

## Université Constantine 1



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

### Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale  
Option : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

# Étude sur les Bactériophages et leur isolement à partir des eaux usées de la station d'épuration de Chelghoum El-Aid

Présenté par:  
Benbouaziz Asma et Satour Asma

Soutenu le 01 juillet 2014

#### Jury de soutenance:

Président : Sekhri-Arafat N.	Maitre de Conférences	Université de Constantine 1
Encadreur: Boubekri K.	Maitre de Conférences	Université de Constantine 1
Examinatrice: Bouzeraib L.	Maitre Assistante	Université de Constantine 1

Année Universitaire

2013-2014

# Remerciements

*En premier lieu, nous tenons à manifester notre louange à Dieu par aisance et excellence de nous avoir donné la volonté et la santé pour pouvoir achever ce travail, veuille-t-Il nous guider toujours dans le droit chemin.*

*Nous tenons à remercier vivement Dr Boubekri Karima d'avoir dirigé ce travail et surtout pour sa collaboration et ses conseils précieux.*

*Nous n'omettrons jamais d'exprimer toutes nos gratitudes à tout le staff de la station d'épuration de Chelghoum EL aid de la wilaya de Mila, qui n'ont épargné aucun effort pour que nos travaux se termine dans les bonnes conditions.*

*Nos plus sincères remerciements*

*Aux enseignants de la filière du la microbiologie générale ainsi que  
tout le  
personnel du département et de la faculté des sciences et de la nature  
de  
l'université de Mentouri Constantine 1 et*

*A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie et biologie  
moléculaire en particulier Mme Nabila et Mme Samia*

*Nous terminons ces remerciements en saluant vivement les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce travail. Que tous ceux qui nous ont aidés trouvent ici l'expression de notre Gratitude*

# dedicace

*Avant tous, je dédie ce travail à l'ame de ma tante Zakia Que Dieu, dans sa grande miséricorde la garde et lui alloue une place de choix dans son royaume céleste*

*D'un cœur plein d'amour et de fierté, je dédie ce modeste travail à mes deux bougies qui brûlent pour m'éclairer le chemin, à la personne qui m'est la plus chère au monde : ma mère qui m'a élevé, éduqué et sacrifié toutes les belles années de sa vie pour moi, et à mon père qui n'a jamais cessé de combattre pour me voir réussir un jour, que dieu les protège pour nous.*

*A mon cher frère: Mohamed charaf eddine*

*A mes sœurs : Oumaima, Zaineb, Anfel et Bouchra*

*A toute la famille BENBOUAZIZ & BENCHELLI*

*A mes tantes : Fahima et Sabrina*

*A ma chère Asma*

*A mes amies : Anfel, Djihed, Mouna et en particulier ma binôme Asma*

*A Toute ma promotion 2ème année master (2013/2014) et à tous mes enseignants.*

*A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**BENBOUAZIZ ASMA**

# *DEDICACE*

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense Joie, que je dédie mon travail a mes très chers parents qui m'ont soutenus et encouragés toute au long de ma vie.*

*À mes très chères sœurs Khadīdja, Manel*

*Et mes frères Oussama et Wassim.*

*A mes grands-parents et à toute*

*Ma Famille, chacun avec son nom.*

*À mes amis surtout mes très chers : Asma, Ghalia, Housseem.*

*Merci mes parents, je souhaite que vous soyez fiers de moi.*

*Satour Asma*

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue Bibliographique</b> .....	3
<b>Description des bactériophages et de la phagothérapie</b> .....	3
<b>1. Présentation</b> .....	3
<b>2. Structure et classification</b> .....	3
<b>3. Plusieurs types d'invasion de la cellule bactérienne</b> .....	3
<b>3-1. Principe du cycle chronique (phages filamenteux)</b> .....	5
<b>3-2. Principe du cycle lysogénique (phages tempérés)</b> .....	5
<b>3-3. Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents)</b> .....	5
<b>4. Les techniques de détection et de quantification des virus de procaryotes</b> .....	6
<b>4-1. La technique des plages de lyse</b> .....	6
<b>4-2. La microscopie électronique en transmission (MET)</b> .....	6
<b>4-3. La microscopie à épifluorescence (ME)</b> .....	8
<b>4-4. La cytométrie en flux</b> .....	9
<b>4-5. Les techniques d'amplification de gène</b> .....	9
<b>5. La phagothérapie</b> .....	10
<b>5-1. La thérapie phagique</b> .....	10
<b>5-2. Protocoles de phagothérapie</b> .....	11
<b>6. Les bactériophages pour une décontamination sélective</b> .....	11
<b>7. Avantages</b> .....	11
<b>8. Limites</b> .....	12
<b>Matériels et méthodes</b> .....	14
<b>1. Présentation de la Station d'épuration de Chelghoume El-Laid</b> .....	14
<b>2. prélèvement des échantillons</b> .....	14
<b>3. La flore totale aérobie mésophile</b> .....	15
<b>4. La technique de plage de lyse</b> .....	15
<b>5. Identification phénotypique des isolats</b> .....	16
5-1. Examen microscopique : Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des isolats en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram. ....	16
5-2. Test Biochimiques:.....	17
<b>Résultats et discussion</b> .....	19
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	36

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

***ADH: Arginine-deshydrase***

**DAPI: 4', 6'-diamino-2-phenylindole**

**ICTV: International Committee on Taxonomy of Virus**

**IPC: Institut Paoli-Calmettes**

***LDC: Lysine-décarboxylase***

**MET: La microscopie électronique en transmission**

**ME: La microscopie à épifluorescence**

**ODC: Ornithine-décarboxylase**

**OMS: Organisation Mondiale de Santé**

**PCR: Polymerase Chain Reaction**

**RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction**

**UFC: Unité Formant Colonie**

**UFP: Unité Formant Plage de Lyse**

**ENT: Eau Non Traitée**

**ET: Eau Traitée**

**BM: Boue Mixte**

## *Liste des figures*

<b>Figure 1: Morphologie des différentes familles de virus des procaryotes (d'après Ackurmann, 2001 et modifié).....</b>	<b>04</b>
<b>Figure 2:Schéma du protocole utilisé dans la technique des plages de lyse.....</b>	<b>07</b>
<b>Figure 3: Photographies de bactériophages après coloration négative et observés en MET prises dans les années 1940 .....</b>	<b>07</b>
<b>Figure 4:Photographie en épifluorescence de procaryotes (gros points) et de leurs virus (petits points) marqués au SYBR Green I .....</b>	<b>08</b>
<b>Figure 5: Système de filtration de 1L (Wheaton, USA).....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 6:Test de catalase de la souche 18 BM .....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 7:Test de l'oxydase de la souche 18 BM.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 8: Identification de la souche 18 BM sur milieu Gélose au Sang.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 9: Identification de la souche 18 BM sur milieu Mannitol Mobilité.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 10: Identification de la souche 18 BM sur le milieu Mac Conkey.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 11: Identification de la souche 18 BM sur milieu Hektoen.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 12: Test de catalase de la souche 19 ENT.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 13: Test d'oxydase de la souche 19 ENT.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 14: Identification de la souche 19 ENT sur le milieu Gélose au Sang.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 15: Identification de la souche 19 ENT sur milieu Mannitol Mobilité.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 16: Identification de la souche 19 ENT sur milieu Mac Conkey.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 17:Identification de la souche 19 ENT sur milieu Hektoen.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 18: Test de catalase de la souche 20 ENT.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 19: Test d'oxydase de la souche 20 ENT.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 20:Identification de la souche 20 ENT sur milieu Gélose au Sang.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 21: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Mannitol Mobilité.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 22: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Mac Conkey.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 23: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Hektoen.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 24: Test de catalase de la souche 21 ENT.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 25: Test d'oxydase de la souche 21 ENT.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 26: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Gélose au Sang.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 27: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Mannitol Mobilité.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 28: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Mac Conkey.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 29: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Hektoen.....</b>	<b>25</b>

Figure 30: Test de catalase de la souche 22 ENT.....	26
Figure 31: Test d'oxydase de la souche 22 ENT.....	26
Figure 32: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Gélose au Sang.....	26
Figure 33: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Mannitol Mobilité.....	26
Figure 34: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Mac conkey.....	26
Figure 35: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Hektoen.....	26
Figure 36: Coloration de Gram de la souche BM18 .....	29
Figure 37: Coloration de Gram de la souche 19 ENT.....	30
Figure 38: Résultat de l'identification de la souche 18 BM par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	30
Figure 39: Résultat de l'identification de la souche 19 ENT par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	30
Figure 40: Coloration de Gram de la souche 21 ENT.....	31
Figure 41: Résultat de l'identification de la souche 21 ENT par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	31
Figure 42: Coloration de Gram de la souche 20 ENT.....	32
Figure 43: Coloration de Gram de la souche 22 ENT.....	32
Figure 44: Résultat de l'identification de l'isolat 20 ENT par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	33
Figure 45: Résultat de l'identification de l'isolat 22 ENT par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	33
Figure 46: Coloration de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
Figure 47: Résultat de l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	34
Figure 48: Coloration de Gram d' <i>Escherichia coli</i> .....	34
Figure 49: Résultat de l'identification d' <i>Escherichia coli</i> par la Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	35

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1: Identification phénotypique et biochimique de la Galerie API20E.....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau 2: Résultat de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile.....</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 3: Résultats de la technique de plagedelyse testée sur 22 isolats (non identifiés) .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 4: Résultats d'identification des bactéries.....</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 5: Résultats d'identification morphologique de <i>Bacillus anthracis</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau 6: résultats d'identification morphologique de <i>Hafnia alevi</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>Tableau 7: Résultats d'identification morphologique de <i>Citrobacter freundii</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>Tableau 8: Résultats d'identification morphologique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>33</b>

# *Introduction*

## Introduction

Les virus ont été connus comme des entités biologiques distinctes pour un peu plus d'un siècle. Les êtres humains n'ont pas seulement été soumis à des maladies virales dans une grande partie de leur histoire, mais ont également manipulé ces agents en fonction de leurs propres besoins (Flint *et al.*, 2000). Pendant les premières décennies du XXe siècle, la découverte d'un microscope électronique a révélé beaucoup d'informations sur les virus. La caractéristique fondamentale des virus est leur dépendance absolue sur les organismes d'accueil spécifiques pour la reproduction, par conséquent, ils sont à juste titre connus comme des parasites intracellulaires obligatoires. En 1917, les bactériophages ont été reconnus comme des infections de bactéries ont été presque immédiatement déployées pour le traitement et la prophylaxie antibactérienne. Au cours des dernières décennies, l'utilisation sans discernement des antibiotiques a conduit à la résistance entre les différentes souches bactériennes. Il s'agit d'une situation potentiellement dangereuse qui menace de se manifester dans les temps modernes.

Les phages sont ainsi préférés car, contrairement aux antibiotiques à large spectre, les phages sont très spécifiques et une résistance illicite de souches bactériennes non ciblées (Sulakvelidze *et al.*, 2005). L'utilisation des bactériophages pour le traitement de maladies qui peuvent menacer la vie est appelée Phagothérapie. Une étude antérieure sur les phages a suggéré que les phages ont guéri 90% des infections bactériennes purulentes chroniques (empyème, péritonite, ostéomyélite) chez l'homme causées par des pathogènes bactériennes résistantes aux antibiotiques tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* (Carlton, 1999).

Les bactériophages sont largement répandus dans l'environnement et peuvent être isolés de sol, l'eau de mer, l'eau douce et des écosystèmes d'eaux usées (Jensen *et al.*, 1998).

