

République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLAB Blida -1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie

Sous le thème :

Comparaison de la diversité bactérienne résistante aux antibiotiques dans les eaux usées des stations d'épuration et des effluents hospitaliers

Présenté par :

soutenu le : 17 / 09 / 2020

Melle MELZI Samar

Devant le jury :

Mme CHELGHOUH H.	Présidente	MCB	USDB1
Mme BOKRETA S.	Examinatrice	MAA	USDB1
Mme OUAHCHIA C.	Promotrice	Enseignante Vacataire	USDB1
Mme HAMAIDI F.	Co-promotrice	Professeur	USDB1

Année universitaire : 2019 - 2020



Remerciements

En tout premier, j'aimerais remercier Allah qui m'a donné la volonté et le courage de réaliser ce travail.

A ma promotrice **Mme OUAHCHIA Celia**

Je ne cesserai point de vous remercier, de m'avoir transmis votre savoir pratique et théorique, votre aide et votre patience ont fait que j'ai pu réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Veuillez bien Madame accepter mes remerciements pour le grand honneur que vous m'avait fait d'encadrer ce travail.

A ma co-promotrice, **Mme HAMAIDI Fella**

J'ai l'immense honneur de vous avoir eu en tant qu'encadreur, d'avoir bénéficié de votre précieuse aide, et d'avoir profité de votre riche enseignement. Je n'oublierai jamais votre gentillesse envers moi, veuillez bien Madame recevoir mes remerciements, l'expression de ma gratitude et de ma grande estime.

J'adresse mes sincères remerciement à **Mme Chelghoum** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à **Mme Bokreta** de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.



Dédicaces

Merci Allah de m'avoir donné la force, la persévérance, le courage et la patience d'aller jusqu'au bout du chemin.

Je dédie ce travail

A mes parents : ma maman et mon papa, votre amour et votre présence permanente durant toute ma vie m'ont toujours permis d'aller de l'avant et de ne jamais abandonner, vous avez toujours cru en moi et à mes capacités, je n'oublierai jamais votre soutiens et vos précieux conseils resteront gravés dans ma tête. Quoique je fasse, je ne pourrai vous rendre tout ce que vous faites pour moi, j'espère vous rendre fière et vous montrer le fruit de vos efforts, merci pour les valeurs nobles, l'éducation exemplaire, merci de me rendre chaque jour une personne meilleure. Que dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.

A Omar, qui ne s'est pas lassé de m'encourager, m'aider, et me remonter le moral durant toutes les épreuves et difficultés que j'ai pu croiser. Qui m'a aidé à finaliser ce travail. Tu es un exemple de la persévérance.

A mes sœurs Sabrine, Yousra et mon petit frère Amirou qui ont toujours cru en moi durant cette période, que dieu vous assiste.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

A mes professeurs, qui doivent voir dans ce travail le fruit d'un savoir bien acquis.

SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations	
Résumé	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les eaux usées	2
I.1. Les effluents hospitaliers.....	2
I.1.1. Définition	2
I.1.2. Origines des effluents hospitaliers	2
I.2. Station d'épuration des eaux usées	2
I.2.1. Origines.....	3
I.3. Paramètres physico-chimiques des eaux usées	3
Chapitre II : Diversité bactérienne des eaux usées	4
II.1. Principales bactéries de contamination hydrique.....	4
II.1.1. Entérobactéries	5
II.1.2. Coliformes totaux	5
II.1.3. Coliformes fécaux.....	5
II.1.4. Salmonelles.....	6
II.1.5. Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D	6
II.1.6. <i>Clostridium</i> sulfito-réducteur	6
II.1.7. Staphylocoques	7
II.1.8. <i>Pseudomonas</i>	7
Chapitre III : Résistance aux antibiotiques et contamination des eaux par les bactéries multirésistantes	9
III.1. Antibiotiques	9
III.1.1. Définition	9
III.1.2. Classification des antibiotiques.....	9
III.2. Antibiorésistance	10
III.2.1. Définition	10
III.2.2. Causes de l'antibiorésistances.....	11
III.2.3. Origines de la résistance	11
III.2.4. Mécanismes de résistance des Antibiotiques	12
III.2.5. Bases génétiques de la résistance.....	14
III.3. Antibiotiques dans les eaux usées	15

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes	16
I.1. Présentation de la zone d'études.....	16
I.1.1. Présentation de la STEP de Beni-Mered	16
I.1.2. Présentation de l'hôpital de Frantz Fanon	17
I.2. Matériels	17
I.3. Méthodes	17
I.3.1. Mode de prélèvement des échantillons et transport	18
I.3.2. Analyses physicochimiques	18
I.3.3. Analyses Bactériologiques	18
I.3.3.1. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et fécaux	19
I.3.3.2. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	23
I.3.3.3. Recherche et dénombrement des spores des Anaérobies Sulfito-Réducteurs.....	26
I.3.3.4. Recherche des Salmonelles	27
I.3.3.5. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	29
I.3.3.6. Recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
I.3.4 Identification des bactéries.....	33
I.3.4.1. Etude macroscopique et microscopique.....	33
I.3.4.2 Galerie biochimique classique	36
I.3.4.3 Galerie biochimique miniaturisé (Api 20E).....	37
I.3.5 Antibiogramme	38
II. Résultats et discussion	41
II.1. Paramètres physico-chimiques	41
II.1.1. Température	41
II.1.2. PH	41
II.2. Paramètres bactériologiques	42
II.2.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT)	43
II.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (CF)	44
II.2.3. Recherche du genre <i>Salmonella</i>	44
II.2.4. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (SF).....	45
II.2.5. Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobie Sulfito-Réducteurs (ASR).....	45
II.2.6. Recherche des bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>	46
II.2.7. Recherche des bactéries du genre <i>Staphylococcus</i>	46
II.3. Identification des souches d'Entérobactéries isolées	47
II.4. Antibiogramme	50
Conclusion	55

Références Bibliographiques

Annexes



Liste des tableaux

Tableau I	Bactéries pathogènes retrouvées dans les eaux usées.....	4
Tableau II	Présentation de l'hôpital Frantz Fanon. Blida	17
Tableau III	Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélectifs.....	35
Tableau IV	Récapitulatif des différents résultats obtenus dans la littérature	42
Tableau V	Examen macroscopique des colonies suspectes	47
Tableau VI	Examen microscopique des colonies suspectes	48
Tableau VII	Résultats des tests d'orientation rapide.....	48
Tableau VIII	Résultats des tests d'orientation rapide.....	49
Tableau IX	Sensibilité et résistance des souches des effluents bruts de la STEP ...	51
Tableau X	Résistance des souches des effluents de l'hôpital de Frantz Fanon.....	52
Tableau XI	Différents caractères du genre <i>Streptococcus</i>	Annexe
Tableau XII	Différentes caractéristiques du genre <i>Staphylococcus</i>	Annexe
Tableau XIII	Caractères biochimique de différentes espèces de <i>Pseudomonas</i>	Annexe
Tableau XIV	Table de Mac-Grady	Annexe
Tableau XV	Table NPP	Annexe
Tableau XVI	Lecture de la galerie miniaturisée API 20 E	Annexe
Tableau XVII	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Annexe
Tableau XVIII	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus spp</i>	Annexe
Tableau XIX	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries.....	Annexe



Liste des figures

Figure 01	Mode d'action des différents antibiotiques	10
Figure 02	Découverte des antibiotiques et apparition des résistances bactériennes : vers une impasse thérapeutique.....	11
Figure 03	Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques Les bactéries	13
Figure 04	Photo de la station d'épuration de Beni-Mered.....	16
Figure 05	Principe de la dilution.....	19
Figure 06	Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide (test de présomption)	21
Figure 07	Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide (test de confirmation)	22
Figure 08	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (test de présomption).....	24
Figure 09	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (test de confirmation)	25
Figure 10	Etapas de recherche des ASR.....	27
Figure 11	Etapas de recherche des Salmonelles	29
Figure 12	Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figure 13	Etapas de recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figure 14	Etude macroscopique et microscopique des bactéries.....	34
Figure 15	Tests utilisés en galerie biochimique classique	36
Figure 16	Galerie Api 20 E non ensemencée	37
Figure 17	Schéma explicatif en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard.....	39
Figure 18	Concentrations critiques inférieures (lower break point des anglosaxons) et supérieures (upper break point)	40



Liste des abréviations

ADH	: Arginine Dihydrolase
API	: Application Programming Interface
ASR	: Anaérobie Sulfito-Réducteur
ATB	: Antibiotique
BCPL	: Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromochrézol
BHIB	: Bouillon cœur-cervelle
CF	: Coliformes Fécaux
CT	: Coliformes Totaux
D/C	: Double Concentration
H₂O₂	: Hydrogène Peroxyde
H₂S	: Sulfure d'hydrogène
JORA	: Journal Officiel de la République Algérienne
LDC	: Lysine décarboxylase
NPP	: Nombre Plus Probable
ODC	: Ornithine Décarboxylase
OMS	: Organisation Mondiale de Santé
ONPG	: Ortho-Nitro-Galactosidase
S/C	: Simple Concentration
SF	: Streptocoques Fécaux
SFB	: Bouillon Sélénite-Cystéine
STEP	: Station d'Épuration
TSI	: Triple Sugar-Iron
VF	: Viande Foie

RESUME

Les effluents hospitaliers et ceux des STEP engendrent une menace pour la santé publique et l'environnement en raison de leur forte charge en bactéries résistantes aux antibiotiques.

Cette étude a pour objectif d'isoler, identifier et comparer la diversité que contiennent les effluents hospitalier et les eaux usées de la STEP en bactéries pathogènes et résistantes Pour cela nous avons procédé au dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale à savoir : les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les *Streptococcus* fécaux et les spores d'anaérobie sulfite-réducteurs, ainsi que la recherche de bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans les deux effluents.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées ont présenté une résistance aux antibiotiques avec un pourcentage de 100% pour les Beta-lactamines (sauf pour l'Imipénème), les Aminosides, les Macrolides.

La souche de *S.aureus* a montré une résistance très élevée vis-à-vis de l'acide fusidique, et de la Métronizadole. Les souches de *Streptococcus du groupe D* ont présenté une résistance vis-à-vis des Aminosides (Kanamycine et Streptomycine), de la Colistine et de la Métronizadole. Une forte résistance vis-à-vis des Aminosides et des Métronizadoles a été constaté avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : Eaux usées, Effluents hospitaliers, STEP, Bactéries Résistantes, Antibiotiques.

ABSTRACT

Hospital effluents and those from WWTPs pose a threat to public health and the environment due to their high load of bacteria resistant to antibiotics.

The objective of this study is to isolate, identify and compare the diversity contained in hospital effluents and wastewater from the WWTP in pathogenic and resistant bacteria. To do this, we have counted the bacteria indicative of faecal contamination, namely: total coliforms, faecal coliforms, faecal *Streptococcus* and sulfite-reducing anaerobic spores, as well as the search for pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in the two effluents.

The results obtained showed that all the strains isolated exhibited resistance to antibiotics with a percentage of 100% for beta-lactams (except for Imipenem), Aminoglycosides and Macrolides.

The *S.aureus* strain showed very high resistance to fusidic acid, and to Metronizadole. Group D strains of *Streptococcus* exhibited resistance to aminoglycosides (Kanamycin and Streptomycin), Colistin and Metronisadole. Strong resistance to Aminoglycosides and Metronizadoles has been observed with the strain of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords : Wastewater, Hospital effluents, WWTP, Resistant bacteria, Antibiotics.

ملخص

تشكل المياه المستعملة في المستشفيات ومياه الصرف الصحي تهديداً للصحة العامة والبيئة، بسبب الحمل الكبير الذي تحتوي عليه هذه النفايات السائلة من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية. كان الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتحديد ومقارنة تنوع البكتيريا المسببة للأمراض والمقاومة التي تحملها مياه الصرف الصحي في المستشفى ومحطة معالجة المياه، وكذلك مقارنة البكتيريا المختلفة الموجودة في هذه المياه المستعملة.

يعتمد البحث على تعداد البكتيريا المسببة للتلوث البرازي *coliformes fécaux* ، *coliformes totaux*، *Streptococcus groupe D spores d'anaéobie sulfito-réducteur*، وكذلك البحث عن البكتيريا المسببة للأمراض *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* التي كشفت عن وجودها في التدفّيقين.

أظهرت جميع السلالات المعزولة مقاومة للمضادات الحيوية، بنسبة 100٪ لبيتا لكتام (باستثناء إيميبيديم)، وأمينوغليكوزيدات، وماكرولايد، وسلالة *S.aureus* تظهر مقاومة عالية جداً ضد حمض الفوسيديك وميترونيزادول. بينما أظهرت سلالات المجموعة D من *Streptococcus* مقاومة للأمينوغليكوزيدات (كاناميسين وستربتومايسين)، كوليستين وميترونيزادول. بالنسبة إلى *Pseudomonas aeruginosa*، كانت المقاومة القوية ضد *Aminoglycosides* و *Metronizadoles*.

الكلمات المفتاحية:

مياه الصرف في المستشفيات ، مياه الصرف الصحي ، معالجة مياه الصرف ، البكتيريا ، المقاومة ، المضادات الحيوية

A dark green ribbon graphic with a central rectangular section and pointed ends on both sides. The word "Introduction" is written in white serif font across the central section.

Introduction

Introduction

La rareté de l'eau, ou autrement dit «l'or bleu», constitue de nos jours un grand problème touchant la globalité de la terre. Aujourd'hui, il est nécessaire de la préserver par tous les moyens possibles : diminution du gaspillage ; réutilisation des eaux usées et introduction de ces dernières dans des techniques spéciales de recyclage (**Ghettas, 2009**).

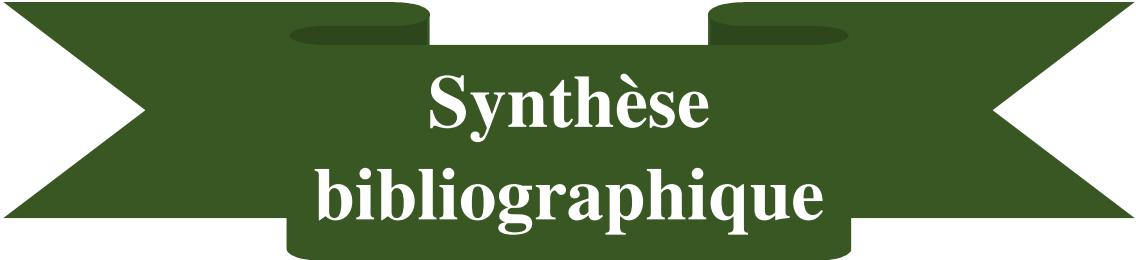
L'utilisation des eaux engendre un nouveau produit appelé effluent ou eau usée. Les problèmes liés aux eaux usées sont aussi anciens que ces eaux elles même et ils s'aggravent suivant la croissance démographique, l'amélioration de la qualité de vie des populations et le développement des activités industrielles (**Salghi, 2010**).

La composition des eaux usées est extrêmement variable en fonction de leur origine (industrielle, domestique, etc.). Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux micro-organismes. En fonction de leurs caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et du danger sanitaire qu'elles représentent, ces substances peuvent être classées en quatre groupes : les micro-organismes, les matières en suspension, les éléments traces minéraux ou organiques et les substances nutritives (**Belaid, 2010**).

Une eau usée est toute eau soumise à une modification défavorable ou nocive des propriétés physico-chimiques et biologiques (**Metahri, 2012**). Elle serait un vecteur privilégié de nombreuses pathologies d'origine bactérienne pouvant ainsi engendrer des infections chez des patients fragilisés ou immunodéprimés (**Diduch et al., 2016**).

Au fil des années, l'utilisation continue de divers agents antibactériens / antimicrobiens a conduit les microorganismes à développer des mécanismes de résistance qui sont à l'origine de la résistance à un ou plusieurs médicaments (multidrug resistance, MDR) (**Giedraitienė et al., 2011**).

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des eaux usées provenant de la STEP de Beni Merad et de l'hôpital de Frantz Fanon et notamment de mettre en évidence le profil de résistance des bactéries pathogènes isolées et identifiées et enfin comparer la diversité bactérienne des différents points d'eaux usées, nous avons réalisé la méta-analyse de mémoires de masters et de publications dans la littérature.



**Synthèse
bibliographique**

I. GENERALITES SUR LES EAUX USEES

I.1. Effluents hospitaliers

I.1.1. Définition

Ces effluents sont générés par toutes les activités de l'hôpital, y compris médicales (opérations, urgences, premiers soins, laboratoires, diagnostic, radiologie, etc.) et non médicales (toilettes, cuisines, buanderie, etc.) (Carraro *et al.*, 2016).

I.1.2. Origine des effluents hospitaliers

D'après Carraro *et al.*, (2016), celles-ci peuvent être classées en deux catégories principales :

- **Les rejets domestiques** des cuisines, des laveries et des toilettes des salles normales ;
- **Les rejets spécifiques** générés par les soins, l'analyse et les activités de recherche.

Ces rejets peuvent contenir des désinfectants, des détergents, des excréments / excréments contagieux, des liquides biologiques, des résidus de médicaments, des radioéléments métalliques et de nombreux autres produits chimiques (acides, alcalins, solvants, benzène, hydrocarbures, colorants, etc.). Ils peuvent potentiellement contenir certaines substances dangereuses ayant une activité génotoxique ou cytotoxique, des produits chimiques toxiques ou dangereux ou des résidus pharmaceutiques, et des agents radioactifs et/ou infectieux (Carraro *et al.*, 2016).

I.2. Station d'épuration des eaux usées (STEPS)

Les stations d'épuration jouent un rôle principal pour la protection de l'environnement et de la santé humaine et évite aussi le problème de contamination de la nappe phréatique. Elles peuvent permettre également une économie d'eau grâce à la réutilisation de celle-ci. Cependant, ce procédé n'est que très peu pratiqué en raison du coût élevé de sa mise en place (Mahdjar, 2016).

Toutefois, les STEP constituent un mécanisme potentiel de propagation de bactéries résistantes et pathogènes provenant des eaux usées d'origines diverses, dans l'environnement, et peuvent ainsi contribuer à la dissémination environnementale de la virulence et de la résistance déterminants qui constituent une préoccupation importante à la santé publique (Calhau, 2015).

I.2.1. Origine

Les principales sources de pollution de l'eau proviennent des eaux usées domestiques et des eaux usées industrielles. Ces dernières représentent généralement la grande majorité (**Deng et al., 2018**).

- **Origine domestique**

Les effluents domestiques sont un mélange d'eaux contenant des déjections humaines : urines et fèces contenues dans les eaux de toilettes (eaux vannes) et les eaux de nettoyage des sols, linges et des aliments (eaux ménagères). Ces eaux sont généralement constituées de matières organiques dégradables de matières minérales sous forme dissoute ou en suspension (**Abibsi, 2011**).

- **Origine industrielle**

Elles sont représentées par les rejets des exploitations industrielles et semi-industrielles (de lavage et graissage, station d'essences, etc.), qui sont caractérisés par une grande diversité de la composition chimique (tel que le chrome VI, le zinc, phosphates, cyanures, nitrites, etc), présentant ainsi un risque potentiel de pollution (**Khadraoui et Talab, 2008**).

I.3. Caractéristiques physico-chimique des eaux usées

Les paramètres les plus étudiés en routine sont la présence et la charge de matières organiques ou inorganiques, mesurée par la conductivité, la Demande Biochimique en Oxygène (DBO), la Demande Chimique en oxygène (DCO), les Matières totales en Suspension (MS), et l'azote total (**Oliveira et al., 2017 ; Wiest et al., 2017**).

II. DIVERSITE BACTERIENNE DES EAUX USEES

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées. Les eaux usées urbaines contiennent environ 10^6 à 10^7 bactéries/100 ml dont la plupart sont des espèces d'Entérobactéries, dont les genres *Salmonella*, *Shigella*, et l'espèce *Escherichia coli*.

Le tableau I montre les bactéries les plus retrouvées dans les eaux usées (Belaid, 2010).

