est résistante au Cefotaxime (CAZ), Imipénème (IMP), Tétracyclines (TE), Ertapénèmes (ETP), Céfotaxime (CTX) et Céfoxitine (FOX). Par contre elle est sensible au Ciprofloxacine (CIP), Chloramphenicol (C), Gentamicine (GN), Lévofloxacine (LE).

Rodriguez et al., (2020), ont constaté que le taux de résistance est de 76,9% au Ceftriaxone (FOX) et 65,4% au Ciprofloxacine (CIP).

II.4.4 Antibiorésistance de *Enterococcus*

L'antibiogramme de *Enterococcus* (**figure 11**) a montré un taux élevé de résistance de 83% aux antibiotiques suivants : Vancomycine (VAN), Erythromycine (E), Pristinamycine (PRI), Cotrimoxazole (COT), et Ciprofloxacine (CIP) et par 50% Ampicilline (AMP), Tétracycline (TE) et Rifampicine (RIP), Ampicilline (AMP), Tétracycline (TE) et Rifampicine (RIP) de et par 50% aux Vancomycine (VAN), Erythromycine (E), Pristinamycine (PRI), Cotrimoxazole (COT), et Ciprofloxacine (CIP).

Des taux élevés de sensibilité de 100% aux antibiotiques suivants : Teicoplanine (TEI), ST(300), Gentamicine (GN), et une sensibilité de 83% pour Lévofloxacine (LEV).

Selon une étude menée par **Galler et al., (2018)**, des profils de résistance très similaires à notre étude sont constatés comme pour l'Ampicilline (AMP), la Teicoplanine (TEI) et la Vancomycine (VAN).

Partie expérimentale

Selon une autre étude menée par **Sadikalay (2018)**, aucune résistance aux antibiotiques testés Vancomycine (VAN) et Ampicilline (AMP) n'a été détectée parmi les souches isolées sur milieux sélectifs.

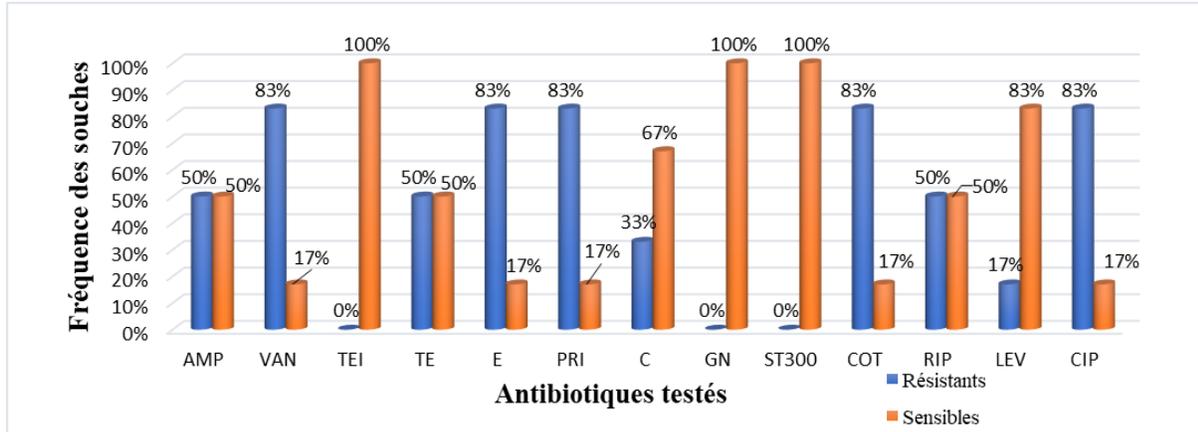
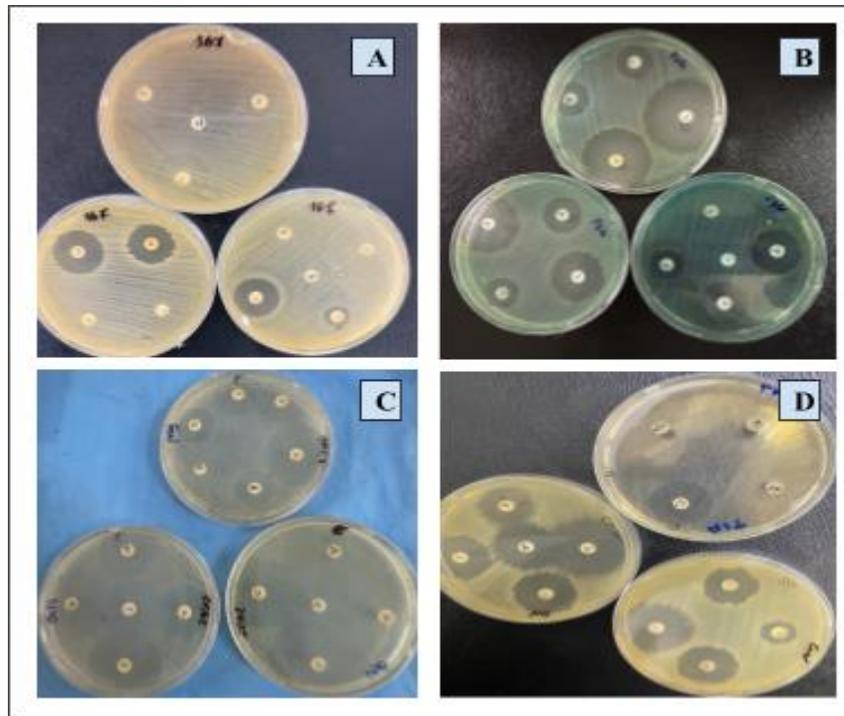


Figure 07 : Taux de résistance chez *Enterococcus* aux différents antibiotiques testés.

Les photos ci-dessous illustrent les résultats de l'antibiogramme des souches multirésistantes:



A: *Enterobacteriaceae* **B:** *Pseudomonas* **C:** *Enterococcus* **D:** *Aeromonas*

Figure 08 : Résultats de l'antibiogramme (Photos originales).

II.4.5 Antibiorésistance chez *Bacillus*

Les résultats obtenus ont montré une résistance élevée aux antibiotique suivants : 100% vis-à-vis d'Ampicilline (AMP), Vancomycine (VAN), Cotrimoxazole (COT) et Ciprofloxacine (CIP), 75% pour Imipénème (IMP) et 50% pour la Gentamicine (GN) (**Tableau IX**), (**Figure 13**).

Tableau IX: Antibiogramme de *Bacillus*.

Antibiotiques	GN	AMP	COT	CIP	VAN	IMP
Résistance	50%	100%	100%	100%	100%	75%
Sensibilité	50%	00%	00%	00%	00%	25%

D'après une étude menée par **Yang et al., (2009)**, les souches ont montré une résistance importante vis-à-vis de l'ampicilline (AMP) 78,5 %, l'Oxacilline (OXA) 77,9 % Les résistances les plus faibles étaient vis à vis de la céfotaxime (CTX) 36,8 % et la ceftazidime (CAZ) 56,4 %.

Une autre étude menée par **Pandey et al., (2011)** où des concentrations Ampicilline (AMP), Ciprofloxacine (CIP), Chloramphénicol (CHL), Tétracycline (TE) qui varient de 100µg/ml à 10 mg/ml, la culture a montré une croissance en présence d'antibiotique jusqu'à une concentration de 1 mg/ml mais à 10 mg/ml l'antibiotique était sensible.

