



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubakr Belkaid – Tlemcen –



Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à
l'Environnement

« LAMAABE »

MÉMOIRE

Présenté par

BOUZEROUATA ACHOUAK

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

**Étude de la résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif
isolés des effluents traités de la ville de Tlemcen**

Soutenu publiquement, le 25/06/2025, devant le jury composé de :

Président	Mr BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Mme AYAD Amel	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	Mme MEZIANI Zahira	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2024 /2025

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Tout-Puissant, pour ses innombrables bienfaits, pour m'avoir accordé la force et la patience nécessaires afin de mener à bien ce modeste travail et d'achever mon parcours universitaire dans les meilleures conditions.

Ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie (LAMAABE) de l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

*J'exprime ma profonde gratitude à mon encadrante, **Madame Ayad Amel**, Maître de conférences au département de biologie, pour sa disponibilité, ses conseils avisés et son accompagnement bienveillant tout au long de ce travail. Son professionnalisme et sa rigueur scientifique ont été d'un apport précieux.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également aux membres du jury, Monsieur **Belyagoubi Larbi**, Professeur au département de biologie et président du jury, pour son soutien constant et son engagement envers ses étudiants, ainsi qu'à **Madame Meziani Zahira**, Maître de conférences au même département, examinatrice de ce mémoire, pour son sérieux, son dévouement et la qualité de ses remarques constructives. Leur acceptation d'évaluer ce travail constitue pour moi un grand honneur.*

Je remercie vivement l'Office National de l'Assainissement ONA pour avoir facilité mes démarches en autorisant les prélèvements d'échantillons, élément essentiel à la réalisation de cette étude.

*Mes remerciements vont également à **Madame Hourmane Fatouma**, responsable de station, pour son accueil chaleureux, son accompagnement sur le terrain et les informations précieuses fournies, ainsi qu'aux agents de la station d'Ain El Hout, pour leur aide et leur disponibilité. Je remercie aussi les responsables de la station ONID pour leur précieuse collaboration lors des prélèvements.*

*Je tiens à saluer le professionnalisme de l'ingénieure du laboratoire LAMAABE ainsi que l'ensemble du personnel, enseignants, chercheurs et étudiants, pour leur soutien tout au long de mon passage au sein du laboratoire. Une mention particulière à **Madame Nas Fatima** pour son aide précieuse.*

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À Achouak, À celle qui a affronté l'épuisement avec courage, Et qui a continué d'avancer, même lorsque tout incitait à l'abandon. À mon âme persévérante, restée fidèle à ses rêves jusqu'au bout, Je dédie ce travail avec fierté et gratitude, En hommage à chaque instant de résistance, À chaque silence chargé d'espoir, Et à chaque pas accompli avec dignité.

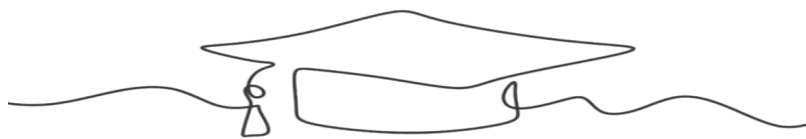
À mes chers parents, Source inépuisable d'amour, de tendresse et de force, Merci pour votre présence constante, Pour votre patience, votre confiance inébranlable, Votre soutien indéfectible, Et vos prières qui m'ont accompagnée à chaque étape. Je vous dédie humblement le fruit de ce parcours, En modeste reconnaissance d'un amour que les mots ne sauraient contenir.

À mes frères et sœur bien-aimés : Israa, Réda et Abdelbasset, Vous avez été mon refuge dans les moments de doute, Ma joie dans les jours les plus lourds, Votre présence m'a éclairé un chemin parfois incertain. Chaque mot sincère, chaque regard encourageant a nourri ma patience et ma force.