Tableau I. Bactéries pathogènes retrouvées dans les eaux usées

Agent pathogène	Symptômes/ maladies	Nombre de bactéries pour un litre d'eau usée	Voies de contamination principales
<i>Salmonella</i>	Typhoïde, paratyphoïde, salmonellose	23 à 80 000	Ingestion
<i>Shigella</i>	Dysenterie bacillaire	10 à 10 000	Ingestion
<i>E. coli</i>	Gastro-entérite		Ingestion
<i>Yersinia</i>	Gastro-entérite		Ingestion
<i>Campylobacter</i>	Gastro-entérite		Ingestion
<i>Vibrio</i>	Choléra	100 à 100 000	Ingestion
<i>Leptospira</i>	Leptospirose		Cutanée/Inhalation/Ingestion
<i>Legionella</i>	Légionellose		Ingestion
<i>Mycobacterium</i>	Tuberculose		Ingestion

(Baumont et al., 2009).

II.1. Principales bactéries de contamination hydrique

Elles sont appelées bactéries témoins de contamination fécale, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont recherchées en routine dans les eaux (Delarras et al., 2010).

II.1.1 Entérobactéries

La définition de la famille est circonscrite biochimiquement et génétiquement à un large groupe apparenté qui présente une hétérogénéité substantielle du point de vue écologique, éventail d'hôtes, et du pouvoir pathogène pour l'homme, les animaux, les insectes et les plantes. Les relations phylogénétiques entre genres au sein de la famille *Enterobacteriaceae* sont basées sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et ces séquences permettent de placer la famille des *Enterobacteriaceae* dans le Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*, Phylum ou Division : *Proteobacteria*, Classe: *Gammaproteobacteria*, Ordre: *Enterobacteriales* (**Brenner et al., 2005 ; Dworkin et al., 2006**).

- **Habitat et pouvoir pathogène**

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large : eau douce, sol, végétaux, animaux (insectes jusqu'à l'homme) et peuvent contaminer des denrées alimentaires. Certaines espèces sont responsables de diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites.). Chez l'homme, les entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.* Et *Serratia marcescens subsp. marcescens*, sont responsables d'environ 50 % des infections nosocomiales (**Brenner et al., 2005 ; Dworkin et al., 2006**).

II.1.2. Coliformes totaux

Ce sont des entérobactéries qui incluent des espèces qui vivent dans l'intestin des animaux homéothermes, mais aussi dans l'environnement en général (sols, végétation et eau). Ce groupe bactérien est utilisé comme indicateur de la qualité microbienne de l'eau car il contient notamment des bactéries d'origine fécale (**Chevalier et al., 2017**).

II.1.3. Coliformes fécaux

Appelées aussi coliformes thermo-tolérants sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (**Chevalier et al., 2017**).

Les groupes de coliforme fécaux regroupent les espèces suivantes : *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*

pneumoniae, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* (sous genre III arizona), *Yersinia enterocolitica*. (Rodier et al., 2005).

II.1.4. Salmonelles

Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatif anaérobies facultatives appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Bien que les espèces de ce genre soient mobiles par ciliature péritriche. Certaines souches peuvent être non mobiles résultant de flagelles dysfonctionnels (Doyle et Beuchat, 2007).

Les bactéries se développent de manière optimale à 37 °C et catabolisent le d-glucose et d'autres glucides avec la production d'acide et de gaz. Les salmonelles sont oxydase négative et catalase positive, elles se développent sur le citrate comme seule source de carbone, produisent généralement de l'hydrogène sulfuré, provoquent la décarboxylation de la lysine et l'ornithine et n'hydrolysent pas l'urée (Doyle et Beuchat, 2007).

II.1.5. Streptocoques fécaux ou Streptocoques du groupe D

Les streptocoques du groupe D (possèdent l'antigène D) sont des coques à Gram positif, catalase négatif, immobiles, anaérobies facultatifs, et non sporulant formant quand ils sont cultivés en milieu liquide des diplocoques et/ou des chainettes (Gillespi, 2006). Tous les caractères morphologiques et culturels sont présentés dans le Tableau X, annexe 1.

Selon Delarras (2014), leur classification est comme suit :

Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.

Phylum XIII : *Firmicutes*.

Classe : *Bacilli*.

Ordre : *Leatobacillales*.

Famille : *Sireptococcace*.

Genre : *Streptococcus*.

II.1.6. Clostridium sulfito-réducteur

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont des bacilles Gram positif, anaérobies stricts, capable de sporuler (Bonney et al., 2002). Ils sont ainsi dénommés, car ils sont capables de réduire les sulfites en sulfures, Ceux-ci se combinent avec un sel de fer pour donner du sulfure de fer noir. Les colonies noires entourées d'un halo noir sont caractéristiques des bactéries sulfito-réductrices (ou anaérobies sulfitoréducteurs) (Delarras et al., 2010).

La présence de l'espèce de *Clostridium* dans les eaux, est un indicateur de contamination fécale. Ils regroupent des espèces telles que *Clostridium perfringens* *Clostridium bifermentans* ; *Clostridium sporogenes* ; *Clostridium novyi* ; *Clostridium fallax* ; *Clostridium septocum* (Delarras, 2014).

D'après Delarras (2014) leur classification est la suivante :

Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.

Phylum : *Firmicutes* ou bactéries à Gram +

Classe : *Clostridia*.

Ordre : *Clostridiales*.

II.1.7. Staphylocoque

Les Staphylocoques sont des cocci Gram positif, immobiles, isolées ou groupées en diplocoques ou le plus souvent en amas. Leur diamètre moyen varie entre 0,8 et 1 µm. leurs caractères biochimiques sont présentés dans le tableau XI, annexe 1.

Ils peuvent être répartis en souches pathogènes et relativement non pathogènes sur la base de la synthèse de coagulase. L'espèce coagulase-positif : *Staphylococcus aureus* est l'agent le plus pathogène pour l'être humain. Les Staphylocoques coagulase-négative : *Staphylococcus epidermidis* ne produisent pas de coagulase, sont non pigmentés et généralement moins invasifs (Willey et al., 2008).

D'après Delarras (2014), leur classification est comme suit :

Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.

Phylum : *Firmicutes*.

Classe : *Bacilli*.

Ordre : *Bacillales*.

Famille : *Staphylococcaceae*.

Genre : *Staphylococcus*

II.1.8. Pseudomonas

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, non capsulés, non sporulés, mobiles (plusieurs flagelles polaires), mésophiles, producteurs de pigments fluorescents (fluorescéine) ou pas (pyocyanine, pyorubine). Ce genre est capable de synthétiser un film bactérien (Carlp, 2008).

Selon, Delarras et al., (2010), leur classification se présente comme suit :

Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.

Phylum XII : *Proteobacteria*.

Classe : *Gammaproteobacteria*.

Ordre : *Pseudomonadales*.

Familles : *Pseudomonadaceae*.

Il existe dix genres dans cette famille dont les genres *Pseudomonas* et *Flavimonas*

Pseuaomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Cette bactérie se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel médical ou chirurgical. Chez l'homme, *P.aeruginosa* est l'agent du pus bleu, des infections cutanées post chirurgicales, de septicémies, d'endocardites etc. Ce germe est aussi un pathogène opportuniste et constitue une cause majeure d'infections nosocomiales diverses chez des personnes fragilisées ou immunodéprimées (grands brules, cancéreux) (Delarras, 2007).

Les principaux caractères biochimiques sont résumés dans le Tableau XII, annexe 1.

III. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET CONTAMINATION DES EAUX PAR LES BACTERIES MULTIRESISTANTES

III.1 Antibiotiques

III.1.1 Définition

Les antimicrobiens sont des produits chimiques naturels ou synthétiques qui tuent ou inhibent la croissance des micro-organismes sensibles. Ils sont utilisés pour traiter et prévenir les infections microbiennes en médecine humaine et vétérinaire depuis des décennies (**Tesfaye et al., 2019**).

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante en pratique médicale. Ils ont joué un rôle important dans le traitement des infections microbiennes. Ces molécules ont également permis de surmonter les complications dans certaines situations, notamment la transplantation d'organes (**Bouyahya et al., 2017**).

III.1.2 Classification des antibiotiques

Ils peuvent être classés par des principes différents (l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action) (**Papanov et al., 2016**).

Selon **Papanov et al., (2016)** la classification générale pharmacologique des antibiotiques est comme suit : Rifampicine, Lincosamides, Carbapenemes, Amfénicoles, Beta-lactaminees, Aminoglycosides, Tetracyclines.

Selon **Carip (2008)**, l'action antibactérienne de ces ATB s'effectue en quatre principaux mécanismes (figure 01) :

- Inhibition de la synthèse des constituants de la paroi (le peptidoglycane).
- Action sur la structure de la membrane plasmique.
- Inhibition de la synthèse protéique.
- Inhibition de la synthèse des acides nucléiques.

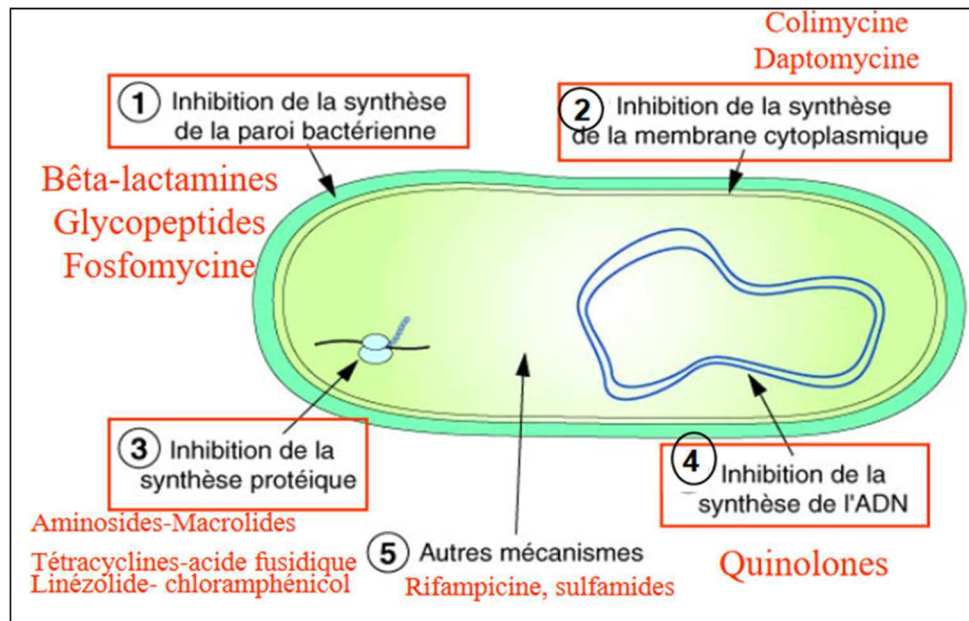


Figure 01. Mode d'action des différents antibiotiques (Mainardi, 2015)

III.2 Antibiorésistance

III.2.1 Définition

L'antibiorésistance se définit par l'inefficacité de la dose d'antibiotique au niveau du site infectieux (Briand, 2012).

L'antibiorésistance est un phénomène biologique connu du monde médical depuis la découverte des antibiotiques, qui constituait un risque potentiel, mais ne devait produire ses effets néfastes que dans la mesure où leur usage serait désordonné ou excessif (Arquembourg, 2015) (figure 02).



Figure 02. Découverte des antibiotiques et apparition des résistances bactériennes : vers une impasse thérapeutique (Brun-Buisson, 2016)

III.2.2 Causes de l'antibiorésistance

Avec le temps, les bactéries ont développé certaines formes de résistances vis-à-vis des antibiotiques. Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation sub-optimale des antibiotiques au cours des traitements. Son émergence est due également à l'hospitalisation prolongée, les comorbidités, le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux (Bouyahya *et al.*, 2017).

III.2.3 Origines de la résistance

D'après Julian et Dorothy (2010), la résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelles et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques.

- **Résistance naturelle**

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques (Allen *et al.*, 2010).

Elle se caractérise par des modifications structurales dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (**Bouyahya et al., 2017**).

- **Résistance acquise**

D'après **Springman et al., (2009)**, elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent.

III.2.4 Mécanisme de résistance des antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes (**Giedraitiene et al., 2011**).

Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes et sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents (figure 03). Les mécanismes de résistance ont été décrits chez plusieurs souches bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa* (**Bouyahya et al., 2017**).

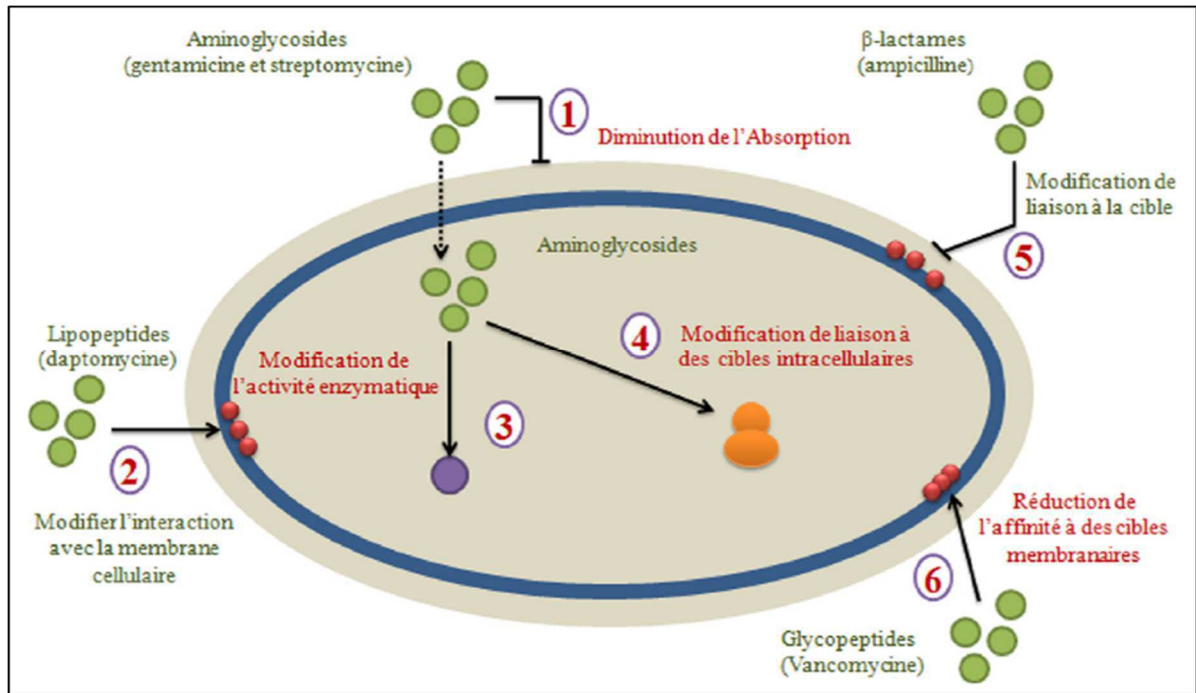


Figure 03. Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques. 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides. 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire. 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides. 4) Modification de liaison des β-lactamines à des cibles intracellulaires. 5) Modification de liaison à des cibles membranaires. 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires (**Bouyahya et al., 2017**).

- **Inhibition d'antibiotiques**

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier. La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (**Bouyahya et al., 2017**).

Selon **Bouyahya et al., (2017)**, l'inhibition des antibiotiques peut se faire par :

- Modification induite par inactivation : les aminoglycosides, le chlo-ramphénicol, les streptogramines, les macrolides et les rifampicines
- Blocage et/ou dégradation des antibiotiques par des enzymes : la β-lactamase est une métalloenzyme détruisant les antibiotiques de la famille des β-lactamines
- Modification de l'affinité des antibiotiques vis-à-vis de leurs cibles : les aminoglycosides : acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases vis-à-vis des aminoglycosides.

- **Modification des cibles des antibiotiques**

Le deuxième mécanisme de résistance est celui qui affecte les cibles des antibiotiques. Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques (Bouyahya et al., 2017).

- **Empêchement de l'entrée de l'antibiotique**

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (Bouyahya et al., 2017).

III.2.5 Bases génétiques de la résistance

Quelle que soit la nature de la résistance : innée ou acquise, elle s'établit via des allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. L'origine de la diversité génétique est due essentiellement à deux phénomènes globaux : les mutations chromosomiques ou parfois des hyper-mutations et le transfert horizontal de gènes entre les espèces de nature différente (Bouyahya et al., 2017).

- **Mutations chromosomiques**

Elles peuvent se produire spontanément lors de la réplication de l'ADN (en absence d'un vrai système de réparation). Cette marque génétique donne lieu à des protéines biochimiquement modifiées. Ce type de mutation est plus étudié chez *Escherichia coli* dont la mutation du gène *gyrA* lui confère une forte résistance. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une mutation dans le gène *mexR* cause la répression de l'opéron *mexAB-oprM* et confère la multirésistance à cette souche pathogène (Bouyahya et al., 2017).

- **Hypermuation**

L'hypermuation est un phénomène génétique qui désigne un état transitoire durant lequel une souche bactérienne subit un taux de mutation très élevé, permettant ainsi l'acquisition de la résistance aux antibiotiques. Cet état a été montré chez certaines souches pathogènes telles qu'*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres souches bactériennes utilisent cette stratégie pour lutter contre d'autres agents pathogènes (Bouyahya et al., 2017).

- **Transfert horizontal de gènes**

Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Selon **Bouyahya et al., (2017)**, ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels :

- La transduction : le transfert des gènes via les bactériophages
- La transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries
- La conjugaison : le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs.

Il peut se produire entre des bactéries phylogénétiquement éloignées, essentiellement entre les bactéries à Gram+ et celles à Gram-. Le transfert horizontal des gènes a donné lieu à une résistance aux différentes classes d'antibiotiques. D'autres éléments responsables du transfert des gènes entre les bactéries sont appelés les intégrons. Ce sont des fragments d'ADN connus sous le nom des cassettes des gènes que les bactéries s'intègrent dans certaines régions d'ADN chromosomique via un mécanisme de recombinaison. Ces éléments transfèrent des gènes impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Bouyahya et al., 2017**).

III. 3 Antibiotiques dans les eaux usées

La pollution est généralement définie comme : « l'entrées nocives des produits chimiques, biologiques et physiques, des déchets produits dans l'environnement provenant de diverses sources telles que les hôpitaux, les maisons, les industries agricoles et urbaines » (**Rahube et Yost, 2010**).

Les stations de traitement des eaux usées (STEP) jouent un rôle essentiel dans la gestion de matières fécales et la suppression des contaminants toxiques organiques et inorganiques contenus dans les déchets provenant des deux activités municipales et agricoles. L'objectif d'un processus de traitement des eaux usées est de réduire la concentration, la dissolution du carbone organique, de l'azote et du phosphore et d'éliminer les agents pathogènes viables de l'effluent liquide. Des procédés physiques (ex : filtration), chimiques (ex : désinfection) et les activités microbiennes sont utilisés efficacement pour remédier à l'entrée des déchets à la station. La diversité des communautés microbiennes dans une station d'épuration peuvent être importantes selon les constituants biochimiques reçus par la station d'épuration (**Rahube et Yost, 2010**).

A dark green ribbon graphic with a central rectangular section and pointed ends on both sides. The ribbon is centered horizontally and vertically on the page.

Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes

Cette étude consiste à isoler, identifier, et mettre en évidence les profils de résistance des bactéries pathogènes existantes dans les eaux usées brutes échantillonnées de l'hôpital Frantz fanon et la STEP de Beni-Mered dans la wilaya de Blida.

I.1 Présentation de la zone d'étude

I.1.1 Présentation de la STEP de Beni-Mered

La station d'épuration (STEP) de Béni Mered est à boue activée (figure 04). Elle est située à l'Est de la route nationale N°1 à proximité de l'oued Béni-Aza et fait partie des installations de protection des cours d'eau de la wilaya de Blida contre la pollution.

Cette station construite sur six hectares, traite les eaux usées domestiques issues de la ville de Blida. Sa capacité nominale depuis 2015 est de 383000 EH pour un débit de pointe de 51 560 m³/j.