Partie expérimentale

Les tableaux ci-dessous (X, XI, XII, XIII) montrent les résultats de l'antibiogramme des souches multirésistantes (S pour sensible et R pour résistant). La multirésistance a été déterminée par le calcul de l'indice de MAR (Blasco et al., 2008).

Tableau X : Phénotype de résistance et l'indice de Mar (IM) chez les *Enterobacteriaceae*

Bactérie	Phénotype de résistance chez les <i>Enterobacteriaceae</i>												IM
	AMP	AMC	CZ	CX	CTX	AT	IMP	C	COT	AK	NA	CIP	
1	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	0,5
2	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	0,75
3	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	0,75
4	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	0,75
5	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	0,66
6	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	0,83
7	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	0,58
8	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	0,83
9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	0,75
10	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	0,5
11	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	0,5
12	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	0,75
13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	0,83
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
15	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	0,83
16	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	0,75
17	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	0,58
18	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	0,75
19	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	0,58
20	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	0,5
21	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	0,75
22	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	0,66
23	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	0,66
24	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	0,66
25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1
<i>E.coli</i> ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0

Partie expérimentale

Tableau XI : Phénotype de résistance et l'indice de Mar chez *Pseudomonas*, *Enterococcus* et *Aeromonas*.

	Phénotype de résistances de <i>Pseudomonas</i>													IM
	TIC	TCC	PIP	CAZ	AZ	IPM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	CTR	NET	
26	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	0,53
	Phénotype de résistance d' <i>Enterococcus</i>													
	AMP	VAN	TEI	TE	E	PRI	C	GN	ST300	COT	RIP	LEV	CIP	
27	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	0,69
28	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,61
29	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	0,53
30	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	0,53
	Phénotype de résistance d' <i>Aeromonas</i>													
	CIP	C	CN	LE	SXT	AK	ATM	CAZ	IMP	TE	ETP	CTX	FOX	
31	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	0,46

Tableau XII : Phénotype de résistance et l'indice de Mar chez *Acinetobacter*.

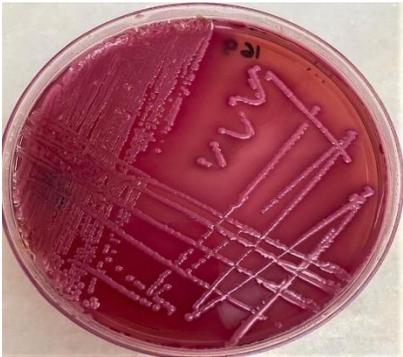
Bactérie	Phénotype de résistance d' <i>Acinetobacter</i>										IM
	CIP	IPM	GEN	AK	LEV	TOB	PIP	TCC	SXT	TC	
32	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	0,6

II.5 Identification biochimique par galeries Api

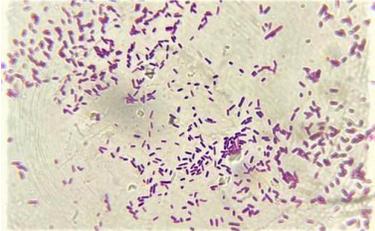
Pour poursuivre cette étude, 40 souches multirésistantes ont été sélectionnées pour l'identification par galeries Api 20 E et Api NE (Tableaux XIV et XVI).

Tableau XIII : Résultats de l'identification des bactéries

Escherichia coli

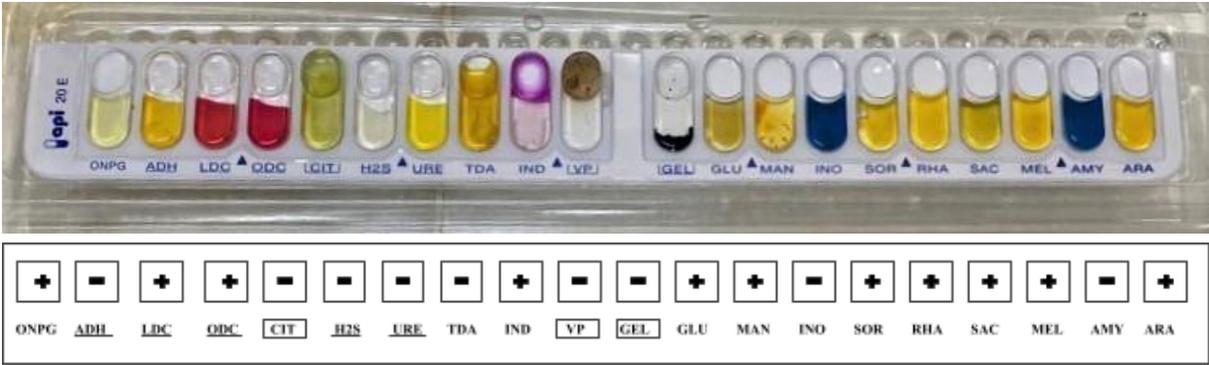


- Sur **Mac Conkey** :
Colonies roses, mates,
arrondies avec un centre
bombé.



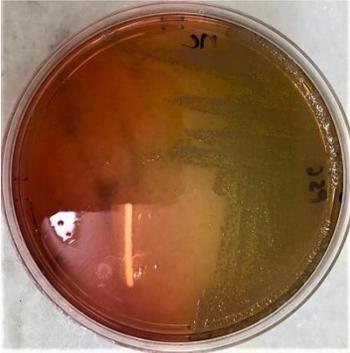
- **Coloration de Gram (GX1000)**: Coccobacilles,
Gram négatif.

- Galerie **API 20E**

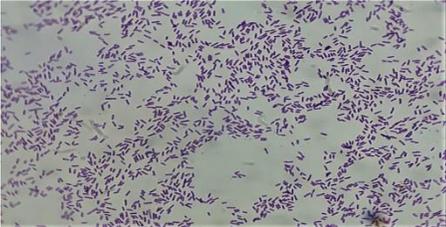


+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA

Pseudomonas aeruginosa



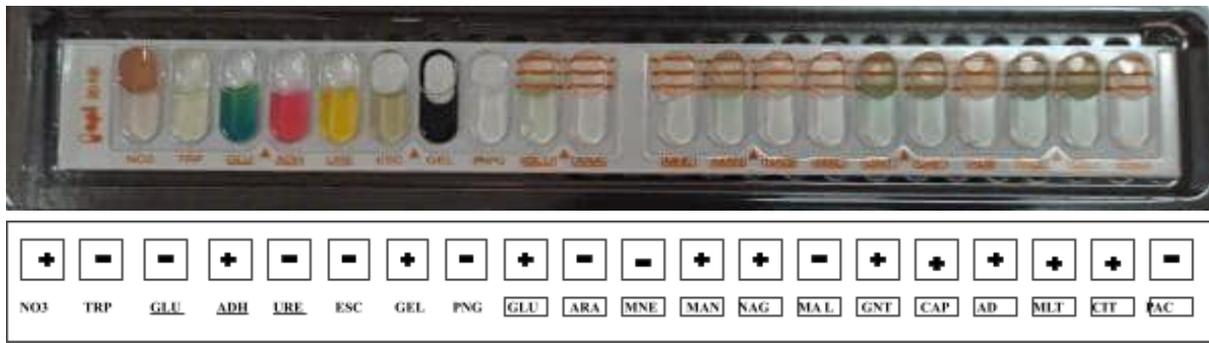
- Sur **Mac Conkey** :
colonies incolores
ou vert.



