



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Microbiologie

**قسم :** الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

---

## **Isolement et Etude de quelques Entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug à Constantine**

---

**Présenté et soutenu par :** SAVADOGO Mahamadi

**Le :** 28/06/2016

BOUBKEIR Youssouf

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Mme BOUBEKRI K. (MCA - UFM Constantine)

**Rapporteur :** Mme BOUZERAIB L. (MAA - UFM Constantine)

**Examinatrice :** Melle MEZIANI M. (MAA - UFM Constantine)

*Année universitaire  
2015 - 2016*

# *Remerciements*

Nous remercions tout d'abord Allah Le Tout Puissant pour nous avoir accordé la santé, l'énergie et l'opiniâtreté nécessaire à la réalisation de ce modeste travail.

Nous remercions très singulièrement notre encadreur Mme BOUZERAIB L. pour avoir accepté diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de cette étude. Tout au long de la réalisation de ce mémoire, nous avons pu apprécier son enthousiasme, son savoir-faire, sa pédagogie, son sens de communication. Vous avez été la quand nos milieux de culture faisaient défauts et nous avons pu apprécier ensemble la bonne odeur de certaines bactéries. Merci pour tous ces bons moments.

Nous adressons également nos remerciements à :

- Mme BOUBEKRI K. Maître de conférences à l'UFM-Constantine pour l'honneur qu'elle nous fait de présider ce jury.
- Melle MEZIANI M. Maître assistante à l'UFM-Constantine d'avoir accepté d'apporter son jugement à ce travail.

Nous remercions aussi nos pays, qui ont bien voulu nous accorder cette bourse d'étude. Nos plus sincères gratitude vont vers ce beau pays, l'ALGERIE, qui nous a accueillis et suivi tout au long de notre parcours.

Nous saisissons cette occasion pour exprimer nos profonds respects et notre reconnaissance à l'ensemble du corps enseignant de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie plus particulièrement celui de la spécialité Microbiologie, pour avoir participé à notre formation graduée.

Merci à Mme ZOGHMAR S. responsable du laboratoire de microbiologie N°11 de la Faculté et son équipe, à Mme BOUZIDI N. et Mr SLOUGHI S. du laboratoire de biologie moléculaire qui nous ont beaucoup aidés tout au long de notre travail.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, nos amis, nos camarades ainsi que tous ceux qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

# Dédicace

*Je ne peux adresser les prémices de cette dédicace qu'à mes parents, premiers piliers de mon éducation, vous m'avez soutenu depuis mes débuts jusqu'à maintenant par vos bénédictions.*

*A ma chère mère*

*Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier sa juste valeur. Puisse Allah vous garder longtemps auprès de nous et vous bénir infiniment.*

*A la mémoire de mon père, paix à son âme.*

*A mon oncle, El Hadj Harouna OUEDRAOGO appelé aussi « Papa » pour tous les efforts qu'il a effectué et qu'il continue d'effectuer pour la bonne marche de mes études. Merci Papa.*

*A mes frères et sœurs Abdoul Salam, Idrissa, Balkissa et Mariam pour leur encouragement, leur sacrifice qui m'ont permis d'aller de l'avant.*

*A toute la communauté Burkinabè à (Salo H., Tamboura A., Ouédraogo F., Ouédraogo I., Bambara I., Zallé R...)*

*A mes professeurs de la faculté de SNV (Dr. Arabet D...)*

*A toute la communauté des étudiants étrangers à Constantine (en particulier Malienne)*

*A tous mes amis algériens Akram, Yahia, Meriem, Asma, Sara qui ont fait de mon séjour en Algérie un paradis sur terre. Merci à vous.*

*Enfin à tous ceux ou celles que j'ai eu l'immense plaisir de côtoyer.*

*Merci à vous tous*

*Mahamadi SAVADOGO*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, que Dieu me les gardent et protègent.*

*A mes frères et sœurs.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis sans citer les noms.*

*Youssef BOUBKEIR*

## Résumé

Les eaux usées sont susceptibles de renfermer et de véhiculer une grande variété d'agents pathogènes pour l'homme. Les organismes pathogènes présents dans les eaux usées d'une collectivité, en reflètent l'état sanitaire.

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif se retrouvant partout y compris les eaux usées. Ce sont les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et l'étude de quelques entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'oued Boumerzoug. Ainsi une évaluation préalable de la FTAM a été effectuée sur nos échantillons avant de procéder à des isolements sur milieux spécifiques ainsi qu'une identification par des méthodes microbiologiques standardisées puis une réalisation de profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées.

Sur trois échantillons étudiés, les résultats de la FTAM varient entre  $1.14 \cdot 10^6$  et  $13.8 \cdot 10^6$  UFC/ml qui témoignent d'une charge microbienne importante des eaux usées. Quant à l'isolement, sur un total de quatre germes recherchés, nous avons pu isoler et identifier 3 souches d'*E. coli* et une absence de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica* a été observée. Par contre d'autres germes ont été isolés comme *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Enterobacter agglomerans* et *Pseudomonas sp.*. Les profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées ont été aussi obtenus.

La présente étude nous a permis de récolter des données locales relatives à la présence de pathogènes et des indicateurs de contamination fécale tels qu'*E. coli*. et une contribution à l'extraction de l'ADN total des souches isolées.

**Mots clés :** Entérobactéries, eaux usées, Oued Boumerzoug, FTAM, isolement

## Abstract

The wastewater is likely containing and conveying a wide variety of pathogens for humans. Pathogenic organisms in wastewater of a community, reflected in the health status.

*Enterobacteria* represent one of the main families of negative Gram of bacilli being found everywhere including wastewater. These are the most involved in human infectious diseases especially in hospitals.

The purpose of our work is researching and studying of some pathogenic *Enterobacteria* in wastewater of oued Boumerzoug. A preliminary evaluation of the TMAF was performed on our samples before making isolations on specific media, and identification by standard microbiological procedures and a realization of the electrophoretic patterns of total DNA of the identified strains were done.

For the three samples studied, the results of the TMAF vary between  $1.14 \cdot 10^6$  and  $13.8 \cdot 10^6$  CFU/ml which reflect a significant microbial load of waste water. As for the isolation of a total of four germs sought we could isolate and identify 3 strains of *E. coli* and an absence of *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* and *Yersinia enterocolitica* was observed. Also other germs were isolated like *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani*, *Enterobacter agglomerans* and *Pseudomonas sp.* The electrophoretic patterns of total DNA identified strains were also obtained.

The present study allowed us to collect local data on the presence of pathogens and indicators of fecal contamination such as *E. coli*. and a contribution to the extraction of total DNA isolated strains.

**Key words:** Enterobacteria, wastewater, Oued Boumerzoug, TMAF, isolation

## المخلص

من المرجح ان مياه الصرف الصحي يمكن ان تحتوي وتنقل مجموعة واسعة من مسببات الأمراض للإنسان. الكائنات المسببة للأمراض في مياه الصرف الصحي لمجتمع ما، يعكس حالتها الصحية.

البكتيريا المعوية تمثل واحدة من العائلات الرئيسية من عصيات غرام السلبية التي تتواجد في كل مكان بما في ذلك مياه الصرف الصحي. وهذه هي الأكثر تورطاً في الأمراض المعدية للإنسان وخاصة في المستشفيات.

عملنا يتمثل في دراسة بعض من البكتيريا المعوية المسببة للأمراض في مياه الصرف الصحي وادي بمرزوق. وتم إجراء تقييم مسبق للبكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة لعيناتنا قبل عزلها من بيئات محددة فضلاً عن تحديدها بالطرق المكروبيولوجية الموحدة وتحقيق أنماط ألكتروفوروتية من الحمض النووي الكلي للسلاسل التي تم تحديدها.

في العينات الثلاثة المدروسة، نتائج البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة تختلف من  $1.14 \times 10^6$  و  $13.8 \times 10^6$  خلية / مل والتي تعكس كمية هامة من الميكروبات في مياه الصرف الصحي. أما بالنسبة لعزل مجموعه من أربعة جراثيم مطلوبة، تمكنا من عزل وتحديد ثلاث سلالات *E. coli* و غياب *Salmonella spp.* و *Shigella spp.* و *Yersinia enterocolitica*. بالمقابل جراثيم أخرى تم عزلها مثل *Proteus mirabilis* و *Proteus morganii* و *Enterobacter agglomerans* و *Pseudomonas sp.* . وقد تم أيضاً الحصول على أنماط الكتروفوروتية للحمض النووي الكلي لسلاسل التي تم تحديدها.

سمحت لنا هذه الدراسة بجمع البيانات المحلية المتعلقة بوجود ميكروبات ممرض ومؤشرات تلوث برازي مثل *E. coli*. والمساهمة في استخراج الحمض النووي الكلي لسلاسل التي تم عزلها.

**الكلمات المفاتيح:** البكتيريا المعوية، مياه الصرف الصحي، واد بمرزوق، FTAM، عزل.

## Tables des Matières

Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des organigrammes.....	viii
Introduction.....	1

## Bibliographie

Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries.....	3
1. Définition et caractéristiques généraux.....	3
2. Position taxonomique.....	6
3. Etudes de quelques genres particuliers.....	8
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	8
3.1.1. Habitat.....	8
3.1.2. Mode de transmission.....	8
3.1.3. Pouvoir pathogène.....	9
3.2. <i>Shigella</i> .....	10
3.2.1. Habitat.....	10
3.2.2. Mode de transmission.....	10
3.2.3. Pouvoir pathogène.....	11
3.3. <i>Salmonella</i> .....	11
3.3.1. Habitat.....	11
3.3.2. Mode de transmission.....	12
3.3.3. Pouvoir pathogène.....	12
3.4. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	12
3.4.1. Habitat.....	12
3.4.2. Mode de transmission.....	13
3.4.3. Pouvoir pathogène.....	13
4. Bases moléculaires de l'antibiorésistance chez les entérobactéries.....	13
4.1.Antibiotiques.....	13
4.1.1. Définition.....	13

4.1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques.....	14
4.2.Résistance aux antibiotiques.....	15
4.2.1. Résistance naturelle.....	15
4.2.2. Résistance acquise.....	16
Chapitre II : Généralités sur les eaux usées.....	17
1. Définition des eaux usées.....	17
2. Origines des eaux usées.....	17
3. Bactéries pathogènes des eaux usées.....	18
Chapitre III : Analyse de l'ADN bactérien.....	22
1. Extraction et purification.....	22
1.1.Extraction de l'ADN.....	22
1.2.Méthodes de purification.....	22
2. Electrophorèse : Analyse des fragments d'acides nucléiques.....	23

## **Matériel et Methodes**

1. Cadre d'etude.....	25
2. Matériel.....	25
2.1.Matériel de prélèvements.....	25
2.2.Matériel de laboratoire.....	25
3. Méthodes.....	27
3.1.Prélèvement.....	27
3.1.1. Lieu de prélèvement.....	27
3.1.2. Période de prélèvement.....	27
3.1.3. Technique de prélèvement.....	28
3.1.4. Transport des échantillons.....	28
3.2.Recherche des germes.....	28
3.2.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).....	28
3.2.2. Pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification.....	29
3.2.3. Profil électrophorétique de l'ADN total.....	35

## **Résultats et discussion**

Résultats.....	36
1. Dénombrement de la FTAM.....	36

2. Aspects cultureux.....	36
2.1.Examen macroscopique.....	36
2.2.Examen microscopique.....	38
3. Test de l'oxydase.....	38
4. Test de catalase.....	38
5. Test de nitrate réductase.....	38
6. Recherche de l'utilisation du glucose, du lactose, de la production de gaz et H <sub>2</sub> S sur milieu KIA et TSI.....	38
7. Recherche de l'utilisation du citrate.....	39
8. Test du mannitol mobilité.....	40
9. Recherche de l'indole et mise en évidence de l'uréase et de la TDA.....	40
10. Le test de RM et du VP.....	41
11. Recherche de la $\beta$ -galactosidase : test ONPG.....	42
12. Galerie API 20 E.....	42
13. Profils électrophorétiques de l'ADN.....	47
Discussion.....	48
Conclusion.....	51

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

***ANNEXES***

**Liste des abréviations**

- ADH : Arginine Dihydrolase
- ADN: Acide désoxyribonucléique
- AMY : Amygdaline
- AND: Acide désoxyribonucléique
- API : Appareillage et Procédé d'Identification
- ARA : Arabinose
- ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
- BET : bromure d'éthidium
- CIT : Citrate de Simmons
- DCL : Milieu Désoxycholate citrate lactosée
- ECAD: *Escherichia coli* à adhésion
- ECEA : *Escherichia coli* entéroaggrégatifs
- ECEP : *Escherichia coli* Entéropathogènes
- ECET : *Escherichia coli* Entérotoxinogène
- EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
- EHEC : *Escherichia coli* Entérohémorragiques
- EIEC : *Escherichia coli* Entéro-invasifs
- EPEI : Eau peptonée exempte d'indole
- ERU : Eau Résiduaire Urbaine
- FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile
- GEL : Gélatinase
- GLU : Glucose
- GN : Gélose nutritive
- H<sub>2</sub>S : Sulfure dihydrogène
- HCl: Chlorure d'hydrogène
- IND : Indole
- kb: kilobase
- KIA : Kligler-Hajna
- KOH: Hydroxyde de potassium
- LDC : Lysine Décarboxylase
- LPS : lipopolysaccharide

- MAN : Mannose
- MEL : Mélibiose
- Ng : nanogramme
- ODC : Ornithine décarboxylase
- ONP : Orthonitrophényl
- ONPG : Orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyrannoside
- pb: Paire de base
- PCA : Plate Count Agar
- PDA: Phenylalanine désaminase
- pH : Potentiel hydrogène
- PLP : Protéines de liaison aux pénicillines
- RHA : Rhamnose
- RM : Rouge Méthyle
- rpm: Rotation par minute
- S: Svedberg
- SAC : Saccharose
- SFB : Sélénite F Broth
- SHU : syndrome hémolytique et urémique
- SOR : Sorbitol
- SS : Salmonella-Shigella
- STEC : Shiga Toxin *Escherichia Coli*
- TBE : Tris Borate EDTA
- TDA : Tryptophane désaminase
- TSI : Triple Sugar Iron Agar
- UFC : Unité Formant Colonie
- VBNC: Viable But Non Culturable
- VP : Voges-Proskauer

## Liste des figures

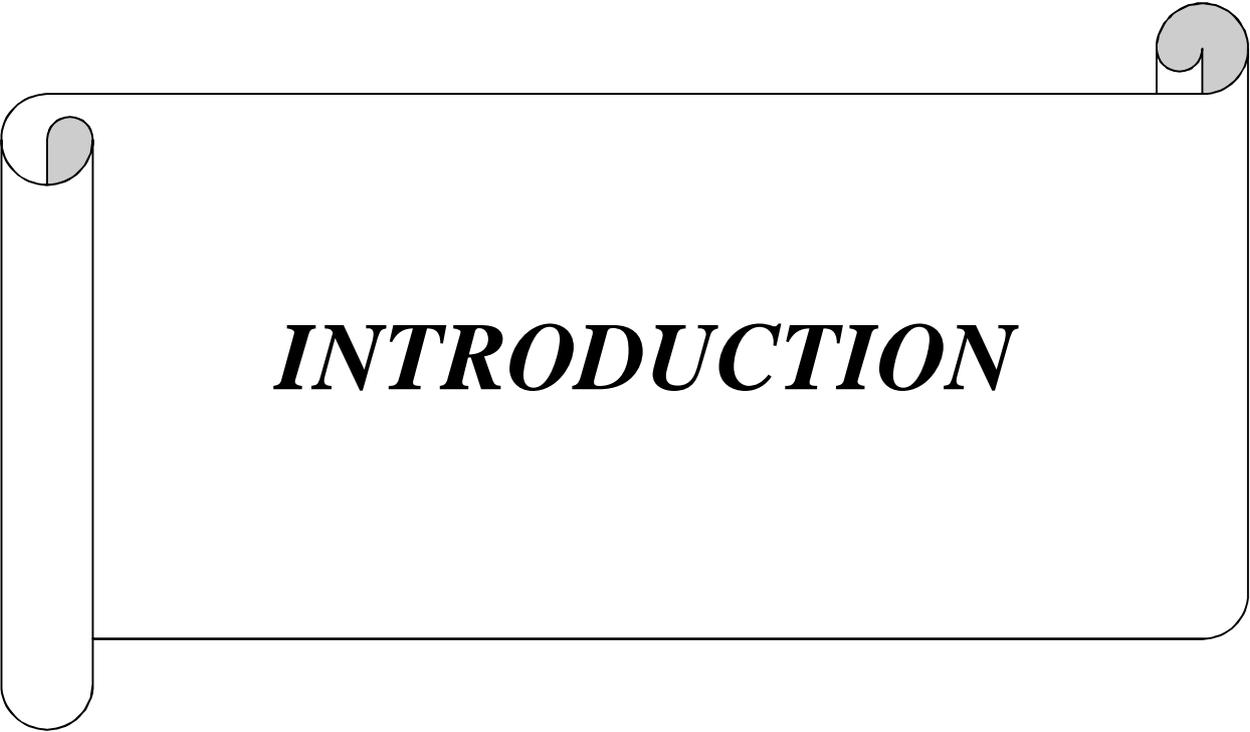
- **Figure 1** : Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae* .....4
- **Figure 2** : Mécanismes d'action des antibiotiques.....14
- **Figure 3** : Sites de prélèvements dans oued Boumerzoug.....26
- **Figure 4** : Aspect des colonies sur BCP.....36
- **Figure 5** : Aspect des colonies sur milieu SS.....37
- **Figure 6** : Aspect des colonies sur milieu DCL.....37
- **Figure 7** : Révélation du test d'oxydase.....38
- **Figure 8** : Résultat du test de catalase.....38
- **Figure 9** : Aspects des colonies testées sur le milieu KIA.....39
- **Figure 10** : Aspect sur milieu citrate de Simmons.....39
- **Figure 11** : Aspect du milieu Mannitol-Mobilité.....40
- **Figure 12** : Résultat du test de l'uréase.....40
- **Figure 13** : Aspect du test de l'indole.....41
- **Figure 14** : Aspect du test de la TDA.....41
- **Figure 15** : Test du rouge de méthyle (RM).....41
- **Figure 16** : Résultats du test d'ONPG.....42
- **Figure 17** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 1.....43
- **Figure 18** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 2.....43
- **Figure 19** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 3.....44
- **Figure 20** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 4.....44
- **Figure 21** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 5.....45
- **Figure 22** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 6.....45
- **Figure 23** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 7.... .....46
- **Figure 24** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 8.....46
- **Figure 25** : Profils électrophorétiques de l'ADN des souches.....47