Figure 04. Photo de la station d'épuration de Beni-Mered

I.1.2 Présentation de l'hôpital de Frantz Fanon

Toutes les informations concernant l'hôpital sont mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II. Présentation de l'hôpital Frantz Fanon. Blida

Siège	Centre de Zabana route de Htatba-Blida
Surface (m²)	350000
Nombre de service	16
Nombre des employés	1442
Nombre de lit	986
Consommation de l'eau par jour en m³	50-150
Types d'antibiotiques utilisés pour chaque service	10-20
Consommation des antibiotiques (g/jour)	100-200
Nombre des patients traités par jour	120-400

I.2 Matériels

- **Matériels-biologique**

Le matériel biologique est :

- Eau usée brute de l'hôpital Franz Fanon
- Eau usée brute de de la STEP de Beni-Mered

- **Matériels non biologique**

Le matériel non biologique (appareillage, réactifs et milieux de cultures) est mentionné en annexe II.

I.3 Méthodes

I.3.1 Mode de prélèvement des échantillons et transport

Le prélèvement doit s'effectuer dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

Pour éviter les risques de contamination, les flacons d'échantillonnage ne doivent être ouverts qu'au moment du prélèvement. Une fois l'échantillon est prélevé, les flacons doivent être fermés hermétiquement jusqu'au moment de l'analyse (**Rodier et al., 2009**).

L'ensemble des prélèvements doivent être transportés directement dans une glacière dont la température doit être comprise entre 4 à 6°C. L'analyse bactériologique doit être effectuée le plus rapidement possible, dans un délai ne dépassant pas 8 heures.

I.3.2 Analyses physico-chimiques

- **Température**

La mesure de ce paramètre est effectuée sur le terrain en utilisant un thermomètre.

- **pH**

La mesure de la température et du pH aurait été réalisée avec un pH mètre, qui indique la valeur du pH ainsi que celle de la température.

- **Mode opératoire**

- Prélever 100 ml d'eau à analyser dans un bécher.
- Rincer avec de l'eau distillée les électrodes du pH mètre, ces derniers seront trempés dans le bécher.
- Après stabilisation du pH mètre, les valeurs de la température et du pH seront notées.

I.3.3 Analyses Bactériologiques

➤ **Préparation des dilutions**

Afin de diminuer la charge des bactéries présentes avec forte densité dans les eaux brutes analysées, on procède à la dilution de l'échantillon, plusieurs séries de dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-4}) sont réalisées (figure 05).

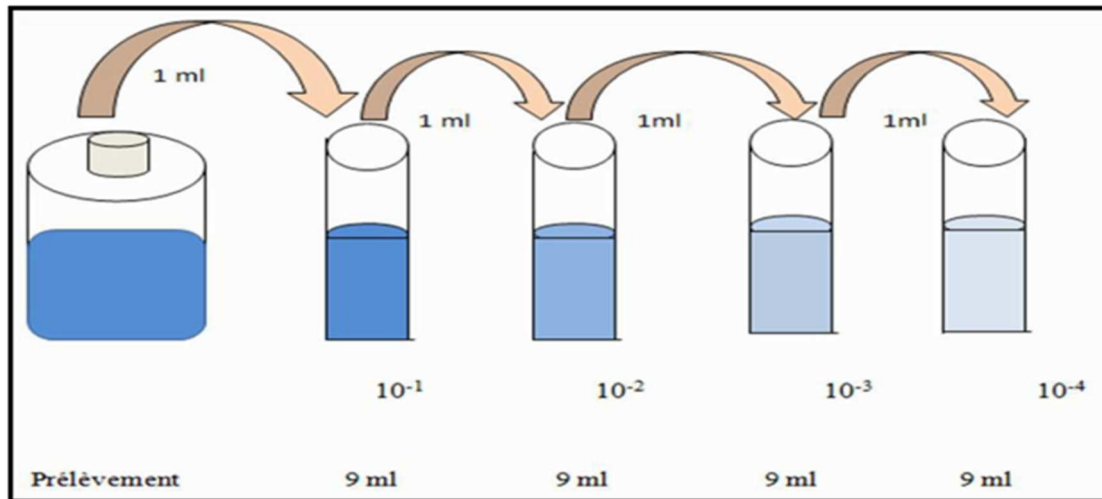


Figure 05. Principe de la dilution

➤ Recherche des bactéries indicatrices de contamination fécale

Les indicateurs de contamination fécale permettent d'apprécier avec plus ou moins de sûreté ou de précocité, le risque d'une contamination par des matières fécales pouvant véhiculer des microorganismes pathogènes (Rodier *et al.*, 2009).

La recherche et le dénombrement des coliformes fécaux sont réalisés en suivant la méthode en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable NPP.

➤ Principe de la méthode du NPP

La technique du NPP fait appel à la méthode de fermentation en tubes multiples. Elle consiste à prendre au moins trois séries (3 séries) consécutives de trois à cinq tubes (3 à 5 tubes), correspondant à trois dilutions successives, dont l'échantillon ou la suspension mère. Pour chaque tube on réalise un test de présomption (milieu non véritablement sélectif) et un test de confirmation (Delarras, 2008).

Le dénombrement du nombre de bactéries par 100 ml est effectué à l'aide de la table du NPP (AnnexeII) à cinq tubes par dilution (Delarras, 2008).

Ce nombre caractéristique obtenu correspond d'après la table de Mac Grady (AnnexeII) au nombre de bactéries présentes (NPP) dans le prélèvement correspondant à la plus faible dilution prise en compte. Le calcul de concentration cellulaire dans la suspension initiale se fait en tenant compte les dilutions effectuées (Rodier *et al.*, 2009).

I.3.3.1 Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et fécaux

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs (figure 06 et 07) à savoir :

- Test de présomption : réservé à la recherche et au dénombrement des coliformes totaux.
- Test de confirmation : encore appelé test de Mac Kenzie est réservé à la recherche et au dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) à partir des tubes positifs du test de présomption.

a) Test de présomption

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham, comme l'indique le schéma n° 1.
- Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum.

Après inoculation, agiter pour homogénéiser sans faire pénétrer d'air dans la cloche de Durham, et placer les tubes dans une étuve à 37°C pendant 24h (Rodier et *al.*, 2009).

➤ Incubation

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

➤ lecture

Pour que le flacon/tube soient considérés comme positifs ils doivent présenter à la fois :

- Un trouble microbien accompagné d'un virage de la couleur initiale du milieu au jaune
- Un dégagement gazeux (supérieur 1/10 de la hauteur de la cloche)

Ces deux caractères sont témoins de la fermentation du lactose en produisant du gaz (figure 06). On note le nombre de tubes positifs dans chaque série et la lecture finale se fait selon les prescriptions de la table NPP (annexe II) pour obtenir le nombre de coliformes présents dans 100 ml d'eau.

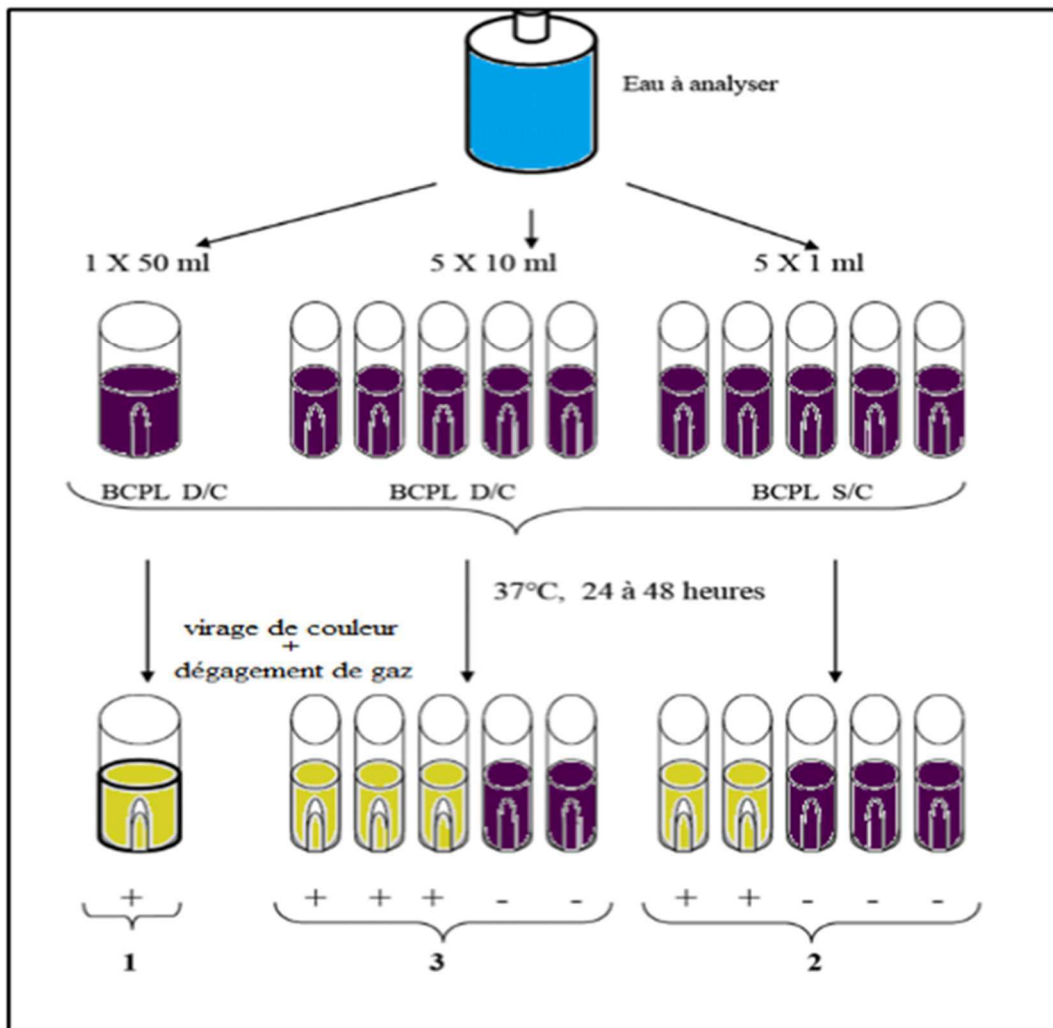


Figure 06. Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide (test de présomption) (Lebres *et al.*, 2002 ; Azizi, 2009)

b) Test de confirmation ou test de Mac-Kenzie

Le test de confirmation ou test de Mac-Kenzie est basé sur la recherche de coliformes thermotolérants dont la recherche exclusive de la présence d'*Escherichia coli* (Rodier, 1996).

Escherichia coli est un coliforme thermotolérant ; dont les caractéristiques sont :

- Production de l'indole à partir du tryptophane à 44°C.
- Donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl.

Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement de coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham (figure 07).

Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.

➤ **Incubation**

Pour cette fois l'incubation se fait à 44°C pendant 24 heures.

➤ **Lecture**

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

- Un dégagement gazeux,
- Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia Coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table NPP en tenant compte du fait qu'*Escherichia coli* est à la fois productrice de gaz et d'indole à 44°C.

Les résultats sont exprimés en nombres de coliformes dans 100 ml d'eau analysée en prenant en considération les dilutions.

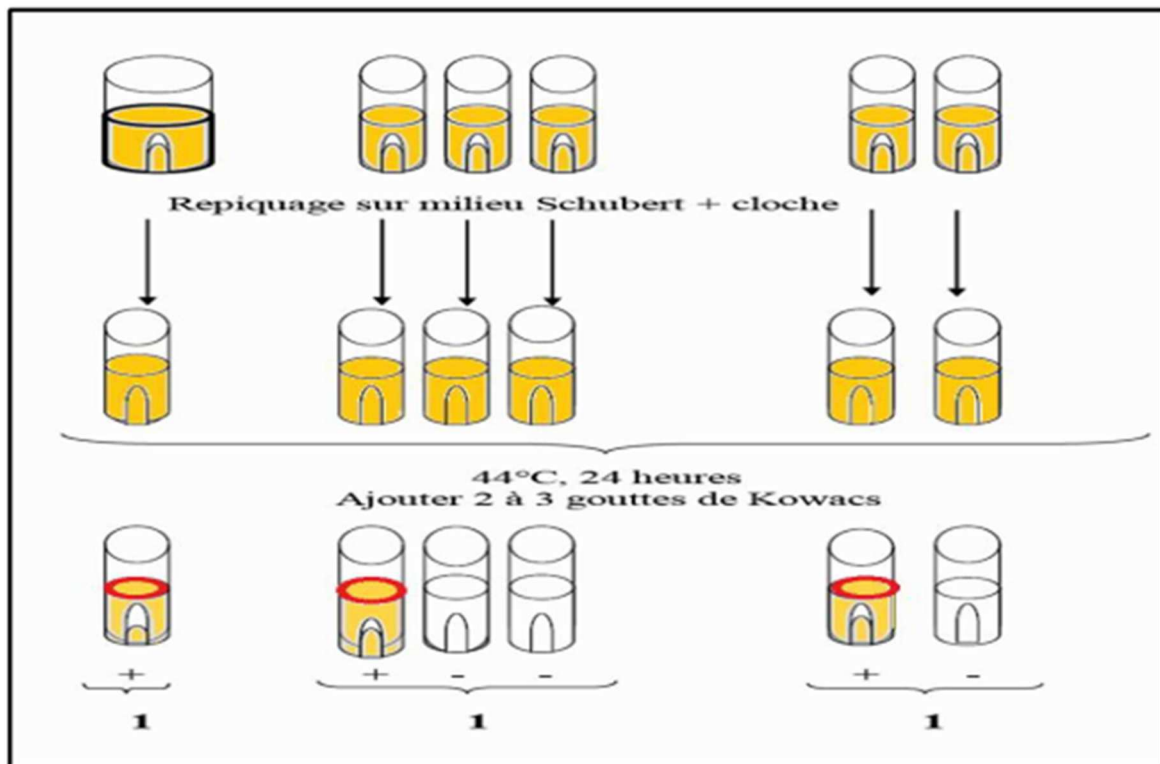


Figure 07. Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide (test de confirmation) (Lebres et *al.*, 2002 ; Azizi, 2009)

I.3.3.2 Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

La recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux est rarement effectuée indépendamment de celle des coliformes présumés, les méthodes sont identiques seuls les milieux différents (Rodier, 1996).

Tout comme la méthode de recherche de coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs qui sont :

- **Test de présomption**
- **Test de confirmation** : réservé à la confirmation réelle des Streptocoques fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

a) Test de présomption

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu ROTHE D/C,
 - 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE D/C,
 - 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C,
 - Bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- **Incubation :**

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- **Lecture :**

Seront considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien (figure 08). Ces derniers doivent absolument faire l'objet d'un repiquage sur milieu EVA-LITSKY dans le but d'être confirmés.

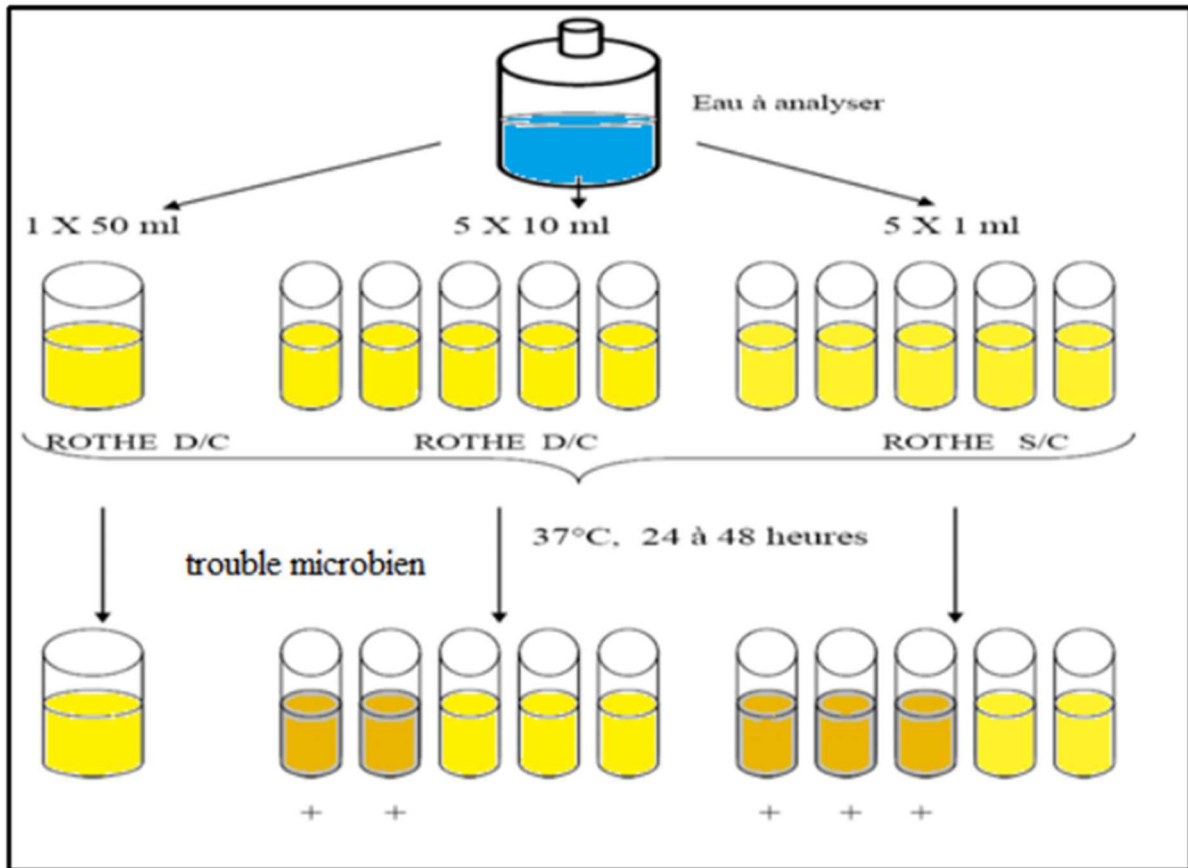


Figure 08. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (test de présomption) (Lebres et *al.*, 2002 ; Azizi, 2009)

b) Test de confirmation

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

Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront donc l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu EVA-LITSKY, comme l'indique la figure 09.

Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

- **Incubation :**

L'incubation se fait cette fois-ci à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture :**

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

- Un trouble microbien,

- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

Parfois, la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette (**Rodier et al., 2009**).

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table NPP (Annexe).

Les résultats sont exprimés en nombres de coliformes dans 100 ml d'eau analysée en prenant en considération les dilutions.