Actuellement le contrôle microbiologique du milieu hydrique repose uniquement sur la recherche d'indicateur bactérienne de contamination fécale tel que les coliformes totaux et les coliformes fécaux, ces indicateur bactérien sont mauvais indicateurs de la contamination virale, il est donc nécessaire de définir un ou plusieurs indicateur qui permet en compte de mettre le risque virale lié au milieu hydrique, dans ce contexte, certain bactériophage ont été proposés pour jouer ce rôle (Skraber, 2003)

Au niveau de notre département aucune recherche n'a été réalisée sur les bactériophages ce qui mérite d'avoir plus d'attention vu leur importance comme agent antibactérien.

Cette étude a pour but d'initier la recherche sur les bactériophages à partir des eaux usées de la station d'épuration de Chelghoum EL-aid, en utilisant la méthode la plus simple, la méthode de plaque de lyse. Dans ce contexte, la qualité bactériologique « dénombrement et identification phénotypiques de quelques isolats » de trois échantillons ; l'affluent, l'effluent et boue seront analysés.

*Revue*  
*Bibliographique*

# Revue Bibliographique

## Description des bactériophages et de la phagothérapie

### 1. Présentation

Les bactériophages sont des virus spécifiques des cellules procaryotes que sont les bactéries. Ils sont généralement très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement quelques individus au sein de cette espèce. Par contre, plusieurs bactériophages différents peuvent être spécifiques d'une même bactérie (Dublanche *et al.*, 2011).

### 2. Structure et classification

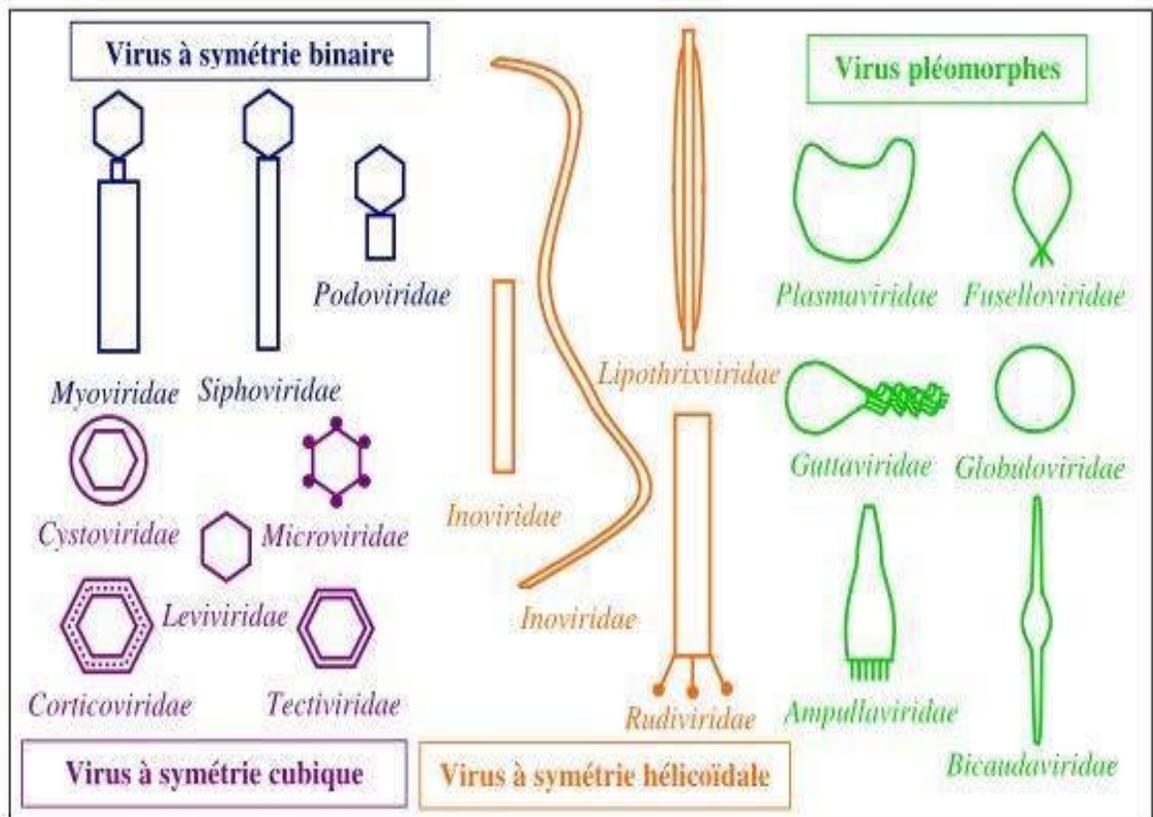
D'après Dublanche (2009) la structure sur laquelle est basée la classification des bactériophages est extrêmement variée. Les critères de classification (fig.1) sont :

- la nature de l'acide nucléique : généralement ADN double brin, parfois ARN simple Brin (Inal, 2003)
- la forme de la capsid (icosaédrique ou tubulaire).
- la présence ou non d'une enveloppe (nommée péplos).

La classification de l'ensemble des virus (phages ou non) est gérée par un comité appelé « International Committee on Taxonomy of Virus », ou ICTV. C'est à lui que revient l'établissement de la nomenclature et de la taxonomie des virus (ICTV, 2012). D'après la banque de données de l'ICTV, 95 % des bactériophages appartiennent à l'ordre des *caudovirales*. Les virus de l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure dite « à symétrie Binaire » ou « caudée », c'est-à-dire se composant d'une tête et d'une queue identifiables, et sont partagés en trois familles : les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. Les 5 % des phages n'appartenant pas à l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure à symétrie non binaire qui peut être soit cubique, soit hélicoïdale, soit complexe

### 3. Plusieurs types d'invasion de la cellule bactérienne

On discerne trois types de bactériophages : les phages dits « virulents » ou « lytiques », représentant près de 90 % des bactériophages, ceux dits « tempérés » ou « endogènes » représentant environ 10 % et ceux dits « filamenteux », bien plus minoritaires (moins d'1 %). Le cycle dit « lysogène » ou « lysogénique », correspondant à celui des phages tempérés, ne sera évoqué que brièvement car il n'est pas exploitable pour la phagothérapie.



**Figure 1: Morphologie des différentes familles de virus de procaryotes (d'après Ackermann, 2001).**

La différence principale entre les deux principaux types de phages (virulents et Tempérés) réside dans leur comportement vis-à-vis de la bactérie après intrusion : un phage lytique va directement détruire la bactérie, tandis qu'un phage tempéré va intégrer son génome à celui du chromosome bactérien, rester « silencieux » un temps et se multiplier avec lui (Inal, 2003).

Le troisième type de phages existant, appelé phage filamenteux ne sera que très peu abordé car ses représentants sont rares et son cycle, nommé cycle chronique, non exploitable pour la phagothérapie (comme le cycle lysogène). Après pénétration dans la bactérie hôte, ce phage ne va pas la lyser mais va produire en continu de nombreux phages par bourgeonnement de la membrane bactérienne (Ackermann, 2003).

Il existe un quatrième type de cycle de reproduction, nommé pseudo-lysogénie. Il s'agit d'un intermédiaire entre les cycles lytiques et lysogéniques, au cours duquel le génome viral ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte, et demeure latent dans le cytoplasme. Ce cycle reste encore mal compris (Grossi, 2006).

### **3-1. Principe du cycle chronique (phages filamenteux)**

La durée d'un cycle de réplication typique chez les phages filamenteux varie entre 10 et 15 minutes. Lors de ce cycle, le phage se fixe sur la membrane de la bactérie à partir du pili sexuel bactérien et injecte son ADN dans la bactérie. L'ADN viral introduit dans la cellule bactérienne est converti de simple brin à double brin puis répliqué et transcrit en ARNm ; les ribosomes bactériens traduisent ensuite les ARNm en protéines de la capsid virale, qui s'insèrent ensuite dans la membrane bactérienne, et s'assemblent entre elles en entourant un nouveau brin d'ADN viral, tout en traversant la membrane bactérienne jusqu'à être totalement excrétées sous forme de nouveaux virions. Cette invasion ne détruit généralement pas les bactéries et n'est donc pas intéressante en ce qui concerne la phagothérapie (Ackermann, 2003).

### **3-2. Principe du cycle lysogénique (phages tempérés)**

Le cycle lysogénique, aussi nommé « lysogénisation » (Dublanche *et al.*, 2011), a lieu lorsqu'un phage tempéré pénètre dans une cellule bactérienne. Le génome du phage s'insère dans celui de la bactérie et devient dès lors partie intégrante de celle-ci (on appelle le génome viral intégré « prophage »). La réplication de ce matériel génétique a ainsi lieu en même temps que celui de la bactérie. Celle-ci, dont le chromosome bactérien a été envahi, transmet ensuite lors de sa division ce nouveau patrimoine génétique à sa descendance (Dublanche, 2009).

Cet état « silencieux » demeure un moment donné jusqu'à ce que le cycle lysogénique s'active en cycle lytique et que le génome du phage s'excise du chromosome bactérien. Ce changement d'état est relativement rare : un cas pour 100 000 phages tempérés environ (Dublanche, 2009), mais sa fréquence est augmentée lors d'un stress, induit par exemple par des rayons ultra-violet, des rayons X ou des substances chimiques comme des oxydants.

### **3-3. Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents)**

Contrairement aux phages tempérés, les bactériophages virulents possèdent la capacité de se multiplier selon leur propre rythme, et non pas au gré des divisions bactériennes. La reproduction d'un tel phage permet d'engendrer simultanément plusieurs dizaines de virus tous identiques. Pour décrire ce cycle, le microbiologiste Mark Müller a déclaré « Les bactéries ne meurent pas, elles explosent en multiples phages ».

Un cycle lytique complet prend quelques minutes à maximum une heure pour se réaliser. À côté de cela, la réplication bactérienne ne permet, dans les conditions optimales, de générer que deux bactéries filles toutes les demi-heures chez les espèces bactériennes à développement rapide. Cette réplication dichotomique bactérienne n'est pas en mesure de résister à une lyse par les dizaines, et même les centaines de bactériophages produits lors de leur réplication. Une colonie bactérienne entière même abondante est ainsi rapidement détruite par le nombre de bactériophages à croissance exponentielle (Dublanche, 2009).

#### **4. Les techniques de détection et de quantification des virus de procaryotes**

Depuis presque un siècle, les moyens de détection et de quantification des virus de procaryotes se sont peu à peu améliorés et diversifiés. Seules les techniques les plus utilisées sont décrites ci-après.

##### **4-1. La technique des plages de lyse**

La mise en évidence des premiers phages a été possible grâce à la lyse qu'ils provoquaient dans une culture de bactéries (Twort *et al.*, 1915 ; D'Hérelle, 1917). Cette propriété a été utilisée très tôt pour déterminer le titre viral des phages lytiques. La technique dite des plages de lyse consiste à étaler une suspension virale très diluée à la surface d'un tapis bactérien dans une boîte de Pétri contenant un milieu nutritif solide. Après incubation, il apparaît des trous dans le tapis bactérien qui sont la résultante de la destruction en cascade des cellules (fig.2) Ces derniers sont appelées plages de lyse et permettent après comptage d'estimer le nombre de virus en pfu (plaque forming unit).ml<sup>-1</sup> (Signer, 1967).

##### **4-2. La microscopie électronique en transmission (MET)**

Cette technique de microscopie basée sur le principe de diffraction des électrons permet un facteur de grossissement d'un million. Son utilisation en virologie a été initiée par (Ruska *et al.*, 1940).