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Les caractères d'identification biochimiques des genres les plus fréquemment rencontrés.....	5
<b>Tableau 2</b> : Classification d'entérobactéries courantes et rares.....	7
<b>Tableau 3</b> : Principales maladies d'origine hydrique et les bactéries pathogènes associées...20	
<b>Tableau 4</b> : Périodes de prélèvements des échantillons.....	27
<b>Tableau 5</b> : Valeurs moyennes en UFC/ml du dénombrement sur PCA.....	36
<b>Tableau 6</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 1.....	42
<b>Tableau 7</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 2.....	43
<b>Tableau 8</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 3.....	43
<b>Tableau 9</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 4.....	44
<b>Tableau 10</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 5.....	44
<b>Tableau 11</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 6.....	45
<b>Tableau 12</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 7.....	45
<b>Tableau 13</b> : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 8.....	46

**Liste des organigrammes**

**Organigramme 1** : Etapes pour l'évaluation de la FTAM.....28



***INTRODUCTION***

## Introduction

Les entérobactéries sont des bactéries Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, retrouvés partout dans le sol dans l'eau et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elles comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, la rapidité de leur multiplication, l'acquisition fréquente de mécanisme de résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier. [1]

Les eaux usées représentent à la fois une ressource et un danger. Les eaux usées non traitées renferment divers organismes excrétés, y compris les agents pathogènes, dont le type et le nombre dépendent des niveaux de fond des infections correspondantes dans la population. Les flambées épidémiques provoquent une augmentation des concentrations d'agents causals dans les eaux usées et les excréta. Les types et les concentrations d'agents pathogènes pouvant être très variables. [2]

Ces organismes peuvent contaminer les cultures, les sols, les eaux de surface, les eaux souterraines. Les eaux usées représentent un important véhicule d'agents biologiques et chimiques issus de l'activité humaine et/ou industrielle. Les agents pathogènes peuvent être transmis à l'homme lors du contact direct avec les eaux usées ou indirectement par la consommation de cultures irriguées avec ces eaux usées, ou encore par des produits d'origine animale. [3]

Parmi les problématiques les plus répandues et qui s'écoulent actuellement dans le monde, on cite celle de la réutilisation des eaux brutes surtout en agriculture qui consomme plus de 80% des ressources hydriques exploitées et aussi l'utilisation pour la consommation. [3]

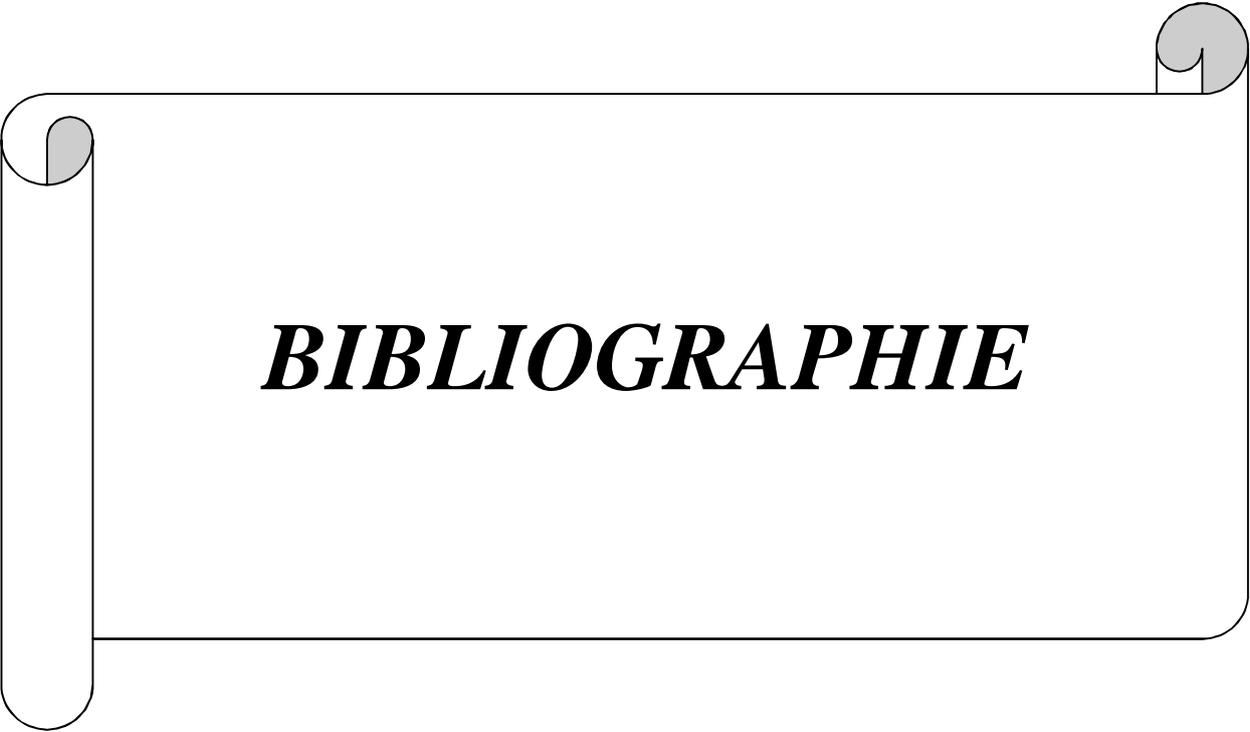
Nous nous sommes intéressés aux eaux usées d'oued Boumerzoug de Constantine dans le but de récolter des données locales pour évaluer la présence de pathogènes et des indicateurs de contamination fécale tels qu'*E. coli*.

L'objectif de notre travail est l'isolement et l'étude de quelques entérobactéries pathogènes spécifiquement *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica*

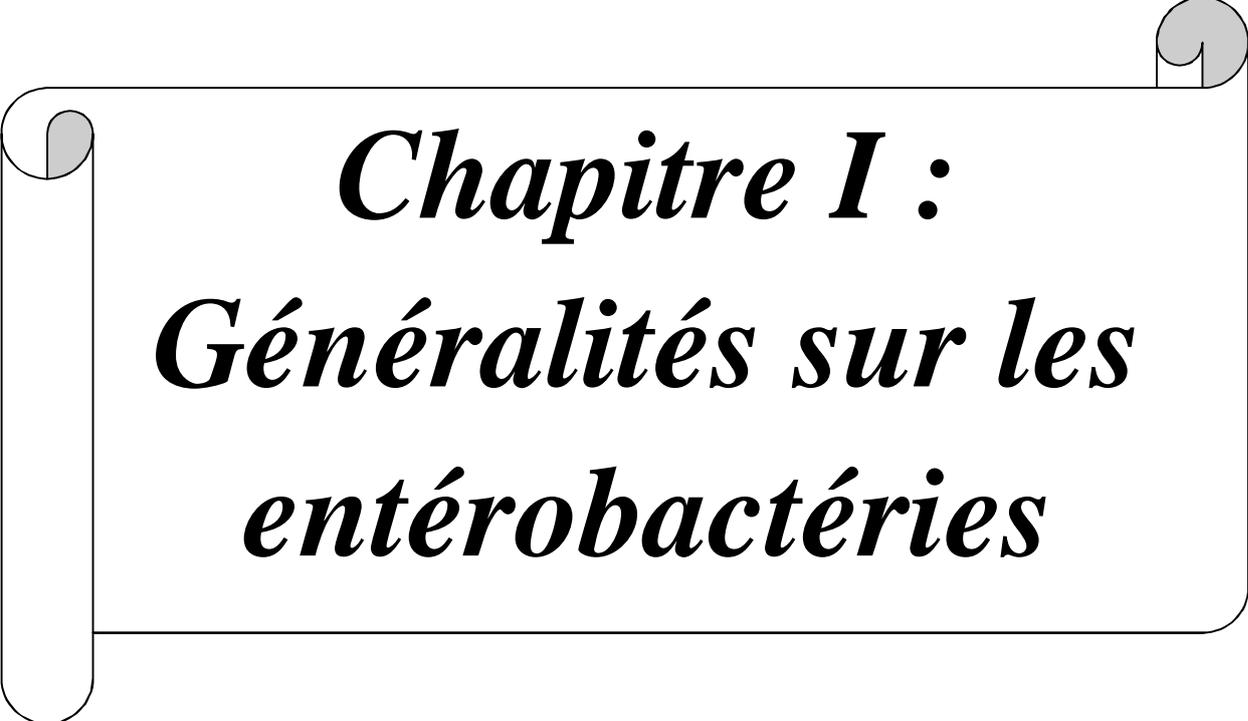
dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug, un écosystème constituant une niche écologique.

Pour développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Evaluation de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) de ces eaux
- Isolement et identification de ces entérobactéries pathogènes
- Extraction et visualisation de l'ADN total des souches identifiées.



***BIBLIOGRAPHIE***



***Chapitre I :***  
***Généralités sur les***  
***entérobactéries***

## Chapitre I : Généralités sur les entérobactéries

### 1. Définition et caractéristiques générales

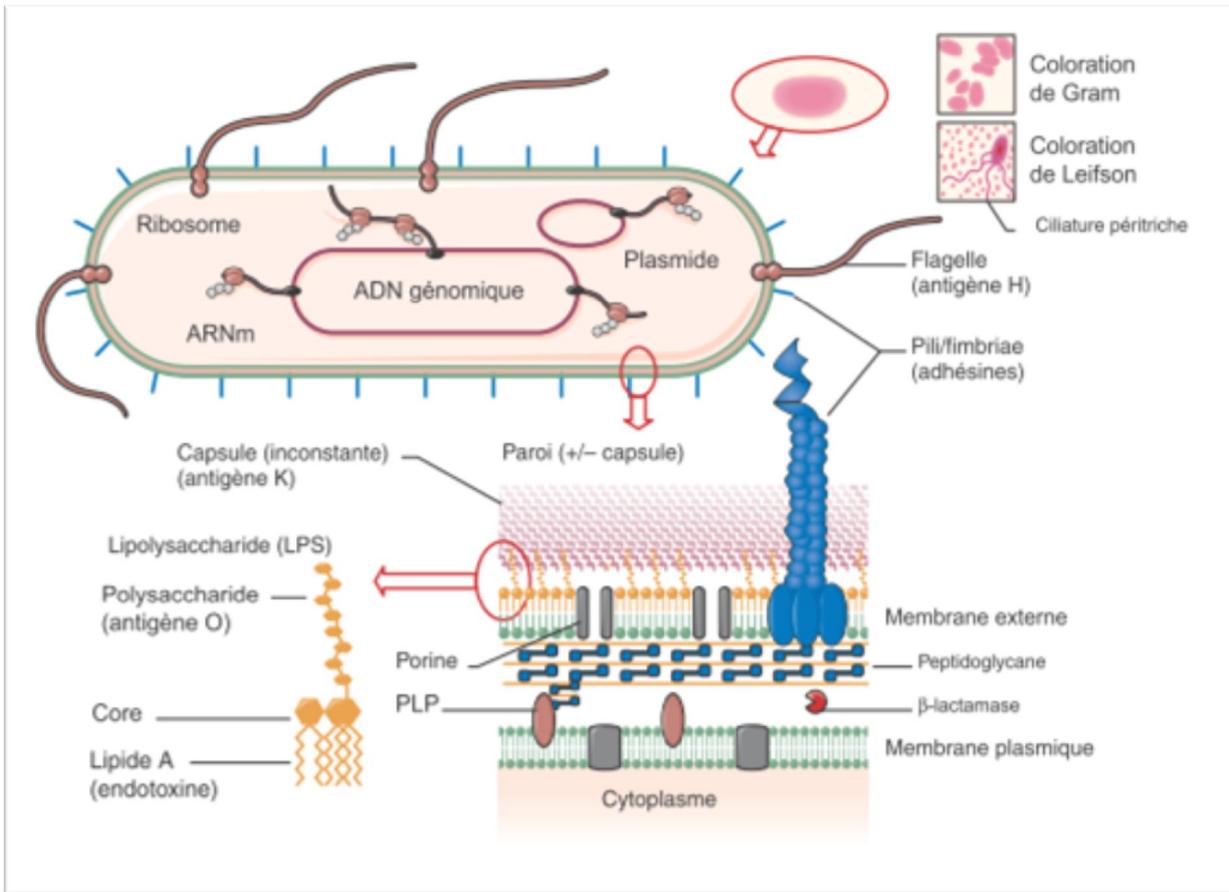
Les entérobactéries constituent une famille bactérienne hétérogène regroupant un grand nombre d'espèces. Au niveau phénotypique, ce sont des bacilles Gram négatif droits ; mobiles par flagelles péritriches, ou immobiles (Figure1) ; non sporulés ; aérobies facultatifs, produisant de l'acide à partir du glucose ; pas de besoin en sodium, ni de stimulation ; catalase positive ; oxydase négative ; réduisent habituellement les nitrates en nitrite (pas en  $N_2$ ) ; ARNr 16S de gamma-protéobactéries. [4] [5]

Les différences entre les nombreux genres et espèces viennent de critères plus précis (Tableau 1), comme la fermentation des différents sucres, la production ou non de sulfure, la production d'indole, la production d'uréase, la présence ou l'absence d'enzymes du métabolisme (désaminases, décarboxylases)...etc. [6]

Leur principale particularité commune est d'être présente dans la flore digestive de l'homme et des animaux à sang chaud. Leur distribution dans la nature est néanmoins plus large, puisqu'on les retrouve notamment chez les végétaux et dans l'environnement (sol et eau). Par leur particularité métabolique, certaines entérobactéries participent au cycle naturel des matières organiques, d'autres peuvent coloniser et dégrader des produits agroalimentaires ou encore provoquer des maladies parfois graves chez l'homme ou chez l'animal. [4]

La famille présente une grande facilité de culture : les milieux les plus simples (gélose ordinaire) suffisent et le substrat énergétique de base (glucose) est également suffisant. La température optimale de développement se situe entre 24 et 37°C (germes mésophiles). [4]

Toutes les entérobactéries possèdent des antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O qui correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS) et qui constituent les endotoxines des bactéries à Gram négatif. Les espèces mobiles possèdent en plus des antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique, constitués de flagellines. Certaines souches possèdent en plus un antigène K qui masque l'antigène O, et qui correspond à une enveloppe polysidique constituant une véritable capsule et donnant un aspect muqueux. [6]



**Figure 1** : Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae*. [7]

**Tableau 1** : Les caractères d'identification biochimiques des genres les plus fréquemment rencontrés. [8]

	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Levinea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus morganii</i>	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Providencia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Pseudotuberculosis</i>
Mobilité	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	+ ou (+)	-	+ ou (+)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
H <sub>2</sub> S	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
LDC	+	-	-	d	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ODC	+	-	+	d	d	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
ADH	-	-	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
TDA, PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Indole	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	+	-	+	+	D	-	-
Citrate de Simmons	+	+	+	-	-	+	+	d*	+	D	d	-	+	+	-	-	-
Malonate	-	-	d	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	-	-	-	d*	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Gaz/glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	d	d	-	-	-
Mannitol	+	+	+	d	d	+	+	+	+	-	-	-	+	d	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	d	d	+	+	+	-	-	-	-	d	-	-	-	+
Saccharose	-	d	d	d	-	+	+	-	+	+	d	d	-	d	+	-	-
Arabinose	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d
Inositol	d	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-	-
Aldonitol	-	-	d	-	-	+	d	-	d	-	-	-	+	d	-	-	-
Galacturonate	-	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	d

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

d : différents types biochimiques

+\* et d\* : positif à 22°C, négatif à 37°C

+\* : positif lent (uréase+ en 18-24 heures)

(+) : positif en 3 à 7 jours

## 2. Position taxonomique

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Si le nom de famille est toujours maintenu, en revanche le classement (Tableau 2) des bactéries dans la famille a beaucoup évolué. [9]

Actuellement, les entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARNr 5S et 16S dans :

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteria*.
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre : *Enterobacteriales*.
- Famille : *Enterobacteriaceae*.