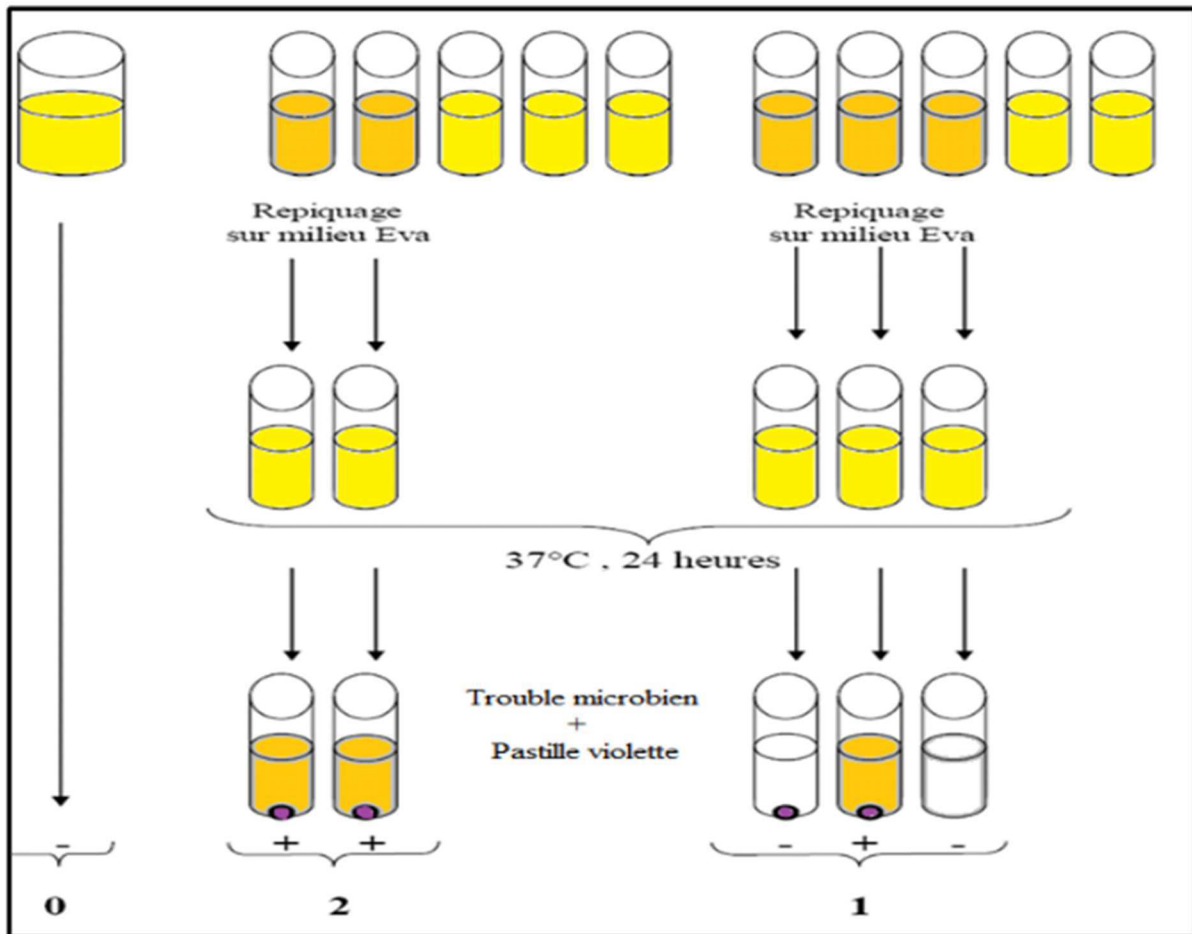


Figure 09. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (test de confirmation) (**Lebres et al., 2002 ; Azizi, 2009**)

I.3.3.3 Recherche et dénombrement des spores des Anaérobies Sulfito-Réducteurs (ASR)

Les Clostridium sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. La forme sporulée, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente (Rodier *et al.*, 2009).

La recherche et le dénombrement des spores de Clostridium Sulfito-Réducteurs est réalisée selon la méthode par incorporation en milieu gélosé et est basée sur la recherche des formes sporulées (Rodier *et al.*, 2009). Pour cela, les étapes suivantes doivent être suivies (figure 10) :

- Agiter soigneusement l'eau à analyser.
- Répartir à l'aide d'une pipette graduée stérile 25 ml d'eau dans des tubes stériles à raison de 5 ml par tube.
- Porter les tubes au bain-marie à 80 °C, pendant 10 min.
- Refroidir immédiatement à l'eau du robinet.
- Faire préalablement fondre 250 ml du milieu viande-foie, ajouter après refroidissement 12,5 ml de la solution de sulfite de sodium à 5%, et 2,5 ml de la solution d'alun de fer à 5%, mélanger sans faire des bulles.
- Verser la gélose VF sulfitée, dans chacun des tubes contenant l'eau traitée à raison de 15 ml par tube.
- Remplir et mélanger doucement sans incorporer d'air.
- Laisser les tubes solidifier sur la paillasse.

- **Incubation**

Elle est réalisée à 37°C pendant 48h avec une première lecture à 16 h.

- **Lecture**

Les colonies entourées d'un halo noir sont comptées comme susceptibles de provenir de bactéries Anaérobies sporulées Sulfito-Réductrices.

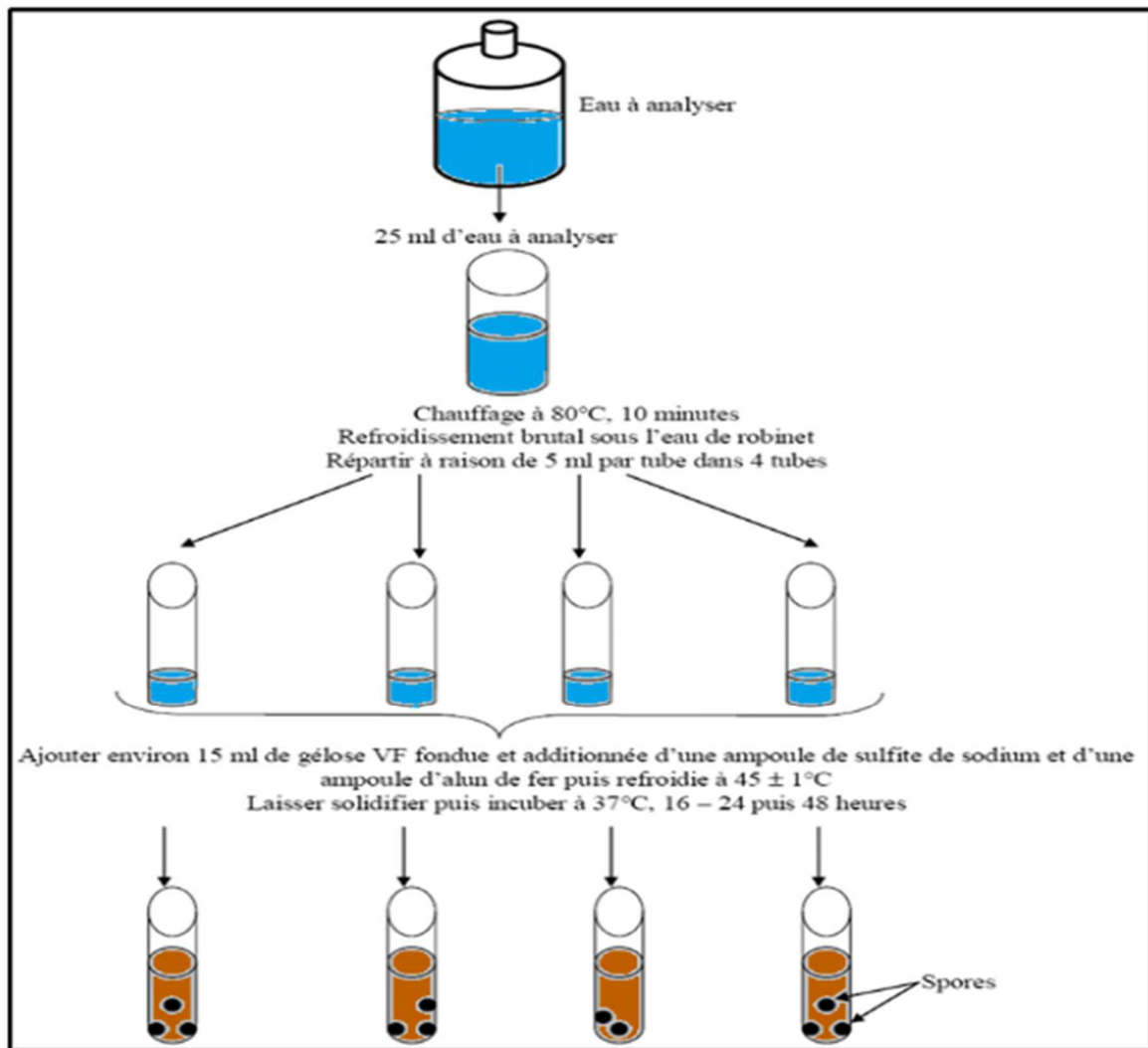


Figure 10. Etapes de recherche des ASR (Lebres *et al.*, 2002 ; Azizi, 2009).

➤ Recherche des germes pathogènes pour l'homme

Il existe une grande variété de bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes (opportunistes) pour l'homme dans tous les types d'eaux. Celles-ci vivent ou survivent dans l'environnement, soit provenant des rejets humains, éliminées par des sujets malades ou des porteurs sains, soit étant autochtones et pouvant s'adapter à l'homme (Rodier *et al.*, 2009).

I.3.3.4 Recherche des Salmonelles

La recherche des Salmonelles se fait en 4 étapes (figure 11).

1ère étape : Enrichissement primaire

- Introduire 50 ml d'eau à analyser dans 100 ml de bouillon sélénite-cystéine D/C. la solution obtenue est appelée SFB I, est incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

2ème étape : Enrichissement secondaire et isolement

- La solution SFB I incubée la veille fera l'objet d'un deuxième enrichissement sur bouillon sélénite-cystéine en tube (SFB II) à raison de 1 ml par tubes et un isolement sur gélose Hecktoen I.
- L'incubation est à 37°C pendant 18 à 24 heures.

3ème étape : Isolement

- Effectuer à partir du bouillon SFB II un isolement sur gélose Heckoten II.
- Prendre ensuite 1 ml du SFB II et l'introduire dans un bouillon sélénite cystéine en tube SFB III, puis l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Effectuer la lecture de la boîte de gélose Hecktoen.

4ème étape : Lecture et identification

- La boîte de gélose Heckoten II préalablement incubée fera objet d'une lecture.
- Les Salmonelles apparaissent le plus souvent sous formes de colonies grises avec ou sans centre noire. Ces dernières subiront une identification biochimique avec une galerie Api 20 E (annexe).

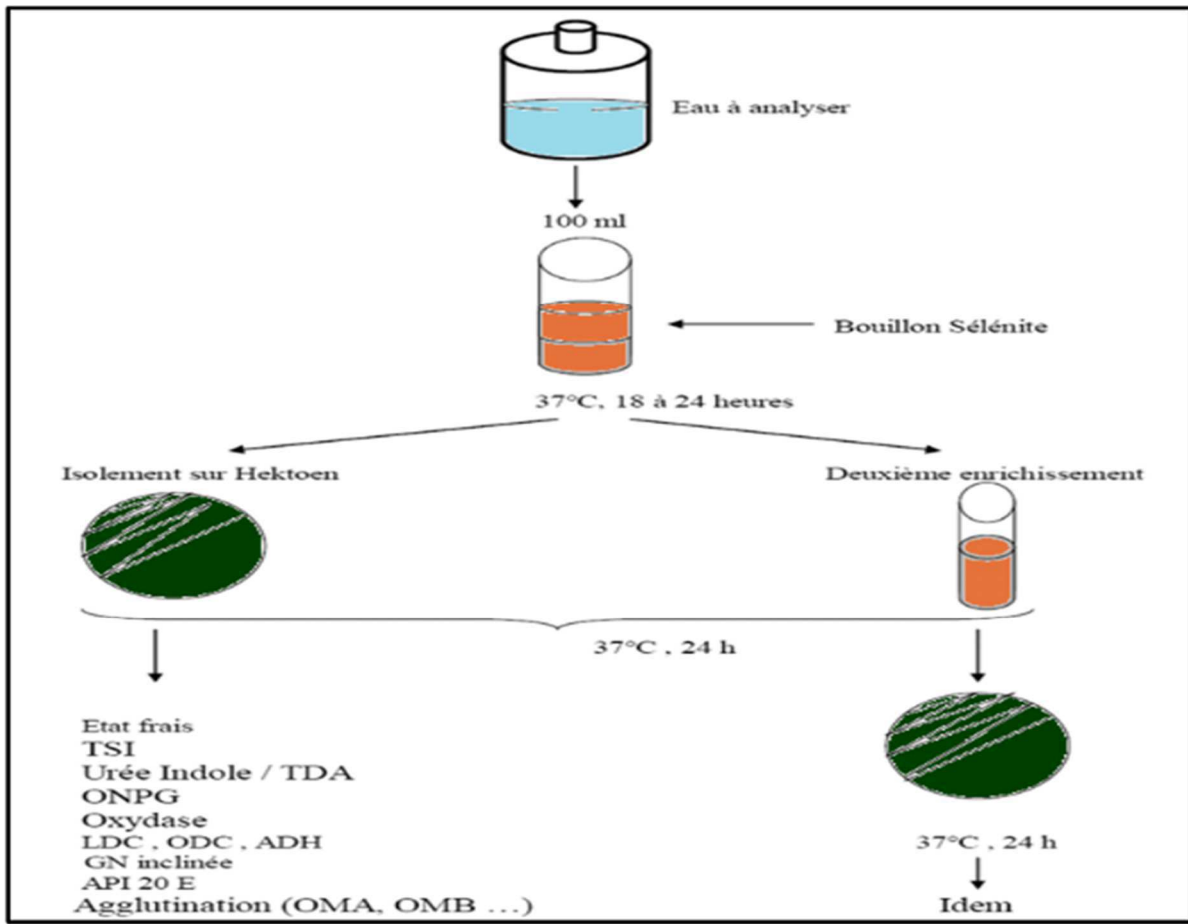


Figure 11. Etapes de recherche des Salmonelles (Lebres et al., 2002 ; Azizi, 2009)

I.3.3.5 Recherche des *Staphylococcus aureus*

Ces bactéries possèdent une catalase et une coagulase et sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37°C sur un milieu sélectif Chapman au mannitol. L'espèce *Staphylococcus aureus* est pathogène et est la plus redoutée (Rodier et al., 2009).

La recherche des staphylocoques se fait comme suit (figure 12) :

En tout premier, faire fondre un flacon de gélose Chapman et la couler dans des boîtes de pétri puis laissez sécher à côté du bec bunsen.

A partir de la solution mère (l'eau à analyser) et des dilutions décimales, on porte aseptiquement 0,1 ml (2 gouttes) dans les boîtes de pétri qu'on étale à l'aide d'un râteau (ou en utilisant la méthode des cadrans).

- **Incubation**

L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures.

- **Identification**

L'identification s'effectue en une série d'étapes suivant un ordre bien déterminé, les souches isolées sont identifiées par des techniques microbiologiques standards.

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

- a) **Examen macroscopique**

Sur le milieu de Chapman, les colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol+ sont des *S. aureus*, *S. saprophyticus*...

- b) **Examen microscopique**

Des colonies cultivées sur milieu Chapman vont subir une coloration de Gram, pour confirmer la présence de Cocci en diplocoques et en grappe de raisin.

Les frottis sont observés au microscope optique, on ajoute de l'huile à immersion (Objectif x100).

- c) **Identification biochimique**

L'identification est également basée sur des caractères biochimiques de ces bactéries

- **Test de Catalase**

Le test de catalase facilite la détection de l'enzyme catalase dans les bactéries. L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. La catalase accélère la dégradation de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2) en eau et oxygène ($2H_2O_2 + \text{Catalase} \rightarrow 2H_2O + O_2$). Cette réaction est évidente par la formation rapide de bulles (**Reiner, 2010**).

A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée, puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

- **Test de Coagulase**

La coagulase libre est présente chez *S.aureus*.

La détermination de cette dernière se fait en ajoutant dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma humain, et 0,5 ml d'une culture de staphylocoques de 24h en bouillon BHIB.

Le mélange est placé pendant 24h dans une étuve à 37°C. La formation d'un coagulum indique la présence de la coagulase.

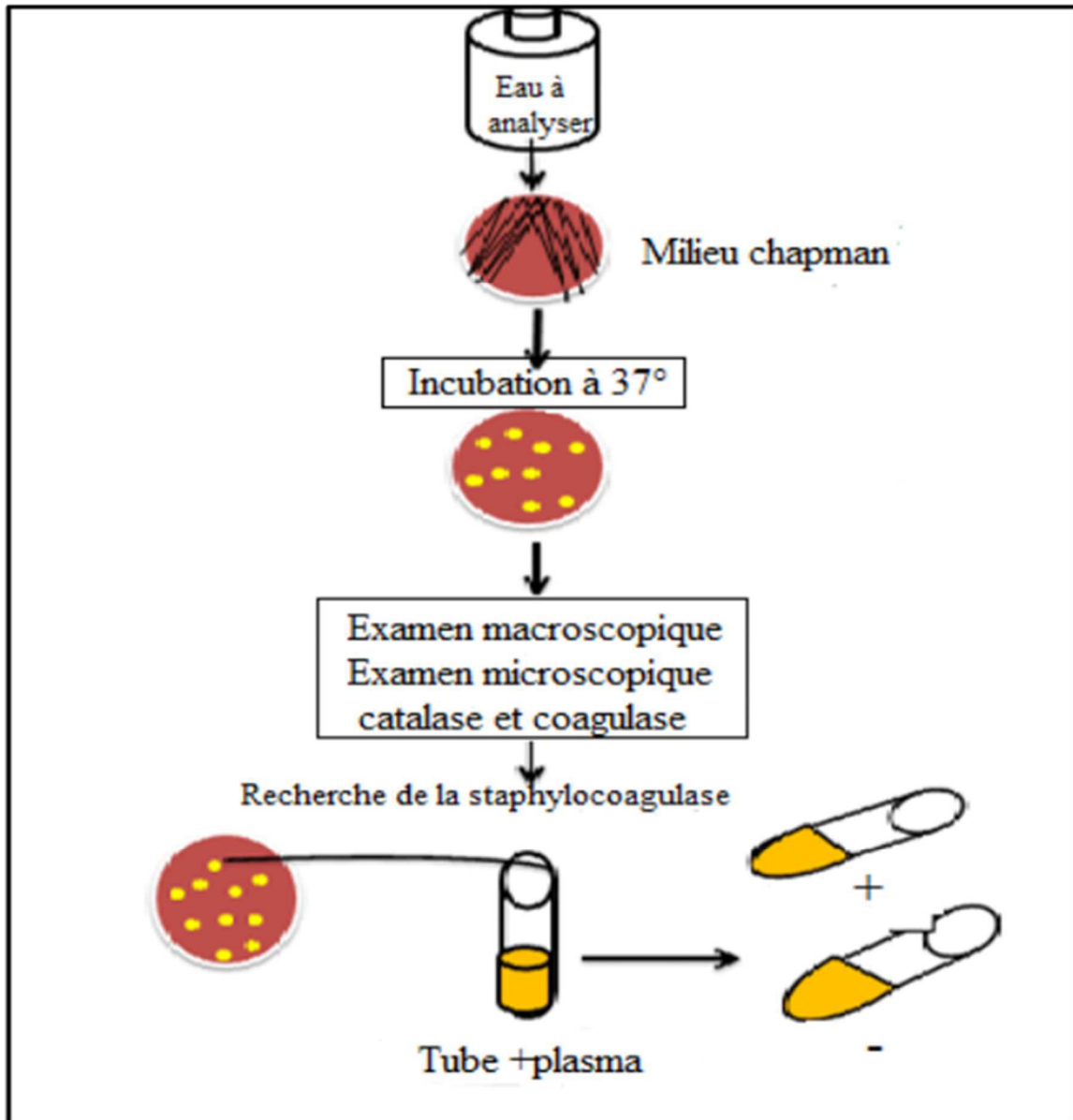


Figure 12. Recherche de *Staphylococcus aureus* (Lebres et al., 2002 ; Azizi, 2009)

I.3.3.6 Recherche des *Pseudomonas aeruginosa*

L'objectif de la recherche de *Pseudomonas* dans les milieux aquatiques est d'étudier sa répartition au sein des compartiments d'un cours d'eau récepteur et définir ses habitats préférés.

Commencer par agiter soigneusement l'eau à analyser puis étaler 0,5 ml d'eau à la surface de la gélose au cétrimide (figure 13).

- **Incubation**

Elle se fait à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* ont un diamètre de 1,5 à 2 mm, un contour circulaire, une surface lisse et brillante, une couleur blanc crème, un aspect muqueux et sont parfois déjà accompagnées d'une production de pigment bleu-vert (pyocyanine) qui commence à diffuser avec émission de fluorescence sous U.V

- **Confirmation**

Pour confirmer la présence de *Pseudomonas aeruginosa* on procède à la recherche des pigments spécifiques sur les milieux King A et King B.

Ensemencer les deux milieux King A et King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose. Fermer les tubes sans serrer et incuber à 37°C pendant 1 à 4 jours.

- **Lecture**

La présence de pigments diffusibles se traduit par l'apparition de différentes couleurs qui peuvent diffuser sur toute la pente.

- **Sur le milieu King A**

Les colonies typiques sur ce milieu sont colorées en bleu-vert, parfois en brun-rose (pyorubine). La pyocyanine est extraite par le chloroforme.

On verse 0,5 ml de chloroforme sur la culture et on laisse 10 à 15 min, en position inclinée la pyocyanine très soluble dans la chloroforme le colore en bleu.

- **Sur le milieu King B**

La production de pyoverdine se manifeste par une coloration jaune-verte, avec une fluorescence observée au U.V à 340 nm. Ce pigment est insoluble dans le chloroforme.