- **Coloration de Gram (GX1000)** : Bacilles, Gram négatif .

- Galerie **API NE**

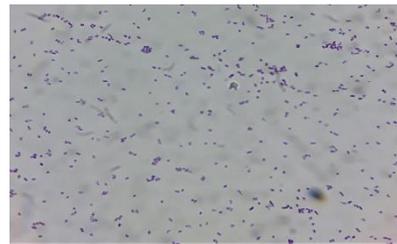
Partie expérimentale



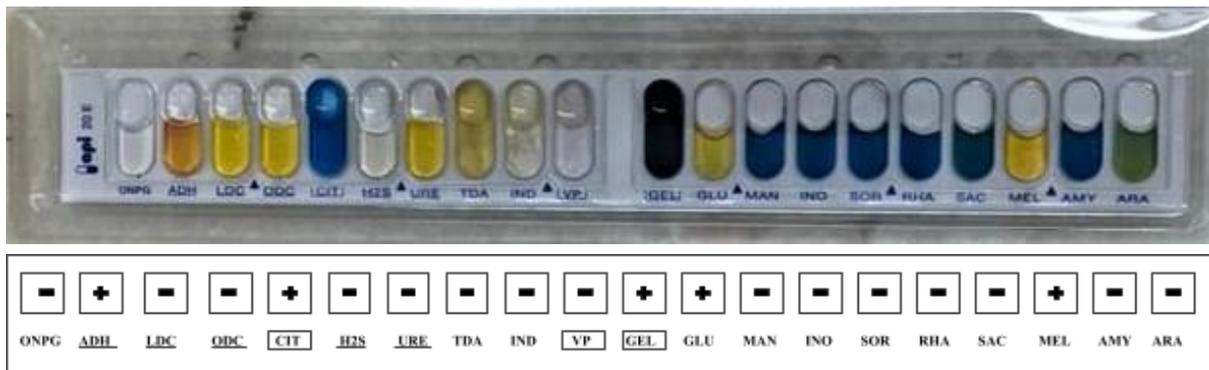
Acinetobacter



-Sur GN :
colonies blanches
muqueuses.



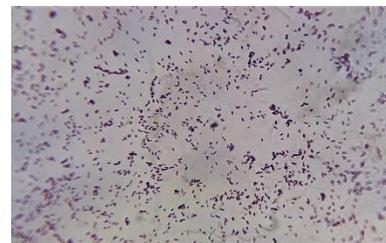
-Coloration de Gram (GX1000) : Gram négatif
Galerie API 20 E



Aeromonas



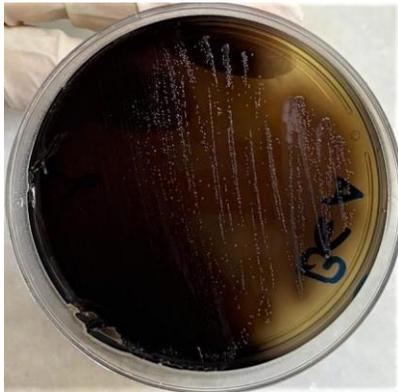
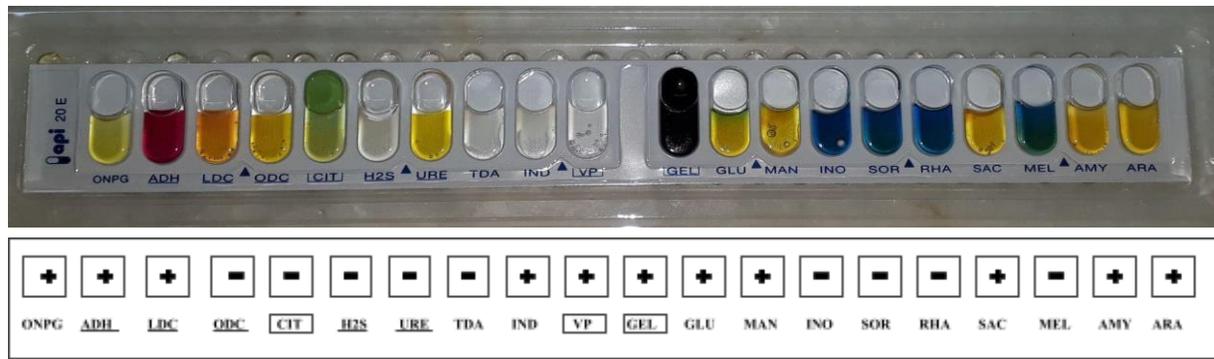
-Sur Hektoen
colonies incolores.



-Coloration de Gram (GX1000) : bacilles à Gram négatif.

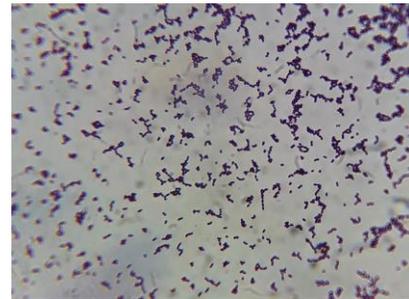
- Galerie API 20 E

Partie expérimentale

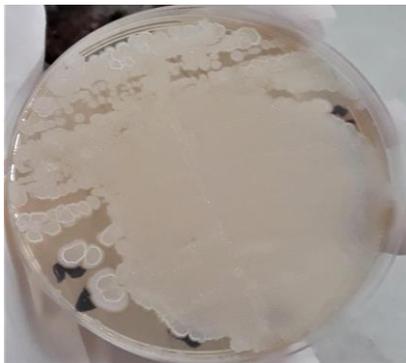


Enterococcus

- Sur **BEA** :
colonies noires.



- **Coloration de Gram (GX1000)** : cocci à Gram positif.



Bacillus

- Sur **Gélose nutritive**:
couleur blanche, marges
dentelées.



- **Coloration de Gram (GX1000)** : bactéries à gram positif.

(Photos originales)

Tableau XIV: Résultats de l'identification des BMR.

Numéro de la souche	Le nom de la bactérie
1,2,3,4,5,6,25	<i>Escherichia coli</i>
7,8,9	<i>Klebsiella oxytoca</i>
10	<i>Rahnella aquatilis</i>
11	<i>Serratia liquefaciens</i>
12	<i>Salmonella arizonae</i>
14,15	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
17,18	<i>Citrobacter aerogenes</i>
19, 13	<i>Citrobacter freundii</i>
20,21	<i>Citrobacter braakii</i>
22,23	<i>Enterobacter cloacae</i>
24	<i>Providencia stuartii</i>
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27,28,29,30	<i>Enterococcus spp.</i>
31	<i>Aeromonas hydrophila groupe 1</i>
32	<i>Acinetobacter baumannii</i>
33,34,35,36,37,38,39,40	<i>Bacillus spp.</i>

II.6 Résultats de l'activité antibactérienne des champignons isolés vis à vis des bactéries multirésistantes

Conclusion

Conclusion

Les champignons constituent une source prometteuse de nouveaux agents antimicrobiens en raison de leur capacité à produire une grande variété de molécules bioactives.