Les virus sont adsorbés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone puis colorés négativement. Une solution contenant un agent contrastant (tétroxyde d'osmium, acétate d'uranyle, citrate de plomb, acide phosphotungstique, molybdate d'ammonium) est ajouté sur la grille. Celui-ci va se fixer préférentiellement au bord des échantillons adsorbés. En raison de sa forte masse atomique, le contrastant dévie les électrons. Ainsi le virus apparaît plus foncé que ce qui l'entoure (fig. 3).

Cette technique présente l'avantage de permettre une observation directe des particules. Ainsi, la morphologie et par conséquent certains critères de classification peuvent être déterminés.

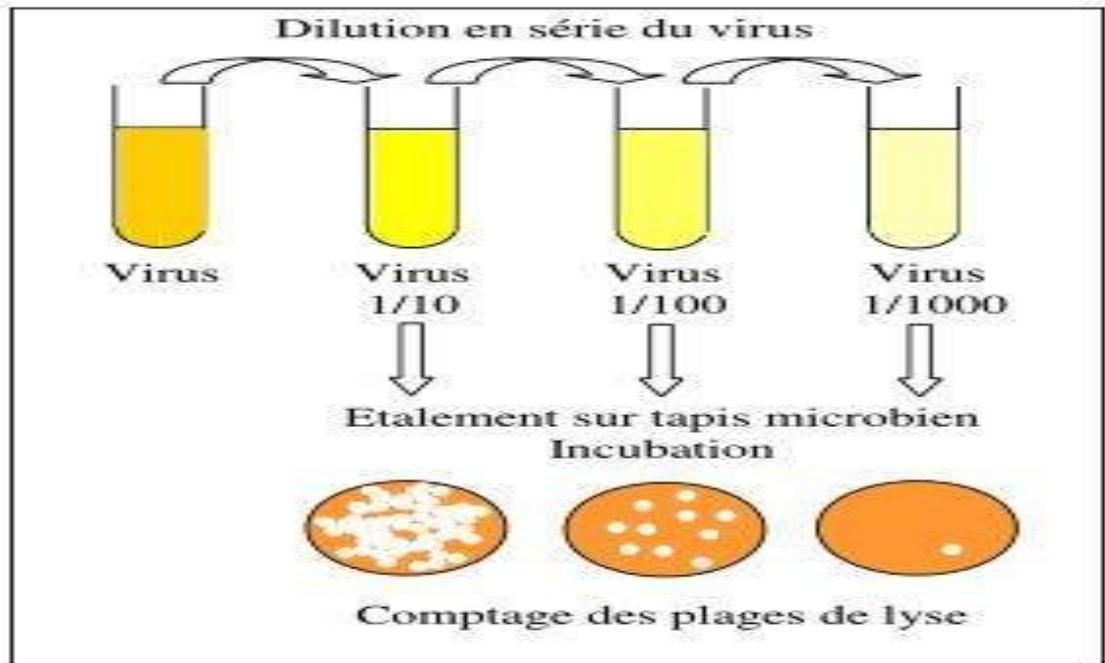


Figure 2: Schéma du protocole utilisé dans la technique des plages de lyse.

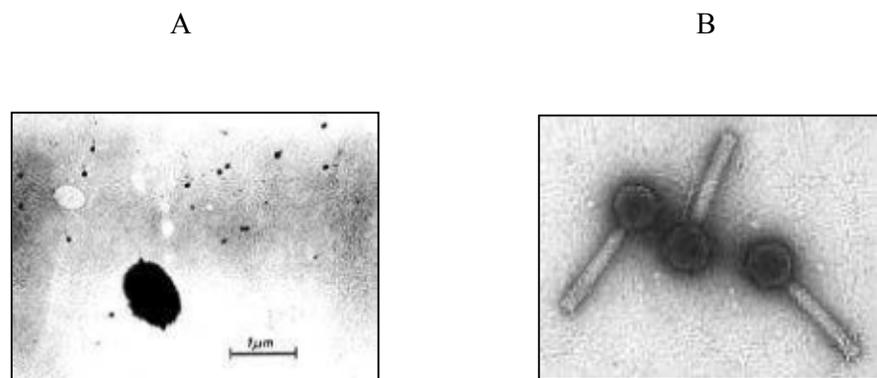


Figure 3: Photographies de bactériophages après coloration négative et observés en MET prises dans les années 1940 (A): (Ruska, 1940), (B): (Inman *et al.*, 1976).

### 4-3. La microscopie à épifluorescence (ME)

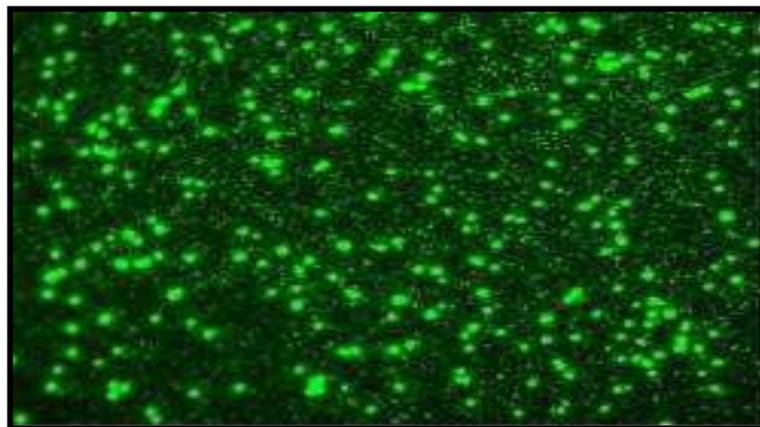
Le coût élevé et la faible disponibilité des MET ont été les principales causes du développement de la microscopie à épifluorescence. Dans cette technique dérivée de celle utilisée pour le comptage des bactéries, l'acide nucléique des virus, concentrés par ultrafiltration, est marqué grâce à un fluorochrome caractérisé notamment par la durée de persistance de sa fluorescence appelée temps de « fading » (fig4). L'observation se fait sur un microscope à épifluorescence (Weinbauer *et al.*, 1997).

Il existe trois types principaux de fluorochromes utilisables pour cette technique.

Le **DAPI** (ou 4',6'-diamino-2-phenylindole), couramment employé pour détecter les bactéries depuis les années 1980, a été le premier utilisé pour marquer le compartiment viral (Suttle *et al.*, 1990). La méthode au DAPI présente l'avantage d'être très rapide (environ 30 min). Cependant, en raison de la faible intensité de fluorescence et du temps de « fading » relativement court (94 sec), le comptage des échantillons se révèle être assez difficile (Porter *et al.*, 1980 ; Weinbauer *et al.*, 1997).

Le Yo-Pro-1 {4-[3-méthyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazole)-2-méthylméthylène]-1-(3'-triméthyl ammoniopropyl)-quinoliniumdiiode} est un colorant à base de cyanine. Contrairement au DAPI, il produit une fluorescence intense et très stable car son temps de « fading » oscille entre 210 et 244 sec. De plus, le protocole a été amélioré et permet maintenant une incubation de 4 min au lieu de 48 h (Hennes *et al.*, 1995 ; Xenopoulos *et al.*, 1997; Bettarel *et al.*, 2000).

Le SYBR Green I est arrivé plus récemment sur le marché. Sa fluorescence est aussi intense que le Yo-Pro-1 mais en revanche son temps de « fading » est plus court que celui du DAPI (49 sec).



**Figure 4: Photographie en épifluorescence de procaryotes (gros points) et de leurs virus (petits points) marqués au SYBR Green I : d'après le site <http://fuhrmanlab.usc.edu>.**

#### **4-4. La cytométrie en flux**

L'apparition d'une nouvelle génération de fluorochromes colorant spécifiquement les acides nucléiques combinée à l'amélioration des techniques de cytométrie en flux a permis l'obtention d'un nouveau moyen de détection et de quantification des virus. Ce système présente le grand avantage d'être complètement adapté à l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons grâce à l'automatisation du procédé. De plus, la cytométrie en flux permet de mettre en évidence différentes populations de virus (Hercher *et al.*, 1979 ; Marie *et al.*, 1999). Les fluorochromes utilisés sont le SYBR Green I et II, le TOTO-1, le YOYO-1, le Pico Green, l'Oligo Green et le SYBR Gold.

#### **4-5. Les techniques d'amplification de gène**

Contrairement des techniques culturales et microscopiques, l'amplification de gènes apporte une preuve indirecte de la présence ou de l'absence de tel ou tel virus.

##### **4-5-1. La Polymérase Chain Réaction(PCR) et la Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Les premières techniques d'amplification de gène qui furent utilisées pour la détection des virus sont la PCR (pour les virus à ADN) et la RT-PCR (pour les virus à ARN) (Saiki *et al.*, 1985 ; Brüssow *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1989 ; Griffin *et al.*, 1999). Dans la PCR, un gène cible est amplifié à l'aide d'amorces spécifiques et d'une polymérase thermostable (souvent la Taq polymérase) au cours de plusieurs cycles comprenant trois phases (dénaturation, hybridation, élongation). Pour la RT-PCR, une réverse transcription est réalisée au préalable pour obtenir de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN viral grâce à une réverse transcriptase.

Ces techniques moléculaires présentent l'avantage d'être très sensibles car elles permettent de détecter les génomes viraux, même s'il n'y a que quelques copies dans l'échantillon analysé. Par ailleurs, le choix judicieux des amorces utilisées autorise une identification rapide du ou des virus présents. De plus, les provirus, invisibles en MET ou en ME car ils ne produisent pas de virions, sont alors détectables.

#### **4-5-2. La PCR et la RT-PCR quantitatives**

Plus récemment, la PCR et la RT-PCR quantitative ont été développées dans le but de quantifier les virus et de suivre leur développement. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR ou RT-PCR. Il existe 2 types de marquage: les agents se liant à l'ADN double brin (comme le SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (comme les sondes Taqman ; Heid *et al.*, 1996 ; Edelman *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 1996 ; Shin *et al.*, 2003).

### **5. La phagothérapie**

La phagothérapie est l'utilisation de ces bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ce traitement a été largement utilisé dans le monde avant la découverte des antibiotiques. Bien qu'elle ait été progressivement abandonnée par les pays occidentaux séduits par les avantages de l'antibiothérapie, la phagothérapie traditionnelle est toujours employée et développée dans certains pays. Depuis environ une décennie, l'utilisation des bactériophages est reconsidérée devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactéries multi résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces.

Aujourd'hui, des applications sont envisagées non seulement dans le domaine médical mais aussi dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental.

#### **5-1. La thérapie phagique**

Les infections traitées étaient causées par du côté environnemental, une étude réalisée par la compagnie intralytix, aux États-Unis, démontre que l'application d'un mélange de phages pendant 5 min sur une surface ou des aliments contaminés avec *E.coli* O157:H7 entraîne une réduction bactérienne moyenne de 97% (Abuladze *et al.*, 2008). Dans une autre étude réalisée au Royaume-Uni, les bactériophages ont été utilisés avec succès afin de réduire la colonisation par *Campylobacter jejuni* chez le poulet. Les résultats démontrent que différentes doses de phages administrés oralement dans une suspension antiacide, entraînent une chute des comptes bactériens de 0,5 à 5 log<sub>10</sub> ufc/g comparativement aux contrôles non traités (Carrillo *et al.*, 2005).