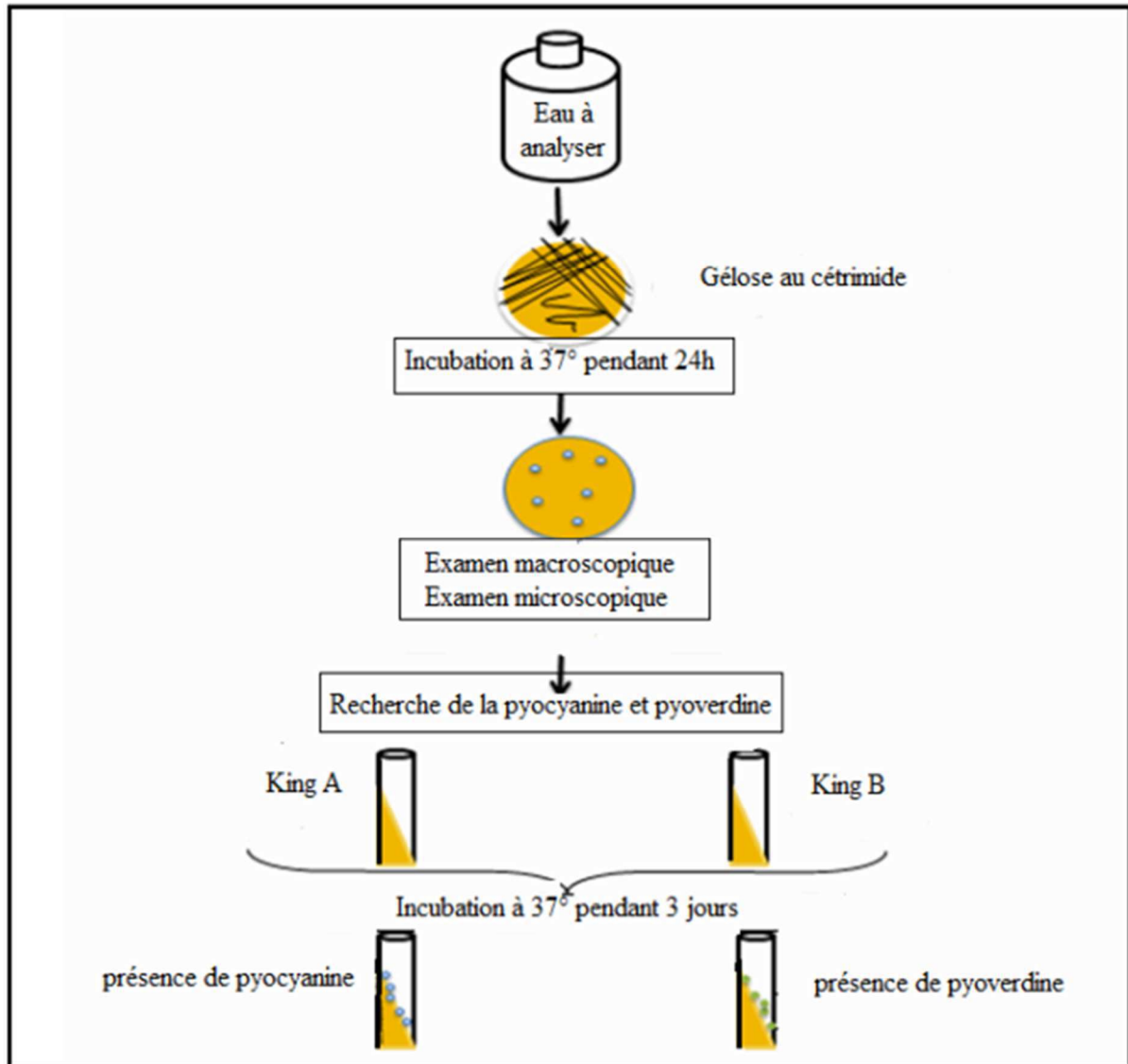


Figure 13. Etapes de recherche de *Pseudomonas aeruginosa* (Lebres et al., 2002 ; Azizi, 2009)

I.3.4 Identification des bactéries

I.3.4.1 Etude macroscopique et microscopique

Lors de l'identification bactérienne d'une souche il est important de commencer en premier par la description macroscopique et microscopique des colonies isolées (figure 14 ; tableau III).

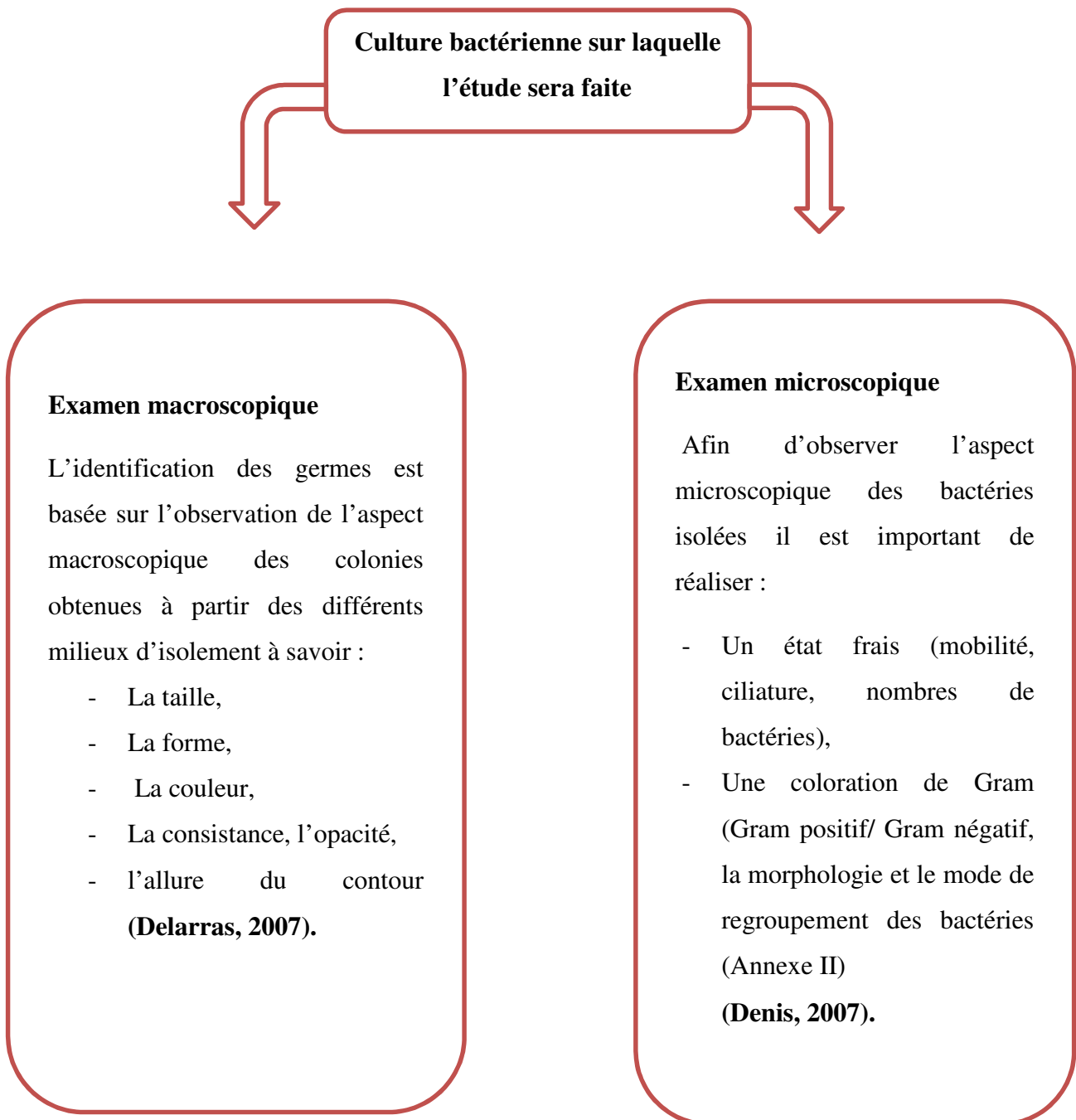


Figure 14. Etude macroscopique et microscopique des bactéries

Tableau III. Aspects macroscopique des bactéries étudiées sur les milieux de culture sélectifs

Milieu d'isolement	Aspects des colonies	Bactéries suspectes
Hektoon	<ul style="list-style-type: none"> – Jaunes saumon sans centre noir – jaunes saumon à centre noir – vertes ou bleuâtres sans centre noir – vertes bleuâtres a centre noir 	<ul style="list-style-type: none"> – Coliformnes, <i>Serratia</i>, <i>Arizona</i>, <i>Levinea</i>, <i>Yersinia</i> – <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Proteus vulgaris</i> – <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i> à H₂S (-). – <i>Proviadentia</i>, <i>Proteus morganii</i>, <i>Proteus rettgeri</i> – <i>Salmonella</i>, <i>Proteus mirabilis</i>
<i>Salmonella-shigella</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Colonies rouges. – Colonies rouges à centre noir – Colonies incolores – Colonies incolores à centre noir 	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, autres coliformes (<i>E.coli</i>) – <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Arizona</i> – <i>Salmonella</i> H₂S (-), <i>Shigella</i>, <i>Serratia</i>, <i>Alkalescens</i>, <i>Enterobacter hafniae</i>, <i>Proteus morganii</i> – <i>Salmonella</i> H₂S (+), <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> – Colonies jaunes entourés d'une zone jaune, mannitol (+) – Colonies roses rouges ou pourpres, mannitol (-) 	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Staphylococcus aureus</i> – <i>Staphylococcus saprophyticus</i> – <i>Staphylococcus epidermidis</i> – <i>Staphylococcus xylosus</i> – <i>Sraphylococcus hominis</i>
Citrémide	<ul style="list-style-type: none"> – Colonies de grande taille avec un aspect œuf sur plat (fried eggs), en reflet métallique, avec une pigmentation bleu-vert 	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

(Rodier et al., 2005 ; Delarras, 2007).

I.3.4.2 Galerie biochimique classique

L'indentification sur galerie classique des bactéries met en évidence plusieurs caractéristiques biochimiques telles que la présence ou absence de certaines enzymes et/ou la fermentation de certains sucres. Elle est réalisée en suivant le protocole ci-dessous (figure 15) :

- Ensemencer quelques gouttes de la suspension bactérienne suspecte sur les milieux suivant :
 - Gélose TSI (Triple SugarIron),
 - Agar citrate de Simmons,
 - Mannitol mobilité,
 - Urée Indole,
 - ONPG (Ortho-Nitro-Galactosidase)



Figure 15. Tests utilisés en galerie biochimique classique

I.3.4.3 Galerie biochimique miniaturisé (Api 20E)

Le système API (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries (Freney *et al.*, 2000).

L'identification des bacilles Gram négatif dont les entérobactéries est fondée sur l'étude des caractères biochimiques et enzymatiques, par l'ensemencement et la lecture colorimétrique sur les galeries miniaturisées API 20 E (bio Mérieux SA, Marcy l'étoile, France) après 24 heures d'incubation (Ebongue *et al.*, 2015).

Elle est ensemencée en remplissant les micro-cupules par la suspension bactérienne à tester à partir du milieu TSI. Pour la suspension bactérienne ; elle doit être préparé dans de l'eau physiologique (figure 16).

- Pour les tests CIT, VP et GEL remplir tubes et cupules.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).
- Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de vaseline. Refermer la boîte est incubée 24 heures à 37°C. pour la lecture le tableau



Figure 16. Galerie Api 20 E non ensemencée

I.3.5 Antibiogramme

C'est l'étude de la sensibilité d'un germe vis-à-vis des différents antibiotiques, afin de surveiller la résistance vis-à-vis de ce dernier et mettre en évidence les bactéries multirésistantes (Jehl *et al.*, 2015).

- **Préparation de l'inoculum**

La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial. La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures et pure sur milieu d'isolement approprié. Elle doit être ajustée à l'aide d'un densitomètre (échelle de McFarland).

L'antibiogramme est réalisé par diffusion en milieu gélosé, et est réalisé avec une suspension calibrée à 0,5 McFarland, contenant environ 10^8 bactéries par ml, en employant un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum (CA-SFM, 2020).

- **Ensemencement**

L'ensemencement se fait dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, il est réalisé par écouvillonnage ou par inondation, de telle façon à avoir après incubation des colonies bien distinctes mais jointives.

La technique de l'écouvillonnage se fait comme suit, selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie :

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Sortir l'écouvillon du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4 mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60°C afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes (CA-SFM, 2020).

- **Application des disques et incubation**

L'application des disques se fait 3 à 5 minutes après l'ensemencement. Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Ils sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliquée le disque ne

doit pas être déplacé (car la diffusion commence dès que l'antibiotique a été déposé) (CA-SFM, 2020) (figure 17).

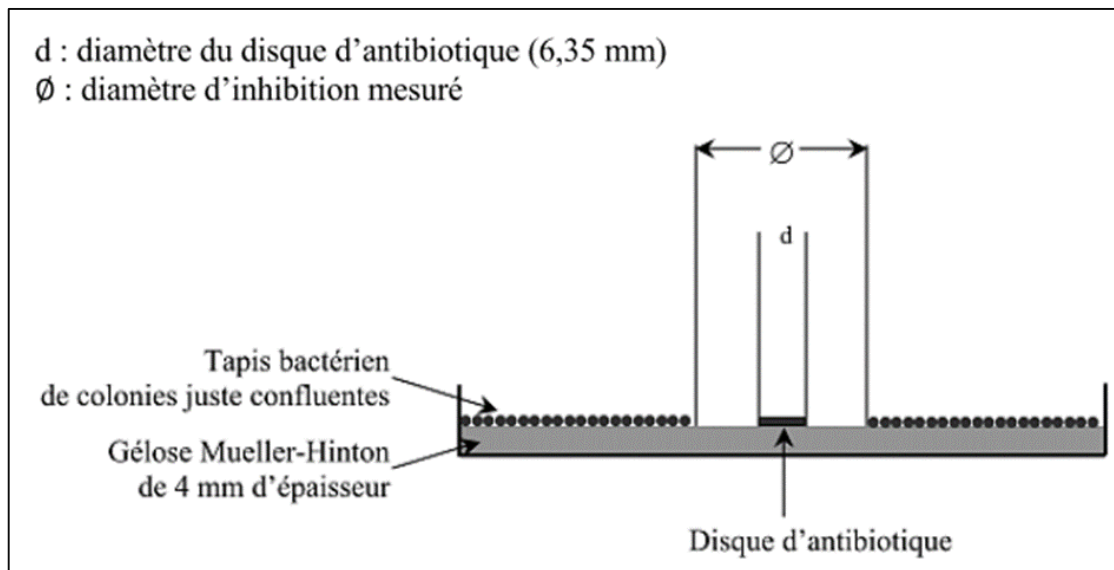


Figure 17. Schéma explicatif en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard (CA-SFM, 1997)

- **Incubation**

Les géloses sont incubées entre 16 à 18 heures à $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$.

- **Lecture**

La lecture est faite par la mesure des différents diamètres des zones d'inhibition, à l'aide d'un pied à coulisse métallique. Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée (CA-SFM, 2020). Les résultats sont comparés aux valeurs écrites figurant dans le Tableau VII, annexe I.

Selon le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2003), trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : Sensible 'S', Résistant 'R' et Intermédiaire 'I' (figure 18) :

- Les souches catégorisées **S** sont celles pour lesquelles la probabilité de Succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée.
- Les souches catégorisées **R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

- Les souches catégorisées **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus in vitro ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique (CA-SFM, 2003).

Deux concentrations critiques sont définies pour chaque antibiotique : La concentration critique basse 'c' et la concentration critique haute 'C' aux quelles correspondent des diamètres critiques 'D', et 'd', respectivement. Les concentrations critiques sont établies sur la base des concentrations sériques obtenues après administration d'une posologie «usuelle» (c) et de la posologie maximale tolérée (C) (Jehl *et al.*, 2015).

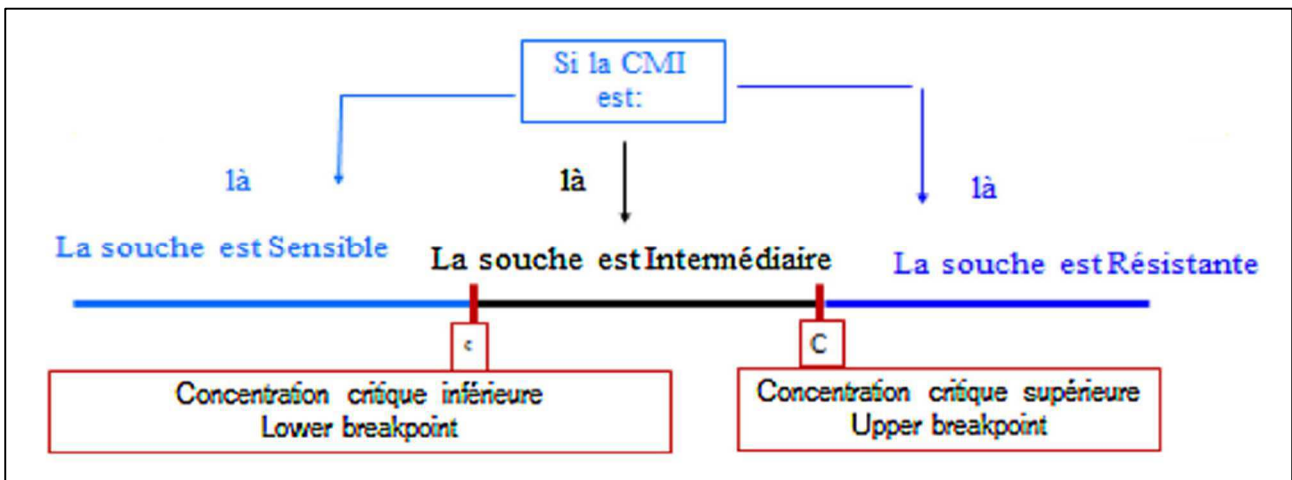


Figure 18. Concentrations critiques inférieures (lower break point des anglosaxons) et supérieures (upper break point) (Jehl *et al.*, 2015).

Pour certains couples antibiotiques/bactéries, ils n'existent qu'une seule concentration critique. Ce sont des CMI seuils, des bornes, qui permettent de statuer sur la sensibilité ou la résistance d'une bactérie donnée à un antibiotique par comparaison à ces seuils de la CMI prise par cet antibiotique vis-à-vis de cette bactérie (Jehl *et al.*, 2015).

Chaque antibiotique a ses concentrations critiques propres. Pour une bactérie et un antibiotique donnés, le diamètre d'inhibition mesuré est comparé aux diamètres critiques (Jehl *et al.*, 2015).

A dark green ribbon graphic with a central rectangular section and pointed ends on both sides. The text is centered within the ribbon.

Résultats et Discussion

II. RESULTATS ET DISCUSSION

De ce fait, cette partie résultats et discussion consistera en une Méta-analyse des publications et des mémoires de master. Une recherche méthodique de la littérature a été effectuée sur la STEP de Beni-Mered, et l'hôpital Frantz Fanon dans la wilaya de Blida

II.1 Paramètres physico-chimiques

II.1.1 Température

La température de l'eau est un facteur écologique important agissant sur la densité, la viscosité, la solubilité des gaz dans l'eau, la dissociation des sels dissouts, de même que sur les réactions chimiques et biochimiques, le développement et la croissance des organismes vivants dans l'eau et particulièrement les micro-organismes (**Makhoukh et al., 2011**).

D'après les mesures obtenues par **Bouzelouf et Serir, (2016)**, les valeurs de la température étaient les suivantes : la température de l'eau usée de l'hôpital de Frantz Fanon oscillait entre un minimum de 15,6°C et un maximum de 20,6 °C avec une température moyenne de 16,1°C. Au niveau de la STEP, la température la plus faible était de 15°C et la plus élevée était de 20°C, avec une valeur moyenne de 18,25±1,58°C (**Belkacemi et Saad, 2019**)

D'après l'étude de **Idrissi et al., (2015)**, la température des eaux usées brutes minimale est de 14,3°C et maximale de 22,7°C avec une moyenne de 15,75°C.