La caractérisation morphologique des champignons a permis de déterminer 61 souches de champignons appartenant à : *Aspergillus terreus* (n=9), *Aspergillus flavus* (n=16), *Aspergillus fumigatus* (n=6), *Aspergillus niger* (n=5), *Trichoderma sp.* (n=12), *Penicillium sp.*(n=6), *Rhizoctonia sp.*(n=7).

Au total, 93 souches bactériennes ont été isolées, réparties comme suit : 68 souches appartenant aux *Enterobacteriaceae*, 06 souches de *Enterococcus*, une souche de *Acinetobacter*, 09 souches du genre *Pseudomonas*, 01 *Aeromonas* et 08 souches du genre *Bacillus*. Les résultats de l'antibiogramme et le calcul de l'IM ont fait ressortir 40 BMR.

Dix (10) champignons ont été sélectionnés pour l'étude de l'activité antibactérienne et ont montré une activité antibactérienne considérable sur les BMR testées. *Rhizoctonia sp.* (07) a montré la plus importante activité sur 39 souches bactériennes (soit 97%) avec des diamètres des zones d'inhibition importants jusqu'à 34mm. Les souches d'*Aspergillus* (04, 06', 5,4 et 08) ont montré une activité sur respectivement 60% (n=24), 67% (n=27), 62% (n=25), 60% (n=24) et 47 % (n=19) de l'ensemble des bactéries. Les champignons du genre *Trichoderma* (03, 03' et 06), ont également montré une activité considérable sur 62% (n=25) à 75% (n=30) des bactéries.

Par rapport aux champignons du genre *Penicillium* (01 et 02), une activité faible a été signalée sur 35% (n=14) des BMR.

Le potentiel fongique de l'activité antibactérienne par la méthode de disque était plus important que par celle des puits.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que les champignons testés ont montré des actions antibactériennes prometteuses contre les bactéries multirésistantes sélectionnées.

Les résultats obtenus à travers cette étude sont importants et méritent d'être plus approfondis. Les perspectives qui peuvent être envisagés sont les suivantes :

- Optimiser les méthodes d'identification des bactéries et des fungi isolés par des méthodes moléculaires.
- Extraction et screening des métabolites secondaires produites par les fungi.
- L'utilisation de plusieurs méthodes d'extraction des métabolites secondaires afin de sélectionner la méthode la plus rentable.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits fongiques.
- Étude de la synergie entre les champignons à activité antimicrobienne.
- Étude de l'activité antifongique des fungi.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., ... & Kafil, H. S. (2019).** Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infection and drug resistance*, 965-975.
- **Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018).** *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. *Plant pathology*, 67(1), 3-17.
- **Alcaide, E., Blasco, M. D., & Esteve, C. (2010).** Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in microbiology*, 161(1), 40-45.
- **Al-Shaibani, A. B., Al-Shakarchi, F. I., & Ameen, R. S. (2013).** Extraction and characterization of antibacterial compound from *Aspergillus niger*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 16(4), 167-174.
- **Amir, S. (2005).** Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage: devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost thèse de doctorat , Université de Toulouse France.
- **Anonymous. (2014).** Identification of *Streptococcus* Species, *Enterococcus* species and morphology of similar organisms. UK standards for microbiology investigation. Public Health .England, London .
- **Anurag S., Avdhesh K., Neelesh K., 2023.** A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture . *Heliyon*, 9(3), P1-23.

B

- **Bachelart, J. (2021).** Étude 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.
- **Bai, B., Liu, C., Zhang, C., He, X., Wang, H., Peng, W., & Zheng, C. (2022).** *Trichoderma* species from plant and soil: An excellent resource for biosynthesis of terpenoids with versatile bioactivities. *Journal of Advanced Research*.

- **Baum, E. Z., Crespo-Carbone, S. M., Morrow, B. J., Davies, T. A., Foleno, B. D., He, W., ... & Bush, K. (2009).** Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(7), 2785-2790.
- **Ben Amira, M. (2018).** Etude de la relation mycoparasitaire *Trichoderma harzianum* avec *Fusarium solani* chez l'Olivier; caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez *Trichoderma harzianum*, Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne(2017-2020).
- **Bentorcha, F., De Cespédès, G., & Horaud, T. (1991).** Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(5), 808-812.
- **Blasco, M. D., Esteve, C., & Alcaide, E. (2008).** Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *Journal of applied microbiology*, 105(2), 469-475.
- **Błaszczuk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G. J., Sobieralski, K., & Siwulski, M. (2011).** Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of applied genetics*, 52, 233-243.
- **Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006).** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement_2), S49-S56.
- **Botelho, J., Grosso, F., Peixe, L. (2019).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*-mechanisms, epidemiology and evolution, drug resistance updates, v 44, P26.
- **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Dakka, N. (2018).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), S173-S183.
- **Braz, V. S., Furlan, J. P. R., Fernandes, A. F. T., & Stehling, E. G. (2016).** Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 363(16).
- **Buratti, S., Girometta, C. E., Baiguera, R. M., Barucco, B., Bernardi, M., De Girolamo, G., & Savino, E. (2022).** Fungal diversity in two wastewater treatment plants in North Italy. *Microorganisms*, 10(6), 1096.

C

- **Cazar, M. E., Schmeda-Hirschmann, G., & Astudillo, L. (2005).** Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1067-1075.
- **Chabasse, D., Bouchara, J-P., Ludovic, G., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002).** Bioforma-Les moisissures d'intérêt médical numéro 25. Laboratoire de parasitologie-mycologie de CHU d'Angers. Paris. 157.
- **Chopra, I., & Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.
- **Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J., & Courvalin, P. (1993).** Characterization of the chromosomal aac (6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1896-1903.
- **Courvalin, P. (2006).** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical infectious diseases*, 42(Supplement_1), S25-S34.

D

- **Delarras, C. 2007.** *Pseudomonas* et *ex-pseudomonas*. Dans : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaires. Édition médicales internationales, Paris : technique et documentation Lavoisier , v 1 , p. 339-340.
- **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.
- **Dupont, P., Hocquet, D., Jeannot, K., Chavanet, P., & Plésiat, P. (2005).** Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(4), 518-522.
- **Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., Falagas, M. E. (2009).** Do we still need the aminoglycosides?. *International journal of antimicrobial agents*, 33(3), 201-205.

E

- **Eichhorn, I., Feudi, C., Wang, Y., Kaspar, H., Feßler, A. T., Lübke-Becker, A., ... & Schwarz, S. (2018).** Identification of novel variants of the colistin resistance gene *mcr-3* in *Aeromonas spp.* from the national resistance monitoring programme GE RM-Vet and from diagnostic submissions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1217-1221.
- **El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., & Plésiat, P. (2007).** Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(3), 1016-1021.
- **Elrouini, A. (2018).** Emergence de la résistance carbapénems chez *Pseudomonas aeruginosa*. These de doctorat, université Mohammed V de Rabat, P7-10-36.