## **5-2. Protocoles de phagothérapie**

En pratique, il existe deux protocoles de phagothérapie: soit on administre un cocktail de bactériophages, soit un phagogramme est pratiqué (à l'image des antibiogrammes pour les antibiotiques) pour cibler la bactérie incriminée et choisir le phage lui correspondant, les bactériophages étant très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement quelques souches dans cette espèce. Utiliser un bactériophage qui ne correspondrait pas la bactérie ciblée serait inefficace (Abedon *et al.*, 2011).

## **6. Les bactériophages pour une décontamination sélective**

Les bactériophages utilisés comme « désinfectants » spécifiques naturels, par leur action ciblée, pourraient réduire significativement la transmission des infections nosocomiales tout en limitant l'impact sur les surfaces de travail, les instruments ainsi que sur les patients et le personnel hospitalier. L'utilisation de produits naturels tels que les bactériophages serait une alternative intéressante pour la prévention et le contrôle des infections nosocomiales. En plus de permettre le développement d'un volet préventif, ces produits écologiques à base de phages gagneraient à être développés comme agents thérapeutiques en alternative et/ou en supplément aux antibiotiques, couvrant ainsi les différents stades de développement d'une infection bactérienne spécifique (Martineau, 2009).

## **7. Avantages**

L'utilisation des phages comme agents de lutte contre les infections Nosocomiales présentent de nombreux avantages par rapport aux antibiotiques.

Les phages sont déjà présents et actifs dans la nature, ils sont donc relativement faciles à isoler, leur production est simple. De plus, ils possèdent la capacité d'évoluer en s'adaptant aux bactéries qu'ils infectent, c'est-à-dire en présence de bactéries résistantes au phage (Barrow *et al.*, 1997).

Il est important de mentionner que le taux de développement de résistance aux phages est dix fois plus faible que celui aux antibiotiques (Sulakvelidze *et al.*, 2001). De plus, l'utilisation d'un cocktail de phages avec différents récepteurs/spécificité permet de limiter encore plus l'apparition de résistance.

Un autre avantage intéressant est leur capacité de croissance exponentielle rapidement au site d'infection en suivant la croissance de leur hôte bactérien jusqu'à sa disparition. Il y a donc une persistance à long terme du traitement. Ce qui signifie qu'une seule dose de phage

pourrait traiter une infection, limitant l'administration de plusieurs doses pendant la durée du traitement et que lorsqu'un cocktail de phages serait administré, seulement les phages pertinents se multiplieraient (Barrow *et al*, 1997). Les traitements phagiques représentent donc un des rares traitements multiplicatifs, sinon le seul.

L'isolement de phages spécifiques aux bactéries nosocomiales et leur caractérisation détaillée permettra de démontrer qu'ils offrent une alternative anti bactérienne naturelle face aux infections nosocomiales.

## **8. Limites**

L'isolement des phages comme agents thérapeutiques doit se limiter aux phages lytiques car en plus de leur potentialité à transmettre des gènes (de virulence) d'une bactérie à l'autre, la période de latence des phages tempérés ne permet pas une thérapie rapide et contrôlée, et ils ne détruisent pas 100% de la bactérie infectée (Kropinski, 2006). Le séquençage du génome des phages potentiellement utilisables en thérapie est donc essentiel pour s'assurer que le génome ne renferme pas de gène de virulence ou de résistance (Duckworth *et al.*, 2002)

*Matériel et  
méthodes*

## **Matériel et méthodes**

### **1. Présentation de la Station d'épuration de Chelghoume El-Laid**

La station de Chelghoum El-aïd a connu des travaux de réhabilitation dans ce sens, la quantité d'eau est déversées directement dans oued Rhummel, considéré comme le coeur battant dans le processus d'approvisionnement en eau du barrage de Béni Haroun. La capacité de cette station est estimée à 9000 mètres cubes/jour, leur objectif d'extension qui permet d'avoir une capacité de 13500 mètres cubes/jour dans le futur.

Cette station se charge de l'assainissement des eaux usées en provenance des villes de Chelghoum el aïd et de Oued El-Outhmania, les eaux épurées sont déversées dans oued Rimmel, a noter que tout au long existe des surfaces agricoles irrigables s'étendant sur environ 374 hectares (Yekhlef., 2009).

La technique de cette épuration dans cette station est basée sur la boue activée à faible charge,

Ce procédé passe inévitablement par plusieurs étapes :

-La première étape est physique, il s'agit d'isoler l'eau de tous les résidus à grand volume, ainsi que du plancton telles les huiles et la terre ;

-La deuxième est biologique, où l'eau est déversée dans les bassins d'aération, elle contient beaucoup de boue activée, cette dernière se charge de l'oxydation des matières organiques ce trouvant dans la boue des eaux usées ;

-La dernière étape est celle de l'humidification, les eaux traitées sont isolées de la boue activée ou une bonne partie de ce dernier est conduite vers les bassins d'aération, le surplus est transporté quant à lui vers les bassins de séchages (Djaloudi, 2009).

Cette infrastructure est dotée des dernières technologies les plus modernes, que ce soit en matière de gestion ou en matière d'analyse des eaux.

### **2. Prélèvement des échantillons**

Au niveau de la station d'épuration de Chelghoum El-Aïd, les échantillons ont été prélevés le 06/04/2014 la température de l'eau été de 13 °C

trois prélèvements ont été réalisés à partir des eaux usées non traité, eaux traitées, et boues mixtes

Notons que ces prélèvements ont été réalisés à partir de 40 cm sous la surface, les échantillons sont placés dans des flacons stériles en verre transparent, et en laissant un volume d'air d'environ 1/10 du volume du flacon.

Les flacons contenant les échantillons à analyser ont été transportés dans des conditions isothermes entre 4°C et 6°C. Les analyses sont effectuées dans les trois premières heures qui suivent les prélèvements.

### **3. La flore totale aérobie mésophile**

Cent millilitre de trois dilutions décimales successives ont été étalés en duplicata sur la Gélose Nutritive (annexe 01). Les boîtes sont directement incubées à 37°C pendant 24 h. Le nombre de colonies observables est compté sur les boîtes "interprétables" contenant entre 30 et 300 colonies. Ce nombre traduit alors le nombre de bactéries présentes initialement dans l'inoculum déposé en termes d'unités formatrices de colonies (UFC/ml).

Les souches isolées ont été purifiées par repiquage successif sur le même milieu d'isolement. Chaque colonie pure a été ensemencée sur un bouillon nutritif puis incubé à 37°C pendant quatre heures pour effectuer la technique des plages de lyse; méthode de la double couche, qui est la seule technique utilisée dans cette recherche.

### **4. La technique de plage de lyse**

Cent millilitre de chaque échantillon ont été centrifugés dans des tubes de 20ml à 2000rpm pendant 15min en utilisant une centrifugeuse de modèle EBA 12 de Hettich (Germany) le surnageant a été filtré par la méthode de filtration sur membrane à l'aide d'un système de filtration de 1L (Wheaton, USA) (**fig.05**). En utilisant une membrane filtrante de 0.45µm (filtre stérile, Wattman, Germany) dont les pores peuvent retenir les cellules bactériennes et les débris cellulaires et laissent passer les phages.

La suspension phagique a été conservée à 4°C dans des bouteilles stériles de 100ml.

Cinquante microlitre de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle ont été mélangés avec 100µl de la suspension phagique (obtenues après dilutions décimales) dans des tubes Eppendorf et incubés à 37°C pendant 15min. Après incubation, cette suspension a été mélangée avec 3ml de la gélose demi-molle (0.7% agar) conservée en surfusion à 45°C. Ce mélange a été homogénéisé avec précaution et coulé rapidement sur un milieu gélose (GN) pour former une mince couche supérieure. Après solidification, les boîtes retournées ont

été incubées à 37°C pendant 24h. L'apparition ou l'absence des plages de lyse claire dans le tapis (UFP) a été observée.



**Figure 5: Système de filtration (Wheaton, USA)**

## **5. Identification phénotypique des isolats**

Deux souches, *E. coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas* ATCC 27853 ont été utilisées comme souches de références.

Cinq isolats ont été sélectionnés de façon aléatoire pour analyse phénotypique. Les souches ont été désignées par le code suivant :

- 18 BM: isolat prélevé à partir de l'échantillon de boue mixte (BM)
- 19 ENT, 20 ENT, 21 ENT et 22 ENT : isolats prélevés à partir de l'eau non traitée (ENT)

L'identification a été basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est mentionnée en annexe 01.

**5-1. Examen microscopique :** Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des isolats en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram.

## 5-2. Test Biochimiques:

### Test de catalase

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (Belarras, 2007).

### Test d'oxydase

Le test a été réalisé en utilisant des disques d'oxydase (Himedia laboratoires, Mumbai, India). Un de ces disques a été placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase positive et elle possède la cytochrome oxydase. Et rien n'apparaît, cela signifie que la bactérie est oxydase négative et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

**Le test de mobilité:** la Gélose Mannitol-mobilité (Institut Pasteur, Algérie), a été ensemencée par piqûre centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre central alors que les germes mobiles diffusent dans la gélose

**Le test d'hémolyse :** Ce test a été réalisé sur la gélose Columbia (Institut Pasteur, Algérie) au sang humain (5%).

**Milieux sélectifs:** Les milieux sélectifs ont été ensemencés par la technique de stries et la lecture a été effectuée après 24h d'incubation à 37 ° C. Le milieu Mac conkey (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour détecter la fermentation du lactose. Le Milieu Hektoen (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour l'isolement de *Salmonella* et *Shigella*.

### La Galerie API 20E

Les cinq isolats ont été identifiés par la galerie API 20E (Biomerieux, SA., Marcy-L'étoile, France). Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les galeries ont été préparées selon les instructions de Biomerieux. Les microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne (trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle McFarland) qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période de 24 h d'incubation à 37°C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (annexe 1). Les résultats de ces réactions sont marqués sur une fiche de résultats standards. La lecture de

ces réactions se fait à l'aide du Tableau (01) de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique.

Le tableau de lecture permet, donc, de déterminer les résultats positifs ou négatifs de tous les tests, et par conséquent, de déterminer le code de la bactérie étudiée. Les tests sont, d'ailleurs, regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Les nombres correspondants aux tests positifs sont additionnés à l'intérieur de chaque groupe. Puis, un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification est obtenue.

Le code de la bactérie, composé des 7 chiffres, est déterminé à l'aide du tableau d'identification ou de lecture Tableau (01).

**Tableau 01: Identification phénotypique et biochimique de la galerie API 20E**

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

# *Résultats et discussion*

## Résultats et discussion

Les résultats de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile réalisé sur le milieu GN sont regroupés dans le tableau 02. La numération de la flore totale bactérienne donne une concentration moyenne en germe de  $113 \times 10^4$  ufc/ml (eau non traitée),  $140 \cdot 10^4$  ufc/ml (boue mixte) et  $5 \cdot 10^4$  ufc/ml (eau traitée) inférieure à celle notée par Ekhaïse *et al.* (2008) au cours de leurs travaux au Bénin où la population bactérienne était comprise entre  $1,9 \times 10^7$  ufc/ml et  $8,3 \cdot 10^{12}$  ufc/ml et supérieure à celle trouvée par Bernet et Fines en 2000 où la concentration moyenne en germe était de  $3 \cdot 10^5$  ufc /ml. Cette concentration est inférieure à la flore totale généralement présente dans les eaux usées ( $10^8$  ufc/ml) (Bernet *et al.*, 2000).

**Tableau 02 : Résultat de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile.**

Echantillon FTAM	Eau traitée (ufc/ml)	Eau non traitée (ufc/ml)	Boue mixte (ufc/ml)
La flore totale	$5 \times 10^4$	$113 \times 10^4$	$140 \times 10^4$

Les résultats montrent une réduction de 38.5% du nombre de germes après traitement des eaux usées par rapport à l'eau non traitées, donc réduction de la pollution.