À mes chères amies : Halima Ikram, Wassila et Maroua, Merci pour votre soutien dans les moments difficiles, Pour votre fidélité constante, Et pour cette amitié précieuse, sincère et inestimable. Le chemin fut véritablement éprouvant...Mais votre présence l'a rendu plus doux, plus supportable.

À toute ma famille, en particulier mes cousines Amariya, Amel, Rawnek, Salima, Samah et Souhila, merci pour votre soutien et vos encouragements.

Et à tous ceux qui m'aiment, de près ou de loin, Merci pour votre affection, vos mots encourageants et vos prières sincères. Vous faites partie de cet accomplissement, ce travail porte aussi un peu de vous.



ملخص

تُعدّ العصيات سالبة الجرام والمتعددة المقاومة في المياه المستعملة المعالجة مصدر قلق متزايد للصحة العامة والبيئة. تهدف هذه الدراسة، التي أُنجزت ما بين شهري مارس وماي 2025 بولاية تلمسان، إلى عزل وتشخيص البكتيريا المقاومة من موقعين: محطة التطهير عين الحوت التابعة للديوان الوطني للتطهير، وحوض التجميع التابع للديوان الوطني للسقي وصرف المياه مثلت البكتيريا المعوية 58.3% من العزلات، وكانت كليبسيلا الرئوية الأكثر انتشارًا بنسبة 57.1%، تليها الاشيريكية القولونية بنسبة 21.4%. أما العصيات غير المخمرة فشكّلت 41.7% من العزلات، وتصدّرتها الزوائف المضيفة /يوتيدا بنسبة 40%، تليها الزوائف الزنجارية بنسبة 30%. سُجّلت نسب مقاومة مرتفعة تجاه عدة عائلات من المضادات الحيوية، لا سيما البيتالاكتام، الكاربابينيمات، الأمينوغليكوزيدات والفلوروكينولونات. كما تم الكشف عن احتمال وجود إنزيمات الكاربابينيماز والبيتالاكتاماز ذات الطيف الموسع لدى بعض العزلات، مما يعكس انتشار آليات مقاومة إنزيمية خطيرة في المياه المعالجة. تؤكد هذه النتائج على الضرورة الملحة لتعزيز مراقبة جودة المياه العادمة المعالجة والمُعاد استخدامها، إلى جانب اعتماد سياسات عقلانية في استخدام المضادات الحيوية، للحد من انتشار المقاومة البكتيرية في الوسط البيئي .

الكلمات المفتاحية: مقاومة، عصيات سالبة الجرام، بكتيريا معوية، مياه مستعملة معالجة، محطة تطهير، تلمسان.

Abstract

The presence of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in treated wastewater represents a growing concern for both public health and the environment. This study, conducted between March and May 2025 in the Tlemcen region, enabled the isolation of 24 bacterial strains from two sampling sites: the Aïn El Hout wastewater treatment plant (ONA) and the ONID collection basin. Enterobacteria accounted for 58.3% of the isolates, with *Klebsiella pneumoniae* being the most predominant (57.1%), followed by *Escherichia coli* (21.4%). Non-fermenting bacilli represented 41.7%, mainly *Pseudomonas fluorescens/putida* (40%) and *Pseudomonas aeruginosa* (30%).

High resistance rates were observed against several antibiotic families, notably β -lactams, carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones. The probable presence of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in some strains highlights the dissemination of concerning enzymatic resistance mechanisms in treated effluents. These findings underscore the urgent need to strengthen surveillance of reused treated water and to promote the rational use of antibiotics to limit the spread of such resistance in the environment.

Key words: resistance, Gram -negative bacilli, Enterobacteria, treated wastewater, wastewater treatment plant, Tlemcen.