F

- **Faure, S., Perrin-Guyomard, A., Delmas, J. M., Chatre, P., Laurentie, M. (2010).** Transfer of plasmid-mediated CTX-M-9 from *Salmonella enterica* serotype Virchow to *Enterobacteriaceae* in human flora-associated rats treated with cefixime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 164-169.
- **Feng, D., Zhang, A., Yang, Y., & Yang, P. (2020).** Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. *Archiv der Pharmazie*, 353(6), 1900380.
- **Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020).** An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1), 129.
- **Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, M. J. (2017).** The presence of contaminations in sewage sludge—The current situation. *Journal of Environmental Management*, 203, 1126-1136.
- **Fluit A.C., Maarten R.V., Schmitz F.J. (2001).** Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology Reviews*. 14 : 836-871

G

- **Gadou, V. (2019).** Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan,, CÔTE D'IVOIRE, thèse de doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N° ORDRE 2186/2019).
- **Galler, H., Feierl, G., Petternel, C., Reinthaler, F. F., Haas, D., Habib, J., ... & Zarfel, G. (2018).** Multiresistant bacteria isolated from activated sludge in Austria. *International journal of environmental research and public health*, 15(3), 479.
- **García, V. G., Onco, M. P., & Susan, V. R. (2006).** Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1), 55-79.

- **García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019).** The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00058-18.
- **Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. R., & Manual, B. S (2007).** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria . Springer Science & Business Media. Philadelphia, PA, USA. volume 2, 556-578.
- **Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2014).** Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(1), 221-228.

H

- **Habbi, A., Bouacha, H., Djera, K., (2020).** Épidémiologie et résistance aux antibiotiques du *Pseudomonas aeruginosa* sur cinq ans (2015-2019) au CHU NEDIR Mohamed de Tizi ouzou, thèse de doctorat, université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, P6-31.
- **Hafiane A. et Ravaoarinoro M. 2008.** “Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose”; Elsevier masson, Médecine et maladies infectieuses. 38, 238-47
- **Han, S., Yang, L., Wang, Y., Ran, Y., Li, S., & Ding, W. (2021).** Preliminary studies on the antibacterial mechanism of a new plant-derived compound, 7-methoxycoumarin, against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 697911.
- **Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., ... & Taherzadeh, M. J. (2022).** *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355.
- **He, F., Bao, J., Zhang, X. Y., Tu, Z. C., Shi, Y. M., & Qi, S. H. (2013).** Asperterrestide A, a cytotoxic cyclic tetrapeptide from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* SCSGAF0162. *Journal of natural products*, 76(6), 1182-1186.
- **Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., ... & Plésiat, P. (2003).** MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1371-1375.
- **Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. (2015).** Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & chemotherapy*, 47(2), 81-97.

- **Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., ... & Frisvad, J. C. (2020).** Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, 95, 5-169.
- **Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, Á., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2023).** Vineyard Management and Physicochemical Parameters of Soil Affect Native *Trichoderma* Populations, Sources of Biocontrol Agents against *Phaeoacremonium minimum*. *Plants*, 12(4), 887.
- **Hultman, J., Tamminen, M., Pärnänen, K., Cairns, J., Karkman, A., Virta, M. (2018).** Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS microbiology ecology*, 94(4), fiy038.

I

- **Imbert, S. (2020).** Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus*, thèse de doctorat, Sorbonne université.

J

- **Jarde, E., Mansuy, L., Faure, P. (2003).** Characterization of the macromolecular organic content of sewage sludges by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography–mass spectrometer (THM-GC/MS). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 68, 331-350.
- **Jeannot, K., Bolard, A., Plesiat, P. (2017).** Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *International journal of antimicrobial agents*, 49(5), 526-535.
- **Jouda J-B., Kusari S., Lamshöft M., Talontsi FM., Meli CD., Wandji J., Spiteller M (2014).** Penialidins A–C with strong antibacterial activities from *Penicillium* sp., an endophytic fungus harboring leaves of *Garcinia nobilis*. *Fitoterapia*, 98:209-214.

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. (2018).** Antibiotic-resistance genes in wastewater. *Trends in microbiology*, 26(3), 220-228.
- **Khalilzadeh P. 2009.** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.

- **Kredics, L., Antal, Z., Dóczi, I., Manczinger, L., Kevei, F., & Nagy, E. (2003).** Clinical importance of the genus *Trichoderma*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 50(2-3), 105-117.
- **Kumar, A., Schweizer, H. P. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1486-1513

L

- **Lamy, B., 2022.** *Aeromonas* et aeromonoses en médecine humaine. *Biologie médicale*, 17(1), P1-15.
- **Le, V. T. (2020).** Exploration de la chimiodiversité d'un *Penicillium restrictum* d'origine marine par approches métabolomique et lipidomique, thèse de doctorat, Nantes.
- **Lebreton, F., Willems, R. J. L., & Gilmore, M. S. (2014).** *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In M. S. Gilmore (Eds.) et. al., *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- **Leghmizi, A., Boulkem, W., bougherra, H. (2005).** Fréquences des entérobactéries dans les infections urinaires et entériques. Diplômes des études supérieures en biologie. Université de jijel.
- **Leylaie, S., & Zafari, D. (2018).** Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from Vinca plants. *Frontiers in microbiology*, 9, 1484.
- **Li, B., Li, L., Peng, Z., Liu, D., Si, L., Wang, J., ... & Lin, W. (2019).** Harzianoic acids A and B, new natural scaffolds with inhibitory effects against hepatitis C virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(3), 560-567.
- **Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Wang, Z. (2009).** Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental microbiology*, 11(6), 1506-1517.
- **Liang, X. U., WANG, X. H., LUO, R. Y., LU, S. Q., GUO, Z. J., WANG, M. A., ... & ZHOU, L. G. (2015).** Secondary metabolites of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn and their biological activities. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 80-87.
- **Liao, L. X., Huang, Z. D., Wei, F. T., Wang, W. J., & Yang, X. L. (2023).** New chromone analog and pyrrole alkaloid produced by *Penicillium sclerotiorum* and their antibacterial activity. *Journal of Asian Natural Products Research*, 25(3), 225-230.
- **Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Zhou, J. (2008).** Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 241-247.

- **López, M., Tenorio, C., Del Campo, R., Zarazaga, M., & Torres, C. (2011).** Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant *Enterococci* of different origins. *Journal of Chemotherapy*, 23(2), 87-91.
- **Lucas, E. M., Castro, M. C., & Takahashi, J. A. (2007).** Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 785-789.
- **Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K., Fudala Ksiazek, S. (2015).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* Isolated from wastewater and waste water impacted marine coastal zone, *Environ Sci Pollut Res* 22:19823–19834.
- **Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009).** Revised road map to the phylum Firmicutes. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, NY. volume 2,(1-13).

M

- **Madsen, A. M., Hansen, V. M., Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007).** Human exposure to airborne fungi from genera used as biocontrol agents in plant production. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14(1).
- **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*, 12(28), PP8.
- **Mandsberg, L. F., Ciofu, O., Kirkby, N., Christiansen, L. E., Poulsen, H. E., & Høiby, N. (2009).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2483-2491.
- **Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000).** Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(12), 3322-3327.
- **Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014).** Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1221-1236.
- **Moal, F. (2023).** Plaidoyer pour un usage raisonné des antibiotiques. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(627), 20-22.
- **Molina, G., Pimentel, M. R., Bertucci, T. C., & Pastore, G. M. (2012).** Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chem. Eng. Trans*, 27 (4).

- **Molina-Muñoz M., Poyatos, J. M., Sánchez-Peinado, M., Hontoria, E., González-López, J., & Rodelas, B. (2009).** Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Science of the total environment*, 407(13), 3994-4003.

N

- **Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A., & Ciavatta, M. L. (2007).** Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163(5), 295-301.

O

- **Okamoto, K., Gotoh, N., & Nishino, T. (2002).** Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(8), 2696-2699.