Ces températures enregistrées sont incluses dans la fourchette des valeurs limites de rejet direct dans le milieu récepteur, et restent acceptables car elles ne dépassent pas la norme de 30°C fixée par le JORA (2006).

I.1.2. pH

Les valeurs du pH des eaux usées brutes de la STEP variaient de 7,20 à 8,20 avec une moyenne de 7,81±0,36 (**Belkacemi et Saad, 2019**).

Le pH des eaux usées de l'hôpital de Frantz Fanon variait entre un pH minimal de 2,22 et un pH maximal de 8,50 (**Bouzelouf et Serir, 2016**).

Des eaux dont le pH est inférieur à 7 sont généralement des eaux plus acides. Cette acidité est due aux acides carboniques, humiques, l'acide fulvique et autres acides organiques. Alors que des eaux dont le pH est supérieur à 7 peuvent supporter une plus grande charge de

substances dissoutes et sont capables de soutenir une bonne vie végétale (Naveen *et al.*, 2017). L'intervalle des limites des rejets directs est compris entre 6,5 et 8,5 (Idrissi *et al.*, 2015).

II.2 Paramètres bactériologiques

Les différentes valeurs obtenues dans la littérature sont présentées par le tableau suivant :

Tableau IV. Récapitulatif des différents résultats obtenus dans la littérature

		Etude de Bouzelouf et Serir (2016)	Etude de Belkacemi et Saad (2019)	Etude de Ameziane et al., (2014)	Etude de Hammadi et Sebsi (2016)
Coliformes totaux (CT)	Effluents STEP		79,125×10 ⁶ UFC/100ml	11,79×10 ⁷ UFC/100ml	
	Effluents hospitaliers	6,38×10 ⁶ UFC/100ml		10,6×10 ⁷ UFC/100ml	
Coliformes fécaux (CF)	Effluents STEP		31,5×10 ⁵ UFC/100ml	10,5×10 ⁶ UFC/100ml	
	Effluents hospitaliers	3×10 ⁶ UFC/100ml		7,44×10 ⁶ UFC/100ml	
<i>Salmonella</i>	Effluents STEP		Absente	Absente	
	Effluents hospitaliers	Absente		Absente	
Streptocoques fécaux (SF)	Effluents STEP		52×10 ⁵ UFC/100ml	8×10 ⁶ UFC/100ml	
	Effluents hospitaliers			2,28×10 ⁶ UFC/100ml	300 UFC/ml
Spores d'Anaérobies Sulfite-Réducteurs (ASR)	Effluents STEP		16,66×10 ⁴ spores/20ml		
	Effluents hospitaliers				153 spores/20ml
<i>Pseudomonas</i>	Effluents STEP		6,75×10 ⁴ UFC/100ml		

	Effluents hospitaliers				50,05×10 ⁶ UFC/ml
<i>Staphylococcus</i>	Effluents STEP		7,25×10 ⁴ UFC/100ml		
	Effluents hospitaliers				325 UFC/ml

II.2.1 Recherche et dénombrement des coliformes totaux (CT)

Les coliformes totaux constituent un groupe hétérogène de bactéries d'origine fécale et environnementale. D'après les résultats des études des années précédentes, le nombre de coliformes présents dans les effluents de l'hôpital de Frantz Fanon variait entre 18×10^6 et 1×10^6 UFC/100ml d'eau analysée, avec une moyenne de $6,38 \times 10^6 \pm 2315,03$ UFC/100ml d'eau analysée (**Bouzelouf et Serir, 2016**).

Le nombre de coliformes retrouvé dans les effluents bruts de la STEP oscillait entre un minimum 35×10^5 UFC/100ml de et un maximum de 160×10^5 UFC/100ml d'eau analysée, avec une moyenne de $79,125 \times 10^5 \pm 39,42 \times 10^5$ UFC/100ml d'eau analysée (**Belkacemi et Saad, 2019**).

Les eaux usées des effluents hospitaliers sont moins chargées en coliformes totaux que celles des STEPs, ce qui corrobore avec les résultats obtenus par **Ameziane et al., (2014)**, pour qui les charges moyennes en CT étaient de $10,6 \times 10^7$ UFC/100ml pour les effluents de l'hôpital Mohamed V (Maroc) et de $11,79 \times 10^7$ UFC/100ml pour la STEP de Ain Choubbik (Maroc).

Ainsi que pour les CT des eaux usées retrouvés à Hambourg par **Ajonina et al., (2015)** était de $8,1 \times 10^5$ UFC/100ml pour le premier prélèvement et de $7,8 \times 10^5$ UFC/100ml pour le deuxième prélèvement. Ces résultats se rapprochent de ceux de l'hôpital Mohamed V, mais ils sont un peu moins chargés que ceux de l'hôpital de Frantz Fanon.

Cette charge est due à l'enrichissement des eaux usées brutes en matières organique. Elle peut être expliquée par le fait que les eaux usées présentent constamment des variations importantes. En effet, plus un milieu aquatique est enrichi en matières organique assimilable directement (production primaire) ou indirectement (un apport d'eau usée), plus le nombre de germes aérobie mésophile s'accroît (**Rheinheimer, 1985**).

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

La présence de coliformes totaux dans les eaux traitées ou leur dépassement par rapport aux normes réglementaires n'implique pas nécessairement un risque pour la santé publique, en effet, la plupart des espèces de ce groupe se trouvent naturellement dans le sol ou la végétation (**Edberg et al., 2000**). Mais ils peuvent indirectement être associés à une pollution d'origine fécale (**Rodier, 2009**).

II.2.2 Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (CF)

Les données recueillies dans leurs précédentes études par **Belkacemi et Saad, (2019)**, montre que la charge en coliformes fécaux des effluents brut de la STEP était comprise entre un maximum de 45×10^5 et un minimum de 17×10^5 UFC/100ml, avec une moyenne de $31,5 \times 10^5 \pm 11,19 \times 10^5$ UFC/100 ml d'eau analysée

Selon **Bouzelouf et Serir, (2016)** la charge en CF des effluents hospitaliers se situait entre un maximum de 5×10^6 et un minimum de 1×10^6 UFC/100ml, avec une moyenne de $3 \times 10^6 \pm 1620,18$ UFC/100ml d'eau analysée.

Ces résultats sont inférieurs de ceux obtenus par **Ameziane et al., (2014)**, dont la valeur moyenne des CF des effluents de l'hôpital Mohamed V était de $7,44 \times 10^6$ UFC/100 ml, celle des eaux usées brutes de la STEP de Ain Choubbik était de $10,5 \times 10^6$ UFC/100 ml d'eau analysée.

Selon **Ameziane et al., (2014)**, la charge des CF dans les effluents hospitaliers se rapproche de celle des eaux usées de la STEP, ce qui corrobore avec les résultats obtenus pour l'hôpital de Frantz Fanon et la STEP de Beni-Mered.

II.2.3 Recherche du genre *Salmonella*

Pour les deux effluents, de la STEP de Beni-Mered et les effluents de l'hôpital de Frantz Fanon, le genre salmonella était absent, sauf pour les deux derniers prélèvements qui se sont révélés positifs. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Ameziane et al., (2014)**, qui ont montré une absence totale du genre *Salmonella* dans tous les prélèvements analysés.

Selon **Aboukacem et al., (2007)**, l'absence des Salmonelles peut être expliquée d'une part par l'absence des porteurs asymptomatiques de la population habitante dans cette région,

et d'autre part la difficulté de recherche de ces germes du fait de leur nombre très faible par rapport aux germes communément retrouvés.

II.2.4 Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux (SF)

Selon les résultats obtenus par **Belkacemi et Saad, (2019)**, la charge des SF dans les effluents bruts de la STEP de Beni-Mered était comprise entre 240×10^5 et 14×10^5 UFC/100 ml, avec une moyenne de $52 \times 10^5 \pm 76,61 \times 10^5$ UFC/100 ml. Celle des effluents de l'hôpital de Frantz Fanon était de 300 UFC/ml d'eau analysée (**Hammadi et Sebsi, 2016**).

Ces résultats ne corroborent pas avec les résultats obtenus par **Ameziane et al., (2014)**, qui ont eu des valeurs différentes pour la STEP de Ain Chooubik (8×10^6 UFC/100 ml) et l'hôpital Mohamed V ($2,28 \times 10^6$ UFC/100 ml).

L'ensemble des espèces Streptococcus du groupe D, sont des bactéries commensales de la flore intestinale humaine et animale, ces bactéries sont recherchées en tant qu'indicatrices de contamination fécale dans les eaux, certaines espèces peuvent être pathogènes (**Delarras, 2007**).

II.2.5 Recherche et dénombrement des Spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs (ASR)

Les Anaérobies sulfito réducteurs, permettent de mettre en évidence un groupe de bactéries anaérobies, caractérisées par la résistance de leurs spores et par un équipement enzymatique réduisant plus au moins activement les sulfites en sulfures (**Attab, 2011**).

Selon **Belkacemi et Saad, (2019)**, le nombre des ASR dans les eaux usées brutes de la STEP de Beni-Mered variait autour d'une valeur moyenne de l'ordre de $16,66 \times 10^4 \pm 8,38 \times 10^4$ spores/20 ml. En revanche, pour l'hôpital de Frantz Fanon, la valeur moyenne des ASR était de 153 spores/20 ml (**Hammadi et Sebsi, 2016**).

La charge en ASR dans les effluents de la STEP dépasse celle des effluents de l'hôpital de Frantz Fanon. Ces résultats ne corroborent pas avec ceux de **Ameziane et al., (2014)**, en effet dans leur étude, ils ont noté une charge plus importante en ASR dans l'hôpital Mohamed V que celle retrouvée dans la STEP de Ain Choubbik.

Les spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs sont extrêmement persistantes dans l'environnement et résistantes au processus de désinfection de l'eau. Par conséquent, leur valeur comme indicateur de contamination fécale a été mise en doute car les spores pourraient se

trouver naturellement dans l'environnement (**Pitkanen, 2010**). Ce qui pourrait expliquer la charge importante retrouvée dans les effluents bruts de la STEP de Beni-Mered.

II.2.6 Recherche des bactéries du genre *Pseudomonas*

Les résultats des études de **Belkacemi et Saad, (2019)** ont mis en évidence la présence de *Pseudomonas* dans les effluents brutes de la STEP de Beni-Mered, avec des valeurs moyennes qui oscillait autour de $6,75 \times 10^4 \pm 10,52 \times 10^4$ UFC/100 ml d'eau analysée. En ce qui concerne l'eau usée des effluents de l'hôpital de Frantz Fanon, la valeur moyenne était de $50,05 \times 10^6$ UFC/ml d'eau analysée (**Hammadi et Sebsi, 2016**).

La charge en *Pseudomonas* retrouvée dans les eaux usées des effluents hospitaliers dépasse celle des effluents bruts de la STEP. Ces résultats concordent avec ceux de **Ameziane et al., (2014)**, pour qui le nombre de *Pseudomonas* était plus élevé pour l'hôpital de Mohamed V que celui retrouvé dans les effluents de la STEP de Ain Choubbik.

Selon **Amazian et al., (2010)**, *Pseudomonas* est un agent pathogène essentiellement responsable d'infection nosocomiale, d'où sa présence massive dans les effluents hospitaliers.

II.2.7 Recherche des bactéries du genre *Staphylococcus*

La valeur moyenne de la charge de *Staphylococcus* retrouvée dans les eaux usées brutes de la STEP variait autour de $7,25 \times 10^4 \pm 13,80 \times 10^4$ UFC/100 ml (**Belkacemi et Saad, 2019**). Concernant les effluents de l'hôpital de Frantz Fanon la valeur moyenne était de 325 UFC/ml (**Hammadi et Sebsi, 2016**).

La charge de *Staphylococcus* obtenue par **Amazian et al., (2010)**, dans les effluents de l'hôpital Mohamed V est similaire à celle retrouvé dans les effluents de Frantz Fanon. Cela peut être expliqué par l'utilisation de détergents et de désinfectants par l'hôpital

La présence du germe *Staphylococcus* dans les rejets d'eaux usées est significative des déchets humains : salive, crachat et sécrétion nasales (**Ceaerq, 2012**).

Selon les études rapportées par **Guessennd et al., (2013)**, *Pseudomonas aeruginosa* était plus fréquent que *Staphylococcus aureus* dans les effluents hospitaliers, contrairement aux résultats ci-dessus *P. aeruginosa* est plus présente que *S. aureus*.

II.3 Identification des souches d'Entérobactéries isolées

Après 24h d'incubation à 37°C, les isolats bactériens ont montré divers aspects culturels, en fonction du milieu de culture utilisé.

➤ **Examen macroscopique**

Tableau V. Examen macroscopique des colonies suspectes d'Entérobactéries

Effluents	Colonies suspectes	Forme	Relief	Couleur
STEP	CS 1	Irrégulier	Plat	Saumon
	CS 2	Ronde	Bombé	Saumon
	CS 3	Irrégulier	Bombé	Blanche
	CS 4	Ronde	Surélevé	Bleut-vert à centre noir
	CS 5	Ronde	Bombé	Orange
Hôpital	CS 1	Irrégulier	Plat	Saumon
	CS 2	Ronde	Bombé	Saumon
	CS 3	Ronde	Bombé	Orange
	CS 4	Ronde	Surélevé	Saumon
	CS 5	Ronde	Bombé	Orange

(Bouzelouf et Serir, 2016 ; Belkacemi et Saad, 2019)

➤ **Examen microscopique**

L'examen microscopique permet d'établir une pré-identification des germes isolés. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus par **Belkacemi et Saad (2019)** et les résultats des études d'**Adjroud et Nahal (2014)** effectués dans les eaux usées de l'oued Messida (El Taref).

Tableau VI. Examen microscopique des colonies suspectes d'Entérobactéries

Effluents	Colonies suspectes	Aspect morphologique	Coloration de Gram
STEP	CS 1	Bacille	-
	CS 2	Bacille	-
	CS 3	Bacille	-
	CS 4	Bacille en forme de bâtonnet	-
	CS 5	Bâtonnet	-
Hôpital	CS 1	Bacille	-
	CS 2	Bacille	-
	CS 3	Bacille	-
	CS 4	Bâtonnet	-
	CS 5	Bâtonnet	-

(Adjroud et Nahal, 2014 ; Belkacemi et Saad, 2019)

➤ **Test d'orientation rapide**

Tableau VII. Résultats des tests d'orientation rapide

Effluents	Colonies suspectes	Catalase	Oxydase	Coagulase
STEP	CS 1	+	-	Non déterminé
	CS 2	+	-	Non déterminé
	CS 3	+	-	Non déterminé
	CS 4	+	-	Non déterminé
	CS 5	+	-	Non déterminé
Hôpital	CS 1	+	-	Non déterminé
	CS 2	+	-	Non déterminé
	CS 3	+	-	Non déterminé

	CS 4	+	-	Non déterminé
	CS 5	+	-	Non déterminé

(+) : positif, (-) : négatif (Adjroud et Nahal, 2014 ; Belkacemi et Saad, 2019)

➤ **Galerie biochimique**

Après identification macroscopique et microscopique, et identification par galerie Api 20 E, le Tableau VII montre les différents genres d'Entérobactéries trouvés dans les effluents de la STEP (Belkacemi et Saad, 2019), dans l'hôpital Frantz Fanon (Bouzelouf et Serir, 2016) et des deux hôpitaux de Bejaia et Tizi-Ouzou (Yousfi et al., 2019).

Tableau VIII. Nombre de souches d'Entérobactéries trouvées dans chaque effluent de la STEP de Beni-Mered, de l'hôpital de Frantz Fanon et des deux hôpitaux de Bejaia et Tizi-Ouzou

Colonies suspectes	Nombre de colonie et souches pour les effluents bruts de la STEP de Beni-Mered Belkacemi et Saad (2019)	Nombre de colonies et souches pour les effluents de l'hôpital de Frantz Fanon Bouzelouf et Serir (2016)	Nombre de colonies et souches trouvées par Yousfi et al., (2019) pour les deux hôpitaux de Bejaia et Tizo-Ouzou
CS 1	(n=4) <i>Escherichia coli</i>	(n=5) <i>Escherichia coli</i>	(n=19) <i>E.coli</i>
CS 2	(n=3) <i>Klesbsiella spp</i>	(n=3) <i>Klebsiella oxytoca</i> , (n=4) <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae</i> , (n=10) <i>Klebsiella ornithinolytica</i> , (n=2) <i>Klebseilla terrigena</i>	(n=14) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , (n=7) <i>Klebsiella oxytoca</i>

CS 3	(n=1) <i>Citrobacter freundii</i>	(n=3) <i>Citrobacter Freundii</i> , (n=5) <i>Citrobacter koseri</i> , (n=1) <i>Citrobacter youngae</i> , (n=1) <i>Citrobacter braakii</i>	(n=9) <i>Citrobacter Freundii</i> , (n=2) <i>Citrobacter youngae</i> , (n=4) <i>Citrobacter braakii</i>
CS 4	(n=2) <i>Proteus mirabilis</i>	(n=1) <i>Proteus vulgaris</i>	(n=2) <i>Proteus vulgaris</i>
CS 5	(n= 2) <i>Serratia odorifera1</i>	(n=3) <i>Serratia marcescens</i> , (n=4) <i>Serratia odorifera1</i>	(n=4) <i>Enterobacter spp</i>

CS : Colonies suspecte

n : nombre de colonie

On remarque que les effluents de Frantz Fanon sont plus chargés en Entérobactéries que ceux des effluents de la STEP de Beni-Mered. Les résultats obtenus corroborent parfaitement avec ceux de **Yousfi et al., (2019)** effectués sur 2 hôpitaux de Bejaia et deux autres de Tizi-Ouzou. On remarque aussi que pour les trois résultats il y a les deux souches *E. coli* et *Klebsiella spp* qui sont les plus présents avec un nombre très important.

Contrairement à l'étude de **Belkacemi et Saad (2019) et Bouzelouf et Serir (2016)** pour les effluents de la STEP et de l'hôpital de Frantz Fanon respectivement qui ont trouvé le genre *Serratia*, **Yousfi et al., (2019)** ont trouvé le genre *Enterobacter*.

II.4 Antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton et interprété après la mesure des diamètres d'inhibition selon la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (**Rahal et al., 2011**).