L'isolement de bactériophages à partir des eaux usées et boue a été démontrée par plusieurs publications (Khan *et al.*, 2002 ; Martineau, 2009). Synnoth *et al.* (2009) ont utilisé les eaux usées provenant de la station municipale de traitement des eaux usées à Tokyo pour le test de criblage des phages capable de lyser *Staphylococcus aureus*.

Le bactériophage invisible au microscope ordinaire, ne peut être révélé dans le cadre de cette recherche que par son action lytique sur ses bactéries correspondantes vivantes.

Le tableau (3) démontre les résultats de la technique de plages de lyses testées sur 22 isolats bactériens « non-identifiés » avec 100 µl de la suspension phagique. Aucune activité lytique n'a été observée. Cette absence de plage de lyse peut être expliquée par plusieurs interprétations.

- Les souches testées ne sont pas sensibles au bactériophage.
- La suspension phagique ne contient pas de phage lytique.
- le temps d'incubation du mélange (suspension phagique + culture bactérienne) n'est pas suffisant pour qu'il y est une adsorption du phage sur la paroi cellulaire de sa bactérie hôte.
- la densité phagique dans la suspension hydrique est faible, il est alors nécessaire de procéder à une concentration à partir d'un grand volume d'eau de façon à recueillir des bactériophages présents sous un faible volume (Logan *et al.*, 1980). Dahling et ses collaborateurs ont démontré en 1989 que la présence des bactériophages dépend de nombreux facteurs tels que les facteurs géographiques et les facteurs saisonniers.

**Tableau 03 : Résultats de la technique de plages de lyses testées sur 22 isolats  
« non-identifiés »**

	Eau traitée	Eau non traitée	Boue mixte
<b>Les plages de lyse</b>	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>	<b>Absence</b>

Les résultats d'identification des isolats 20, 21 et 22 ENT sur la gélose Hektoen démontrent la présence des colonies de petites tailles, de forme arrondies et de couleur jaune (figs. 23, 29 et 35). Les colonies jaunes utilisent un ou plusieurs glucides, elles sont donc saccharose et/ou lactose et/ou salicine positives. Un précipité de sels biliaires apparaît pour les souches acidifiantes.

Sur le milieu Mac Conkey les souches 20, 21 et 22ENT sont de forme arrondies de couleur rose; due à la précipitation des sels biliaires ce qui indique que ces bactéries fermentent le lactose et produisent des acides (lactose+) (figs. 22, 28 et 34). Contrairement à la souche 18BM et à la souche 19ENT on remarque une absence de croissance due à la présence des agents sélectifs (cristal violet et sels biliaires) qui freinent le développement des bactéries à Gram positif (figs .10 et16)

Les cinq souches testées poussent sur le milieu gélose au sang et sont de forme arrondies et de couleur verdâtre, donc l'hémolyse est incomplète (alpha hémolyse), les bactéries sont incapables de détruire complètement les globules rouge (figs. 8, 14, 20, 26 et 32)

Les résultats d'ensemencement des isolats 20, 21 et 22 ENT sur milieu mannitol mobilité donne un virage au jaune de l'indicateur rouge de phénol ce qui indique que ces bactéries fermentent le mannitol et produisent des acides (mannitol +), la formation de voile au niveau de la pique central démontre que ces souches diffusent dans tout le milieu donc elles sont mobiles (figs. 21, 27 et 33)

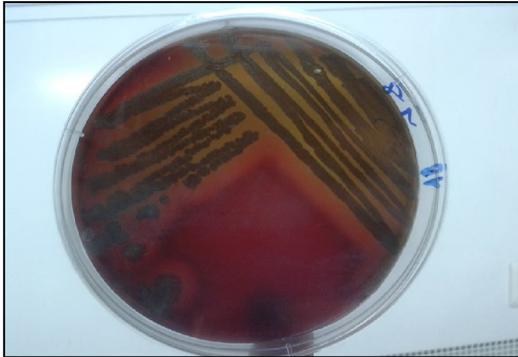
Au contraire, le milieu est resté rouge pour les souches 18 BM et 19 ENT avec absence de diffusion ce qui indique que ces souches ne fermentent pas le mannitol donc mannitol négatif et mobilité négative (figs. 9 et 15)



**Figure 6: Test de catalase de la souche 18 MB**



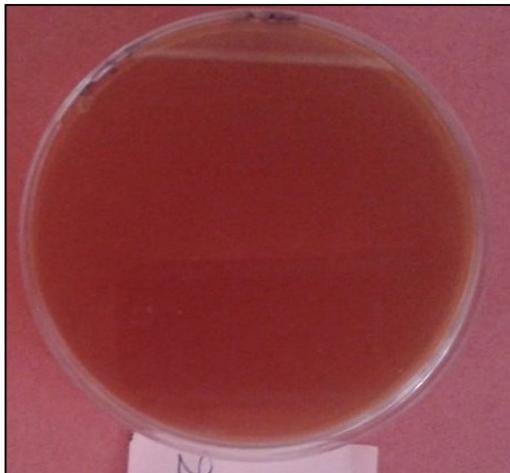
**Figure 7: Test de l'oxydase de la souche 18 MB**



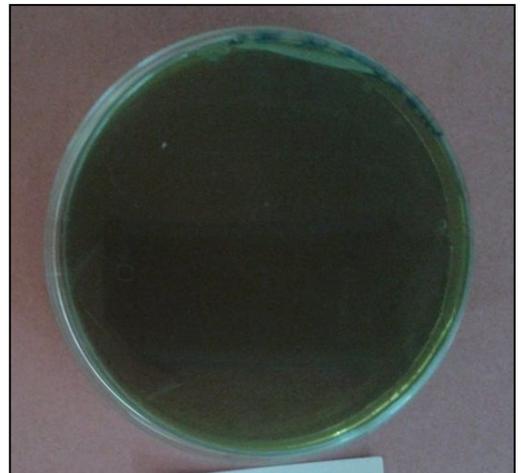
**Figure 8: Identification de la souche 18 BM sur milieu Gélose au sang**



**Figure 9: Identification de la souche 18 BM sur milieu Mannitol Mobilité**



**Figure 10: Identification de la souche 18 BM sur le milieu Mac conkey**



**Figure 11: Identification de la souche 18 BM sur milieu Hektoen**

Fi



**Figure 12: Test de catalase de la souche 19 ENT**



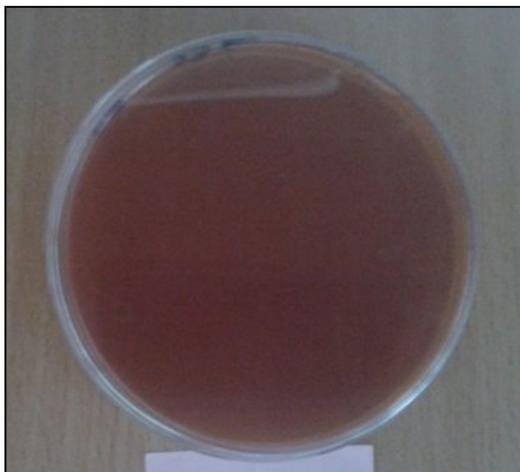
**Figure 13: Test d'oxydase de la souche 19 ENT**



**Figure 14: Identification de la souche 19 ENT sur le milieu Gélose au sang**



**Figure 15: Identification de la souche 19 ENT sur milieu Mannitol Mobilité**



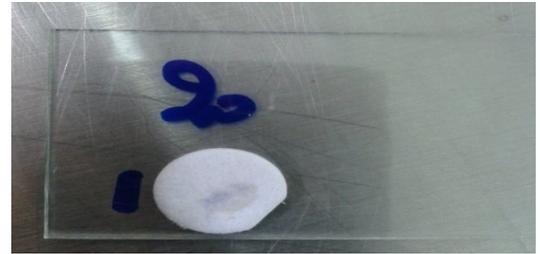
**Figure 16: Identification de la souche 19 ENT sur milieu Mac conkey**



**Figure 17: Identification de la souche 19 ENT sur milieu Hektoen**



**Figure 18: Test de catalase de la souche 20 ENT**



**Figure 19: Test d'oxydase de la souche 20 ENT**



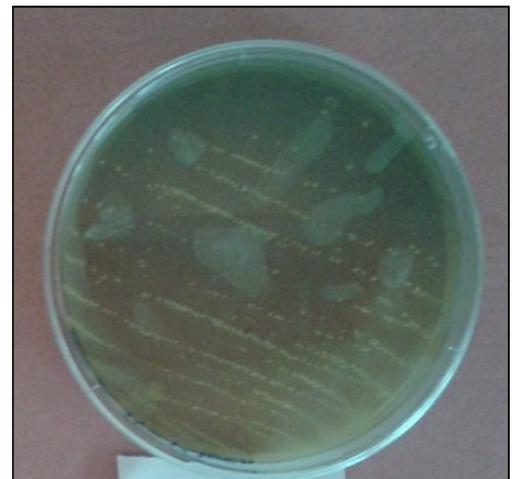
**Figure 20: Identification de la souche 20ENT sur milieu Gélose au sang**



**Figure 21: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Mannitol Mobilité**



**Figure 22: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Mac conkey**



**Figure 23: Identification de la souche 20 ENT sur milieu Hektoen**



**Figure 24: Test de catalase de la souche 21 ENT**



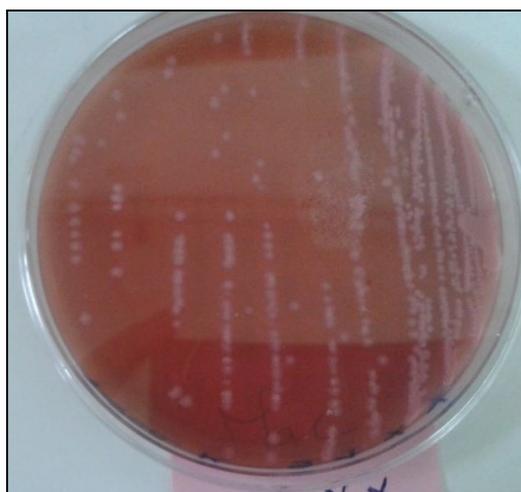
**Figure 25: Test d'oxydase de la souche 21 ENT**



**Figure 26: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Gélose au sang**



**Figure 27: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Mannitol Mobilité**



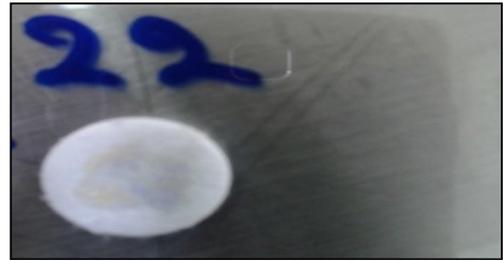
**Figure 28: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Mac conkey**



**Figure 29: Identification de la souche 21 ENT sur milieu Hektoen**



**Figure 30: Test de catalase de la souche 22 ENT**



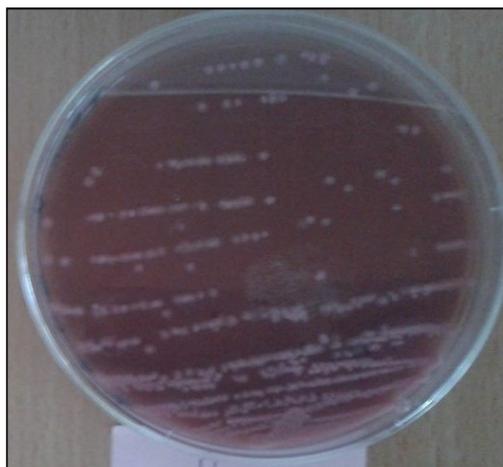
**Figure 31: Test d'oxydase de la souche 22 ENT**



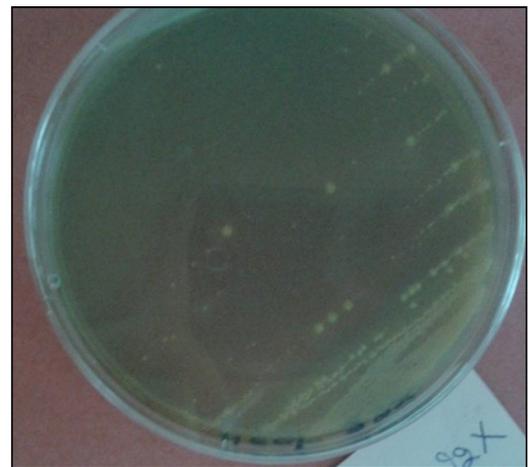
**Figure 32: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Gélose au sang**



**Figure 33: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Mannitol Mobilité**



**Figure 34: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Mac conkey**



**Figure 35: Identification de la souche 22 ENT sur milieu Hektoen**

Les résultats d'identification par la galerie API 20E sont représentés dans le tableau 03.