P

- **Pandey, A., Afsheen, A. F., Tiwari, S. K. (2011).** Isolation and characterization of multi drug resistance cultures from waste water. *J Pharm Biomed Sci*, 13(7).
- **Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.
- **Pantel, A. (2015).** *Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez Escherichia coli ST131*, thèse de doctorat , Université Montpellier.
- **Pechère, J. C. (2001).** Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *International journal of antimicrobial agents*, 18, 25-28.
- **Pepper, K. A. R. E. N., Horaud, T. H. E. A., Le Bouguéneq, C. H. A. N. T. A. L., & de Cespédès, G. I. L. D. A. (1987).** Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with similar antibiotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(9), 1394-1402.

- **Pepper, K., Horaud, T., Le Bouguéneq, C., & de Cespédès, G. (1987).** Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with similar antibiotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(9), 1394-1402.
- **Pichinoty, F., Asselineau, J., & Mandel, M. (1984, September).** Biochemical characterization of *Bacillus benzoovorans* sp. nov., a new filamentous, sheathed mesophilic species, degrading various aromatic acids and phenols. In *Annales de Microbiologie* .135(2),209-217.

Q

- **Quignon-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-Ferrand II.

R

- **Rachada, H., Pranee, R., Rungtiwa, C., Nattawut, B., & Masahiko, I. (2010).** Butyrolactones from the Fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1545-1548.
- **Rahal, k., Benslimani, A., Tali maamar, H., (2020).** Standardisation des tests de la sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale. Édité avec la collaboration de L'OMS.
- **Rahman, M., Borah, S. M., Borah, P. K., Bora, P., Sarmah, B. K., Lal, M. K., ... & Kumar, R. (2023).** Deciphering the antimicrobial activity of multifaceted rhizospheric biocontrol agents of solanaceous crops viz., *Trichoderma harzianum* MC2, and *Trichoderma harzianum* NBG. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- **Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010).** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, 13(6), 151-171.
- **Rawat, D., & Nair, D. (2010).** Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of global infectious diseases*, 2(3), 263.
- **Regitano, J. B., Rodrigues, M. M., Martins, G. L., Osti, J. F., Viana, D. G., de Souza, A. J. (2022).** Sewage Sludge Management for Environmental Sustainability: An Introduction. *Sustainable Management and Utilization of Sewage Sludge*, 1-28.
- **Richter, S., Cormican, M. G., Pfaller, M. A., Lee, C. K., Gingrich, R., Rinaldi, M. G., & Sutton, D. A. (1999).** Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1154-1160.
- **Risdian, C., Mozef, T., & Wink, J. (2019).** Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 7(5), 124.

- **Robin, F., Gibold, L., Bonnet, R. (2012).** Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne?. *Revue Francophone des laboratoires*, 2012(445), 47-58.
- **Rocha, L. C., Luiz, R. F., Rosset, I. G., Raminelli, C., Selegim, M. H., Sette, L. D., & Porto, A. L. (2012).** Bioconversion of iodoacetophenones by marine fungi. *Marine biotechnology*, 14, 396-401.
- **Rodríguez, E. A., Garzón, L. M., Gómez, I. D., & Jiménez, J. N. (2020).** Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative *bacilli* throughout a wastewater treatment plant in Colombia. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, 358-366.
- **Rukachaisirikul, V., Chinpha, S., Phongpaichit, S., Saikhwon, N., Sakayaroj, J., & Preedanon, S. (2019).** Sesquiterpene and monoterpene derivatives from the soil-derived fungus *Trichoderma reesei* PSU-SPSF013. *Phytochemistry Letters*, 30, 124-129.
- **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.Sabatier - Toulouse III. Toulouse.

S

- **Sadikalay, S. (2018).** *Influence des rejets humains et animaux sur la diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, aux animaux et à l'environnement en Guadeloupe*, thèse de doctorat, Antilles.
- **Sadrati N., Harzallah D., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S (2013).** Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *Journal of Plant Protection Research* 53(2):128-136.
- **Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M-L., Albihn, A. (2004).** Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Research* vol 38, (8), pp1989-1994.

- **Saito, K., Yoneyama, H., & Nakae, T. (1999).** nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS microbiology letters*, 179(1), 67-72.
- **Samwal, A., Avdhesh K., Neelesh K., 2023.** A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture . *Heliyon*, 9(3), P1-23.
- **Saussereau, E.2013.** Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat d'université Pierre et Marie Curie.Paris VI
- **Schleifer K. H., Kilpper-Balz R.(1984)** .Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.34(1):31–34.
- **Shaikh, S., Nazam, N., Rizvi, S. M. D., Ahmad, K., Baig, M. H., Lee, E. J., & Choi, I. (2019).** Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2468.
- **Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., & Gutmann, L. (2001).** Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9), 2594-2597.
- **Singh, K. P., Mohan, D., Sinha, S., Dalwani, R. (2004).** Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55(2), 227-255.
- **Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002).** An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1845-1850.
- **Sköld, O. (2000).** Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates*, 3(3), 155-160.

- **Sonawane, H., Ghule, S., Math, S., Shelke, D., & Nikalje, G. (2021).** *Rhizoctonia bataticola*: From plant pathogen to a potential source of pharmaceutically relevant metabolites. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100171.
- **Srikumar, R., Paul, C. J., & Poole, K. (2000).** Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1410-1414.
- **Srivastava, S., Bhargava, A., Pathak, N., & Srivastava, P. (2019).** Production, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* and monitoring of protein-ligand interaction through in-silico approaches. *Microbial pathogenesis*, 129, 136-145.
- **Švec P, Franz, C., (2014).** The genus *Enterococcus*. In Holzappel WH, Wood BJB (ed). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons.Ltd, Chichester, England.175–211 .

T

- **Tani, Z. B. A. K., Arlet, G. (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie*, 62(3), 169-178.
- **Tekedar, H. C., Kumru, S., Blom, J., Perkins, A. D., Griffin, M. J., Abdelhamed, H., ... & Lawrence, M. L. (2019).** Comparative genomics of *Aeromonas veronii*: Identification of a pathotype impacting aquaculture globally. *PloS one*, 14(8), e0221018.
- **Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T., Bodmer, T. (1993).** Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(10), 2054-2058.Thèse de doctorat, Université de Toulouse France.
- **Tian, Z. X., Yi, X. X., Cho, A., O’Gara, F., & Wang, Y. P. (2016).** CpxR activates MexAB-OprM efflux pump expression and enhances antibiotic resistance in both laboratory and clinical nalB-type isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 12(10), e1005932.
- **Tidrarine, S. (2019).** Epidémiologie des *entérobactéries* multirésistantes productrices de carbapénemases à l’HIT. Thèse de doctorat, faculté de médecine et de pharmacie-marrakech, P: 56.
- **Todar, k. (2003).** Online textbook. Emeritus, University of Wisconsin-Madison. <http://textbookofbacteriology.net>.
- **Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005).** Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 118-125.

- **Trebosc, V., Gartenmann, S., Tötzl, M., Lucchini, V., Schellhorn, B., Pieren, M., ... & Kemmer, C. (2019).** Dissecting colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *MBio*, 10(4), e01083-19.