44 genres dont les genres récents *Alterococcus*, *Arsenophorus*, *Brenneria*, *Pectobacterium*, *Raoultella*, *Samsonia*, *Sodalis*. [10]

Les genres de cette famille sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae*. [11]

**Tableau 2** : Classification d'entérobactéries courantes et rares. [10]

	Genres	Espèces
<b>Entérobactéries Courantes</b>	<i>Escherichia</i>	Six espèces: <i>Escherichia coli</i> ...
	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella bongori</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. subterranean</i> ...
	<i>Shigella</i>	Quatre espèces : <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> .
	<i>Citrobacter</i>	Douze espèces : <i>Citrobacter freundii</i> , <i>C. youngae</i> , <i>C. braakii</i> , <i>C. koseri</i> ...
	<i>Klebsiella</i>	Quatre espèces : <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae subsp. ozaenae</i> ...
	<i>Enterobacter</i>	Quatorze espèces : <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazakii</i> ...
	<i>Hafnia</i>	Espèce unique : <i>Hafnia alvei</i>
	<i>Serratia</i>	Onze espèces : <i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. rubidaea</i> ...
	<i>Proteus</i>	Six espèces : <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> ...
	<i>Morganella</i>	Une espèce : <i>Morganella morganii subsp. Morganii</i>
	<i>Providencia</i>	Cinq espèces : <i>Providencia alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> ...
	<i>Yersinia</i>	Onze espèces : <i>Yersinia pestis</i> , <i>Y. enterocolitica subsp. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> ...
		<i>Erwinia</i>
<b>Entérobactéries rare ou récemment décrites</b>	<i>Cedecea</i>	
	<i>Ewingella</i>	
	<i>Pantoea</i>	
	<i>Rahnella</i>	
	<i>Budvicia</i>	
	<i>Buttiauxella</i>	
	<i>Kluyvera</i>	
	<i>Leclercia</i>	
	<i>Moellerella</i>	
	<i>Trabulsiella</i>	
	<i>Yokenella</i>	
	<i>Edwardsiella</i>	
	<i>Leminorella</i>	
	<i>Obesumbacterium</i>	
	<i>Pragia</i>	
	<i>Photorhabdus</i>	
<i>Tatumella</i>		
<i>Xenorhabdus</i>		

### 3. Etudes de quelques genres et espèces particuliers

#### 3.1. *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae*. Cependant, au sein de ce genre, l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité des isolats humains. L'espèce *E. coli* présente une grande diversité sur le plan génétique et sur le plan pouvoir pathogène. [7]

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. [12]

##### 3.1.1. Habitat

Les *E. coli* sont des hôtes normaux du tube digestif, de la partie distale de l'iléon et du colon de l'homme et de la plupart des animaux à sang qu'ils colonisent dès les premières heures de la naissance. [8]

La présence de cette bactérie dans le sol, l'eau et/ou les aliments témoigne d'une contamination fécale et suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent. On considère que leur présence rend l'eau ou les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation. [4]

##### 3.1.2. Mode de transmission

Les études d'épidémiologie analytique et les investigations d'épidémies ont permis d'améliorer les connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination des Shiga Toxin *Escherichia coli* (STEC). A l'heure actuelle, les quatre principales voies d'infection à EHEC sont l'ingestion d'aliments, la transmission hydrique (eau de boisson ou de baignade), la transmission interhumaine et le contact avec les animaux de ferme et leur environnement. [13]

- La majorité des infections est le résultat d'une transmission alimentaire. En effet, un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié épidémiologiquement à la consommation de denrées animales. La viande de bœuf constitue la source majeure de contamination suite principalement à une cuisson insuffisante. [14] [15]

- Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau de boisson ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades. [13]
- Le portage sain humain de STEC existe mais semble rare et transitoire. La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades. [16] [17]
- La transmission d'*E. coli* O157:H7 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leurs déjections, a été décrite lors de cas sporadiques mais aussi lors d'épidémies. [13]

### 3.1.3. Pouvoir pathogène

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes). Les infections à *E. coli* sont de deux types : infections intestinales à type de diarrhée et infections extra-intestinales. [18] [7]

Les *E. coli* entériques ou intestinaux sont responsables de gastro-entérites infantiles ou de diarrhée des voyageurs. [4]

On distingue six pathovars entérovirulents :

- Les ECEP : *E. coli* entéropathogènes responsables de gastro-entérites infantiles. Elles ne sont ni invasives ni toxiques mais peuvent adhérer aux membranes des entérocytes et provoquer la destruction de leurs microvillosités. S'ensuit une diarrhée aqueuse importante mais autolimitée. [7] [4]
- Les ECET : *E. coli* entérotoxigènes sont une cause fréquente de diarrhée chez les enfants dans les pays en voie de développement. Ils sont aussi régulièrement responsables de la diarrhée du voyageur. [19]
- Les EIEC : *E. coli* entéro-invasifs encore appelés *Escherichia coli* shigella-like, responsables de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale. [20]
- Les EHEC : *E. coli* entérohémorragiques responsables d'épidémies de diarrhées sanglantes d'origine alimentaire pouvant se compliquer de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'enfant par production de Shiga toxines. [7]

- Les ECEA : *E. coli* entéroaggrégatifs provoquent une diarrhée persistante chez les enfants, particulièrement dans les pays en voie de développement. [19]
- Les ECAD : *E. coli* à adhésion diffuse qui seraient responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant. [7]

Les *E. coli* extradiigestifs (extra-intestinaux), sont responsables d'infections urinaires (*E. coli* uropathogènes), de septicémies, prostatites, méningites... Ces germes ne produisent pas d'entérotoxines et n'entraînent pas l'apparition de diarrhées. [4]

### 3.2. *Shigella*

Ces bactéries furent décrites la première fois par Chantemesse et Widal en 1888. Ils avaient isolé des selles de malades présentant un syndrome dysentérique. [8]

Nommé *Shigella* en l'honneur du bactériologiste japonais Kiyoshi SHIGA qui a découvert le bacille de la dysenterie en 1897. [21]

Bien que faisant partie sur le plan génétique de l'espèce *Escherichia coli*, le genre *Shigella* a été conservé dans la taxonomie pour des raisons médicales. Ce genre comprend quatre « espèces » ou sous-groupes A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs serotypes : groupe A, *S. dysenteriae* avec 15 serotypes ; groupe B, *S. flexneri* avec 6 serotypes ; groupe C, *S. boydii* avec 18 serotypes ; et groupe D, *S. sonnei* avec un seul serotype. [7]

#### 3.2.1. Habitat

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines. Elles ne font pas partie de la flore intestinale normale. On ne les retrouve que chez les malades, les convalescents et les rares porteurs sains. [22]

Ils peuvent survivre relativement longtemps dans le milieu externe : 10-11 jours dans les matières fécales, 8 jours sur les vêtements des malades et 2-3 jours dans l'eau. [4]

#### 3.2.2. Mode de transmission

La transmission est directe ou indirecte par voie fécale-orale à partir d'un malade ou d'un porteur. Les mauvaises pratiques d'hygiène contribuent à propager l'infection de façon directe, par contact physique, ou de façon indirecte, par contamination des aliments.

La transmission par l'eau, le lait, les blattes et les mouches peut survenir par suite de la contamination fécale directe. La dose infectante est généralement comprise entre 10 et 100 bactéries. [21] [4]

### 3.2.3. Pouvoir pathogène

*S. dysenteriae* type 1 ou bacille de Shiga est l'agent de la dysenterie bacillaire *stricto sensu*. [7]

Les autres sérotypes provoquent des colites infectieuses chez l'adulte et des gastroentérites chez l'enfant. Les *Shigella* provoquent des ulcérations de la muqueuse intestinale et une réaction inflammatoire. En conséquence, les selles sont sanglantes avec des leucocytes, des glaires et des fausses membranes, douleurs abdominales, épreintes et ténésme caractérisent le syndrome dysentérique. Les localisations extra-digestives sont peu fréquentes. Les moins rares sont les infections urinaires. On observe parfois des formes bactériémiques, des arthrites, des méningites. [23]

### 3.3. *Salmonella*

Les salmonelles sont des entérobactéries, pour la plupart pathogènes pour l'homme, agent de nombreuses infections comme les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, de gastro-entérites et de toxi-infections alimentaires parfois collectives. Ces maladies sont à déclaration obligatoire. [4]

Les hybridations ADN/ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongorii*, qui est exceptionnellement isolée chez l'homme. L'espèce *S. enterica* est divisée en six sous-espèces. [7]

#### 3.3.1. Habitat

Le réservoir naturel est constitué par le tube digestif des espèces contaminées : mammifères (y compris l'homme), volailles, reptiles, escargots, grenouilles, animaux de compagnie (chiens et chats)... Les déjections de ces espèces peuvent contaminer le sol et/ou l'eau. Si elles ne peuvent s'y multiplier de manière significative, elles peuvent y survivre, en particulier dans le sol, pendant plusieurs semaines ou même plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables. [4] [8]

### 3.3.2. Mode de transmission

Les salmonelles sont éliminées par les matières fécales, et de manière inconstante par les urines. La maladie est contractée par absorption d'eau ou d'aliments contaminés, directement ou indirectement, par des excréments. [8]

### 3.3.3. Pouvoir pathogène

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes à l'intérieur du genre *Salmonella* :

- Les salmonelles majeures, agents des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes – *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*. Ces sérovars sont responsables de septicémies à point de départ lymphatique par envahissement des ganglions mésentériques.
- Les autres sérovars « mineurs » habituellement responsable de toxi-infections alimentaires qui se manifestent par des gastro-entérites avec diarrhées et vomissements survenant dans les 8 à 10 heures suivant l'injection de l'aliment contaminant et dont l'évolution est en règle spontanément favorable dans quelques jours. [7]

## 3.4. *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* s'imposa en 1962, par la vague épizootique qui détruisit les élevages de chinchillas d'Europe occidentale. Elle atteignit ensuite les lièvres puis les porcs. A partir de 1964, les cas humains apparaissent et, les années suivantes, la liste des espèces atteintes et celle des infectés ne cessent de s'accroître. Par la suite, la découverte de souches gardées en collection, isolées aux Etats-Unis dès 1939 ou en Suisse en 1949, montra qu'en fait cette espèce attendait seulement les conditions nécessaires à sa diffusion. [8]

### 3.4.1. Habitat

*Y. enterocolitica* a un réservoir très vaste : environnement (eaux, sols), ou animaux (rongeurs, porcs, etc.), avec souches adaptées ou non à des espèces animales voire à l'homme. Ainsi, les biovars 4 (Sérogroupe O : 3), 3 (O : 5) et 2 (O : 9) sont les plus fréquents chez l'homme en Europe. [7]

### 3.4.2. Mode de transmission

La transmission par voie féco-orale est la plus importante; elle se fait par l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminées, ou par un contact avec des animaux ou des personnes infectés. [24]

Des cas de transmissions nosocomiales et de transmission par des produits sanguins infectés ont été signalés. [25]

### 3.4.3. Pouvoir pathogène

*Y. enterocolitica* est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant, d'adénite méésentérique chez l'adolescent et l'adulte jeune. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur un terrain fragilisé, immunodéprimé, et des manifestations cliniques variées ont été décrites (abcès profonds, endocardite, méningite, etc.). [7]

## 4. Bases moléculaires de l'antibiorésistance chez les entérobactéries

La connaissance des bases moléculaires de la résistance naturelle et acquise (caractéristiques et variété des supports génétiques, multiplicité des mécanismes impliqués, différents modes de transfert des déterminants de la résistance entre bactéries) est indispensable pour comprendre comment l'utilisation des antibiotiques exerce une pression de sélection sur les micro-organismes et influence leur état de résistance. [26]

### 4.1. Antibiotiques

#### 4.1.1. Définition

Les antibiotiques sont des molécules chimiques ou de synthèses capables de détruire les micro-organismes ou du moins de limiter de manière significative leur multiplication. Ce terme est généralement réservé aux molécules dont l'action est antibactérienne (bactéricides ou bactériostatiques). [4]

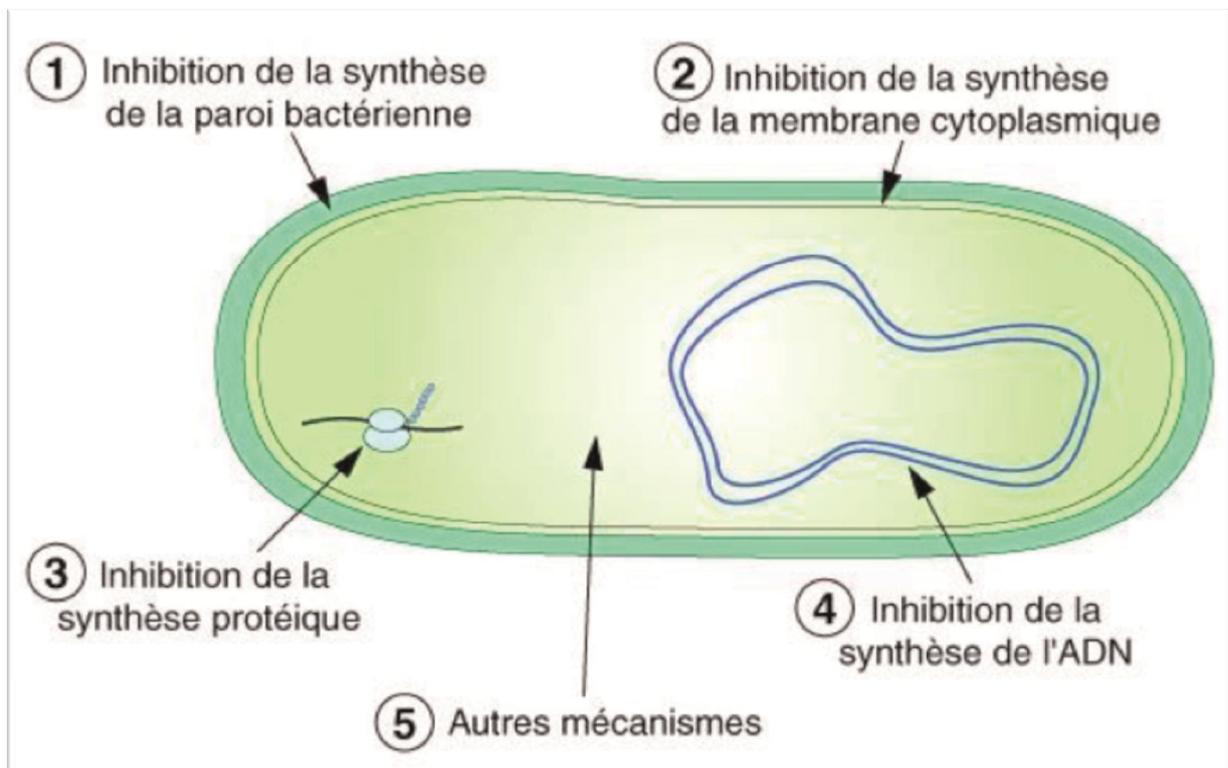
Ils agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires perturbant une étape essentielle du métabolisme des bactéries (synthèse protéique, synthèse des acides nucléiques, réplication, transcription, transport transmembranaire...) [27]

#### 4.1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques, contrairement aux antiseptiques, agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises (Figure 2) telles que la synthèse de la paroi ( $\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), la réplication/transcription de l'ADN (4-quinolones, rifampicine, sulfamides, triméthoprime), la synthèse protéique (aminosides, tétracycline, macrolides et apparentés, chloramphénicol) ou encore la respiration cellulaire (polymyxines, daptomycine).

Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques le plus souvent intracellulaires. [28]

Les antibiotiques les plus utilisés pour lutter contre les infections humaines interfèrent avec les réactions structurales ou physiologiques qui sont particulières aux pathogènes infectieux. Ceci est possible car les bactéries sont physiologiquement très différentes des eucaryotes. Par conséquent, les antibiotiques antibactériens peuvent exploiter ces différences et détruire les « envahisseurs » sans dommages significatifs à l'hôte humain. [29].



**Figure 2** : Mécanismes d'action des antibiotiques. [30]

## 4.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne se définit comme la capacité de continuer à croître ou à survivre en présence de l'antibiotique. Les conditions d'activité d'un antibiotique sont de posséder une cible spécifique, de demeurer sous forme active, d'accéder à la cible et d'interagir efficacement avec elle en la désactivant.

Il existe de nombreux mécanismes aboutissant à l'expression de la résistance et suivant son caractère inné ou acquis : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle est programmée sur le génome et constante à l'intérieur du taxon ; elle constitue un critère d'identification stable d'une espèce. Les résistances acquises sont quant à elles consécutives à des modifications de l'équipement génétique. [31]

### 4.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien. Elle peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique qui est une conséquence des différences existant entre les structures pariétales bactériennes, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique, ou encore à l'absence de la cible. [32]

La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien. [33]

Ainsi, les membres de la tribu des *Proteae* sont naturellement résistants aux nitrofuranes et à la colistine. Concernant la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines, les entérobactéries sont classiquement divisées en quatre classes :

- Celles qui ne produisent pas naturellement de  $\beta$ -lactamase comme *Salmonella* et *Proteus mirabilis* ou produisent une céphalosporinase à très bas niveau comme *Escherichia coli* et *Shigella* (classe 1) ;
- Celles qui produisent naturellement une pénicillinase comme *Klebsiella*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalo-naticus* et *Escherichia hermanni* (classe 2) ;

- Celles (les plus nombreuses) qui produisent naturellement une céphalosporinase (classe 3) ; et
- Celles qui produisent à la fois une pénicillinase et une céphalosporinase comme *Yersinia enterocolitica* (classe 4).