La sensibilité et la résistance des souches obtenues pour chaque effluent est présenté dans les Tableaux VIII et IX :

Tableau IX. Sensibilité et résistance des souches des effluents bruts de la STEP

Souches testées	Sensibilité aux antibiotiques	Résistance aux antibiotiques
Streptocoques du groupe D	Amoxicilline + acide clavulanique, Ampicilline, Vancomycine, Céfotaxime, Gentamicine	100% au Ceftriaxone, Erythromycine, Céfoxitine, Céfotaxime, Kanamycine, Ticarcilline+acide clavulanique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ticarciline + Acide clavulanique, Céfotaxime, Gentamicine, Aztreoname	100% au Cefotaxime, Erythromycine, Céfoxitine, Ampicilline, Vancomycine, Céfalexine, Amoxicilline + Acide Clavulanique
<i>Escherichia coli</i>	100% Céfotaxime, Chloramphénicol, Céftriaxone, 25% Céfazoline	100% Ampicilline, Vancomycine, Oxacilline, Erythromycine, Pénicilline, l'Imipenème
<i>Klebsiella spp</i>	100% Céfotaxime, Céfazoline, Céftriaxone,	100% Ampicilline, Vancomycine, Oxacilline, Erythromycine, Pénicilline, l'Imipenème
<i>Serratia odorifera</i>	Amoxicilline, Céftriaxone, Céfotaxime, Chloramphénicol, Imipenème	Pénicilline, Oxacilline, Erythromycine, Vancomycine, 50% Ampicilline, Céfazoline
<i>Proteus mirabilis</i>	Chloramphénicol, Cefazoline, Imipeneme	100% Vancomycine, Oxacilline, Erythromycine, Pénicilline 50% Ampicilline, Amoxicilline, Ceftriaxone, Céfotaxime

<i>Citrobacter freundii</i>	Imipenème et Chloramphénicol	Ampicilline, Céfazoline, Oxacilline, Erythromycine, Pénicilline
-----------------------------	------------------------------	---

(Belkacemi et Saad, 2019)

Tableau X. Résistance des souches des effluents de l’hôpital de Frantz Fanon

Souches testées	Résistance des souches aux antibiotiques
<i>Klebsiella spp</i>	100% Pénicilline, Ampicilline, Amoxicilline/Acide clavulanique, Tétracycline, Acide fusidique, Vancomycine et Triméthoprim/ sulfaméthoxazole, Lincomycine 66,66% Imipenème, Rifampicine et de la Céfazoline, 100% Kanamycine, 33,33% Aztréonam
<i>Escherichia coli</i>	100% Pénicilline, Oxacilline, Triméthoprim/sulfaméthoxazole, Acide fusidique et Rifampicine, Lincomycine, 80% pour l’Ampicilline, l’Amoxicilline/acide Clavulanique, 66,66% pour l’Imipenème
<i>Citrobacter freundii</i>	100% Pénicilline, Ampicilline, Amoxicilline/Acide clavulanique, Oxacilline, Céfazoline, Céfotaxime, Tétracycline, Lincomycine, Triméthoprim/sulfaméthoxazole Acide fusidique et Vancomycine, 66,66% pour Kanamycine,
<i>Staphylococcus aureus</i>	100% Métronidazole, l’Acide fusidique l’Oxacilline 87,5% et l’Amoxicilline et l’Ampicilline 75%, Kanamycine (87,5%), Streptomycine (62,5%), 50% Gentamicine, 37,5-62,5% macrolides, (42,85%) Colistine, 20% Vancomycine

<p><i>Streptocoques du groupe D</i></p>	<p>100% Kanamycine et Streptomycine, Colistine et Métronidazole, Cefotaxime 14,3-57,14% Lincomycine, Erythromycine 28,58, Amoxicilline 42,85%. Céfazoline 42,86%, Oxacilline 28,57%, l'Ofloxacin 42,85%, l'Acide fusidique 28,57%, la Tétracycline 28,57%, la Chloramphénicol 14,3%</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>100% Macrolides, Aminosides, Vancomycine, Acide fusidique, Pristinamycine et Métronidazole, Ofloxacin et Gentamicine 75%, 50% Tobramycine, Imipenème et Tetracycline 25%</p>

(Bouzelouf et Serir, 2016 ; Hammadi et Sebsi, 2016)

Pour les streptocoques du groupe D, on remarque que les souches des différents effluents sont résistantes aux mêmes antibiotiques, seul le pourcentage de résistance diffère. Nous avons constaté par exemple que pour les effluents de la STEP, 100% des souches étaient résistantes vis-à-vis de l'Erythromycine alors que 28,58% est le taux obtenu pour celles qui sont isolées des effluents de l'hôpital de Frantz Fanon.

Le taux de résistance des Streptocoques fécaux vis-à-vis l'Amoxicilline est de 42,85%. Ce résultat est élevé par rapport à celui trouvé par **Fatou (2002)** au Dakar(Sénégal) qui est de 15,4%. Par contre le taux de résistance à l'Oxacilline est de 28,57%, ce taux est faible par rapport au taux de 100% obtenu par **Bekkari et al., (2016)** au Maroc.

Pour les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, les souches des deux effluents étaient résistantes aux mêmes antibiotiques, avec le même pourcentage de résistance.

Selon **El Bouamri et al., (2013)**, les deux espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* étaient les plus résistantes aux Béta-lactamines.

Nous avons également noté dans la littérature, la sensibilité de quelques souches testées (*E. coli*, *Serratia odorifera*) vis-à-vis des Céphalosporines de troisième génération (Céfotaxime). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Oubrim et al., (2012)** pour les deux STEP de Settat et Soualem au Maroc.

La résistance des Entérobactéries vis-à-vis la Pénicilline était de 100%, pour les effluents hospitaliers. Les Pénicillines sont majoritairement prescrites en médecine humaine, ce qui conduit à la forte résistance des Entérobactéries vis-à-vis ces derniers (**Petit, 2018**).

Les souches de *S. aureus* ont manifesté une grande résistance à l'Acide fusidique et à la Métronidazole (100%).

Les souches de *S. aureus* isolées dans l'étude de **Hammadi et Sebsi, (2016)**, avaient une résistance assez élevée vis à vis des Béta-lactamines tels que la Pénicilline G (62,5%), l'Amoxicilline, l'Ampicilline (75%) et l'Oxacilline (87,5%). Ces résultats concernant le taux de résistance à la Pénicilline sont moins élevés en comparaison avec l'étude de **Diouara en 2006** dans la STEP de Bamako(Mali), où le taux était de 86,25%, par contre il a rapporté un taux faible pour l'Amoxicilline (43%). Ainsi, selon **Ramoul (2014)** pour les effluents du CHU de Annaba, 37.5% des *S. aureus* sont résistants à l'Oxacilline. Ce taux est très faible par rapport aux résultats ci-dessus.

La bactérie la plus fréquente est *P. aeruginosa* avec des taux de résistances très élevés aux différentes classes des antibiotiques. En effet, les souches isolées de cette bactérie dans l'étude de **Hammadi et Sebsi, (2016)**, ont montré un taux de résistance très important (100%) vis-à-vis des antibiotiques appartenant aux Béta-lactamines à l'exception de l'Imipenème où on a enregistré un taux de résistance le plus faible (25%). Ces taux sont semblables à ceux rencontrés dans la littérature par **Igbinosa et al., (2012)** en Afrique du sud et contraire à ceux obtenus par **Acton (2013)** aux Etats Unis d'Amérique, où le taux de résistance de l'Oxacilline est de 16,6%.

Les bactéries avaient montré une sensibilité vis-à-vis l'Imipenème (pour une résistance de 25%), pour les effluents de la STEP. Ces résultats concordent avec ceux de **El Bouamri et al., (2013)** avec une résistance de 10% pour l'hôpital Avicenne de Marrakech (Maroc).

Plusieurs composés antibiotiques ne sont pas complètement dégradés dans le processus de traitement des eaux usées et sont donc rejetés dans l'environnement par les effluents où ils peuvent sélectionner des bactéries résistantes aux antibiotiques (**Gatca et al., 2013**).

A dark green ribbon graphic with a central rectangular section and two pointed ends on either side. The word "Conclusion" is written in white serif font across the central section.

Conclusion

CONCLUSION

C'est en 1928 qu'a eu lieu la découverte révolutionnaire du premier antibiotique. Depuis l'antibiothérapie n'a cessé d'évoluer en découvrant d'autres antibiotiques et en sauvant des vies. Toutefois l'utilisation massive et répétée de ces molécules a provoqué l'apparition de bactéries multirésistantes (BMR). On peut retrouver ces BMR même dans les milieux aquatiques. Ces germes peuvent être acheminés jusqu'à l'homme par la chaîne alimentaire ou par les activités de loisirs ce qui constitue un problème de santé publique et exige l'évaluation de leur résistance dans les milieux aquatiques.

Les effluents hospitaliers et ceux des STEP s engendrent une menace pour la santé publique et l'environnement en raison de leur forte charge en bactéries résistantes aux antibiotiques.

Dans cette étude Méta-analyse, les analyses bactériologiques ont révélé la présence d'une diversité bactérienne dans les eaux usées de la STEP de Beni Merad à savoir CT ($79,125 \times 10^5$ UFC/100ml), CF ($31,5 \times 10^5$ UFC/100 ml), SF (52×10^5 UFC/100ml), ASR ($16,66 \times 10^4$ spores/20 ml), *Staphylococcus aureus* ($7,25 \times 10^4$ UFC/100ml), *Pseudomonas aeruginosa* ($6,75 \times 10^4$ UFC/100ml).

Pour les effluents de l'hôpital de Frantz Fanon, nous avons également noté la présence de CT ($6,38 \times 10^6$ UFC/100ml), de CF (3×10^6 UFC/100ml), de SF (300 UFC/ml), de ASR (153 spores/20 ml), de *Staphylococcus aureus* (325 UFC/ml), de *Pseudomonas aeruginosa* ($50,05 \times 10^6$ UFC/ml).

Pour certaines bactéries, la charge était importante pour l'hôpital (*Klebsiella pneumoniae*) et pour d'autres c'était dans les prélèvements de la STEP où il y avait une plus forte charge en *Escherichia coli*.

Pour les entérobactéries, il y avait une prédominance des deux souches *Escherichia coli* et *Klebsiella spp* avec un pourcentage de 26,66% et 20% respectivement. Les effluents hospitaliers étaient plus chargés en entérobactéries que ceux de la STEP.

Quant à la résistance aux antibiotiques, l'analyse de la littérature a montré qu'un nombre élevé des souches isolées s'est révélé résistante vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques : les Béta-lactamines (25%-100%) à l'exception d'Imipenème, les Aminosides (24%-100%), les Quinolones (12,5%-75%), les Glycopeptides (37,5%-100%), les Polypeptides basiques (22,22%-100%), les Phénicoles (11,12%-100%), les Cyclines (28,57%-100%) et autres

CONCLUSION

antibiotiques comme l'Acide fusidique (28,57%-100%), la Métronidazole (100%) et la Pristinamycine (11,12%-100%).

L'Imipènème reste l'antibiotique de choix le plus actif avec un taux de résistance de 25%. Ces niveaux de résistance sont associés à de nombreux mécanismes qui peuvent s'exprimer seuls ou de façon concomitante.

En perspectives, l'antibiorésistance est un phénomène qui ne cesse de s'agrandir. En effet, c'est de notre responsabilité et de notre devoir à tous de lutter contre ce fléau en diminuant la consommation d'antibiotiques afin de préserver la santé humaine et animale et même celle de l'environnement.



**Références
bibliographiques**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- ❖ **Abibsi N. 2011.** Réutilisation des eaux usées épurées par filtres plantes (phytoepuration) pour l'irrigation des espaces verts application á un quartier de la ville de Biskra. Thèse de magister, hydraulique urbaine et ouvrages hydrotechniques, université Mohamed Khider, Biskra, 114p.
- ❖ **Aboukacem, A., Chahlaoui, A., Soulaymani, A., Rhazi-Filali F. et Benali, D. 2007.** Etude comparative de la qualité bactériologique des eaux des oueds Boufekrane et Ouislane à la traversée de la ville de Meknès (Maroc). REMISE. vol(1). 10-22.
- ❖ **Acton, Q.A. 2013.** Pseudomonas aeruginosa New insights for the health care professional. 29p.
- ❖ **Adjroud, N et Nahal, M. 2014.** La recherche des bactéries antibiorésistantes dans les eaux de surfaces : cas de l'Oued Messida (Nord-Est Algérien). Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma. 87p.
- ❖ **Ajonina, C., Buzie, C., Rubiandini, R.H., Otterpohl, R. 2015.** Microbiol pathogens in Wastewater Treatment Plants (WWTP) in Hamburg. *Jornal of Toxicology and Environmental Health*, Part A : Current issues.
- ❖ **Allen, HK., Donato, J., Wang, HH. 2010.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Review, Microbiol*, 8 : 9-251.
- ❖ **Amazian, K., Rossello, J, Castella, A., Sekkat, S, Terzaki, Set Dhidah, L. 2010.** Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterranean Health*. 1070-1078.
- ❖ **Ameziane, NE et Benaabidate, A. 2014.** Caractérisation microbiologique des effluents de l'hôpital Mohamed V de Meknès et étude de leur impact sur l'environnement. *Revue Nature et technologie*. 31-38.
- ❖ **Arquembourg, J. 2015.** Antimicrobial Resistance in France, from Risk to Fear. The unachieved Process of Constitution of a Public Problem. *Question de communication*. 29-47.
- ❖ **Attab, S. 2011.** Amélioration de la qualité microbiologique des eaux épurées par boues activées de la station d'épuration Haoud Berkaoui par l'utilisation d'un filtre à sable local. Mémoire de Magister. Univesité d'Ouargla. 91p.
- ❖ **Azizi, D. 2009.** Cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux. Institut pasteur d'Algérie, Algérie. 100p.



- ❖ **Baro, F. 2007.** Mémoire de Maitre des sciences : Phylogénie et transferts horizontaux de gènes chez les bactéries, Université de Montréal, 97p.
- ❖ **Baumont, S., Camard, J.P et Le franc, A. 2009.** Thèse : Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France, École nationale supérieure agronomique de Toulouse (ENSAT). 222p.
- ❖ **Bekkari, H., Touijer, J., Berrada, S., Ettaybi, M., Benchemsi, S., Maniar, S., El Ouali Lalami, A. 2016.** Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés (Surveillance of bacteriological quality and resistance to disinfectants and antibiotics in a provincial hospital in Morocco). J. Mater. Environ. Sci : 2508p.
- ❖ **Belaid, N. 2010.** Evaluation des impacts de l'irrigation par les eaux usées traitées sur les plantes et les sols du périmètre irrigué d'El Hajeb-Sfax : salinisation, accumulation et phytoabsorption des éléments métalliques, thèse de doctorat, Université de Limoges, 236 p.
- ❖ **Bonnefoy, C., Guillet, F., Leyar, G., Vernes-Bourdais, E. 2002.** Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires .Collection: Biosciences et Technologiques : série : Science des aliments ; Chapitre IV : Population contaminants altérant la qualité sanitaire et marchande. CRDP d'Aquitaine. 105p.
- ❖ **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N. 2017.** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries, Lavoisier, 11p.
- ❖ **Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T and Garrity, G.M. 2005.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, vol. Two (The Proteobacteria), part B (The *Gammaproteobacteria*), Springer-Verlag, New York. 922p.
- ❖ **Briand, Y.M. 2012.** Une histoire de la résistance aux antibiotiques. A propos de six bactéries. Ed le Harmattan. 360p.
- ❖ **Brun-Buisso, C. 2016.** Revue: santé publique France ; consommation d'antibiotique et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. 2p.



- ❖ **Calhau, V., Mendes, C., Pena, A., Mendonça, N., et Da Silva, G. J. 2015.** Virulence and plasmidic resistance determinants of *Escherichia coli* isolated from municipal and hospital wastewater treatment plants. *Journal of Water and Health*, 13(2) : 311–318.
- ❖ **Carip, C. 2008.** Microbiologie d'Hygiène, Bases microbiologiques de la diététique. Éditions TEC et DOC.- 251p.
- ❖ **Carraro, E., Bonetta, S., Bertino, C., Lorenzi, E., Bonetta, S., et Gilli, G. 2016.** Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *Journal of Environmental Management*, 168: 185–199.
- ❖ **CA-SFM, comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 1997.** Valeurs critiques pour l'antibiogramme. 133p.
- ❖ **CA-SFM, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Report 2003.** CA-SFM/ International Journal of Antimicrobial Agents. 364p.
- ❖ **CA-SFM, comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. 2020.** Recommandation. 133p.
- ❖ **Chevalier, P., INSPQ., DSP., et MDDELCC .2017.** Revue Coliformes totaux. Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. Institut national de santé publique du Québec.
- ❖ **Coulibaly, K., Zirihi, G., Guessennnd-Kouadio, N., Oussou, K., Dosso, M. 2014.** Antibacterial properties studies of trunk barks of terminalia ivorensis (Combretaceae), a commercial and medicinal specie, on some methicillin-resistant Staphylococci spp strains. *African health sciences*. 14(3) :753-756. .
- ❖ **Ceaerq. 2012.** Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* méthode par filtration sur membrane. Québec. 19p.



- ❖ **Diduch, M., Polkowska, Z., Namie, S.J. 2016.** Food Control. 61:188-195.
- ❖ **Delarras, C. 2003.** Microbiologie de l'environnement avec législation. Travaux pratiques commentés. Gaetan morin éditeur. 230p.
- ❖ **Delarras, C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. Paris. 296p.
- ❖ **DELARRAS, C. 2008.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. Tec & doc/Lavoisier, France. 476p.
- ❖ **Delarras, C., Trébaol, B., Durand, J. 2010.** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux. 87,98.
- ❖ **Delarras, C. 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactérie et levures moisissures ». Ed : Lavoisier. P 651.
- ❖ **Delcenserie, V., Cina, B., Gavini, F., Beerens, H., Daube, G. 2002.** Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre Bifidobacterium. 280p.
- ❖ **Deng, D., Aryal, N., Ofori-Boadu, A., and Jha, M. K. 2018.** Textiles Wastewater Treatment. Water Environment Research. 90(10): 1648–1662.
- ❖ **Denis, F. (2007).** Bactériologie médicale techniques usuelles. Masson. 384p.
- ❖ **Diouara, M. 2006.** Thèse de Doctorat : Sensibilité Des Bactéries Pathogènes Aux Antibiotiques Dans Le District De Bamako En 2006, Université De Bamako. 299p.
- ❖ **Doyle, M.P., Beuchat, L.R. 2007.** Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition, 1038p.
- ❖ **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H and Stackebrandt, E. 2006.** The Prokaryotes, third edition, vol6, (Proteobacteria: Gamma Subclass), Springer-Verlag, New York. 300p



- ❖ **Ebongue, C.O., Tsiazok, M. D., Nda, J. P., Ngaba, G. P., Beyiha, G., & Adiogo, D. 2015.** Evolution de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à l'Hôpital Général de Douala de 2005 à 2012. *Pan African Medical Journal*. 20p.
- ❖ **Edberg, S., Rice, W., Karlin, R et Allen, M. 2000.** *Escherichia coli* : the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*. 88 : 116.

- ❖ **El Bouamri, M.C., Arsalane, L., Kamouni, Y., Berraha, M et Zouhair, S. 2014.** Evolution récente du profil épidémiologique des Entérobactéries Uropathogènes productrices de β -lactamase à spectre élargie à Marrakech, Maroc. 7(24) : 451-455.



- ❖ **Fatou, D. 2002.** Données sur la sensibilité aux antibiotiques des souches de streptocoques déficients isolées d'infections respiratoires, ostéo-articulaires et cardiovasculaires. Thèse pour obtenir grade de Docteur en Pharmacie. Université Cheikh ANTA DIOP. 385p.
- ❖ **Freney, J., Reanaud, F., Hansen, W., Bollet, C. 2000.** Précis de bactériologie clinique. Ed ESKA. 597p.



- ❖ **Gatica, J. 2013.** Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. Environmental science and pollution research. 3529-3538p.
- ❖ **Ghettas, N., 2009.** Epuration des Eaux Usées : Cas de la Ville de Touggourt Mémoire d'ingénieur D'état En Biologie Université Kasdi Merbah –Ouargla. 98p.
- ❖ **Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. 2011.** Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. Review: Medicina. 47:137–46.
- ❖ **Gillespie, S.H., Hawkey, P.M. 2006.** Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2ème édition. John Wiley & Sons. England. 620 p.
- ❖ **Gravet, A., Camdessouens-Miché, G., Gessier, M., Peluso, A.-R., Vogelsperger-Fuchs, B., Lohmann, C., Delarbre, J.M. 2011.** Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie. Pathologie Biologie. 59(1) : 19–25.



I

- ❖ **Igbinosa, R.M., Emmanuel, E., Etinosa, O., Igere, B., Igeleke, CL. and Okoh, A. I. 2012.** Prevalence of Multiple Antibiotics Resistant (MAR) Pseudomonas Species in the Final Effluents of Three Municipal Wastewater Treatment Facilities in South Africa. Journal List Int. J. Environ. Res. Public Health. 9 (6) :339-366.
- ❖ **Idrissi, Y.A., Alemad, A., Aboubaker, S., Daifi, H., Elkharrim, K et Belghyti, D. 2015.** Caractérisation physico-chimique des eaux usées de la ville d'Azilal-Maroc-. International Journal of Innovation and Applied Studies. 559p.



J

- ❖ **Jehl, F., Chabaud, A., et Grillon, A. 2015.** L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? Journal Des Anti-Infectieux. 17(4) : 125–139.
- ❖ **Julian, D et Dorothy, D. 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Review. 74 : 417–33.



K

- ❖ **Khadraoui, A., Taleb, S. (2008).** Qualité des eaux de sud Algérien. Pollution et impact sur le milieu. Ed Khyam. 367p.