V

- **Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... & Samson, R. A. (2014).** Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78(1), 343-371.
- **Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011).** *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Firmicutes*. Springer Science & Business Media. NEW YORK, NY, USA. volume(3)

W

- **Wang, D. Y. (2012).** Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Aspergillus spp.* isolates from avian farms in Guangxi, China, thèse de doctorat, AgroParisTech; Université de Guangxi (Chine).
- **Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M., Levy, S. B. (2001).** Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1515-1521.
- **Wei, Z., Liu, Y., Feng, K., Li, S., Wang, S., Jin, D., ... & Deng, Y. (2018).** The divergence between fungal and bacterial communities in seasonal and spatial variations of wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 628, 969-978.
- **Wright, G. D. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.
- **Wu, C. J., Chuang, Y. C., Lee, M. F., Lee, C. C., Lee, H. C., Lee, N. Y., ... & Ko, W. C. (2011).** Bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Aeromonas spp.* at a medical center in Southern Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12), 5813-5818.

X

- **Xu, L. L., Cao, F., Tian, S. S., & Zhu, H. J. (2017).** Alkaloids and polyketides from the soil fungus *Aspergillus terreus* and their antibacterial activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 53, 1212-1215.

Y

- **Yamamoto, T., Izumi, N., Ui, H., Sueki, A., Masuma, R., Nonaka, K., ... & Shiomi, K. (2012).** Wickerols A and B: novel anti-influenza virus diterpenes produced by *Trichoderma atroviride* FKI-3849. *Tetrahedron*, 68(45), 9267-9271.
- **Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021).** Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. *Antibiotics*, 10(3), 318.
- **Yang, Y., Wang, L., Xiang, F., Zhao, L., & Qiao, Z. (2020).** Activated sludge microbial community and treatment performance of wastewater treatment plants in industrial and municipal zones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 436.
- **Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., ... & Fujisawa, M. (2011).** Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *Journal of clinical microbiology*, 49(11), 3912-3916.

Z

- **Zakariya, N. A., Majeed, S., & Jusof, W. H. W. (2022).** Investigation of antioxidant and antibacterial activity of iron oxide nanoparticles (IONPS) synthesized from the aqueous extract of *Penicillium* spp. *Sensors International*, 3, 100164.
- **Zhang, H., Bai, X., & Wu, B. (2012).** Evaluation of antimicrobial activities of extracts of endophytic fungi from *Artemisia annua*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(2), 120-123.
- **Zhao, J., Chen, J., Zhao, M., Qiu, X., Chen, X., Zhang, W., ... & Zhang, F. (2016).** Multilocus sequence types and virulence determinants of hypermucoviscosity-positive *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired infection cases in Harbin, North China. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69(5), 357-360.

Annexes

Annexe n°01: Classification des bactéries

1. Entérobactéries:

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

Dembelle (2019)

2. *Aeromonas* :

Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Aeromonadales</i>
Famille	<i>Aeromonadaceae</i>
Genre	<i>Aeromonas</i>

(Bergey's manual of systematic bacteriology, 2007)

3. *Pseudomonas aeruginosa* :

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

(Delarras, 2007)

4. *Enterococcus* :

Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Enterococcaceae</i>

(ex thiercelin & jouhaud 1903) Schleifer et Kilpper-Bälz, 1984.

5. *Bacillus* :

Phylum	<i>Firmicutes</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>

(Ludwig et al., 2009)

Annexe n°02: Matériel non biologique

● Appareillage et autre matériel

- | | | | |
|-------------------|---------------------|----------------|---------------------|
| - Lames | - Pipette graduée | - Etuve | - Microscope |
| - Boîtes de Pétri | - Pipette Pasteur | - Autoclave | - Plaque chauffante |
| - Ecouvillon | - Anse de platine | - Bain marie | - Balance |
| - Bec benzène | -Agitateur secoueur | -Micropipettes | -Pied à coulisse |
| - Papier filtre | -Centrifugeuse | | |

● Réactifs et colorants

- Lugol / Fuschine / violet de gentiane / Bleu de lactophénol
- VP1 / VP2/RM
- Kovacs / TDA

- Milieux de culture

Milieu de cultur	Composition	Milieu de cultur	Composition
BGT	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	MH	Peptone de caséine acide(H) :17,5g Infusion de viande : 2 g Agar Agar bactériologique : 17g Amidon : 1,5g
TSA	Digestion pancréatique de caséine :15g Peptone de soja : 5g Chlorure de sodium : 5g Agar : 15g	GN	Agar bactériologique : 15 g Peptone : 5g Extrait de levure : 2 g Extrait de viande : 1g Chlorure de sodium : 5g
Hektoen	Bleu de bromothymol : 0,065g Agar : 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	BMH	Peptone de caséine acide(H) :17,5g Infusion de viande : 2 g Agar Agar bactériologique : 17g Amidon : 1,5g
PDA	Extrait de pommes de terre : 200g Glucose : 20,0 g Agar agar bactériologique : 15,0 g	PDB	Extrait de pommes de terre : 200g Glucose : 20,0 g
Gélose au sang	Mélange spécial de peptones : 23g, amidon : 1g chlorure de sodium : 5 g agar : 10 g sang : 50 mL. (pH) 7,3.	Gélose à l'amidon	Amidon soluble: 10.0g Caséine (sans vitamine) : 0.30g KNO3: 2.0g MgSO4.7H2O : 0.05g K2HPO4 : 2.0g NaCl : 2.0 g Voleur3 : 0.02g FeSO4.7H2O : 0.01g Agar : 18.0g

<p>Mac Conkey</p>	<p>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</p>	<p>Slanetz</p>	<p>Agar-agar : 10 g Peptone : 20 g Azide de sodium : 0,4 g Glucose : 2 g TTC (chlorure de 2-3-5-triphényl-tétrazolium) : 0,1g</p>
<p>BEA</p>	<p>Tryptone : 17.0g Peptone pepsique de viande: 3.0g Extrait de levure : 5.0g Bile de bœuf déshydratée : 10.0g Azide de sodium: 0.25g Esculine: 1.0g Citrate ferrique ammoniacal : 0.5g Citrate de sodium :1.0g Chlorure de sodium :5.0g Agar :13.0g Eau distillée :1L</p>	<p>Gélose au Cétrimide</p>	<p>Peptone de gélatine :16.0g Peptone de caséine : 10.0g Cétrimide : 0.2g Acide nalidixique ou pas : 15.0g Sulfate de potassium : 10.0g Chlorure de magnésium : 1.4g Agar : 10g Eau distillée : 1L</p>
<p>BHIB</p>	<p>Protéose-peptone: 10,0 g Infusion de cervelle de veau:12,5 g Infusion de cœur de bœuf: 5,0 g Glucose: 2,0 g Chlorure de sodium: 5,0 g Hydrogénophosphate de sodium: 2,5 g pH = 7,4</p>		

Annexe n°03: Identification des bactéries

- **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.

- **Examen microscopique**

- **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 1 min).

- On rince avec l'eau distillée.

- On ajoute le Lugol (pendant 1 min).

- On rince avec l'eau distillée.

- On trempe la lame dans l'alcool (Décoloration) pendant 30 sec.

- On rince avec l'eau distillée.

- On recouvre la lame par la fuschine (pendant 30 sec).

- On rince avec l'eau distillée puis on la laisse sécher.

- On met une goutte d'huile d'immersion puis on observe sous microscope (Objectif X 100).

- ❖ **Lecture**

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

- **Galerie miniaturisée (Api 20 E)**

La galerie API 20 E est constituée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

- ❖ **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, H₂S 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.