Résumé

La présence de bacilles à Gram négatif multirésistants dans les eaux usées traitées constitue un enjeu préoccupant pour la santé publique et l'environnement. Cette étude, réalisée entre mars et mai 2025 dans la wilaya de Tlemcen, a permis l'isolement de 24 souches à partir de deux sites de prélèvement : la station d'épuration d'Aïn El Hout (ONA) et le bassin de récolte de l'ONID. Les entérobactéries représentaient 58,3 % des isolats, dominées par *Klebsiella pneumoniae* (57,1 %) et *Escherichia coli* (21,4 %). Les bacilles non fermentaires constituaient 41,7 %, principalement *Pseudomonas fluorescens/putida* (40 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (30 %).

Des taux élevés de résistance ont été observés envers plusieurs familles d'antibiotiques, notamment les β -lactamines, les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones. La présence probable de carbapénémases et de BLSE chez certaines souches met en évidence la circulation de mécanismes enzymatiques préoccupants dans les effluents traités. Ces résultats soulignent la nécessité de renforcer la surveillance des eaux traitées réutilisées et de promouvoir une gestion raisonnée des antibiotiques afin de limiter la dissémination de telles résistances dans l'environnement.

Mots clés : résistance, Bacilles à Gram négatif, entérobactéries, eaux usées traitées, Station d'épuration, Tlemcen.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Les stations d'épuration.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Importance et objectifs des stations d'épuration	4
1.2.1. Objectifs techniques et sanitaires	4
1.2.2. Importance environnementale	4
1.3. Classification des stations d'épuration	5
1.3.1. Stations à traitement biologique	5
1.3.2. Stations à traitement physico-chimique.....	9
1.3.3. Stations de lagunage.....	10
1.3.4. Stations hybrides	10
1.4. Les étapes du traitement des eaux usées	10
1.4.1. Prétraitement	10
1.4.2. Traitement primaire.....	11
1.4.3. Traitement secondaire	12
1.4.4. Traitement tertiaire	12
1.5. Traitement des boues	13
1.5.1. Épaississement.....	13
1.5.2. Digestion	13
1.5.3. Déshydratation.....	13
1.5.4. Valorisation	13
1.6. Limites et défis des stations d'épuration	14
1.6.1. Impact écologique et risques sanitaires	14
1.6.2. Gestion et valorisation des boues	14

1.6.3. Rejets d'antibiotiques et gènes de résistance.....	14
1.6.4. Persistance des bactéries résistantes	15
1.7. Innovations et perspectives d'amélioration.....	15
1.7.1. Les technologies membranaires dans le traitement des eaux usées.....	15
1.7.2. Réduction de la résistance bactérienne en station d'épuration	15
2. les bactéries résistantes aux antibiotiques	18
2.1. Définition.....	18
2.1.1. Résistance intrinsèque	18
2.1.2. Résistance acquise	18
2.2. Mécanismes de résistance bactérienne	18
2.2.1. Réduction de l'imperméabilité	19
2.2.2. Pompes d'efflux	19
2.2.3. Modification de la cible.....	19
2.2.4. Mécanisme enzymatique	20
2.3. Impact en santé publique et en microbiologie environnementale	20
2.4. Origines des bactéries résistantes	21
2.4.1. Usage médical des antibiotiques.....	21
2.4.2. Usage vétérinaire des antibiotiques	21
2.4.3. Agriculture et aquaculture	21
2.4.4. Déversements industriels et hospitaliers.....	22
2.4.5. Stations d'épuration et sélection des bactéries résistantes.....	22
2.5. Les bactéries résistantes aux antibiotiques isolées à partir des stations d'épuration	22
Matériel et Méthodes.....	24
1. Matériel	25
1.1. Milieux de culture	25
1.1.1. Milieux de culture liquides.....	25
1.1.2. Milieux de culture solides	25
1.2. Tests biochimiques.....	25
1.3. Antibiotiques	25
1.3.1. En disques.....	25
1.3.2. En poudre	26