Selon les tests biochimiques et morphologiques, les souches 18BM et 19ENT ont été identifiées comme *Bacillus anthracis* en consultant le catalogue d'identification de galerie API E20. (figs.38 et 39).

*Bacillus anthracis* est un grand bacille à Gram positif (figs. 36 et 37) non mobile, alpha hémolyse, glucose +, non exigeant, VP + (caractère de la classification des *Bacillus*), gélatinase +, uréase -, maltose +, saccharose +

*B. anthracis* cause des infections peut être le résultat d'une inhalation de spores de *B. anthracis* venant de produits d'origine animale contaminés ou d'une libération intentionnelle de ces spores. Il existe trois formes d'anthrax chez l'humain: cutanée, gastrointestinale et pulmonaire. *B. anthracis* libérant une toxine œdémateuse (Laboratoire de santé publique du Québec, 2001)

Selon les tests biochimiques et morphologiques, la souche 21 ENT a été identifiée comme *Hafnia alvei* en consultant le catalogue d'identification de galerie API E20 (fig.41)

*Hafnia alvei* est un bacille entérique et oropharyngé Gram-négatif (fig.40)

Selon Richard et Alonso (1976), le genre *Hafnia* se définit comme une entérobactérie mobile, présentant une réaction de Voges-Proskauer positive, d'indole (-).

Selon Farmer (1999), ONPG (+), LDC (+), ODC (+), GLUCOSE (+), H<sub>2</sub>S-, Citrate de Simmons (-), Urée (-)

Cent des souches de *Hafnia alvei* sont lysées par un bactériophage (le phage *Hafnia* 1672, couramment désigné sous le nom de phage *Hafnia*) isolé de l'eau en 1968 par Guinée et Valkenburg. Ce phage est spécifique de *Hafnia alvei* et il est commercialisé et utilisé pour le diagnostic de cette espèce.

*Hafnia alvei* peut se comporter comme une bactérie pathogène opportuniste. Elle est rarement isolée seule. Le plus souvent en milieu hospitalier et en association avec d'autres bactéries, lors de septicémies, de gastro-entérites, de pneumonies, d'abcès, d'infections urinaires et de plaies infectées.

Selon les tests biochimiques et morphologiques, la souche 20 ENT et 22 ENT ont été identifiées comme *Citrobacter freundii* en consultant le catalogue d'identification de galerie API E20 (figs. 44 et 45)

Cette bactérie est bacille ou coccobacille Gram négatif (fig.42.43), mobilité(+) (Abbott, 2007). Glucose (+), réduction des nitrates en nitrites (+), indole (-), ONPG (+), H<sub>2</sub>S (+),

urease (-), TDA(-) ; VP (-), citrate (+). Les bactéries du genre *Citrobacter* fermentent le mannitol et produisent du H<sub>2</sub>S gazeux, elles sont aussi capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone (Chen *et al.*, 2002).

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares (Ryan, 2004) qui entraînent normalement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales (Pepperell *et al.*,2002) comme la méningite, le sepsis néonatal, l'infection articulaire et la bactériémie (Doran, 1999).

**Tableau 04 : Résultats d'identification des bactéries**

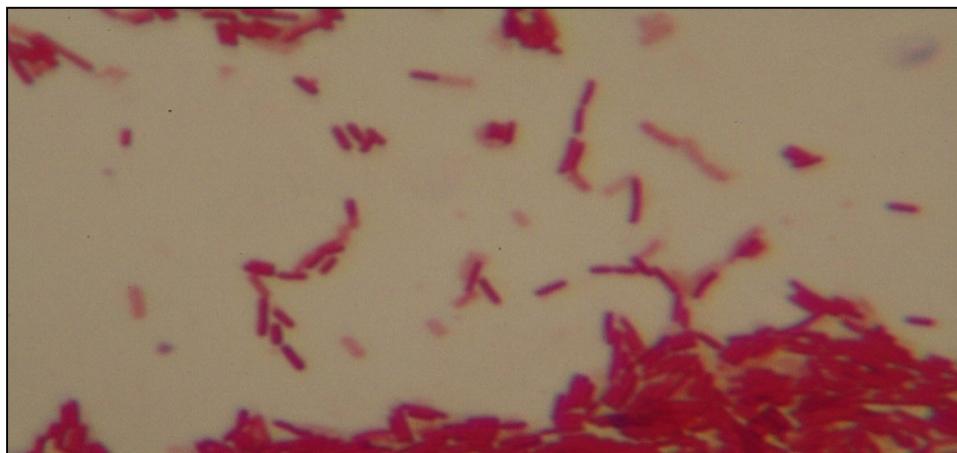
Tests	<i>Bacillus anthracis</i> (19ENT 18BM)	<i>Hafnia alvei</i> (ENT)	<i>Citrobacter freundii</i> (ENT)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Echerichia coli</i> ATCC25922
<b>ONPG</b>	+	+	+	-	+
<b>ADH</b>	-	-	-	+	-
<b>LDC</b>	-	+	-	-	+
<b>ODC</b>	-	+	-	-	+
<b>CIT</b>	-	-	+	+	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	+	-	-
<b>URE</b>	-	-	-	-	-
<b>TDA</b>	-	-	-	-	-
<b>IND</b>	-	-	-	-	+
<b>VP</b>	+	+	+	-	-
<b>GEL</b>	+	-	-	+	+
<b>GLU</b>	+	+	+	-	+
<b>MAN</b>	+	+	+	-	+
<b>INO</b>	-	-	-	-	-
<b>SOR</b>	-	+	+	-	+
<b>RHA</b>	-	+	+	-	+
<b>SAC</b>	+	-	+	-	-
<b>MEL</b>	-	-	+	-	-

<b>AMY</b>	+	-	-	-	-
<b>ARA</b>	+	+	+	+	+
<b>N<sub>2</sub></b>	+	-	-	-	
<b>NO<sub>2</sub></b>	-	+	+	-	
<b>Oxydase</b>	+	-	-	+	-
<b>Hémolyse</b>	α	α	α	α	α
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+

α : hémolyse

**Tableau 05: Résultats d'identification morphologique de *Bacillus anthracis* (10270052)**

Caractères	<i>Bacillus anthracis</i>
<b>Gram</b>	+
<b>Aspect</b>	Grand bacille
<b>Mobilité</b>	-



**Figure 36: Coloration de Gram de la souche 18 BM**

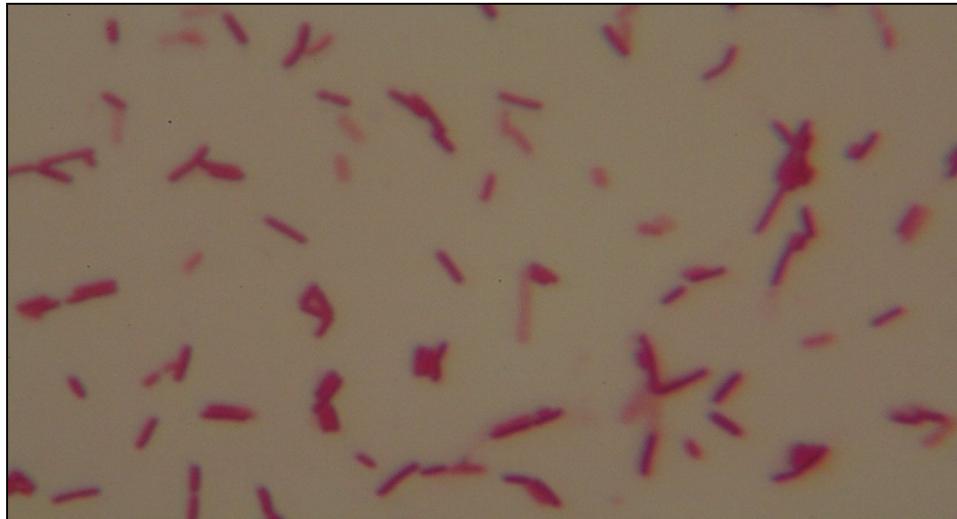


Figure 37: Coloration de Gram de la souche 19 BM



Figure 38: Résultat de l'identification des isolats 18 BM par la galerie API 20E



Figure 39: Résultat de l'identification des isolats 19 ENT par la galerie API 20E

**Tableau 06: Résultats d'identification morphologique de *Hafnia alvei*.**

Caractères	<i>Hafnia alvei</i> (21ENT)
Gram	-
Aspect	Bacille
Mobilité	+



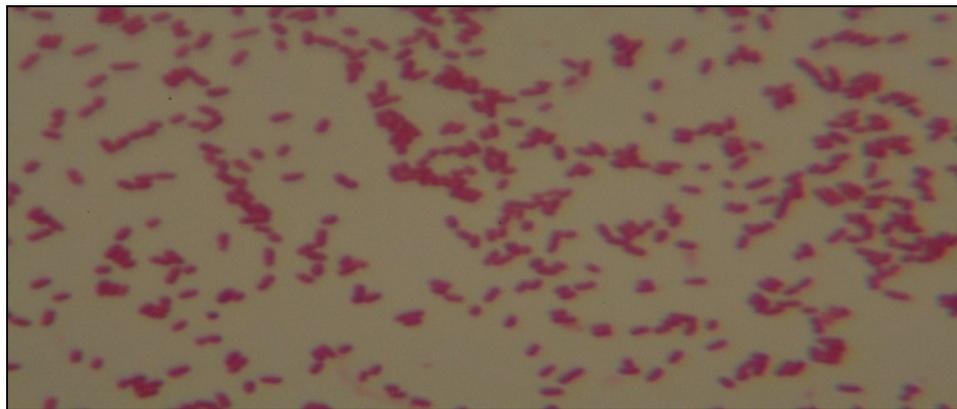
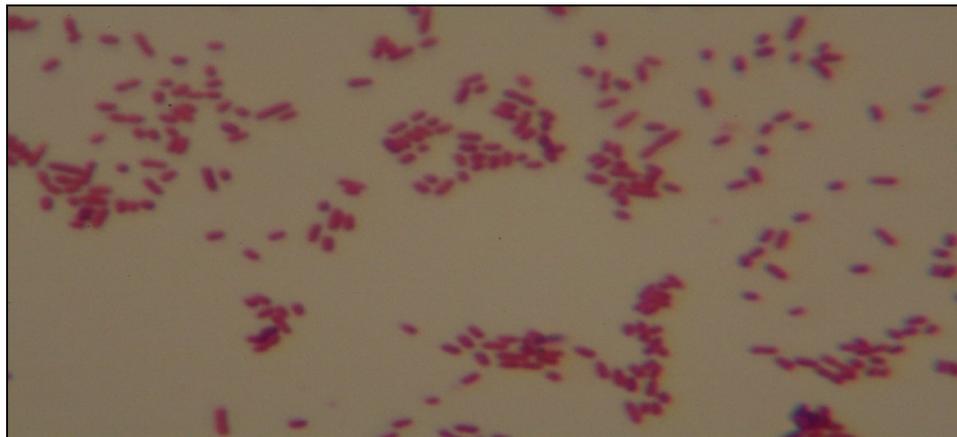
**Figure 40: Coloration de Gram de la souche 21 ENT**