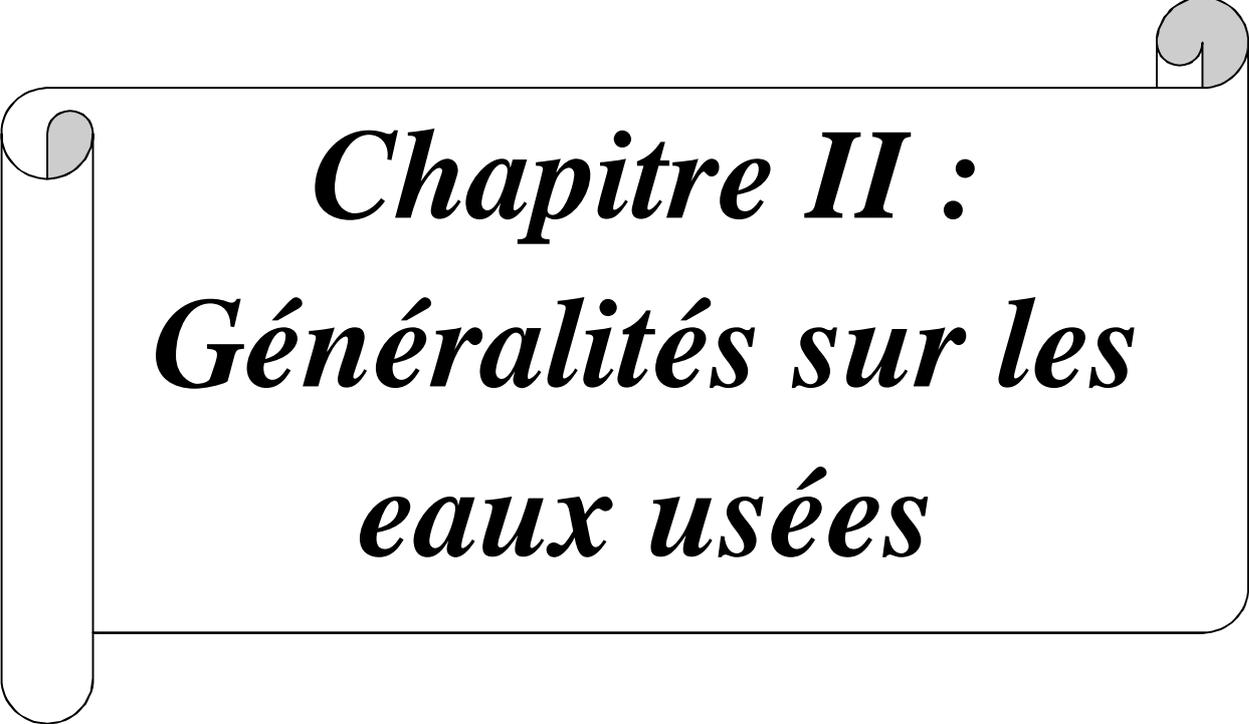
D'autres enzymes particulières ne rentrent pas dans cette classification : céfuroximase de *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* ou  $\beta$ -lactamase à spectre étendue (BLSE) chromosomique de *Kluyvera*, *Rahnella*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina*. [7]

#### 4.2.2. Résistance acquise

Ce terme est utilisé pour désigner le résultat d'un processus permettant à des bactéries d'une espèce originellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques. [31]

La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible, elle est due à l'emploi en thérapeutique des antibiotiques. [32]

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome, soit l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes peuvent provenir du chromosome d'espèces différentes ou être véhiculés par des éléments génétiques mobiles pouvant être transférés d'une bactérie à l'autre, on parle alors de transmission. [34]

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the rolled-up ends, framing the chapter title.

***Chapitre II :***  
***Généralités sur les***  
***eaux usées***

## Chapitre II : Généralités sur les eaux usées

En parlant des eaux usées, il semble important d'avoir une idée sur leur définition, leurs origines et caractéristiques ainsi que les maladies qu'elles peuvent véhiculer.

### 1. Définition des eaux usées

Selon Rejsek, les eaux résiduaires urbaines (ERU), ou eaux usées, sont des eaux chargées de polluants, solubles ou non, provenant essentiellement de l'activité humaine. [35]

Les activités humaines, domestiques, agricoles et industrielles produisent toutes sortes de déchets et de souillures qui sont transportés par voie liquide. Ils sont susceptibles d'engendrer différentes sortes de pollution et de nuisance dans le milieu récepteur. Cet ensemble d'eau rejetée et de déchet constitue ce qu'on appelle les eaux usées. [36]

Donc sous la terminologie d'eau résiduaire, on groupe des eaux d'origines très diverses qui ont perdu leurs puretés ; c'est-à-dire leurs propriétés naturelles par l'effet des polluants après avoir été utilisées dans des activités humaines (domestiques, industrielles ou agricoles).

### 2. Origines des eaux usées

Selon Demers, on distingue trois catégories d'eaux usées [37]:

- Les eaux domestiques, provenant des usages résidentiels tels la lessive, l'eau de vaisselle, la cuisine, les toilettes et les douches. Les eaux domestiques peuvent être traitées collectivement (eaux municipales) ou individuellement (système autonome tel qu'une fosse septique) ;
- Les eaux industrielles, qui sont les rejets des procédés industriels qui utilisent de l'eau dans la composition, la fabrication et le nettoyage d'un produit ;
- Et les eaux pluviales sont celles qui proviennent des précipitations atmosphériques. Sont assimilées à des eaux pluviales celles provenant des eaux d'arrosage et de lavage des voies publiques et privées, des jardins, des cours d'immeubles, des eaux de vidange de bassins de natation. Ce sont donc essentiellement des eaux de ruissellement de surface. [38]

L'urbanisation et le développement de l'industrie ont passablement changé ce qu'on appelle les eaux usées. En plus de la matière organique, on y retrouve des résidus de produits nettoyants domestiques et des rejets industriels et commerciaux variés. [37]

### 3. Bactéries pathogènes des eaux usées

Les bactéries sont les plus fréquentes des agents pathogènes microbiens présents dans les eaux usées. Il existe une large gamme d'agents pathogènes bactériens et des agents pathogènes opportunistes qui peuvent être détectés dans les eaux usées. Les eaux usées contiennent en moyenne  $10^7$  à  $10^8$  bactéries/l. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de  $10^4$  /l. Le nombre de germes peut être multiplié par 1 000 dans les eaux de rivières après un rejet urbain. [39] [40]

Les bactéries des eaux usées ont été caractérisées et appartiennent aux groupes suivants :

- Bactéries Gram négatives anaérobies facultatives : par exemple, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, et *Shigella*.
- Bactéries aérobies à Gram négatif : par exemple, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*.
- Bactéries sporulantes Gram positif : par exemple, *Bacillus spp.*
- Bactéries non sporulantes Gram positif : par exemple, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*. [41]

Beaucoup d'agents pathogènes bactériens sont d'origine entérique, cependant, les agents pathogènes qui causent des maladies non entériques (par exemple, *Legionella spp.*, *Mycobacterium spp.* et *Leptospira*) ont également été détectées dans les eaux usées. [39]

Les infections gastro-intestinales sont parmi les maladies les plus courantes causées par des pathogènes bactériens des eaux usées. Celles-ci comprennent la diarrhée, les exemples les plus connus sont le choléra causé par *Vibrio cholerae* et les salmonelloses causées par un certain nombre d'espèces de *Salmonella* ; et la dysenterie causée par diverses espèces de *Shigella*, ainsi que des espèces de *Salmonella*. [39]

*Campylobacter*, *Helicobacter* et *Arcobacter* sont attribués au fait d'être les principales causes de l'entérite aiguë humaine. [39]

Les maladies bactériennes non entériques qui peuvent être transmises par des agents pathogènes présents dans les eaux usées comprennent la légionellose (maladie du Légionnaire) une pneumonie potentiellement mortelle causée par les espèces de *Legionella*; la leptospirose, une infection zoonotique causant une maladie fébrile causée par *Leptospira*

*interrogans* et la mélioïdose, une maladie semblable à la pneumonie causée par *Pseudomonas pseudomallei*. [39]

En plus des agents pathogènes établis, un certain nombre d'agents pathogènes opportunistes (micro-organismes qui provoquent des infections et des maladies sous des conditions optimales, généralement chez les très jeunes, les personnes âgées et immuno-déprimés) peuvent être trouvés dans les eaux usées non traitées et traitées. Ces agents pathogènes opportunistes comprennent des espèces de *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*. [39]

Une compilation des bactéries les plus importantes qui peuvent être pathogènes pour l'homme et qui peuvent être transmises directement ou indirectement par le biais de l'eau est représenté sur le tableau suivant (tableau 3) :

**Tableau 3** : Principales maladies d'origine hydrique et les bactéries pathogènes associées.  
[42]

Maladies	Bactéries	Dose infectante	Caractéristiques
<b>Choléra</b>	<i>Vibrio cholerae</i>	10 <sup>6</sup>	Diarrhée sévère, déshydrations
<b>Salmonelloses</b>	<i>Salmonella spp.</i>		Diarrhée aqueuse souvent avec des crampes abdominales, des nausées, des vomissements fièvre et frissons
<b>Fièvre typhoïde</b>	<i>Salmonella typhi</i>	<1000	Fatigue, maux de tête, des douleurs abdominales, une température élevée. taux de mortalité Environ 4%
<b>Gastroentérite ou Campylobactériose</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<500	Diarrhée aqueuse souvent avec des crampes abdominales, des nausées, des vomissements fièvre et frissons
<b>Dysenterie ou shigellose</b>	<i>Shigella spp.</i>	≈ 10	Diarrhée sanglante, des crampes abdominales, des douleurs rectales. La plupart des espèces virulentes, <i>S. dysenteriae</i> , produit une toxine causant le syndrome hémato-urémique
<b>Colite hémorragique et syndrome hémolytique et urémique</b>	<i>Escherichia coli</i> O157 :H7	Inconnu	Etat grave, condition systémique qui se produit principalement chez les enfants de moins de 10 ans
<b>Leptospirose</b>	<i>Leptospira spp.</i>	Inconnu	Fièvre, infection rénale pouvant entraîner une insuffisance rénale. Dans certains cas, il y a une hémorragie interne, y compris hémorragie pulmonaire
<b>Légionellose</b>	<i>Legionella pneumophila</i>	Inconnu	Pneumonie aiguë, une forte fièvre, des maux de tête, de la toux, des expectorations peu
<b>Ulcère gastro-duodénal et cancer de l'estomac</b>	<i>Helicobacter pylori</i>	Inconnu	Plaie ou trou dans la paroi de l'estomac ou du duodénum. Cancer

Les bactéries pathogènes d'origine hydrique sont responsables de la mort de 3 à 10 millions de personnes par an dans le monde. Et les pays industrialisés ne sont pas épargnés : ainsi, une inondation au Canada qui avait fait déborder les égouts et souillé le réservoir d'eau potable d'une ville, diffusant alors des bactéries de contamination fécale, a provoqué 400 intoxications dont 5 cas mortels. [40]



***Chapitre III :***  
***Analyse de l'ADN***  
***bactérien***

## Chapitre III : Analyse de l'ADN bactérien

### 1. Extraction et purification

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire. [43]

#### 1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- la rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique),
- le traitement chimique (ex.: lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols)
- et la digestion enzymatique (ex.: protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation du nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation. [43]

#### 1.2. Méthodes de purification

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques suivantes :

- Extraction/précipitation,
- Chromatographie,
- Centrifugation et
- Séparation par affinité. [43]

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement l'extraction et la purification à l'aide de réactifs prêt à l'emploi. [44]

## 2. Electrophorèse : Analyses de fragments d'acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées à pH 8 qui vont pouvoir migrer sous l'effet d'un champ électrique: ils migrent vers le pôle positif (anode). [44]

La vitesse de migration d'une molécule d'acide nucléique sera fonction de :

- sa masse moléculaire donc du nombre de bases (ou de paires de bases). Plus une molécule sera de faible masse moléculaire, plus sa vitesse de migration sera grande.
- la concentration d'agarose ou d'acrylamide du gel.

La migration est inversement proportionnelle au logarithme de la masse molaire exprimée en général en nombre de bases ou paires de bases. Le gel est étalonné avec des fragments d'ADN ou d'ARN de taille connue. [44]

✚ Choix du support:

- le gel d'agarose est le support le plus utilisé. Les tailles de fragments qu'il est possible de séparer sont comprises entre 0,1 et 30 kb. La migration s'effectue en position horizontale.
- le gel de polyacrylamide est utilisé pour la séparation des petits fragments de moins de 0,1kb = 100 pb. Le gel est coulé entre deux plaques de verre à l'abri de l'oxygène. La Migration est verticale. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode d'analyse plus résolutive car on peut séparer les fragments d'ADN à une base près. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée dans la méthode de séquençage de l'ADN

✚ Visualisation des acides nucléiques:

Les acides nucléiques sont visualisés par coloration du gel au bromure d'éthidium (BET) qui est un agent s'intercalant entre les plateaux de paires de bases et émettant une fluorescence orange lorsqu'il est éclairé par des UV courts (200-300nm).

✚ Le seuil de détection est de l'ordre de quelques nano grammes : 2 à 3 ng/ bande.

✚ L'électrophorèse permet aussi de séparer des molécules d'acides nucléiques suivant leur structure, par exemple les différentes formes d'un plasmide. [44]



***MATERIEL ET  
METHODES***

## Matériel et méthodes

### 1. Cadre d'étude

Notre travail se porte sur l'isolement et l'identification de quelques espèces d'entérobactéries pathogènes isolées au niveau des eaux usées d'oued Boumerzoug dans la ville de Constantine.

Dans notre étude nous avons utilisé des méthodes d'isolement classiques connues pour la recherche de ces germes et ce travail a eu lieu au niveau du laboratoire de Microbiologie (Laboratoire 11) de la Faculté SNV (Université Frères Mentouri Constantine) qui s'est étalée sur une période allant du mois de Février au mois de Mai 2016.

### 2. Matériel

#### 2.1. Matériel de prélèvements

Le matériel de prélèvement est constitué :

- Des flacons stérilisés au préalable pour les prélèvements des échantillons;
- D'un sac isotherme pour le transport des échantillons;
- D'un marqueur pour identifier les flacons.
- Des gants

#### 2.2. Matériel de laboratoire

- Matériel de stérilisation : Four Pasteur, bec Bunsen, autoclave;
- Matériel de pesée : Balance de précision;
- Matériel d'incubation : étuves à 30°C, 37°C et 44°C;
- Matériel divers : pipettes, micro-pipettes, béchers, porte-tubes, boîtes de Pétri, pipettes Pasteur, flacons, vortex, réfrigérateur; pince, microscope optique, lames et lamelles, compteur de colonies, cuve à électrophorèse, tubes d'ependorf, imageur.
- Milieux de culture et réactifs (Annexe 2 et 3) :
  - Gélose PCA Plate Count Agar (Institut Pasteur d'Alger)
  - Gélose nutritive ordinaire (GN) (Institut Pasteur d'Alger)
  - Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) (Institut Pasteur d'Alger)
  - Gélose salmonella-Shigella (SS) (Institut Pasteur d'Alger)

- Gélose désoxycholate citrate lactosée (DCL) (Institut Pasteur d'Alger)
- Bouillon nutritif (Institut Pasteur d'Alger)
- Bouillon nitraté (Institut Pasteur d'Alger)
- Milieu Kligler-Hajna (KIA) (Institut Pasteur d'Alger)
- Milieu Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Institut Pasteur d'Alger)
- Milieu Mannitol-Mobilité (Institut Pasteur d'Alger)
- Milieu Citrate de Simmons (Institut Pasteur d'Alger)
- Milieu Urée –indole (Institut Pasteur d'Alger)
- Galerie API 20E (BioMerieux)
- Eau peptonée exempte d'indole (EPEI) (Institut Pasteur d'Alger)
- Bouillon Sélénite F Broth (SFB) (Institut Pasteur d'Alger)
- Eau distillé stérile,
- Eau oxygénée (10V),
- Réactif de Kovacs,
- Réactif VP I Alpha naphtol à 6%,
- Réactif VP II KOH à 40%,
- Nitrate réductase I acide sulfanilique (en solution à 8<sup>0</sup>/<sub>00</sub> en acide acétique 5N),
- Nitrate réductase II Naphtylamine (en solution à 6<sup>0</sup>/<sub>00</sub> en acide acétique 5N),
- Réactif TDA (Tryptophane désaminase) solution de per chlorure de fer,
- Poudre de zinc,
- Disques d'ONPG (2-NitrophenylB-D-galactopyranoside) (Fluka),
- Disques d'oxydase (Fluka)
- Huile de paraffine et de vaseline
- Tris Borate EDTA à 10X(Sigma)
- Protéinase K (Gene On)
- Solution de bromure d'éthidium (BET) 10 mg/ml (Promega)
- Marqueur de taille (DNA ladder) 1kb (Biomatik)
- Tampon de charge (DNA loading buffer) (Biomatik)
- Tris HCl à 5 mM (pH 8.2)
- Gel d'agarose à 1% (Promega)

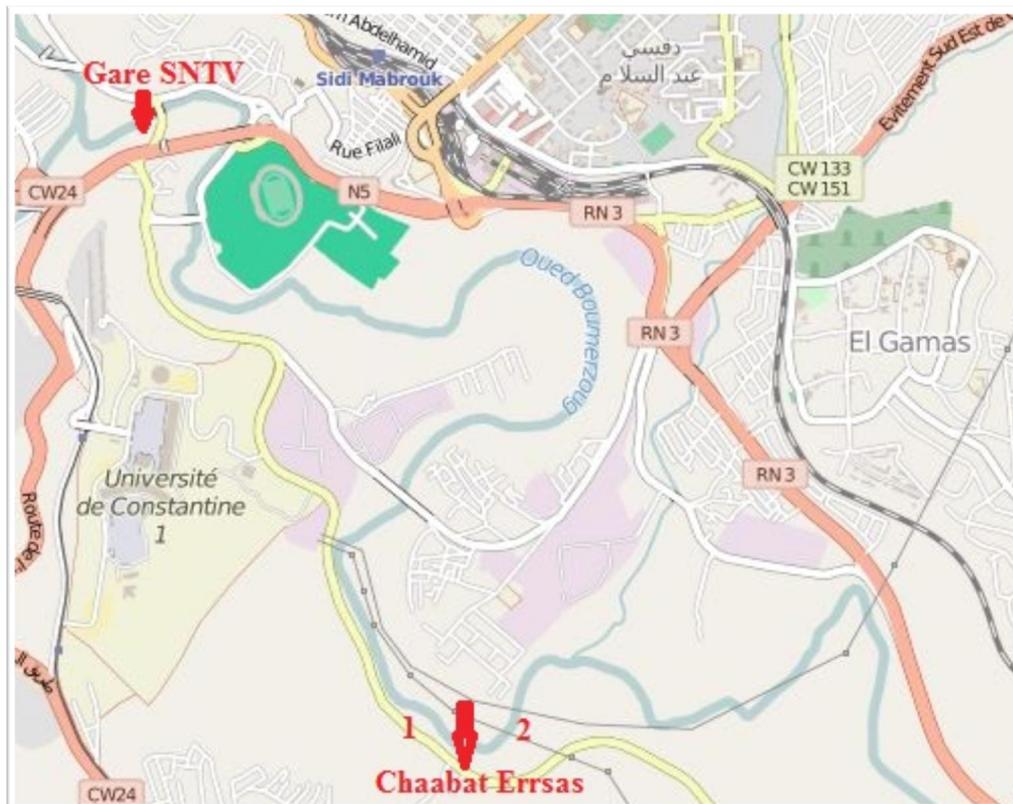
### 3. Méthodes

Les *Enterobacteriaceae* comprennent un nombre très élevé de genres et d'espèces. Ainsi nous avons jeté notre dévolu sur la recherche de ces quatre entérobactéries: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica*.