1.4. Solutions et colorants	26
2. Méthodes	27
2.1. Lieu d'étude.....	27
2.2. Présentation des sites de prélèvement	27
2.2.1. Station d'épuration d'Aïn El Hout.....	27
2.2.2. Le site ONID	30
2.3. Prélèvement	30
2.4. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques	31
2.4.1. Enrichissement	31
2.4.2. Isolement et purification.....	31
2.5. Identification des souches bactériennes.....	32
2.5.1. Coloration de Gram	32
2.5.2. Test de la catalase	32
2.5.3. Test de l'oxydase	33
2.5.4. Test de TSI	33
2.5.5. Galerie API 20 E	34
2.5.6. Galerie API 20 NE.....	35
2.6. Conservation des souches.....	35
2.7. Étude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques	36
2.7.1. Antibiogramme	36
2.7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	36
2.8. Étude des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	38
2.8.1. Recherche de la production de carbapénémases par test de CIM	38
2.8.2. Test de Hodge	39
2.8.3. Test de synergie.....	40
Résultats et discussion	41
1. Résultats	42
1.1. Répartition des souches identifiées.....	42
1.2. Répartition des souches selon les espèces	42
1.3. Etude de la résistance aux antibiotiques	47
1.3.1. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	47

1.3.2. Résistance des bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques	49
1.4. Concentration minimale inhibitrice	51
1.5. Phénotype de résistance aux β -lactamines	54
1.5.1. Résultats de test CIM (Carbapenem Inactivation Method)	54
1.5.2. Résultats de test de Hodge.....	55
1.5.3. Résultats du test de synergie.....	55
2. Discussion	57
Conclusion	60
Références bibliographiques	62
Annexes	71

Liste des abréviations

STEP	Station d'épuration des Eaux Usées
BGN	Bacilles à Gram Négatif
C3G	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
MES	Matières en Suspension
ODD	Objectifs de Développement Durable
SARM	Staphylococcus aureus Résistant à la Méricilline
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Étendu
HRT	Temps de Rétenion Hydraulique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
PLP	Protéine Liant la Pénicilline
TIC	Ticarcilline
FOX	Céfoxitine
AMC	Amoxicilline + Acide Clavulanique
TCC	Ticarcilline + Acide Clavulanique
IMP	Imipénème
MEM	Méropénème
CPD	Céfpodoxime
GN	Gentamicine
TOB	Tobramycine
NOR	Norfloxacin
SXT	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime
K	Kanamycine
CAZ	Ceftazidime

CTX	Céfotaxime
ERT	Ertapénème
ONA	Office National de l'Assainissement
ONID	Office National de l'Irrigation et du Drainage
UFC	Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par boues activées.....	6
Figure 2: Schéma représentent le principe de fonctionnement de l'épuration par lits bactériens.....	7
Figure 3: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par disques biologiques rotatifs	8
Figure 4: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par lagunage. ..	10
Figure 5: Représentation schématique d'une station d'épuration	13
Figure 6: Schéma illustrant les mécanismes d'inactivation microbienne induits par les nanomatériaux	16
Figure 7: Tableau synoptique de la station d'épuration de Tlemcen	29
Figure 8: Bassin de récolte des eaux traitées relevant de l'ONID.	30
Figure 9: Test CIM	39
Figure 10: Test de Hodge	40
Figure 11: Répartition des souches identifiées selon le lieu de prélèvement.	42
Figure 12: Répartition des souches isolées selon les espèces.	43
Figure 13: Identification des entérobactéries par galerie API 20E.	46
Figure 14: Identification des BGN non fermentaire par galerie API 20 E et API 20 NE.	47
Figure 15: Taux de résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	48
Figure 16: Résistance des entérobactéries aux antibiotiques au niveau des deux sites de prélèvement.	49
Figure 17: Taux de résistances des BGN non fermentaire aux antibiotiques.	50
Figure 18: Résistance des BGN non fermentaires aux antibiotiques au niveau des deux sites de prélèvement.	51
Figure 19: Résultats des CMI sur une microplaque.	53
Figure 20: Résultats de test CIM.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 21: Résultats de test de Hodge.	55
Figure 22: Résultats du test de synergie	56

Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des procédés de traitement biologique des eaux usées	9
Tableau 2: Sites et dates des prélèvements	31
Tableau 3: Résultats des tests d'identification des souches étudiées.	43
Tableau 4: Résultats des CMI pour Ertapénème et Imipénème	52

Introduction

Les antibiotiques représentent l'un des outils thérapeutiques les plus déterminants de la médecine moderne, en raison de leur efficacité contre un large éventail d'infections bactériennes (Aminov, 2010). Toutefois, leur usage intensif, souvent inapproprié, dans les secteurs médical, vétérinaire et agricole a fortement contribué à l'émergence et à la propagation de bactéries multirésistantes, menaçant ainsi l'efficacité de ces traitements à l'échelle mondiale (Berendonk *et al.*, 2015).

L'antibiorésistance est ainsi devenue un enjeu sanitaire mondial, reconnue par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme l'une des plus grandes menaces actuelles pour la santé humaine (WHO, 2014).

Parmi les agents pathogènes les plus redoutés, les bacilles à Gram négatif jouent un rôle majeur, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, en raison de leur capacité à développer des résistances croisées à de multiples familles d'antibiotiques (Tacconelli *et al.*, 2018). Cette problématique est encore plus marquée dans les pays en développement, où les systèmes de régulation de l'usage des antibiotiques et de gestion des effluents demeurent souvent insuffisants (Tadesse *et al.*, 2017).

Face à l'inefficacité croissante des antibiotiques de première intention, les carbapénèmes sont devenus des agents de dernier recours pour le traitement des infections graves provoquées par les BGN multirésistants (Poirel *et al.*, 2017). Cependant, l'émergence de souches résistantes à ces molécules a été signalée dans divers milieux, notamment à travers la production de carbapénémases, des enzymes capables d'hydrolyser non seulement les carbapénèmes, mais aussi d'autres β -lactamines comme les céphalosporines de 3^{ème} génération (Liu *et al.*, 2016). Ces mécanismes de résistance enzymatique posent un défi majeur en milieu hospitalier comme dans l'environnement (Hamidou *et al.*, 2025).

Plusieurs études ont démontré la présence de souches de BGN multirésistants dans les eaux traitées, y compris en Algérie, ce qui soulève des inquiétudes quant à leur réutilisation en irrigation ou leur rejet dans le milieu naturel (Cherak *et al.*, 2022 ; Mokeddem *et al.*, 2025).

Les environnements aquatiques, et notamment les stations d'épuration, sont aujourd'hui identifiés comme des réservoirs et des vecteurs majeurs de la dissémination de la résistance bactérienne, en raison de la présence simultanée de contaminants microbiens et chimiques (Rizzo *et al.*, 2013).

Compte tenu de cette situation, la présente étude a pour objectif d'identifier les bacilles à Gram négatif résistants présents dans les eaux usées traitées et d'analyser leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques. Elle s'articule en trois parties : une synthèse bibliographique portant sur les stations d'épuration et les bactéries résistantes aux antibiotiques ; une section méthodologique décrivant les sites de prélèvement, les techniques d'identification et les tests de sensibilité réalisés ; et enfin, une partie consacrée à l'analyse des résultats et à leur mise en perspective par rapport aux données de la littérature.

Synthèse bibliographique

1. Les stations d'épuration

1.1. Définition

Les stations d'épuration (STEP) sont des infrastructures techniques conçues pour assurer le traitement des eaux d'origine domestique et industrielle avant leur rejet dans le milieu naturel. Elles mobilisent des procédés physiques, chimiques et biologiques visant à éliminer ou réduire la charge polluante contenue dans ces eaux.

Le traitement génère principalement deux types de boues : les boues primaires, issues de la décantation primaire, et les boues secondaires (ou boues activées), produites lors du traitement biologique. Ces résidus, riches en matière organique et en composés divers, doivent être soumis à un traitement complémentaire avant toute élimination ou valorisation (Demirbas *et al.*, 2017).