**Figure 41: Résultat de l'identification des isolats 21 ENT par la galerie API 20E**

**Tableau 07: Résultats d'identification morphologique de *Citrobacter freundii*.**

Caractère	<i>Citrobacter freundii</i> (20,22ENT)
<b>Gram</b>	-
<b>Aspect</b>	bacille ou coccobacille
<b>Mobilité</b>	+

**Figure 42: Coloration de Gram de la souche 20 ENT****Figure 43: Coloration de Gram de la souche 22 ENT**

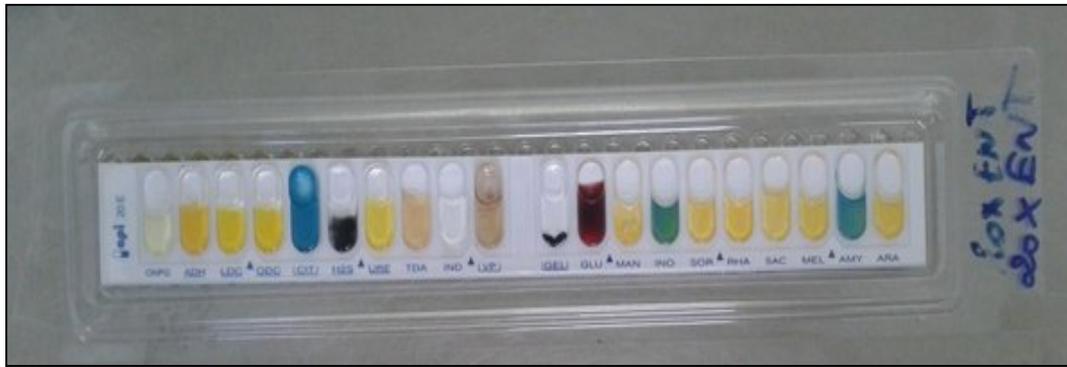


Figure 44: Résultat de l'identification de l'isolat 20 ENT par la galerie API 20E



Figure 45: Résultat de l'identification de l'isolat 22 ENT par la galerie API 20E

Tableau 08 : Résultats d'identification morphologique de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et d'*Escherichia coli* (ATCC 25922)

Caractère	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gram	-	-
Aspect	bacille	bacille
Mobilité	-	+

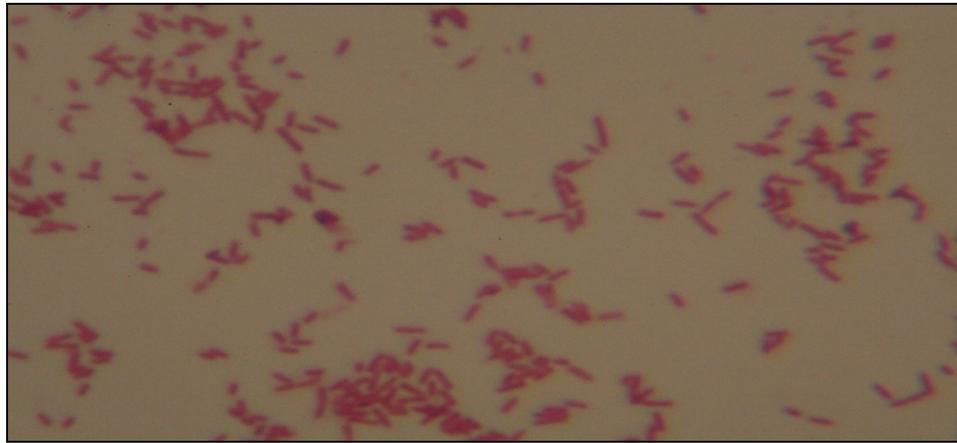


Figure.46: Coloration de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)



Figure 47: Résultat de l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853) par la galerie API 20E

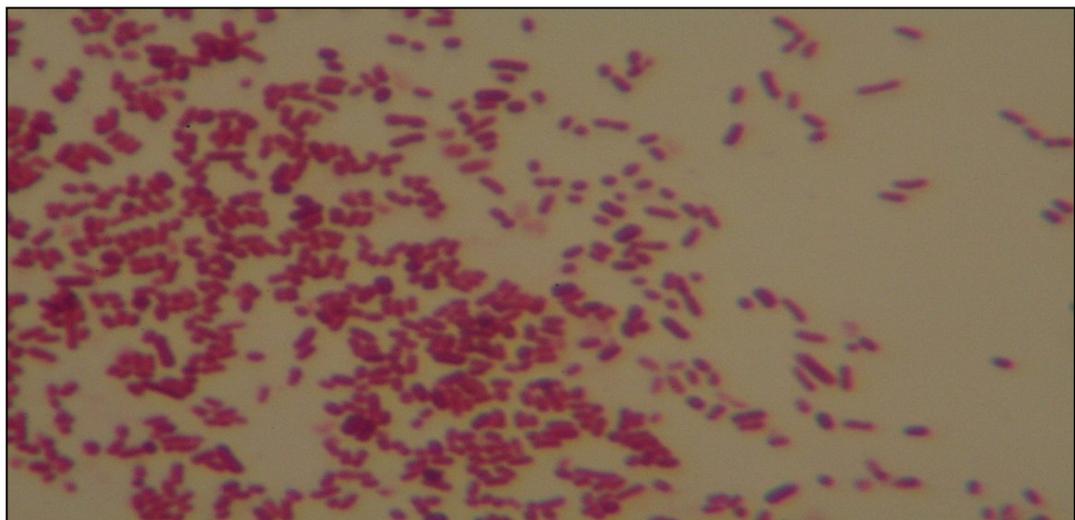


Figure 48 : Coloration de Gram d'*Escherichia coli* (ATCC25922)



**Figure 49: Résultat de l'identification d'*Escherichia coli* par la galerie API 20E(ATCC25922)**

# *Conclusion*

## Conclusion et perspectives

A travers cette étude de recherche sur les bactériophages provenant des eaux usées qui restent la source principale de contamination du milieu hydrique, les résultats révèlent l'absence de phages dans les trois échantillons testés avec 22 isolats. Ces résultats peuvent être dus à plusieurs facteurs :

- Les souches testées ne sont pas sensibles aux bactériophages, il faudrait donc isoler d'autres souches et refaire le test plusieurs fois.
- La quantité de bactériophage dans l'eau, varie suivant la souche employée pour son identification. C'est pourquoi il est indispensable d'appliquer dans toute la recherche des souches standards sensibles pour dépister en eaux usées la présence de bactériophages. La souche *Escherichia coli* ATCC 11303 et le phage T2 sont envisagés d'être utilisés comme souches de références pour développer cette recherche.
- La quantité de virus présents dépend des facteurs géographiques, climatiques, le type d'échantillon et aussi selon la technique de prélèvement. Le prélèvement est primordial puisqu'il est l'étape amont qui conditionne toute la chaîne de mesure et donc la représentativité des résultats obtenus *in fine*. Les prélèvements doivent être effectués à partir de points différents et doivent être espacés dans le temps et tout au long des saisons. Une concentration préalable de la suspension phagique est nécessaire afin d'obtenir une quantité détectable de bactériophages par la méthode de plaque de lyse.

Les résultats de dénombrement des germes pour l'ensemble des échantillons (eau non traité et boue mixte) indiquent qu'il y a une contamination élevée qui peut être causée par des germes pathogènes. Ces microorganismes constituent un danger potentiel pour la santé des personnes. Vu le manque de matériel et milieux de culture, juste cinq souches ont été soumises à différents tests d'identification. Ces souches sont considérées comme *Hafnia alvei*, *Bacillus anthracis* et *Citrobacter freundii*. Autres tests phénotypiques et génotypiques sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

*Références  
bibliographique*

Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM (2011). Phage treatment of human fections. *Bacteriophage*, 1, 66–85.

Abuladze, T., L. Manrong, M.Y. Menetrez, T. Dean *et al.* (2008). Bacteriophages reduce Experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*; 6230-6238.

Ackermann, HW. (2001). Frequency of morphological phage description in the year 2000, brief review. *Archive virological* 146(5) :843-57

Ackermann H-W (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 245-251.

Barrow, P. A. a. J. S. (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in microbiology*; 5(7): 268-271

Bernet N., Delgenès N., Akunna J.C., Delgenès J.P. et Molleta R. (2000). Combined anaerobic-aerobic for the treatment of piggery waswater .,34(2),611-619

Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., and Laveran, H. (2000). A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*; 66: 2283-2289.

Brüssow, H., Fremont, M., Bruttin, A., Sidoti, J., Constable, A., and Fryder, V. (1994) Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Industrial milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*; 60: 4537-4543.

Carlton, RM, 1999. Phagothérapie: l'histoire passée et les perspectives d'avenir. *Archivum Immunol. Therapiae Exp*, 47: 267-274.

Carrillo, C. L., R.J. Atterbury, A. El-Shibiny, P.L. Connerton *et al.* (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*; 6554-6563.

Chen, Y. S., Wong, W. W., Fung, C. P., Yu, K. W., and Liu, C. Y. (2002). Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacter freundii* bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*; 35(2), 109-114.

Costa-Mattioli M., Monpoeho S., Nicand E., Aleman MH, Billaudel S., and Ferré V. (2002), Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hepat* 9: 101-106

Cubitt w. D. (1991). A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral Infections. *Wat. Sci. Tech.*, 24, 197-203.

Dahling D.R., Saffermann R.S. and Writh B.A. (1989). Isolation of Entérovirus and Réovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 503-506.

Degrémont G. *Mémento Technique de l'Eau*, version électronique 2001.

Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. P : 128, 129, 269, 271.

Djaloudi, A. (2009). *Modèles de stations d'épuration des eaux usées en Algérie*. chef de station d'épuration de chelghoum el aid

Doran, T. I. (1999). The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review of *Clinical Infectious Diseases*, 28(2), 384-394.

D' Hérelle F (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 165, 373-375.

Dublanchet A (2009). Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : Renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre.

Dublanchet, A. et Patey, O. (2011). La phagothérapie: passé et avenir (faits nouveaux et Procédure[s] pour une réhabilitation). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26, 165-175.

Dublanchet A, Patey O. Histoire de la phagothérapie. *Feuill. Biol.*, 2012; 53(304): p. 59-65

Duckworth, D. H., P. A. Gulig (2002). "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections." *Biodrugs* 16 (1): 57-62.

Edelman, D.C., and Barletta, J. (2003) Real-time PCR provides improved detection and titer determination of bacteriophage. *Biotechniques* 35: 368-375.