#### 3.1. Prélèvement

##### 3.1.1. Lieu de prélèvement

Les prélèvements ont été faits à partir des eaux usées au niveau d'Oued Boumerzoug (**Figure 3**) à Chaâbat Erssas et l'ancienne gare SNTV à Constantine à des périodes différentes.



**Figure 3 :** Sites de prélèvements dans oued Boumerzoug

##### 3.1.2. Période de prélèvement

Deux sorties ont été faites à 2 stations différentes et à des périodes différentes avec des échantillons de 200 ml dans des flacons stérilisés au préalable (Tableau 4).

**Tableau 4** : Périodes de prélèvements des échantillons.

Sites de prélèvement (Stations)	Périodes de prélèvement
<b>Chaâbat Erras (1)</b>	23/02/2016
<b>Gare SNTV</b>	23/02/2016
<b>Chaâbat Erras (2)</b>	11/04/2016

### 3.1.3. Technique de prélèvement

- Se désinfecter les mains
- Sortir le flacon stérile de son emballage et le plonger à l'horizontale. Le redresser jusqu'à ce que le volume d'eau recueillie soit suffisant tout en gardant un volume d'air dans le flacon pour permettre une agitation correcte avant l'analyse.
- Toutes les informations concernant le prélèvement (site, lieu, date, heure...) sont mentionnées.

### 3.1.4. Transport des échantillons

Le transport des échantillons au laboratoire a été effectué dans un sac isotherme qui permet de maintenir la température des prélèvements.

## 3.2. Recherche des germes

Les germes recherchés dans la présente étude sont *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica*.

### 3.2.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

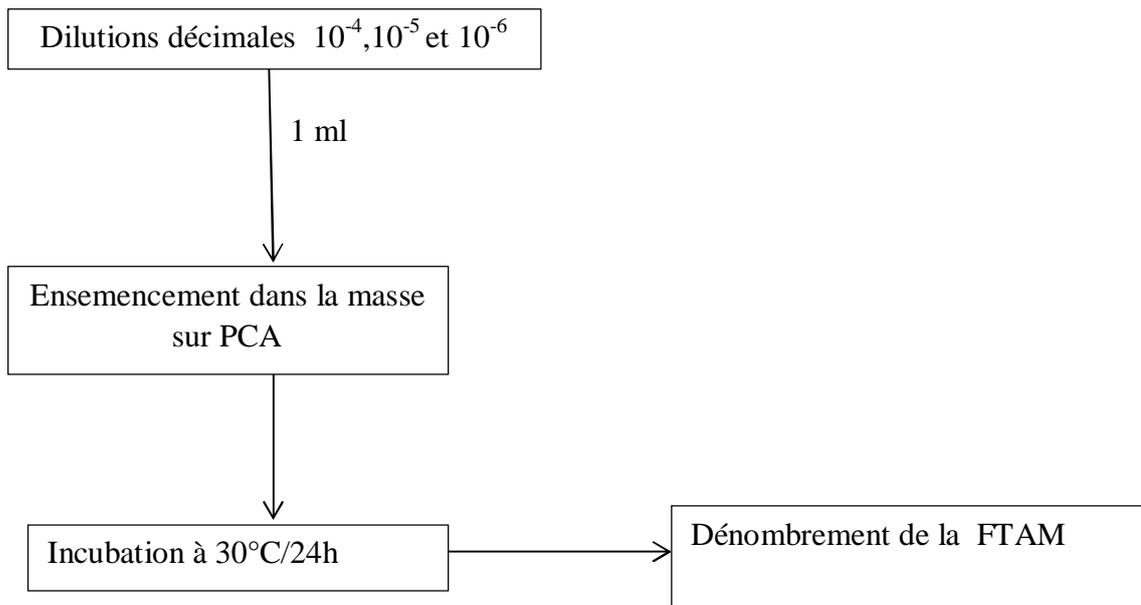
#### ❖ Préparation des échantillons

Les échantillons étudiés ont été dilués avec de l'eau physiologique jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ .

### ❖ Dénombrement et Isolement

A partir des dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ , l'ensemencement a été effectué dans la masse sur gélose PCA. Les boîtes ensemencées sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.

L'organigramme suivant représente le mode opératoire adopté:



**Organigramme 1** : Etapes pour l'évaluation de la FTAM

### 3.2.2. Pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification

La recherche de ces germes est souvent compliquée par leur faible concentration dans l'échantillon à analyser. Une première solution consiste en un enrichissement mécanique ou physico-chimique lorsque cela est possible (centrifugation, précipitation au lait d'alumine). Une deuxième solution plus fréquemment pratiquée consiste à utiliser des milieux d'enrichissement (et parfois de pré-enrichissement) liquides qui permettent la multiplication des germes avant leur isolement et identification. [45]

#### ❖ Pré-enrichissement

Le pré-enrichissement est destiné à revivifier les cellules de façon à faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement. [45]

Cette étape concerne la recherche de *Salmonella*. Il est réalisé à l'aide de divers milieux, par exemple le bouillon au mannitol ou le milieu eau peptonée tamponnée.

- Placer 1 ml de l'échantillon dans un volume adapté d'eau peptonée exempte d'indole
- Incuber à 37°C durant 18 à 24 heures.

#### ❖ Enrichissement

L'enrichissement en vue de l'isolement et de l'identification s'effectue sur des milieux sélectifs, soit directement à partir du produit ou des dilutions, soit le plus souvent à partir du milieu de pré-enrichissement.

- L'enrichissement des *Shigella* est réalisé conjointement avec celui des *Salmonella*. Ainsi 1 ml du bouillon de pré-enrichissement (eau peptonée exempte d'indole) est prélevé et placé dans un volume adapté de bouillon SFB et incubé à 37°C durant 16 à 20 heures.
- L'enrichissement des *Yersinia* est réalisé à 4°C pendant 7 à 15 jours en 1 ml de l'échantillon mère dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole.

#### ❖ Isolement

Les entérobactéries pathogènes peuvent être directement recherchées sur des milieux sélectifs en boîte de Pétri, soit directement, ce qui permet leur numération, soit après enrichissement.

##### - *E. coli*

La recherche des souches d'*E. coli* se fait directement sans un enrichissement au préalable. Ainsi à l'aide d'une anse de platine, une öse de l'échantillon mère bien agité est prélevée et déposée sur le milieu BCP par des techniques de stries puis le tout est incubé pendant 24h à 37°C et à 44°C vu la thermotolérance de certaines souches d'*E. coli*.

- ***Salmonella et Shigella***

La gélose Salmonella-Shigella (SS) est fréquemment utilisée dans la recherche de ces germes. Ainsi une ose du bouillon d'enrichissement (SFB) est déposée par des stries sur la gélose SS au préalable coulé dans des boîtes de Pétri puis incubé à 37°C pendant 24h.

- ***Yersinia enterocolitica***

On réalise un isolement à partir du bouillon d'enrichissement sur gélose Mac Conkey ou sur gélose DCL et incubation à 37°C pendant 24 heures.

Décontamination par KOH à 5% : On prend également 1ml du bouillon d'enrichissement qu'on rajoute à 5ml de solution de KOH à 5%, on laisse pendant quelques secondes et on isole sur gélose Mac Conkey ou DCL, et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

❖ **Examen macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après Joffin et Leyral, les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- la forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.,
- la taille des colonies par la mesure du diamètre,
- la couleur de la colonie,
- l'élévation : convexe, concave, plate,
- l'opacité : opaque, translucide ou transparente,
- la surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc. [46]

❖ **Examen microscopique**

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes après une coloration de Gram (Annexe 1) qui permet de connaître la forme, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

### ❖ Identification biochimique

L'identification et la classification des entérobactéries sont basées essentiellement sur l'étude des caractères suivants, dont les principaux concernent la mobilité, l'utilisation des sucres (dont particulièrement le lactose) et les caractères : indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, inositol (abandonné), citrate. [45]

#### ✚ Recherche de l'oxydase

Le disque de papier filtre imprégnés de réactif : l'oxalate de N-dimethyl paraphénylène diamine, qui est incolore sous forme réduite et rouge-violet sous forme oxydée a été utilisé.

Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque. [10]

#### ✚ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries en  $H_2O$  et  $\frac{1}{2} O_2$ .



Prendre une lame porte-objet propre. Déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. [10]

#### ✚ Test de nitrate réductase

Le bouillon nitraté est un bouillon de culture permettant la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate par certains micro-organismes, notamment par respiration nitrate.

On met une ou deux gouttes dans du bouillon nitraté cultivé pendant 24 h à 37°C. S'ils sont présents, ils donnent une coloration rose en présence d'acide sulfanilique et d' $\alpha$ -Naphtylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de Griess.

### **Recherche de l'utilisation du glucose, lactose, production de gaz et H<sub>2</sub>S sur le milieu KIA ou TSI**

Le milieu KIA ou TSI est utilisé principalement pour orienter l'identification des entérobactéries (bacilles à Gram-). Il permet de permettre en 24 heures les fermentations du glucose, du lactose et du saccharose (pour TSI), la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et de gaz provenant de la fermentation du glucose.

Ensemencer le culot du milieu par piqûre centrale et la pente en stries serrées, afin d'avoir une culture en nappe avec la souche bactérienne à tester. Ne pas revisser à fond le bouchon du tube. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

### **Recherche de l'utilisation du citrate**

Le milieu citrate de Simmons est un milieu solide qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Seules les bactéries possédant une citrate perméase seront capables de se développer sur ce milieu.

La pente du milieu est ensemencée par des stries sur toute la surface et incubé à 37°C, pendant 24 heures. En cas de réaction négative, prolonger l'incubation de 24 heures.

### **Test de Mannitol Mobilité**

Le milieu mannitol mobilité est un milieu semi solide qui permet d'étudier simultanément la dégradation du mannitol (la dégradation en anaérobiose conduit à la formation de fructose qui est un produit de dégradation du mannose) et la mobilité.

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec la souche à tester à l'aide d'une anse de platine (fil droit sans boucle). Incubation à 37°C durant 24 heures.

### **Recherche de l'indole et mise en évidence de l'uréase et de la TDA**

Le milieu urée-tryptophane, improprement appelé urée-indole est un milieu de culture synthétique utilisé en bactériologie permettant la mise en évidence simultanée :

- De la production de l'indole (par hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase)
- De l'hydrolyse de l'urée (par une uréase)

- De la désamination du tryptophane par le tryptophane désaminase

Ensemencer abondamment un milieu urée-indole avec quelques colonies de la souche à étudier et incubé 24 heures à 37°C.

#### **Test du Rouge de Méthyle (RM) et du Voges-Proskauer (VP)**

Le milieu Clark et Lubs permet de rechercher les voies fermentaires des entérobactéries et de différencier la fermentation « acides mixtes » et la fermentation « butylène glycolique ».

- Le test RM : permet la mise en évidence grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification du milieu glucosé après fermentation du glucose
- Le test VP : permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone) au cours de la fermentation butylène glycolique en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'  $\alpha$ -naphthol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

Ensemencer un milieu Clark et Lubs avec quelques gouttes de la suspension bactérienne et étuver 24 à 48 heures à 37°C.

Après incubation le milieu est partagé en deux tubes pour réaliser les tests.

#### **Recherche de la $\beta$ -galactosidase : test ONPG**

Il s'agit d'une recherche particulière dans le cadre de l'étude de la dégradation du lactose, dans le cas de bactéries lactose négatif (dans le but de préciser l'origine de l'incapacité à utiliser le lactose).

Le test ONPG consiste à rechercher la présence de  $\beta$ -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre  $\beta$ -galactoside : l'ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG) qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un produit coloré (l'orthonitrophenol ONP). Ceci est possible car la  $\beta$ -galactosidase n'est pas spécifique du lactose, mais des  $\beta$ -galactosides.

- Prélever une anse complète d'une culture bactérienne sur un milieu lactosé gélosé (pente du milieu Kligler) et faire une suspension dense dans 0.5 ml d'eau distillée stérile. La réaction est d'autant plus rapide qu'il y a plus de bactéries, donc plus d'enzymes.

- Ajouter un disque ONPG (papier filtre stérile imprégné de tampon et d'ONPG)
- Incuber au bain-marie à 37°C pendant un temps variant entre 15 à 30 minutes et jusqu'à 24 heures au maximum, en raison de réactions tardives positives avec certaines bactéries.

#### ❖ Galerie API 20E

L'identification est ensuite complétée par ensemencement sur galerie API 20E (Appareillage et Procédé d'Identification) : la galerie API 20E comporte 20 microtubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent.

On prélève une colonie bien isolée sur gélose nutritive et on réalise une suspension homogène dans 5 ml de medium ou d'eau distillée. On inocule la galerie selon la méthodologie recommandée par la notice technique (Annexe 4). Les réactions produites pendant la période d'incubation (24h à 48h à une température de 37°C) se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. On fait la lecture et on interprète en se référant au catalogue analytique API (Annexe 4).

### 3.2.3 Profil électrophorétique de l'ADN total

Les souches ainsi identifiées vont subir une dernière caractérisation qui consiste à l'établissement du profil électrophorétique de leur ADN total.

#### ❖ Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN total a été réalisée à partir des colonies bactériennes cultivées sur gélose nutritive. Les cellules ont été traitées à la protéinase K. L'équivalent d'environ 10 µl de cellules (un ôse métallique pleine) est mis en suspension dans 200 µl de tris HCl à 5mM (pH 8.2) auquel est ajouté 10 µl de protéinase K à 1.3 mg/ml et le tout est centrifugé pendant 10 s à 13000 rpm. Ce mélange est incubé à 55°C pendant toute la nuit, puis la protéinase K est dénaturée à 100°C pendant 10 min. A partir du surnageant contenant l'ADN, nous avons effectué l'électrophorèse. [47]

#### ❖ Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Afin de vérifier la qualité de la réaction d'extraction, 6µl du surnageant additionné de 2µl de tampon de charge ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose

(Promega U.S.A) à 1 % dans lequel ont été ajouté 4 $\mu$ l de BET (10mg/ml-Promega). Ce gel a été placé dans la cuve d'électrophorèse à 100 V pendant 20 min dans une solution de tampon TBE (Tris-Borate EDTA 1X) préparé à partir de TBE 10X. La DNA ladder (Biomatik) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

La visualisation a été faite sous UV à l'aide d'un imageur relié à une imprimante. La présence de l'ADN est révélée grâce à la fluorescence du BET piégé entre les molécules.



***RESULTATS ET  
DISCUSSION***

## Résultats

### 1. Dénombrement de la FTAM

Le dénombrement sur milieu PCA a été effectué à partir des dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ . A l'aide d'un compteur, seules les colonies dont le nombre compris entre 30 et 300 ont été prises en compte.