L

- ❖ **Labres, E et Mouffok, F. 2008.** Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. 53p.
- ❖ **Lebres, E. Azizi, D. Hamza, A. Taleb, F. Taouchichet, B. 2002.** Manuel des travaux pratiques, unité des eaux de boissons et produits de la mer. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut pasteur d'Algérie, Algérie. 35p.
- ❖ **Laurain, C., Durand, P. Y., Albert, M., Weber, M., Kessler, M., Chanliou, J., & Dailoux, M. 2004.** Péritonites infectieuses chez les patients traités par dialyse

péritonéale : bilan microbiologique sur quatre ans. Pathologie Biologie. 52 :10. 575–578p.



- ❖ **Madani, K. 2003.** Dr. Hans Christian Joachim Gram: inventor of the Gramstain. Primary Care Update for OB/GYNS. Vol 10. n°5. 235-237p.
- ❖ **Mahdjar, M., 2016.** Etude des performances de la station d'épuration de la ville d'Ouargla, Université KASDI MERBAH, Mémoire de Master. 61p.
- ❖ **Mainardi, J.L. 2015.** Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques/Session interactive autour de l'antibiogramme, Faculté de médecine paris Descartes, hopital Georges Pompidou. 5p.
- ❖ **Makhoukh, M., Sbaa, M., Berraho et Vanclooster, M. 2011.** Contribution à l'étude physico-chimique des eaux superficielles de l'Oued Moulouya (Maroc oriental) Larhyss Journal n°09. Science Lib Edition Mersenne (4), N° 120605. 20p.
- ❖ **Metahri, M.S. 2012.** Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitée, par des procédés mixtes. Cas de STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. Thèse doctorat en Agronomie, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 350p.



- ❖ **Nambatingar, N.M. 2011.** Contribution à l'étude analytique des polluants (en particulier de type métaux lourds) dans les eaux du fleuve chari lors de sa traversée de la ville de n'djamena. Thèse de doctorat, L'université Claude Bernard Lyon1. Lyon. 410p.
- ❖ **Naveen, B.P., Durga Madhab Mahapatra, D., Sitharam, T.G., Sivapullaiah, P.V., Ramachandra, T.V. 2017.** Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. Environmental Pollution 229 : 1-12.



- ❖ **Oliveira, T.S., Al Aukidy, M., and Verlicchi, P. 2017.** Occurrence of Common Pollutants and Pharmaceuticals in Hospital Effluents. *Hospital Wastewaters*. 17–32p.
- ❖ **Oubrim, N., Cohen, N., Hajjami, K., Bennani, M., Ennaji, M.M. 2012.** Détection des Entérocoques Fécaux et Escherichia Coli Résistant AuR Antibiotiques Isolés à Partir des Eaux Brutes Epurées et Cultures. *European Journal of Scientific Research, Maroe*. 453-461p.



- ❖ **Papanov, S., Petkova, E., Georgieva, V., Ivanov, K., Ivanova, S., Mladenov, R. 2016.** Le Traitement Antibiotique Dans La Pédiatrie. *European Scientific Journal* November 2016 edition. Vol 12. N°33. 1857 – 7881p.
- ❖ **Panoff, J.M., Velot, C., Séralini, G.E. 2006.** Les transferts génétiques horizontaux. *BIOFUTUR* 269. 53p.
- ❖ **Petit, F. 2018.** L'antibiorésistance dans les milieux aquatiques : une problématique d'écologie microbienne et de santé publique. *Environ Risque Santé*. 17(S1) : 41-46p.
- ❖ **Pitkanen, T. 2010.** Studie on the detection methods of campylobacter and feacl indicator bacteria in drinking water. *National Institutue for Health and Welfare, Finland*. 118p.



- ❖ **Rahal Kilouni, R., Benslimani, A. 2011.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. *Rec de L'OMS*. 6^{ème} édition. Algérie. 192p.

- ❖ **Rahube, T.O and Yost, C.K. 2010.** Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. African Journal of Biotechnology. 9183-9190p.
- ❖ **Ramoul, A. 2014.** Thèse de Doctorat Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA. 157p.
- ❖ **Reiner, K. 2010.** Catalase Test Protocol, American society for microbiology. 2p.
- ❖ **Rheinheimer, G.1985.** Aquatic Microbiology. 3rd Edition. John Wiley & Sons. 257p.
- ❖ **Rodier, J. 1996.** L'analyse de l'eau (eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer) 8eme édition, DUNOD. 1079p.
- ❖ **Rodier, J. 2005.** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles .Résiduaires. Eau de mer. 8ème édition. Dunod technique. Paris. 1383p.
- ❖ **Rodier, J., Leguebe, B., Merlet, N., BTUNET, R. 2009.** L'analyse de l'eau. Eaux naturelles .Résiduaires. Eau de mer 9ème édition. Dunod. Paris. 1524p.



- ❖ **Salghi, R. 2010.** Différentes filières de traitement des eaux université Ibn Zohr Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir. 220p.
- ❖ **Springman, A.C., Lacher, D.W., Milton, G.W.N. 2009.** Selection, recombination, and virulence gene diversity among group Bstreptococcal genotypes. J Bacteriol 191p.



- ❖ **Tesfaye, H., Alemayehu, H., Desta, A.F., and Eguale, T. 2019.** Antimicrobial susceptibility profile of selected Enterobacteriaceae in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 8(1) : 11p.



- ❖ **Willey, J.M., Linda, M.S. 2008.** Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition. 853p.



- ❖ **Yousfi, K., Touati, A., Lefebvre, B., Garneau, P., Brahmi, S., Gharout, A., Harel, S.J., Bekal, S. 2019.** Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a bla_{OXA-48}-like in *Klebsiella oxytoca*, Algeria. 50: 175–183.

A dark green ribbon graphic with a central rectangular section and pointed ends on both sides. The word "Annexes" is written in white serif font across the central section.

Annexes

Annexe I

Matériel pour les analyses physicochimiques

- Thermomètre
- PH-mètre

Matériel pour les analyses microbiologiques

- **Appareillages et verreries**
 - Bain marie 80°C
 - Bec Bunsen.
 - Boîtes de Pétri.
 - Etuves.
 - Glacière.
 - Lame et lamelle
 - Pince stérile.
 - Pipettes Pasteur.
 - Portoir.
 - Réfrigérateur.
 - Tubes à essai.
- **Réactif, additifs et solution**
 - Additif Hektoen.
 - Additif SFB.
 - Alcool.
 - Alun de fer.
 - Disques d'ONPG.
 - Disques d'antibiotiques.
 - Eau distillée.
 - Eau de Javel.
 - Fushine.
 - Huile de vaseline.
 - Huile d'immersion.
 - Lugol.
 - Sulfite de sodium.
 - Réactif kovacs.
 - Réactif VP1 et VP2 (Vosges-Proskauer).
 - Rouge de méthyle.
 - TDA (Tryptophane desaminase).
 - Violet de Gentiane.

- **Milieux de cultures**

Bouillon lactosé au bromocrésol pourpre (BCPL, milieu double et simple concentration)

Peptone	5g
Extrait de viande.....	3g
Lactose.....	10g
Pourpre de bromocrésol.....	0,3g
Bacto agar difco.....	15g
Eau distillée	1000ml

PH final= 6,9 ±0,2

Bouillon de Schubert en g/l d'eau distillée

Tryptophane.....	0,2g
Acide glutamique	0,2g
Sulfate de magnésium	0,7g
Citrate de sodium.....	0,5g
Sulfate d'ammonium	0,4g
Chlorure de sodium	2g
Peptone	10g
Mannitol	7,5g
Phosphate disodique	4g
Phosphate monopotassique.....	0,6g
Eau distillée	500ml

PH final= 7,4 ±0,2

Milieu Rothe (milieu simple et double concentration) en g/l

	S/C	D/C
Hydrolysate trypsique de caséine	12,6g	25,2g
Peptone bactériologique	8g	16g
Glucose.....	5g	10g
Chlorure de sodium	5g	10g

Phosphate dipotassique.....	2,7g.....	5,4g
Phosphate monopotassique.....	2,7g.....	5,4g
Azide de sodium.....	0,2g.....	0,4g

PH final= 6,8 ±0,2

Milieu Litsky (EVA BROTH) en g/l d'eau distillée

Peptone	20g
Glucose.....	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate dipotassique.....	2,7g
Phosphate monopotassique.....	2,7g
Azothydrate de sodium.....	3g
Ethyl violet	5ml
Eau distillée	1000ml

PH final= 6,8 ±0,2

Bouillon sélénire de sodium cystéine (SFB)

Lactose.....	4g
Tryptophane.....	5g
Phosphate disodique	10g
Sélénite de Sodium.....	0,01g
L-Cystine	0,01g
Eau distillée	1000ml

PH final= 7,2 ±0,2

Gélose Hektoen

Peptone	12g
Extrait de viande.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Salicine	2g
Citrate de fer et d'ammonium	2g

Sels biliaire	9g
Fuchsine acide	0,1g
Bleu de Bromothymole	0,065g
Agar	13g

PH = 7,6 ±0,2

Gélose viande foie (VF)

Base Viande foie	30g
Glucose.....	2g
Agar.....	6g
Eau distillée	1000ml

PH= 7,6

Gélose Chapman

Extrait de viande.....	1g
Peptone	10g
Chlorure de Sodium	5g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	25g
Gélose	15g
Eau distillée	1000ml

PH= 7,4

Gélose King A

Peptone bactériologique « A »	20g
Glycérol.....	10ml
K ₂ SO ₄	10g
MgCl ₂	1,4g
Agar purifié	1,2g

PH=7,2 ±0,2 à 25°C

Gélose King B

Peptone bactériologique « B ».....	20g
------------------------------------	-----

Glycérol	10ml
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	1,5g
Sulfate de Magnésium hydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O).....	1,5g
Arag purifié	12g

PH= 7,2 ±0,2 à 25°C

Gélose au Cétrimide

Peptone de gélatine.....	16g
Peptone de caséine.....	10g
Bromure de Tetradonium (Cétrimide).....	0,2g
Acide nalidixique	0,015g
Sulfate de Potassium	10g
Chlorure de Magnésium.....	0,4g
Agar	10g

PH= 7,1

Gélose TSI (Tree Sugar Iron)

Extrait viande bœuf	3g
Extrait de levure	3g
Peptone tryptique	20g
Chlorure de Sodium.....	5g
Citrate ferrique	0,3g
Thiosulfate de Sodium.....	0,3g
Lactose.....	10g
Glucose.....	1g
Saccharose	10g
Rouge de phénol	0,05g
Agar	12g

PH= 7,4

Milieu Citrate de Simmons

Citrate de Sodium.....	2g
------------------------	----

Chlorure de Sodium.....	5g
Sulfate de magnésium	0,2g
Phosphate monoammoniaque.....	1g
Phosphate bipotassique.....	0,01g
Bleu de bromothymol.....	0,08g
Agar.....	15g

PH= 7.0- 7,2

Milieu Urée Indole

L-tryptophane	3g
Phosphate Monopotassique	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Chlorure de Sodium.....	5g
Urée	20g
Alcool à 95	10g
Rouge de phénol.....	0,025g

PH=7

Tableau XI. Différents caractères du genre *Streptococcus*

Caractères principaux-identification biochimique	
Morphologie	Cocci ovalaire ou sphérique, de 0.6 à 1µm en moyenne, isolés en diplocoques ou chaînes
Coloration de Gram	Gram ⁺
Capsule	Chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Diplocoques encapsulés)
Mobilité	Immobilés en général
Type respiratoire	Aéro-Anérobies facultatifs
Catalase	Négative
Conditions de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Température générale : 20 à 42 C° • Température optimale : 35 à 34 C° <ul style="list-style-type: none"> • pH optimal : 7.2 à 7.4
Identification biochimique	<ul style="list-style-type: none"> • API 20® strep bioMérieux ®

Tableau XII. Différentes caractéristiques du genre *Staphylococcus*

		<i>S.épidermidis</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.saprophyticus</i>	autres
Coagulase		-	-	-	-
Fermentation	Glucose	+	+	+	+
	Mannitol	-	V	+	V
	Xylitol	-	-	+	-
Phosphatase		+	-	-	V
Dnase		+	-	-	V

(Denis et al., 2007)

V : variable

+ : 90% ou plus de souches positives.

- : 90% ou plus de souches négatives.

Tableau XIII. Caractères biochimique de différentes espèces de *Pseudomonas*

Espèce		<i>P.aeruginose</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.monteillii</i>
Caractères					
Pigment		PC+PV	PV	PV	PV
Nombre flagelles		1	>1	>1	>1
Oxydase		+	+	+	+
Croissance	À 47 C°	+	-	-	-
	À 4 C°	+	+	+	-
Réduction NO₃⁻		+	-	-	-
ADH		+	+	+	+
Hydrolyse	Gélatine	+	-	-	-
	Lécithinase	V	-	-	-
	Urée	V	-	-	V
Citrate Simmons		+	+	+	+
Acidification	Glucose	+	+	+	+
	Tréhalose	-	+	-	-
	Mannitol	+	+	-	-
	Xylose	+	+	+	-
	Maltose	-	-	V	-

(Denis et al., 2007)

V : variable

+ : 90% ou plus de souches positives.

- : 90% ou plus de souches négatives.

Annexe II

Tableau XIV. Table de Mac-Grady

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

Tableau XV. Table NPP

1 × 50 ml	5 × 10 ml	5 × 1 ml	Nombre caractéristique
0	0	0	≤1
0	0	1	1
0	0	2	2
0	1	0	1
0	1	1	2
0	1	2	3
0	2	0	2
0	2	1	3
0	2	2	4
0	3	0	3
0	3	1	5
0	4	0	5
1	0	0	1
1	0	1	3
1	0	2	4
1	0	3	6
1	1	0	3
1	1	1	5
1	1	2	7
1	1	3	9

1	2	0	5
1	2	1	7
1	2	2	10
1	2	3	12
1	3	8	8
1	3	1	11
1	3	2	14
1	3	3	18
1	3	4	21
1	4	0	13
1	4	1	17
1	4	2	22
1	4	3	28
1	4	4	35
1	4	5	43
1	5	0	24
1	5	1	35
1	5	2	54
1	5	3	92
1	5	4	160
1	5	5	≥ 240

Coloration de Gram

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

-Préparation d'un frottis bactérien : prélever la colonie bactérienne à identifier, et l'étaler sur une goutte d'eau physiologique déposée sur une lame propre puis la fixer par simple passage sur la flamme du bec bunsen ;

-Coloration par le violet : chaque frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite lavé rapidement par l'eau courante;

-Mordantage : traiter durant une minute par la solution de Lugol et laver à l'eau ;

-Décoloration : en traitant avec l'alcool, couler le solvant sur frottis pendant une à trois secondes puis laver immédiatement à l'eau courante.

A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores, les cellules Gram positives restent violettes ;

-Recoloration : soumettre le frottis durant trente secondes à une courte coloration par la Fuchsine pour recolorer les cellules Gram négatives présentes, puis rincer et sécher entre deux feuilles de papier buvard propre ;

-Examiner le frottis, à immersion à l'objectif $\times 100$.

Lecture : Les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet alors que les bactéries Gram négatif sont bien colorées en rose (**Madani, 2003**).

.

Tableau XVI. Lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

Tests	Réactions/Enzymes	Résultats négatifs	Résultats positif
ONPG	Galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Blue-vert/blue
H ₂ S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noire/fin liseré
URE	Urease	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
		Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production incolore	JAMES/immédiat	
		Vert-pâle/jaune	Rose
VP	Acetion production	VP1 + VP2 / 10 min	
		Incolore	Rose/rouge
GEL	Gelatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noire
GLU	Glucose fermentation/oxydation	Blue/blue-vert	Jaune/jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxydation	Blue	Blue-vert/jaune
INO	Inositol fermentation/oxydation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxydation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxydation		
SAC	Sarcose fermentation/oxydation		

MEL	Melibiose fermentation/oxydation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxydation		
ARA	Arabinose fermentation/oxydation		

Tableau XVII. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotique testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Imipenème	10µg	≤13	14-15	≥16
Gentamycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Tobramycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Colistine	10µg	≤10	-----	≥11

Tableau XVIII. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus spp.*

Antibiotique testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Oxacilline (S. aureus)	10µg	≤10	11-12	≥13
Gentamycine	10µg	≤12	13-14	≥15
Kanamycine	10µg	≤13	14-14	≥18
Erythromycine	30µg	≤13	14-22	≥23
Clindamycine	15µg	≤14	15-20	≥21
Vancomycine	30µg	-----	-----	-----
Ofloxacine	5µg	≤14	15-17	≥18
Tétracycline	30µg	≤14	15-18	≥19
Chloramphénicol	30µg	≤12	13-17	≥18
Pristinamycine	15µg	≤19	19-21	≥22
Acide fusidique	10µg	≤24	-----	≥24

Tableau XIX. Valeurs critiques des diamètres d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (**Rahal et al., 2008**)

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	R	S	
Ampicilline	10µg	≤4	>8	≥19	<16	Interprétation valable pour bacampicilline, pivampicilline Cf. règles (1) et (2) Cf. règles (1) et (2)
Amoxicilline	25µg	≤4	>8	≥21	<16	
Ampicilline/sulbactam	10/10µg	≤4/8	>8/8	≥19	<16	Cf. règle (1b)
Amoxicilline/ac.clavulamique	20/10µg	≤4/2	>8/2	≥21	<16	Cf. règle (1b) et (5)
Ticarcilline	75µg	≤8	16	≥21	<22	Interprétation valable pour un traitement intraveineux Cf. règles (1), (2) et (3)
ticarcilline/av. clavulanique	75/10µg	≤8/2	>16/2	≥24	<22	
Pipéracilline	75µg	≤8	>16	≥20	<16	Interprétation valable pour un traitement intraveineux Cf. règles (1), (2) et (3)
Pipéracilline/tazobactam	75/10µg	≤8/4	>16/4	≥21	<17	
Mécillinam	10µg	≤8	>8	≥24	<22	Interprétation uniquement pour les souches isolées des urines. Déterminer la CMI en cas de résistance par diffusion à l'értapénéme avec
Imipénéme	10µg	≤2	>8	≥24	<17	
Méropénéme	10µg	≤2	>8	≥22	<15	
Ertapénéme	10µg	≤0.5	>1	≥28	<26	
Doripénéme	10µg	≤1	>4	≥24	<19	
Aztréonam	30µg	≤1	>8	≥27	<21	

Céfalotine	30µg	≤8	>32	≥18	<12	<p>sensibilité à l'imipénème.</p> <p>Cf.règles (4) et (5).</p> <p>Interprétation valable pour les céphalopaires injectables de 1ère génération (céfapirine , céfacoline).</p>
Céfuroxime	30µg	≤8	>8	≥22	<22	Interprétation également valable pour les céphèmes orale de
Céfamanadole	30µg	≤8	>32	≥22	<15	1ère génération (céfadroxil,
Céfoxitine	30µg	≤8	>32	≥22	<15	céfalexine,céfaradine,cé
Céfotétan	30µg	≤4	>32	≥23	<17	factol
Lalamoxef	30µg	≤4	>32	≥23	<17	loracbef) mais uniquement pour les souches isolées des urines.
						Non commercialisé en France

Céfotaxome	30µg	≤1	>2	≥26	<23	Pour les 6 céphalosporines de ce groupe Cf. règles (4) et (5). Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines.
Céftriaxone	30µg	≤1	>2	≥26	<23	
Céftazidime	30µg	≤1	>8	≥26	<19	
Céfépime	30µg	≤1	>8	≥24	<17	
Céfpinorre	30µg	≤1	>8	≥24	<17	
Céfixine	10µg	≤1	>2	≥25	<21	
Kanamycine	30µg	≤8	>16	≥17	<15	Interprétation valable pour néomycine, framyoétine, paromomycine.
Tobramycine	10µg	≤2	>4	≥18	<16	Cf. règles (6),(9) et (11). Cf. règles (6),(7) Cf. règles (6),(7) Cf. règles (6),(8) et (11). Cf. règles (6),(10) et (11)
Amikacine	30µg	≤8	>16	≥17	<15	
Isépamicine	30µg	≤8	>16	≥17	<15	
Gentamicine	15µg(10UI)	≤2	>4	≥18	<16	
Nétilmicine	30µg	≤2	>4	≥21	<19	