Ellis, EL et Delbrück, M. 1939. La croissance de bactériophages. *Journal of GenPhysiol* 22. 365-384.

Flint, S.J., L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello et A.M. Skalka, (2000). *Principes de Virologie*. ASM Press, Washington, and ISBN: 1-55581-127-2, pp: 3-15.

Gibson, U.E.M., Heid, C.A., and Williams, P.M. (1996) a novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research* 6: 995-1001.

Griffin, D.W., Gibson, C.J., Theurd, Lipp, E.K., Riley, K., Paul, J.H., Theurd, and Rose, J.B. (1999). Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial Indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Applied and Environmental Microbiology*; 65: 4118-4125.

Grossi, O. (2006). Évaluation de l'efficacité d'une suspension de bactériophages anti-Staphylococciques : corrélation *in vitro-in vivo*. Université de Médecine de Nantes.

Hagens, S. and Blasi, U. (2003). Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: A pilot study. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 318-323

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.

Hennes, K.P., and Suttle, C.A. (1995) Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1050-1055.

Hercher, M., Mueller, W., and Shapiro, H.M. (1979) Detection and discrimination of individual viruses by flow cytometry. *J HistochemCytochem*; 27: 350-352.

<http://fuhrmanlab.usc.edu>. consulté on juin. 2014

ICTV (2012). *Virus Taxonomy* : 2012 Release In: International Committee on Taxonomy of Viruses.  
[en ligne]. [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>](Consulté le 9/5/13).

Inal, J.M. (2003). Phage therapy : a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archiv umimmunologiae et therapie experimentalis*, 51, 237-244.

Inman, R.B., Schnos, M., and Howe, M. (1976) Location of the "variable end" of Mu DNA within the bacteriophage particle. *Virology* 72: 393-401.

Jensen, CE, HS Schrader, B. Rieland, TL Thompson, KW Lee, KW Nickerson et TA Kokjohn, (1998) .Prévalence de la large gamme d'hôtes bactériophages lytiques de Sphaerotilus natans, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Environ appliquée. Microbiol, 64. 575-580.

Khan MA, Satoh H, Mino T, Katayama H, Kurisu F and Matsuo T. (2002). Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. Water Science Technology; 46(1-2):39-43.

Kropinski, A. M. (2006). Phage therapy - Everything old is new again. Can J Infect Dis Med Microbiol; 17 (5): 297-306.

Lee, M.S., LeMaistre, A., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Freireich, E.J., Trujillo, J.M., and Stass, S.A. (1989). Detection of two Alternative bcr/abl mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia Chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. Blood 73: 2165-2170.

Loeffler. JM., Nelson D, Fischetti, VA. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. Science. 294: 2170-2172

Logan k.B., Ress G.F., Seeley N.D., and Primrose S.B. (1980). Rapid concentration of bacteriophage from large of freshwater: evaluation of positive charged microporous filters .J.virology.methods, 87-97

Marie, D., Brussaard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., and Vaulot, D. (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl Environ Microbiol 65: 45-52.

Martineau, A (2009). Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales. Université de Montréal, Faculté des études supérieures. Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine.

Matsuda, T., Freeman, TA., Hilbert, DW., Duff, M., Fuortes, M., Stapleton, PP., and Daly, JM. (2005). Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator Release and improves survival in a murine peritonitis model. Surgery. 137: 639-646

**Microbial Ecology 13: 225-232. Xenopoulos, M.A., and Bird, D.F. (1997). Virus à la sauce Yo-Pro: microwave-enhanced Staining for counting viruses by epifluorescence Microscopy. Limnol Oceanogr 42: 1648-1650.**

**Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.C., Billaudel, S. and Ferré V. (2000). Quantification of enterovirus RNA in sludge samples by single tube real-time RT-PCR, Biotechniques; 29, 88-93.**

**Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V.A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc.Natl.**

**Pepperell, C., Kus, J. V., Gardam, M. A., Humar, A., & Burrows, L. L. (2002). Low Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemother. Nov., 46(11), 3555-3560.**

**Porter, K.G., and Feig, Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol Oceanogr 25: 943-948.**

**Ruska, H. (1940). Die Sichtbarmachung der bacteriophagen Lyse im Übermikroskop. Die Naturwissenschaften 28: 45-46.**

**Ryan, K. J. (2004). Enterobacteriaceae. In K. J. Ryan, & C. G. Ray (Eds.), Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases (4th ed., pp. 343-371). USA: Mc Graw Hill,**

**Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site Analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Biotechnology 24: 476-480.**

**Shin, G.A., and Sobsey, M.D. (2003). Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. Appl Environ Microbiol 69: 3975-3978.**

**Signer, E.R. (1967). A plaque assay for lambda attachment. Virology 33: 352-354.**

**Skraber, Sylvain - (2003-). Intérêt des bactériophages en tant que témoin de contamination fécale et de présence de virus Entériques pathogènes dans les eaux de la rivière Moselle. UHP - Université Henri Poincaré**

**Sulakvelidze, A. et E. Kutter, (2005). Bactériophage thérapie chez les humains. Bactériophages: Biologie et Applications. CRC Press, Boca Ratan FL, ISBN: 8493-1336-8, pp: 381-436.**

**Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J.G. Morris Jr. (2001). Bacteriophage Therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy 45(3): 649-659.**

**Suttle, C.A. chan, A.M. , and Cottrell, M.T. (1990). Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. Nature 347 : 467-471.**

**Synnott, A. J., et al. (2009). Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. Applied and Environmental Microbiology; 75: 4483-4490**

**Twort, F.W., Lond, L.R.C.P., and Lond, M.R.C.S. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet, 189: 1241-1243.**

**Weinbauer, M.G., and Suttle, C.A. (1997). Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. Aquatic**

**Yekhlef, A. (2009). Modèles de stations d'épuration des eaux usées en Algérie. directeur d'unité de mila**

# *Annexe*

## ANNEXE.1

### 1-Bouillon nutritif (g/l)

Tryptone.....	10g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
pH=7.2	

### 2-Gélose nutritive (g/l)

Extrait de viande .....	1g
Peptone.....	5g
Agar.....	15g
pH=7.2	

### 3-Hecktoen (gélose)

Protéase .peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Sccharose.....	12g
Salicine.....	2g
Citrate de fer et d'ammonium.....	1.5g
Sels biliaire.....	9g
Fuschine acide.....	0.1g
Bleu de Bromothymol.....	10.065g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	13g
pH=7	

#### **4-Mac Conkey**

Peptone.....	20g
Lactose.....	10
Sel biliaire.....	1.5
Cristal violet.....	0.001
Rouge neutre.....	0.05
Chlorure de sodium.....	5
Agar.....	15

pH=7.2

#### **5-Gélose au sang**

Mélange spécial de peptones.....	23g
Amidon.....	1g
NaCl.....	5ml
Agar.....	10g
Sang de mouton.....	50ml

pH = 7.3

#### **6-Gélose demi molle (g/l)**

Peptone.....	10g
Extrait de viande .....	4g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	7g

pH=7.2

### **7-Mannitol mobilité**

Hydrolysate tryptique de caséine:.....	10,0 g
Mannitol:.....	7,5 g
Rouge de phénol:.....	0,4 mg
Nitrate de potassium.....	1,0 g
Agar:.....	3,5 g

pH = 7,6

### **8-Les réactifs utilisés dans la galerie biochimique API20E**

**JAMES**

**ZINC**

**RM : rouge de méthyle**

**VP : Voges-Proskauer**

**IND : indole**

**TDA : tryptophanase**

**Huile de vaseline**

# *Résumé*

## Résumé

Les bactériophages sont des agents antibactériens répartis largement dans l'environnement et peuvent être isolés du sol, de l'eau marine, l'eau douce et des écosystèmes d'eaux usées.

Cette étude présente les résultats de la recherche de bactériophages provenant des eaux usées de la station d'épuration de Chelghoum Laid. Trois prélèvements (eaux usées, eaux traitées et boues) ont été effectués le 06/04/2014.

La flore totale a été réalisée par la méthode d'étalement sur gélose nutritive, et la technique de plaque de lyse a été effectuée pour le criblage de bactériophages en eaux usées par 20 puits isolats non-identifiés. Cinq souches ont été soumises à différents tests phénotypiques d'identification.

Les résultats révèlent l'absence de phage dans les trois échantillons testés. Le dénombrement de la flore totale pour l'ensemble des trois échantillons indique une contamination élevée. Les cinq isolats sont identifiés comme *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* et *Bacillus anthracis*.

Cette étude envisage de développer la méthode d'isolement avec des souches de référence sensibles aux phages et d'utiliser des échantillons de taille adéquate pour une recherche quantitative.

**Les mots clés :** la flore totale, bactériophage, plaque de lyse, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* and *Bacillus anthracis*, Station d'épuration de Chelghoum Laid, eaux usées, boue.

## **Abstract**

Bacteriophages are antibacterial agents widely spread in the environment and can be isolated from soil, sea water, freshwater and wastewater ecosystems.

This study presents the results of bacteriophage isolation from wastewater treatment plant of Chelghoum El-Aid. Three samples (wastewater, treated water and sludge) were collected on 06.04.2014.

The total flora account was carried out by the spread method on nutrient agar, and the plaque assay test was used for phage isolation from wastewater using 20 unidentified pure isolates. Just five strains were subjected to various phenotypic tests.

The results indicate the absence of phage in the three tested samples. The enumeration of the total flora for all three samples indicates a high contamination. The five isolates were identified as *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* and *Bacillus anthracis*.

The main perspective of this study is to develop the bacteriophage isolation method by using sensitive type strains and to use adequate sample size for quantitative reaserch.

Keywords: Total flora count, plaque assay, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Bacillus anthracis*, wastewater treatment plant of Chelgoum El-Aid, wastewater, sewage

## ملخص

الفيروسات البكتيرية هي مضادات بكتيرية تنتشر على نطاق واسع في البيئة، و يمكن عزلها من التربة، المياه البحرية، المياه العذبة و النظم الإيكولوجية لمياه الصرف الصحي. تقدم هذه الدراسة نتائج عزل الفيروسات البكتيرية من مياه الصرف الصحي من محطة معالجة المياه لشلغوم العيد.

ثلاث عينات (مياه المجاري، المياه المعالجة و الوحل) تم الحصول عليها يوم 6 أبريل 2014= أجريت طريقة الاطباق المنتشرة لحساب العدد البكتيري الكلي في العينات الثلاث على اطباق الآجار، و استعمل إختبار تقدير المناطق الرائقة لعزل الفاج من مياه المجاري و الوحل باستخدام 20 عزلة بكتيرية نقية و غير مشخصة. خمسة مستعمرات معزولة تم تشخيصها بإختبارات الايضية و المظهرية.

نتائج هذا البحث تظهر عدم وجود الفاج في العينات الثلاث التي تم إختبارها، و العدد البكتيري الكلي للعينات يشير إلى تلوث عال للمياه المستعملة و الوحل، أما المزارع الخمسة فقد حددت على انها *Citrobacter freundii*، *Hafnia alvei* و عصيات الجمره الخبيثة .

المنظور الرئيسي من هذه الدراسة هو تطوير طريقة عزل البكتريوفاج باستخدام السلالات البكتيرية المرجعية الحساسة و كذلك استعمال عينات متعددة و مختلفة للبحث الكمي =

**الكلمات الرئيسية:** العدد البكتيري الكلي، البكتريوفاج، إختبار تقدير المناطق الرائقة، عصيات الجمره الخبيثة، *Citrobacter freundii*، *Hafnia alvei*، محطة معالجة المياه لشلغوم العيد، مياه المجاري، الوحل.