Le nombre a été déterminé selon la formule suivante :

$$N = \frac{Nc}{V \times Fd}$$

avec

Nc = Nombre de colonies  
 V = Volume de l'inoculum V= 1ml  
 Fd = Facteur de dilution

Les résultats sont donnés en UFC/ml dans le tableau suivant :

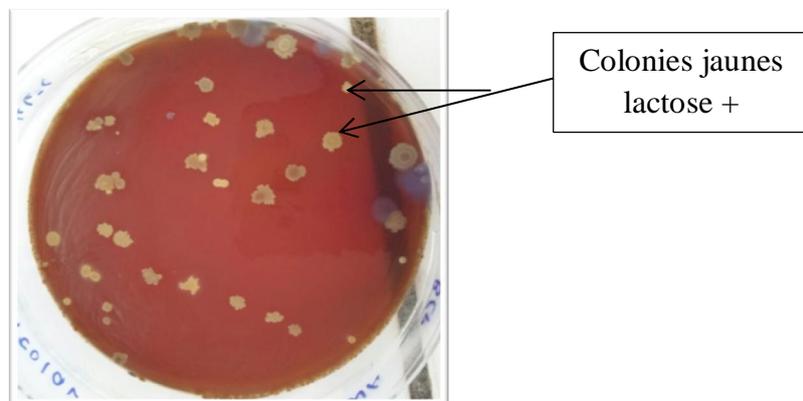
**Tableau 5** : Valeurs moyennes en UFC/ml du dénombrement sur PCA

Echantillons	Chaâbat Erssas 1	Chaâbat Erssas 2	SNTV
UFC/ml	$1.14 \cdot 10^6$	$13.8 \cdot 10^6$	$5.54 \cdot 10^6$

## 2. Aspects culturels

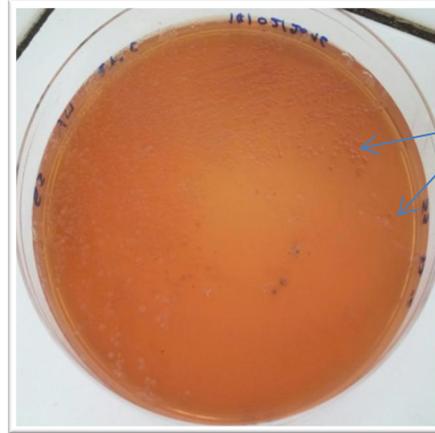
### 2.1. Examen macroscopique

- Sur milieu BCP, plusieurs colonies de tailles variables entre 1- 4mm de diamètre se sont formées, de couleurs violette et jaune présentant des aspects différents (rugueuses, lisses, contour régulier) aussi bien à 37°C qu'à 44°C.



**Figure 4** : Aspect des colonies sur BCP

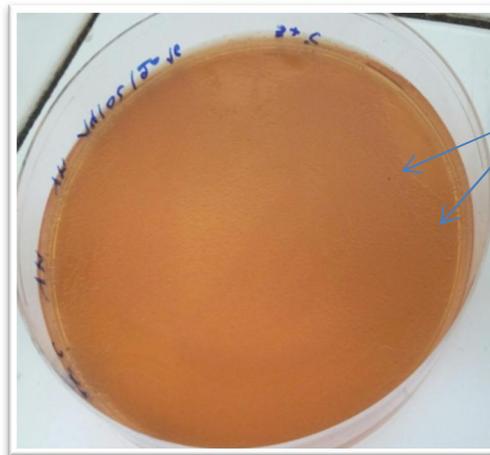
- Sur milieu SS, des colonies transparentes (incolores), de taille comprise entre 1-3 mm de diamètre présentant différents aspects ont été observées.



Colonies transparentes  
lactose -

**Figure 5** : Aspect des colonies sur milieu SS

- Sur milieu DCL, les colonies observées avaient les aspects suivants :
  - Colonies transparentes de petites tailles (1mm)
  - Colonies transparentes de taille comprise entre 2-3 mm avec un centre noir
  - Colonies roses brillantes de 2-3 mm de diamètre



Colonies transparentes  
lactose -

**Figure 6** : Aspect des colonies sur milieu DCL

- Sur Mac Conkey, des colonies roses, incolores, de tailles variables présentant divers aspects ont été observées.

A partir de chaque colonie présomptive, nous avons réalisé une coloration de Gram, des tests de l'oxydase et de la catalase.

## 2.2. Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration de Gram, nous a permis d'observer différents aspects de bacilles colorés en rose. Ce sont des bactéries Gram négatif.

## 3. Test de l'oxydase

L'absence de la coloration violette révèle un résultat négatif sur les disques d'oxydase.



**Figure 7** : Révélation du test d'oxydase

## 4. Test de catalase

Toutes les colonies testées sont catalase positives dont la présence se manifeste par un dégagement de bulles d'air dès leur contact avec l'eau oxygénée.



**Figure 8** : Résultat du test de catalase

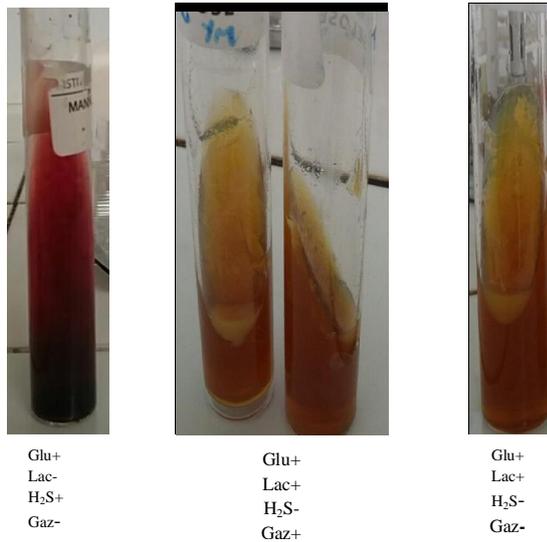
## 5. Test de nitrate réductase

Après l'ajout des réactifs Nit1 et Nit2, nous avons pu observer une coloration rouge du milieu.

## 6. Recherche de l'utilisation du glucose, du lactose, de la production de gaz et H<sub>2</sub>S sur milieu KIA et TSI

Après incubation du milieu KIA, nos souches ont présenté différents aspects.

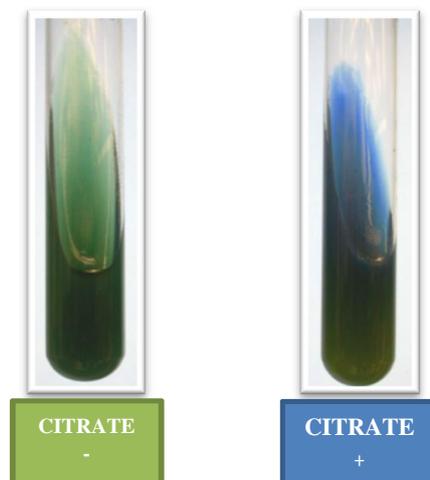
- L'utilisation du glucose se traduit par un virage au jaune du culot
- L'utilisation de lactose se traduit par un virage au jaune de la pente. Une pente rouge désigne la non utilisation du lactose
- Une déformation de la gélée désigne une production de gaz
- La production de H<sub>2</sub>S se traduit par un noircissement du milieu



**Figure 9** : Aspects des colonies testées sur le milieu KIA

## 7. Recherche de l'utilisation du citrate

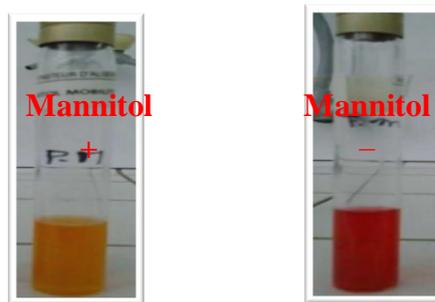
L'utilisation du citrate se traduit par un virage au bleu du milieu. Certaines souches sont citrate +, d'autres par contre sont citrate- donc pas d'utilisation du citrate (coloration verte).



**Figure 10** : Aspect sur milieu citrate de Simmons

### 8. Test du mannitol mobilité

Le virage de l'indicateur coloré rouge de phénol du rouge au jaune témoigne d'une utilisation du mannitol. De plus la mobilité des souches est avérée par la formation de voiles autour de la piqûre centrale avec un trouble du milieu. Les colonies testées présentaient divers aspects. Certaines sont Mobilité + et mannitol+, Mobilité – et mannitol +, Mannitol – mobilité – et d'autres mannitol – et mobilité +.



**Figure 11** : Aspect du milieu Mannitol-Mobilité

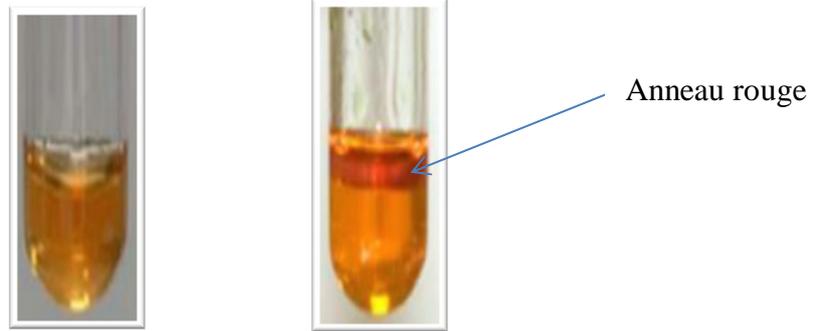
### 9. Recherche de l'indole et mise en évidence de l'uréase et de la TDA

- ✚ La présence de l'uréase se traduit par virage au rouge du milieu urée-indole. Certaines souches possèdent une uréase positive (coloration rouge), d'autres par contre n'en possèdent pas (uréase –).



**Figure 12** : Résultat du test de l'uréase

- ✚ La présence de l'indole est révélée après ajout du réactif de Kovacs dans le milieu urée-indole. La formation d'un anneau rouge témoigne de sa présence et un anneau jaune son absence.

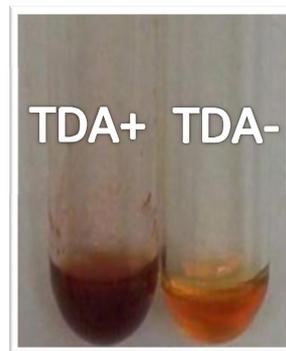


Aspect négatif

Aspect positif

**Figure 13** : Aspect du test de l'indole

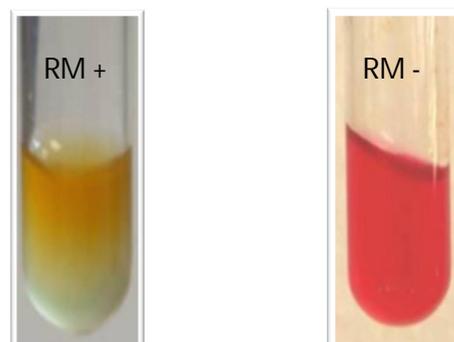
- La TDA est mise en évidence après ajout du réactif de la TDA. Une coloration rouge brun témoigne de la désamination du tryptophane.



**Figure 14** : Aspect du test de la TDA

#### 10. Le test de RM et du VP

- La voie des acides mixtes est mise en évidence après ajout du réactif de RM dans le milieu. Une coloration rouge désigne un RM+ c'est-à-dire une fermentation acide mixte. Une coloration jaune est un résultat négatif. La plupart des colonies testées étaient RM+. Par contre quelques-unes étaient RM-



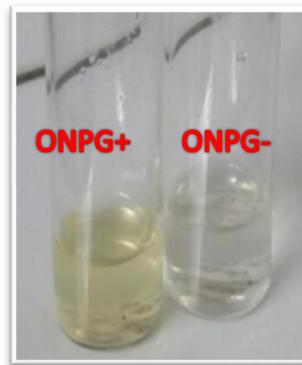
**Figure 15** : Test du rouge de méthyle (RM)

- ✚ La voie du butylène glycolique est mise en évidence après ajout des réactifs VP I et VP II. Une coloration rouge témoigne d'un VP+ et la réaction négative est révélée par l'absence de la coloration rouge.

Les colonies que nous avons testées avaient les profils suivantes : (RM+ ; VP-), (RM- ; VP+) et (RM- ; VP-).

### 11. Recherche de la B-galactosidase : test ONPG

Après incubation, les résultats sont négatifs pour les tubes incolores ONPG- et positif pour les tubes jaunes ONPG+.



**Figure 16 :** Résultats du test d'ONPG

### 12. Galerie API 20 E

La galerie API 20 E, nous a permis d'affiner nos résultats dans l'identification des souches. Au total 8 souches présomptives ont été retenues.

Les résultats obtenus après incubation sont les suivants :

#### ✚ Souche 1

**Tableau 6 :** Résultats de la galerie API 20 E de la souche 1

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

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche 1 correspond à *Escherichia coli*



**Figure 17:** Résultat de la galerie API 20 E de la souche 1

✚ Souche 2

**Tableau 7 :** Résultats de la galerie API 20 E de la souche 2

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

A partir du catalogue analytique, il s'avère que la souche 2 correspond à *Escherichia coli*.



**Figure18 :** Résultat de la galerie API 20 E de la souche 2

✚ Souche 3

**Tableau 8 :** Résultats de la galerie API 20 E de la souche 3

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

La souche 3 correspond à *Escherichia coli* à 75% ODC + d'après le catalogue analytique.



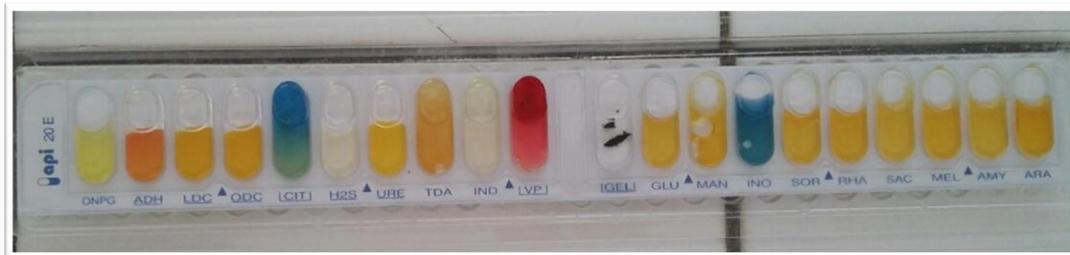
**Figure 19** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 3

**+** Souche 4

**Tableau 9** : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 4

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

Avec son caractère IND-, SAC+, la souche 4 correspond beaucoup plus à *Enterobacter agglomerans*.



**Figure 20** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 4

**+** Souche 5

**Tableau 10** : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 1

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

A partir du catalogue, nous avons pu correspondre la souche 5 à la souche *Proteus mirabilis*.



**Figure 21** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 5

**Souche 6**

**Tableau 11** : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 1

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

A partir du catalogue, nous avons pu correspondre la souche 6 à la souche *Proteus mirabilis*.



**Figure 22** : Résultat de la galerie API 20 E de la souche 6

**Souche 7**

**Tableau 12** : Résultats de la galerie API 20 E de la souche 7

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

Avec un résultat positif à ODC, URE, TDA et GLU, nous avons pu correspondre la souche à *Proteus morganii* à 97% IND+.



**Figure 23 :** Résultat de la galerie API 20 E de la souche 7

**+** Souche 8

**Tableau 13 :** Résultats de la galerie API 20 E de la souche 8

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

Les résultats de la souche 8 de la galerie API 20 E ne nous permet pas de la faire correspondre à aucune souche du catalogue analytique vu les résultats négatifs obtenus sur les différents tests.

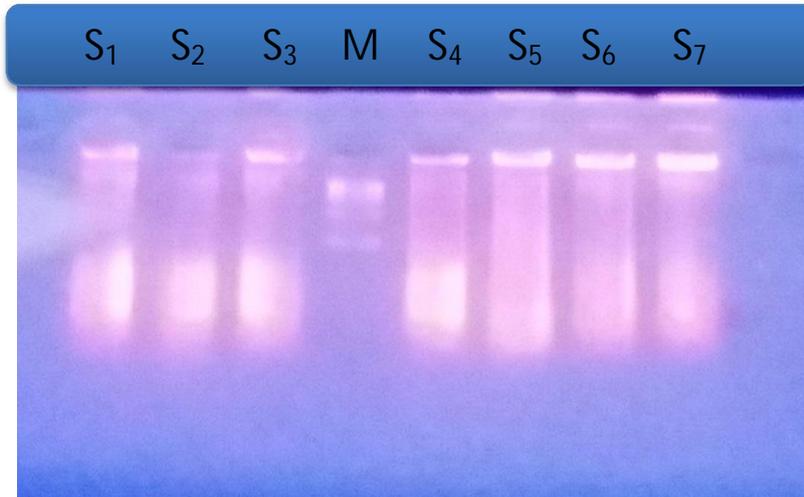


**Figure 24:** Résultat de la galerie API 20 E de la souche 8

En marge de la galerie API 20 E nous avons pu correspondre une colonie présomptive à une souche de *Pseudomonas spp.* après isolement sur gélose nutritive et obtention d'un pigment verdâtre.

### 13. Profils électrophorétiques de l'ADN

L'électrophorèse du surnageant contenant l'ADN nous a permis d'établir les profils électrophorétiques de 7 souches identifiées (**Figure 25**).