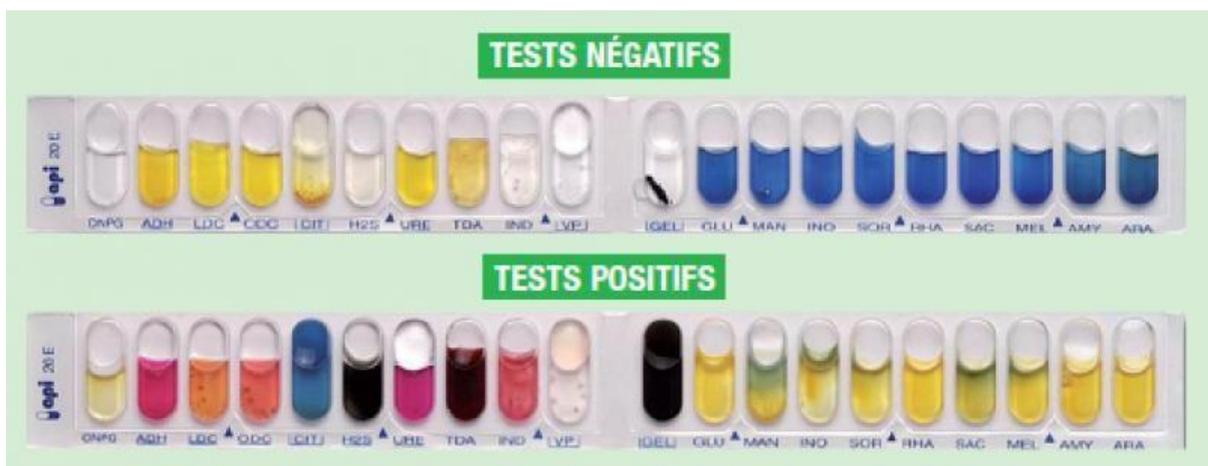
❖ Lecture : Figure 14

Figure 14: Lecture galerie API 20 E

- **Galerie API 20 NE**

Est un système standardisé pour l'identification des bacilles à gram négatif non entérobactéries et non fastidieux comme *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- ❖ **Préparation de la galerie**

-Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation avec l'eau distillée ou déminéralisée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Sortir la galerie de son emballage individuel en toute mesure de stérilité et la placer dans la boîte d'incubation.

- ❖ **Préparation de l'inoculum**

À partir d'une culture jeune et pure, on prépare une suspension bactérienne dans une ampoule de NaCl 0.85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité de 0.5 Mcfarland.

- ❖ **Inoculation de la galerie**

-On introduit la suspension bactérienne dans les tubes des tests NO₃ à PNPG et non les cupules à l'aide d'une 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 GLU, ADH, URE, on crée une anaérobiose en remplissant leur cupules d'huile de paraffine.

-Dans une ampoule AUX Medium, on transfère 200µL de la suspension bactérienne déjà préparée et on homogénéise.

- On remplit les micro-cupules des tests GLU à PAC, en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe.

-On renferme la boîte d'incubation et la place dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

❖ Lecture

La lecture se fait après incubation (**Tableau XVII**)

Tableau XVII: Lecture API 20 NE

API 20 NE	
Résultats négative	
Résultats positive	

Annexe n°04:Listes des antibiotiques

Tableau XVII : Liste des antibiotiques testés sur les *Entérobactéries* et *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Entérobactéries</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
	Carbapeneme	Imipeneme	IMP	10µg	≤19	20-22	≥23
	C1G	Cefazolin	CZ	30µg	≤19	20-22	≥23
	C2G	Céfoxitine	CX	30µg	≤14	15-17	≥18
	C3G	Céfotaxime	CTX	30µg	≤19	20-22	≥23

Aminosides	Amikacine	AK	30µg	≤14	15-16	≥17	
Phénicolés	Chloramphenicol	C	30µg	≤12	13-17	≥18	
Quinolones 1ère génération	Acide nalidixique	NA	30µg	≤13	14-18	≥19	
Fluoroquinolon	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≤20	21-30	≥31	
Aminosides	Gentamicine	GN	10µg	≤12	13-14	≥15	
Diaminopyrimidines + sulfamides	Triméthoprime + sulfaméthoxazole	COT	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Famille	Antibiotiques	Sigle	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			
				R	I	S	
B-lactamines	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	Aztreonome	AT	30µg	≤15	16-18	≥19
	carbapeneme	Imipenem	IMP	10µg	≤15	15-17	≥18
	C3G	Ceftazidime	CAZ	30µg	≤14	15-17	≥18
	Aminosides	Amikacine	AK	30µg	≤14	13-14	≥15
		Netilmicin	NET	30µg	≤12	13-14	≥15
		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)

Tableau XVIII : listes des antibiotiques testés pour *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus Spp.* et *Aeromonas*

Antibiotiques testés	charge des disques	diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ticarcilline	75µg	≤14	15-19	≥20
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	≤14	15-19	≥20
Pipéracilline	100µg	≤17	18-20	≥21
Imipeneme	10µg	≤18	19-21	≥22
Amikacine	30µg	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	10µg	≤12	13-14	≥15
Tobramycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5µg	≤13	14-16	≥17
Trimethoprim+sulf améthoxazole	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16
<i>Enterococcus spp</i>				
Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10µg	≤16	—	≥17
Tetracycline	30µg	≤14	15-18	≥19
Vancomycine	30µg	≤14	15-16	≥17
Teicoplanine	30µg	≤10	11-13	≥14
Gentamicine a haut niveau	120µg	≤6	7-9	≥10
Streptomycine à haut niveau	300µg	≤6	7-9	≥10
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5µg	≤13	14-16	≥17

Chloramphenicol	30µg	≤12	13-17	≥18
Erythromycine	15µg	≤13	14-22	≥23
Rifampicine	5µg	≤16	17-19	≥20
<u>Quinupristine-dalfopristine</u>	15µg	≤15	16-18	≥19
<i>Aeromonas</i>				
Antibiotiques testés	Charge des disques	diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Cefoxitine	30µg	≤14	15-17	≥18
Cefotaxime	30µg	≤22	23-25	≥26
Ceftazidime	30µg	≤17	18-20	≥21
Imipeneme	10µg	≤19	20-22	≥23
Ertapenem	10µg	≤18	19-21	≥22
Aztreonam	30µg	≤17	18-20	≥21
Amikacine	30µg	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	10µg	≤12	13-14	≥15
Tetracycline	30µg	≤11	12-14	≥15
Ciprofloxacine	5µg	≤15	16-20	≥21
Levofloxacine	5µg	≤13	14-16	≥17
Chloramphenicol	30µg	≤12	13-17	≥18
Trimethoprim+sulfamethoxazole	1.25/3.75µg	≤10	11-15	≥16

(Rahal et al., 2020)

Tableau XIX: Listes des antibiotiques testés pour Bacillus spp

Antibiotiques testés	valeurs critiques des CMI(µg/ml)		
	R	I	S
Ampicilline	≤0.5	—	≥0.25
Imipeneme	≤16	8	≥4

Annexes

Vancomycine	—	—	≥ 4
Gentamicine	≤ 16	8	≥ 4
Ciprofloxacine	≤ 4	2	≥ 1

(Rahal et al., 2020)