**Figure 25:** Profils électrophorétiques de l'ADN des souches

S<sub>1</sub>: *E. coli*

S<sub>2</sub>: *E. coli*

S<sub>3</sub>: *E. coli*

M: Marqueur de taille

S<sub>4</sub>: *Enterobacter agglomerans*

S<sub>5</sub>: *Proteus mirabilis*

S<sub>6</sub>: *Proteus mirabilis*

S<sub>7</sub>: *Proteus morganii*

## Discussion

### 1. Dénombrement de la FTAM

Notre étude avait pour but principale, l'isolement et la caractérisation de certaines espèces d'entérobactéries isolées à partir des eaux usées. Afin de procéder à notre isolement, une étude au préalable a été faite pour évaluer la flore totale aérobie mésophile (FTAM) de nos échantillons (eaux usées). Les résultats de la FTAM se situent entre  $1.14 \cdot 10^6$  UFC/ml à  $13.8 \cdot 10^6$  UFC/ml. Cela montre que les eaux usées sont chargées en bactéries. Nos résultats tendent vers ceux de Baumont [40] qui trouva que les eaux usées contiennent en moyenne  $10^7$  à  $10^8$  bactéries/l. Il rajouta également que le nombre de germes pathogènes avoisinait les  $10^4$  bactéries/l. De plus, une étude réalisée en 2011 par Lezzar [48] sur les eaux usées d'oued Rhumel qui a comme principal affluent oued Boumerzoug a fait état d'une FTAM avoisinant les  $1.8 \cdot 10^5$  UFC/ml. Cette charge élevée de bactéries pourrait sans doute s'expliquer par la teneur en matière organique qui favorise la prolifération des bactéries mais aussi par la contamination continue de ces eaux (rejets domestiques...) qui apporte à chaque fois une nouvelle communauté de bactéries. Baumont [40] révèle que le nombre de germes peut être multiplié par 1 000 dans les eaux de rivières après un rejet urbain.

### 2. Isolement et identification

Les milieux d'isolement spécifiques BCP, SS, DCL et Mac Conkey ont présenté une sélectivité plus ou moins efficace qui a permis à de nombreuses colonies suspectes de cultiver mais aussi plusieurs autres colonies ont pu croître sur ces milieux.

L'isolement sur ces milieux spécifiques, nous a permis de tester les colonies présomptives prélevées sur ces milieux. Ainsi la plupart des colonies testées présentaient une oxydase négative, une catalase positive, une nitrate réductase positive et aussi la coloration de Gram nous a montré des bacilles Gram négatif. Ces tests sont donc fondamentaux pour orienter le diagnostic et classer les souches dans la famille des entérobactéries.

La fermentation du glucose sur milieu KIA est aussi un élément important qui définit les entérobactéries et les différencie des autres bacilles Gram- non fermentaire. Ainsi toutes nos souches testées fermentaient le glucose.

Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des souches présumptives montrent qu'elles sont des bacilles à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive avec des variations concernant la mobilité, l'utilisation des sucres (dont particulièrement le lactose) et les caractères : indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, citrate.

Ces tests nous ont permis de sélectionner 8 souches présumptives dont l'identification a révélé sur galerie API 20 E : 3 souches d'*Escherichia coli* qui diffèrent par l'utilisation des sucres (RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), 1 souche d'*Enterobacter agglomerans*, 2 souches de *Proteus mirabilis* et 1 souche de *Proteus morganii*. La dernière souche n'a pas pu être identifiée.

De plus des espèces de *Pseudomonas spp.* ont également été trouvées présentant une oxydase positive ainsi qu'une pigmentation verdâtre sur gélose nutritive. Elles ont été aussi retrouvées en 2015 par Pierre [30] dans leurs travaux sur la recherche de *Vibrio* dans les eaux usées d'oued Boumerzoug.

Parmi les germes recherchés seules les *Escherichia coli* se sont révélés présentes vu leurs caractères ubiquitaire ainsi que leur facilité de culture.

L'absence des *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica* dans notre recherche ne signifie en aucun cas leur inexistence. Bien au contraire la présence de ses germes a été confirmée par les travaux de El Ouali [49] en 2014 ainsi que Bitton [41]

L'absence des salmonelles a été observée également par les mêmes travaux de El Ouali [49] sur le contrôle microbiologique des eaux usées domestiques et industriels de la ville de Fès au Maroc dans certains points de prélèvements.

Les données bibliographiques relatives à ce sujet sont très variées car la concentration de ces bactéries pathogènes dans les eaux usées dépend des conditions épidémiologiques et environnementales des régions où sont réalisées les études. [49]

Ainsi l'absence de ces germes pourrait s'expliquer par un certain nombre d'hypothèses :

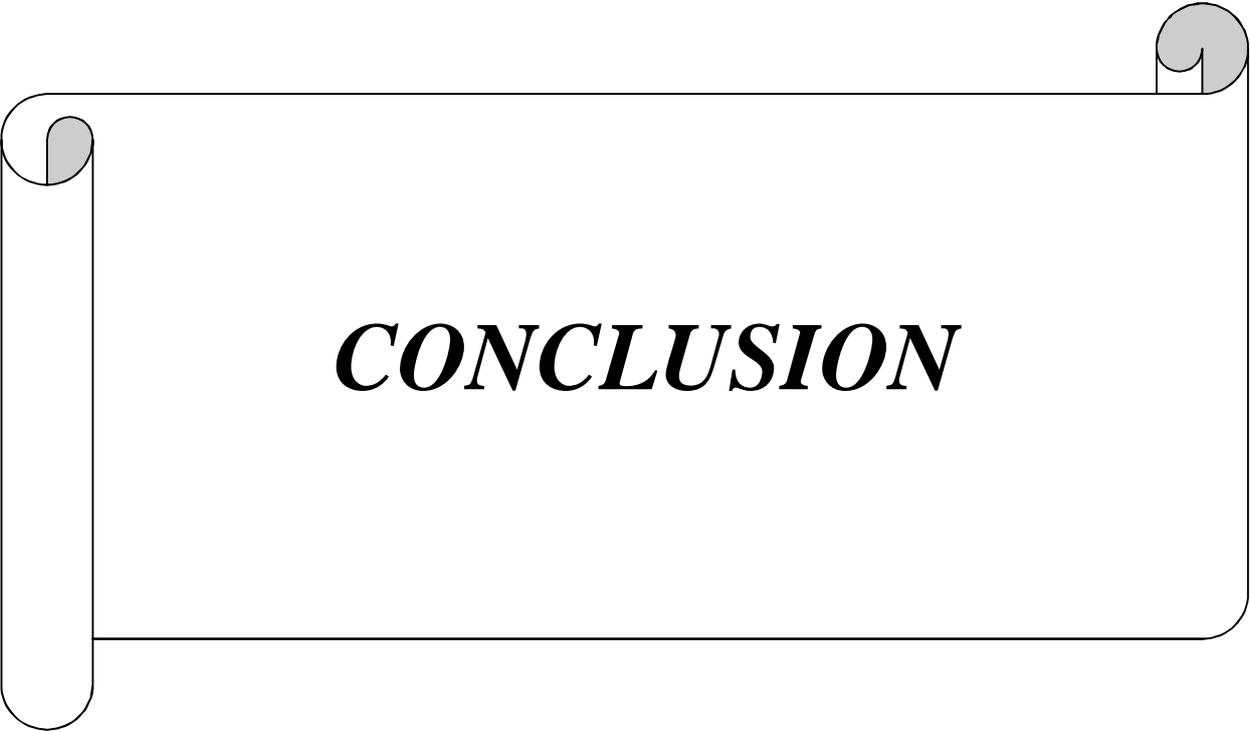
- Une fois rejetées dans le milieu naturel, ces bactéries se trouvent confrontées à des conditions défavorables telles que la limitation en nutriments, le stress osmotique, de faibles températures et des variations de pH ainsi que face à de multiples prédateurs. Une partie de ces bactéries peuvent survivre à ces conditions défavorables en entrant dans l'état VBNC [50]. En effet, de nombreuses publications montrent qu'après leur introduction dans un milieu aquatique naturel, les bactéries fécales perdent assez rapidement leur faculté de croître dans/sur les milieux spécifiques utilisés pour leur dénombrement mais conservent beaucoup plus longtemps certaines activités métaboliques.[50] [51] [52] [53]
- Elle peut s'expliquer également par le caractère instantané des prélèvements, l'absence de porteurs de germe. En effet, la survie des bactéries d'origine anthropique dans l'environnement ne dépend pas uniquement de la qualité du milieu récepteur, mais également de leur historique avant rejet. [49]

Les autres espèces que nous avons identifiées à savoir *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis* et *Proteus morgani* font également partie des espèces isolées souvent dans les eaux usées et sont fréquemment diagnostiquées en pathologie infectieuse humaine.

### 3. Profils électrophorétiques

L'extraction d'ADN des souches ainsi que leur électrophorèse sur gel d'agarose a permis d'obtenir des bandes fluorescentes après observation sous UV. Cette fluorescence témoigne donc de l'efficacité de la méthode d'extraction qui fut utilisée chez les bactéries nodulantes *Rhizobium* dans les travaux de Laguerre [47].

Ces profils ainsi obtenus ne nous permettent de tirer d'avantages d'information concernant certains aspects de nos souches comme le poids moléculaire. Néanmoins, cela reste une initiative à l'identification des bactéries par les techniques de biologie moléculaire qui vont leur apparition ces dernières années dans ce domaine.



***CONCLUSION***

## Conclusion

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif qui constituent une part importante des bactéries isolées lors du diagnostic bactériologique des infections humaines. Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine.

Les eaux usées constituent un milieu aquatique rassemblant l'essentiel des rejets domestiques. Par leur richesse en matière organique, ils constituent un environnement favorable pour la prolifération des bactéries.

La présente étude s'est intéressée à la recherche et la caractérisation de quelques entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'oued Boumerzoug.

Il ressort de cette étude après évaluation de la FTAM que ces eaux usées sont une véritable niche écologique pour les bactéries vu la charge très élevée de ces dernières.

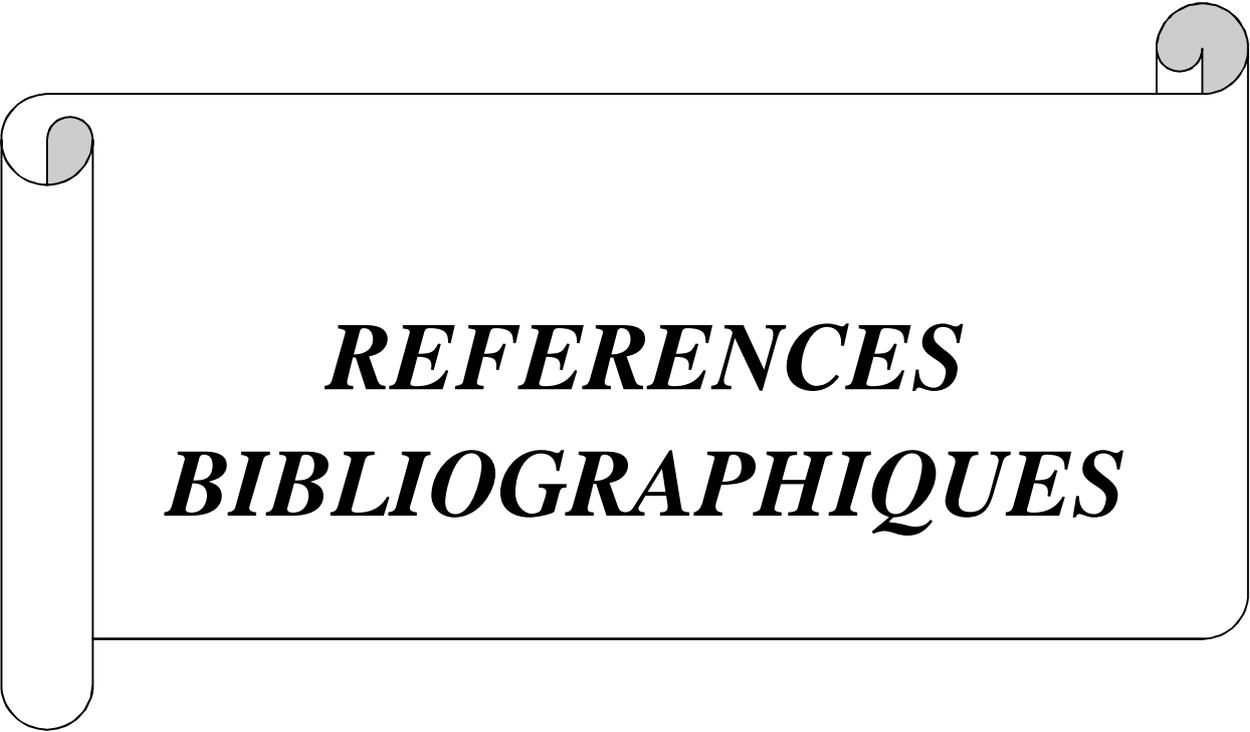
Parmi les germes recherchés, seules les souches d'*E. coli* se sont révélées présentes et les plus fréquentes. L'absence des *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica* dans notre recherche ne signifie en aucun cas leur inexistence. Leur absence pourrait s'expliquer par un certain nombre d'hypothèse parmi elle, le faible nombre de nos échantillons.

Outre les germes recherchés, nous avons pu mettre en évidence la présence d'autres souches d'entérobactéries qui pourraient s'avérer pathogènes.

Une initiation à l'étude moléculaire nous a permis également de réaliser une extraction ainsi que des profils électrophorétiques de l'ADN total des souches isolées.

Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de cette étude nous permettront de penser aux perspectives suivantes :

- Etaler notre étude sur une large zone (plusieurs sites) pendant une période longue avec plusieurs prélèvements.
- Déterminer les sérotypes
- Etudier l'antibiorésistance des germes recherchés
- Réaliser une étude moléculaire variée (PCR, RLFP, Profils de restriction...)
- Comparer les souches avec celles isolées dans les milieux hospitaliers.



***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## Références bibliographiques

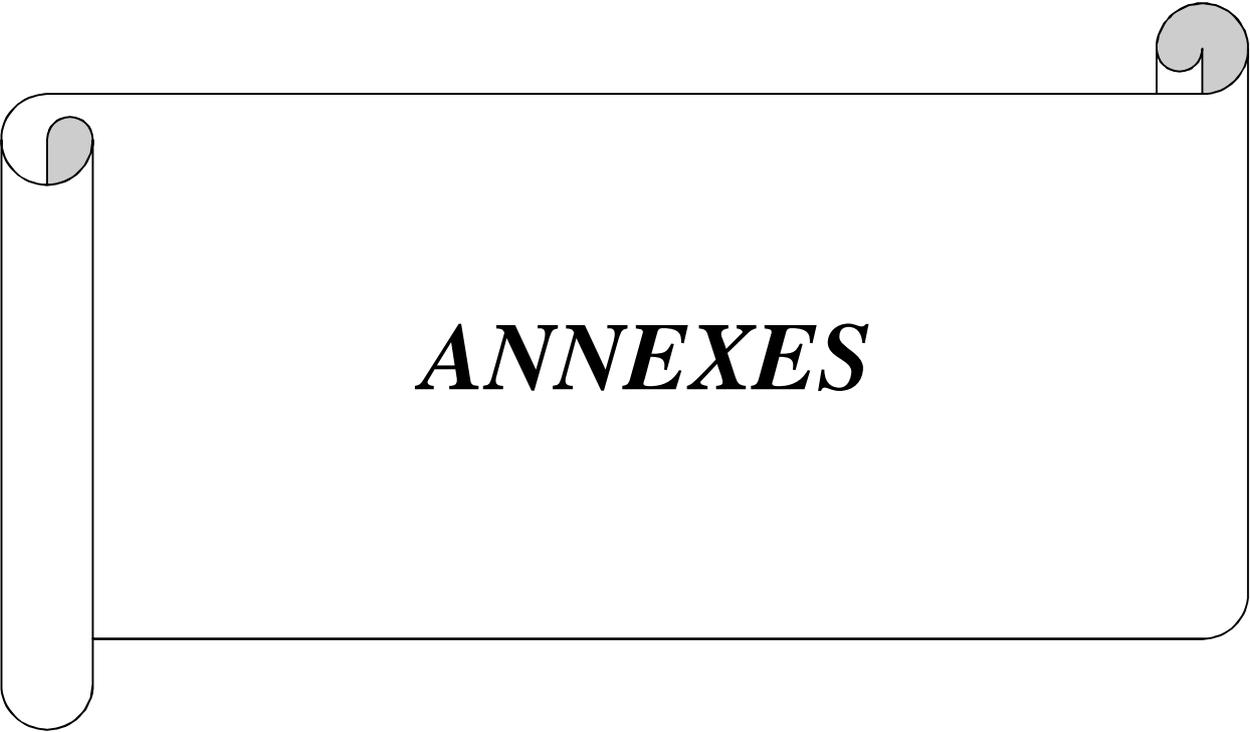
- [1]- **Verhaegen J. Bactériologie.** [En ligne]  
<https://www.kuleuven.be/vesaliusonline/UNIKEN%20KONGO.doc> (Consulté le 13/06/2016). p 1.
- [2]- **OMS. 2012.** Directives OMS pour l'utilisation sans risque des eaux, des excréta et des eaux ménagères. Volume II : utilisation des eaux usées en agriculture. 3<sup>e</sup> édition. OMS. p.27-28.
- [3]- **El Rhazi O. et Habib R. (2007).** Impact sanitaire de réutilisation des eaux usées. Université Cadi Ayyad Marrakech – Project de fin d'études de Licence SV. p1-6.
- [4]- **Cristian C. (2008).** Microbiologie Hygiène Base microbiologiques de la diététique. Ed. TEC & DOC Lavoisier, Paris. p.76 -86, 257.
- [5]- **Madigan M. et Martinko J. (2007).** Biologie des micro-organismes. 11<sup>ème</sup> Edition. PEARSON Education, France. p.354-355.
- [6]- **Meziani M. (2012).** Mémoire de Magistère, Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas, Université Mentouri Constantine. p.3.
- [7]- **Denis F.; Ploy C. M.; Martin C.; Bingen E. et Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Ed. Elsevier Masson SAS. p.335-401.
- [8]- **Le Minor L. et Veron M. (1989).** Bactériologie médicale. 2<sup>e</sup> édition. Edition Flammarion Médecine-Sciences. Paris. p.312-459.
- [9]- **Joly, B. et Reynaud, A. (2007).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation. Paris. p.3.
- [10]- **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Techniques et Documentation Lavoisier, Paris. p.128-129,247
- [11]- **Larpent J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Edition Technique et Documentation Lavoisier. Paris. p280.

- [12]- **Avril J. ; Dabernat H. ; Denis F. et Monteil H. (2000)**. Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Ellipses. Paris. p171-229.
- [13]- **Savoie F. (2011)**. Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments. THÈSE de doctorat en Microbiologie. Université de Bourgogne. France. p 42-43.
- [14]- **Vernozy-Rozand C. et Montet M.P. (2001)**. *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc, pp. 135.
- [15]- **Roberts C.L. ; Mshar P.A. ; Cartter M.L. ; Hadler J.L. ; Sosin D.M. ; Hayes P.S. et Barrett T.J. (1995)**. The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol and Infect* **115**: 447-454.
- [16]- **Griffin P.M. (1995)**. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Infectious of the Gastrointestinal Tract/Ed. par Blaser MJ, Smith PD, Radvin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, 739-758.
- [17]- **Stephan R. et Untermann F. (1999)**. Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers. *J Clin Microbiol* **37**: 1570-1572.
- [18]- **CHU-PS Pitié-Salpêtrière. (2003)**. Bactériologie DCEM1. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie.
- [19]- **Singleton P. (2005)**. Bactériologie pour la médecine, et les biotechnologies. 6<sup>e</sup> édition, Dunod, Paris. p.327-328.
- [20]- [microcsb.net/IMG/pdf/doc-62.pdf](http://microcsb.net/IMG/pdf/doc-62.pdf). [En ligne]. (Consulté le 06/02/2016)
- [21]- **Dufour J-P. (2005)**. Les diarrhées du macaque cynomolgus (Macaca fasciculaires): essai de prophylaxie dans un élevage de l'île Maurice. Université Paul-Sabatier De Toulouse. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. p. 65.
- [22]- **Carbannelle B. ; Denis F. ; Marmonier A. ; Pinon G. et Vargues R. (1987)**. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA. Paris. p.146, 155.
- [23]- **Fauchere J.L. et Avril J.L. (2002)**. Bactériologie générale et médicale. Ed Ellipses. Paris. p.365.

- [24]- ANSES. (2012). Agence Nationale de Sécurité Sanitaire : alimentation, environnement, travail. *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. p.2
- [25]- Boulahlib S. et Benrahma M. (2013). Caractérisation et étude de l'antibiorésistance de *Yersinia enterocolitica*. Mémoire Master. Université Mentouri Constantine. p. 16.
- [26]- Amara I. et Bakiri N. (2009). Etude de l'antibiorésistance des souches d'entérobactéries isolées des eaux polluées et en milieu hospitalier. Mémoire Master. Université Mentouri Constantine. p. 6.
- [27]- Belouni R. ; Benslimani A. ; Ramdani Bouguessa N. et Seghier M. (2009). Manuel de Microbiologie. 2<sup>e</sup> Edition. OPU. Alger. p.91
- [28]- Courvalin P. ; Leclercq R. et Bingen E. (2006). Antibiogramme. 2<sup>e</sup> édition. Editions ESKA. p.13.
- [29]- Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004). Microbiologie. DUNOD. Paris. p.162.
- [30]- Mounkoro P. et Diakité A. (2015). Recherche et étude de *Vibrio cholerae* dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug. Mémoire Master. Université Frères Mentouri Constantine. p.24, 41.
- [31]- Diallo A. A. (2013). *Escherichia coli* pathogène et résistance aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier. Toulouse. p. 59.
- [32]- Poyart C. (2003). Cours de professeur POYART dans la Faculté de Médecine Necker-Enfants malades. p. 62.
- [33]- Sekhri A. N. (2011). Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en sciences. Université Mentouri Constantine. p. 44.
- [34]- Galimand M. ; Sabtcheva S. ; Courvalin P. et Lambert, T. (2005). Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother*; **49**: 2949-2953.

- [35]-**Rejsek F. (2002)**. Analyse des eaux : Aspects réglementaires et techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine (CRDP). Bordeaux. 358 p.
- [36]- **Mara D.D. (1980)**. Sewage treatment in hot climates. Editions John Willey and Sons.
- [37]- **Demers A. et Lacroix E.** Les eaux usées : une pollution encore et toujours à la une. Comité de la recherche et de la sensibilisation. Coalition québécoise pour une gestion responsable de l'eau - Eau Secours! p. 1
- [38]- **Direction de l'Assainissement. (2003)**. Règlement d'assainissement collectif. Communauté urbaine de Nantes. p.2.
- [39]- **Toze S. (1997)**. Microbial pathogens in wastewater. Literature Review for Urban Water Systems. *Multi-divisional Research Program, Technical Report N° 1/97*. p. 7-8.
- [40]- **Baumont S. (2004)**. Réutilisation des eaux usées épurées : risques et faisabilité en Ile de France. Rapport de stage. ENSAT (Toulouse). p.19.
- [41]-**Bitton G. (2005)**. Wastewater microbiology. Wiley-Liss 3rd ed. New Jersey (USA). p.117.
- [42]- **Mara D. et Horan N. (2003)**. Handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press. London (UK). p.59.
- [43]- **Somma M. (2004)**. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Module 4 Extraction et purification de l'ADN. European Commission. [En ligne]  
[gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20FR/Module%2004.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20FR/Module%2004.pdf). Consulté le 14/06/2016. p. 4-5
- [44]- **Vinas E.** Méthodes d'études des acides nucléiques. [En ligne]  
[http://eric.vinas.free.fr/IMG/pdf/methodes\\_etude\\_acides\\_nucleiques-eleves.pdf](http://eric.vinas.free.fr/IMG/pdf/methodes_etude_acides_nucleiques-eleves.pdf). Consulté le 14/06/2016. p. 2-15-16
- [45]- **Guiraud J-P. (2012)**. Microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris. p. 253-254
- [46]-**Joffin J. N. et Leyral G. (2006)**. Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4<sup>e</sup> édition. Edition CRDP d'Aquitaine.

- [47]- **Laguerre G. ; Van Berkum P.; Amarger N. et Prévost D. (1997)**. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4748-4758.
- [48]- **Lezzar C. et Fekraoui I. (2011)**. Recherche de bactéries pathogènes au niveau des eaux de l'oued Rhumel à Constantine. Mémoire de Master. Université Mentouri Constantine. p.24
- [49]- **El Ouali Lalami A. ; Zanibou A. ; Bekhti K., Zerrouq F. et Merzouki M.( 2014)**. Contrôle de la qualité microbiologique des eaux usées domestiques et industrielles de la ville de Fès au Maroc. *J. Mater. Environ. Sci.* **5 (S1)**: 2325-2332.
- [50]-**Oliver J.D. (2005)**. The viable but non culturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* **43** 93-100.
- [51]-**Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A., et Palmer, L.M. (1985)**. Viable but non-culturable *Vibrio Cholerae* and related pathogens in the environment: Implication for release of genetically engineered microorganisms . *Biotechnology* 3.p. 817-820.
- [52]-**Barcina, I. ; Lebaron P. et Vives Rego J. (1997)**. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: *A biological approach*. *FEMS Microbiology Ecology* **23 (1)**: 1-9.
- [53]-**Grimes D.J. et Colwell, R.R. (1986)**. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiology Letters* **34 (2)**: 161-165.



***ANNEXES***

## ANNEXE 1 : Coloration de Gram

### 1. Prélèvement

- A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu
- A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile)
- A partir de produits alimentaires ou biologiques : prélever un aliquote du produit (dilué ou non) à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu

### 2. Réalisation du frottis

Étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

Le frottis réalisé doit être :

- MINCE et HOMOGENE, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame propre et dégraissée, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.

### 3. Séchage

- à la température du laboratoire, si possible
- ou bien à chaleur douce : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. **NE JAMAIS CHAUFFER BRUTALEMENT**

### 4. Fixation

**But** : tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame.

- Fixation par la chaleur :
  - à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
  - passer la lame-**frottis situé sur le dessus** dans la flamme chauffante, **LENTEMENT** et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.
- Fixation par l'alcool : employé **quel que soit le produit traité.**

- recouvrir la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

### 5. Coloration

**Principe:** La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi.

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
<b>COLORATION PRIMAIRE</b>	- Recouvrir la lame de <b>crystal violet ou violet de gentiane</b> - Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
<b>MORDANÇAGE</b>	- Recouvrir de <b>Lugol</b> - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
<b>DECOLORATION</b>	-Tenir la lame inclinée et faire couler pendant <b>quelques secondes</b> de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore.  - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	5 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.
<b>COLORATION SECONDAIRE</b>	- Recouvrir la lame de <b>fuschine</b>  - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
<b>SECHAGE</b>	- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

**ANNEXE 2: Milieux de Culture****Milieu Gélose Plate Count Agar (PCA)**

Tryptone.....	5 g/l
Extrait autolytique de levure.....	2.5 g/l
Glucose.....	1g/l
Agar agar.....	15g/l
pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: 7,0 +/- 0,2.	

**Milieu Eau peptonée exempte d'indole**

Tryptone .....	10g/l
Chlorure de sodium .....	5g/l
pH final à 25°C : 7,3 ±0,2	

**Milieu Gélose nutritive**

Extrait de viande .....	1,0 g/l
Extrait de levure .....	2.5 g/l
Peptone .....	5,0 g/l
Chlorure de sodium .....	5,0 g/l
Agar .....	15, 0 g/l
pH .....	7, 0

**Milieu Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP)**

Peptone.....	5g/l
Extrait de viande.....	3g/l
Lactose.....	10g/l
BCP .....	0,025g/l
<b>Agar</b> .....	15g/l

pH final = 7

**Milieu Gélose Désoxycholate Citrate Lactose (DCL)**

Extrait de viande .....	5 g/l
Peptone bactériologique.....	5 g/l
Désoxycholate de sodium .....	5 g/l
Thiosulfate de sodium .....	5,4 g/l
Citrate ferrique.....	1 g/l
Citrate de sodium.....	8,5 g/l
Lactose.....	10 g/l
Rouge neutre.....	0,02 g/l
Agar.....	12 g/l

pH final = 7,3

**Milieu Gélose *Salmonella-Shigella* (SS)**

Extrait de viande de bœuf .....	5g/l
Polypeptone.....	5g/l
Sels biliaires .....	8,5g/l
Thiosulfate de sodium .....	8,5g/l
Citrate ferrique.....	1g/l
Citrate de sodium .....	10g/l
Lactose .....	10g/l
Vert brillant .....	0,00033g/l
Rouge neutre .....	0,025g/l
Agar .....	13,5g/l

pH final = 7,0

**Milieu Gélose T S I**

Mélange de peptones .....	18g/l
Extrait de levure .....	3 g/l
Extrait de viande.....	4 g/l
Lactose.....	10g/l
Saccharose .....	10g/l
D-glucose.....	1g/l
Chlorure de sodium .....	5g/l

Citrate d'ammonium ferrique .....	0.3g/l
Thiosulfate de sodium.....	0.3g/l
Rouge de phénol .....	0.025g/l
Agar .....	14g/l

pH final :  $7,4 \pm 0,2$

### Milieu Kligler-Hajna

Extrait de viande de bœuf.....	3 g/l
Extrait de levure.....	3 g/l
Peptone.....	20 g/l
NaCl.....	5 g/l
Citrate ferrique.....	0,3 g/l
Thiosulfate de sodium.....	0,3 g/l
Lactose.....	10 g/l
Glucose.....	1 g/l
Rouge de phénol.....	0,05 g/l
Agar.....	12 g/l

pH = 7,4

### Milieu Mannitol-Mobilité

Peptone .....	20g/l
Nitrate de Potassium .....	1g/l
Mannitol .....	2 g/l
Rouge de Phénol à 1% .....	4ml
Agar .....	4 g/l

pH=8, 1

### Milieu Citrate de Simmons

Sulfate de Magnésium .....	0,2g/l
Phosphate mono ammoniacque .....	1g/l
Phosphate dipotassique .....	1g/l

Citrate de Sodium .....	2g/l
NaCl .....	5g/l
Bleu de bromothymol .....	80mg/l
Agar .....	12g/l

pH=6,8

#### Milieu Urée-indole

L-tryptophane .....	3g/l
Phosphate monopotassique .....	1g/l
Phosphate bipotassique .....	1g/l
NaCl .....	5 g/l
Urée .....	20 g/l
Alcool 95° .....	10ml
Rouge de phénol .....	25ml

pH=6,7

#### Milieu Clark et Lubs

Peptone tryptique.....	5 à 7g/l
Glucose.....	5g/l
Phosphate bipotassique.....	5g/l

pH = 7

#### Bouillon Nitraté

Infusion cœur-cerveau.....	25,0g/l
Nitrate de sodium.....	10, g/l

pH = 7,2

### ANNEXE 3 : Réactifs utilisés

#### Réactif de la recherche de l'oxydase

Disques imprégnés d'une solution à 1% de chlorhydrate de  
Tétraméthylparaphénylènediamine.

#### Réactif de Kovacs

P-dimethyl aminobenzaldéhyde.....	7g/l
Alcool amylique.....	75ml
Acide chlorhydrique concentré .....	20ml

#### Réactif de Voges-Proskauer

##### VP I

Hydroxyde de Potassium.....	40g/l
Eau.....	100ml

##### VP II

$\alpha$ -naphthol .....	6 g/l
Ethanol .....	100ml

#### Réactif TDA

Perchlorure de fer .....	3,4g/l
Eau distillée stérile .....	100ml

#### Réactif pour la recherche de la Nitrate réductase (NR)

##### Réactif I

Acide sulfanilique.....	0,8g/l
Acide Acétique 5N.....	100ml

##### Réactif II

Naphtylamine.....	0,5 g/l
Acide acétique 5N .....	100ml

**Solution de l'eau oxygénée à 10 % :**

Eau oxygénée à 10 V.....	0,5ml
Eau distillée .....	14,5ml

**Composition de la solution tampon Tris – Borate – EDTA**

TRIS (89 mM).....	10,78 g
Acide borique (89 mM).....	5,50 g
EDTA (2 mM).....	0,58 g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 8 ,2

**Gel d'agarose**

Tampon TBE.....	100ml
Agarose.....	0,8 g



Tableau d'identification de la galerie API 20 E

TUBE	REACTIONS		COMMENTAIRES
	POSITIVE	NEGATIVE	
ONPG	Jaune	Incolore	Une teinte jaune pâle est souvent obtenue, la considérer comme une réaction négative.
ADH	Rouge ou Jaune	Jaune	
LDC	Rouge ou Jaune	Jaune	
ODC	Rouge ou Jaune	Jaune	
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pâle ou jaune	La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobic)
H <sub>2</sub> S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	
URE	Rouge ou Jaune	Jaune	
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de James. Lire la réaction immédiatement
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pale	Ajouter 1 goutte de KOH à 40% puis 1 goutte d'alpha-naphtol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffuse du pigment	Aucune diffusion, incolore	La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative.
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation des sucres commence dans la partie la plus anaérobic du microtube (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive

## Isolement et Etude de quelques Entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'Oued Boumerzoug à Constantine

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

### Résumé

Les eaux usées sont susceptibles de renfermer et de véhiculer une grande variété d'agents pathogènes pour l'homme. Les organismes pathogènes présents dans les eaux usées d'une collectivité, en reflètent l'état sanitaire.

Les entérobactéries représentent une des principales familles de bacilles à Gram négatif se retrouvant partout y compris les eaux usées. Ce sont les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine surtout en milieu hospitalier.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et l'étude de quelques entérobactéries pathogènes dans les eaux usées d'oued Boumerzoug. Ainsi une évaluation préalable de la FTAM a été effectuée sur nos échantillons avant de procéder à des isollements sur milieux spécifiques ainsi qu'une identification par des méthodes microbiologiques standardisées puis une réalisation de profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées.

Sur trois échantillons étudiés, les résultats de la FTAM varient entre  $1.14 \cdot 10^6$  et  $13.8 \cdot 10^6$  UFC/ml qui témoignent d'une charge microbienne importante des eaux usées. Quant à l'isolement, sur un total de quatre germes recherchés, nous avons pu isoler et identifier 3 souches d'*E. coli* et une absence de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Yersinia enterocolitica* a été observée. Par contre d'autres germes ont été isolés comme *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Enterobacter agglomerans* et *Pseudomonas sp.*. Les profils électrophorétiques de l'ADN total des souches identifiées ont été aussi obtenus.

La présente étude nous a permis de récolter des données locales relatives à la présence de pathogènes et des indicateurs de contamination fécale tels qu'*E. coli*. et une contribution à l'extraction de l'ADN total des souches isolées.

**Mots clés :** Entérobactéries, eaux usées, Oued Boumerzoug, FTAM, isolement

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Microbiologie (Laboratoire 11) de la FSNV (UFM-C)

Jury d'évaluation :

<b>Présidente du jury :</b>	Mme BOUBEKRI K.	(MCA - UFM Constantine)
<b>Rapporteur :</b>	Mme BOUZERAIB L.	(MAA - UFM Constantine)
<b>Examinatrice :</b>	Melle MEZIANI M.	(MAA - UFM Constantine)

**Date de soutenance :** 28/06/2016