1.2. Importance et objectifs des stations d'épuration

1.2.1. Objectifs techniques et sanitaires (Tchobanoglous *et al.*, 2014)

Les stations d'épuration poursuivent plusieurs objectifs techniques et sanitaires essentiels afin de limiter les impacts environnementaux et sanitaires des eaux usées

- ❖ **Réduction des matières solides et flottantes** : pour prévenir l'envasement et les obstructions dans les milieux aquatiques.
- ❖ **Diminution de la charge organique biodégradable** : par la réduction de la demande biochimique en oxygène (DBO), évitant ainsi l'appauvrissement en oxygène des milieux récepteurs.
- ❖ **Élimination des agents pathogènes** : afin de protéger la santé publique contre les maladies d'origine hydrique.
- ❖ **Réduction des nutriments (azote et phosphore)** : pour prévenir les phénomènes d'eutrophisation des plans d'eau.
- ❖ **Conformité réglementaire** : en assurant le respect des normes locales et nationales relatives à la qualité des rejets.

1.2.2. Importance environnementale

La réutilisation et le traitement des eaux usées jouent un rôle clé dans la préservation de l'environnement et la gestion durable des ressources

- ❖ **Protection des écosystèmes aquatiques** : la réduction de la charge polluante (matière organique, substances chimiques toxiques) préserve la biodiversité et protège les habitats naturels sensibles (Choudri *et al.*, 2020).

- ❖ **Réduction de la pollution** : le traitement des eaux usées permet de diminuer la concentration de polluants organiques, inorganiques et microbiologiques, limitant la contamination des eaux de surface et les risques pour la santé humaine et animale (Choudri *et al.*, 2020).
- ❖ **Réutilisation des eaux traitées** : en période de stress hydrique, l'eau traitée peut être utilisée pour l'irrigation agricole, les usages industriels ou la recharge des nappes phréatiques, contribuant à la gestion durable de la ressource (Jaramillo et Restrepo, 2017).
- ❖ **Valorisation des sous-produits** : les boues issues du traitement peuvent être utilisées pour la récupération de nutriments ou la production de biogaz, dans une logique d'économie circulaire (Jaramillo et Restrepo, 2017).
- ❖ **Contribution aux Objectifs de Développement Durable (ODD)** : La réutilisation des eaux usées traitées aide à atteindre l'ODD 6 en améliorant l'accès à l'eau propre et à l'assainissement, tout en protégeant la santé publique et les milieux aquatiques (Tortajada, 2020).

1.3. Classification des stations d'épuration

1.3.1. Stations à traitement biologique

Le traitement biologique repose sur l'utilisation de micro-organismes capables de dégrader la matière organique biodégradable contenue dans les eaux usées. Parmi les procédés les plus utilisés, on trouve plusieurs systèmes différents, chacun ayant des caractéristiques et des avantages spécifiques (Henze *et al.*, 2008).

- **Système de boues activées**

Le système de boues activées (figure 1) est l'une des méthodes les plus couramment utilisées dans le traitement biologique des eaux usées. Dans ce procédé, des micro-organismes sont maintenus en suspension dans un bassin aéré. L'oxygénation permet de favoriser la dégradation de la matière organique, tout en assurant une aération suffisante pour le métabolisme des micro-organismes (Henze *et al.*, 2008). Ces derniers sont principalement des bactéries aérobies hétérotrophes, telles que *Acinetobacter*, *Comamonas* et *Pseudomonas*, qui assurent la dégradation des polluants organiques et la formation des floccs. Des bactéries nitrifiantes comme *Nitrospira* peuvent également être présentes. Par ailleurs des archées méthanogènes (*Methanosarcinales*) et des protozoaires tels que les ciliés contribuent à l'équilibre et à la clarification du système (Shchegolkova *et al.*, 2016).

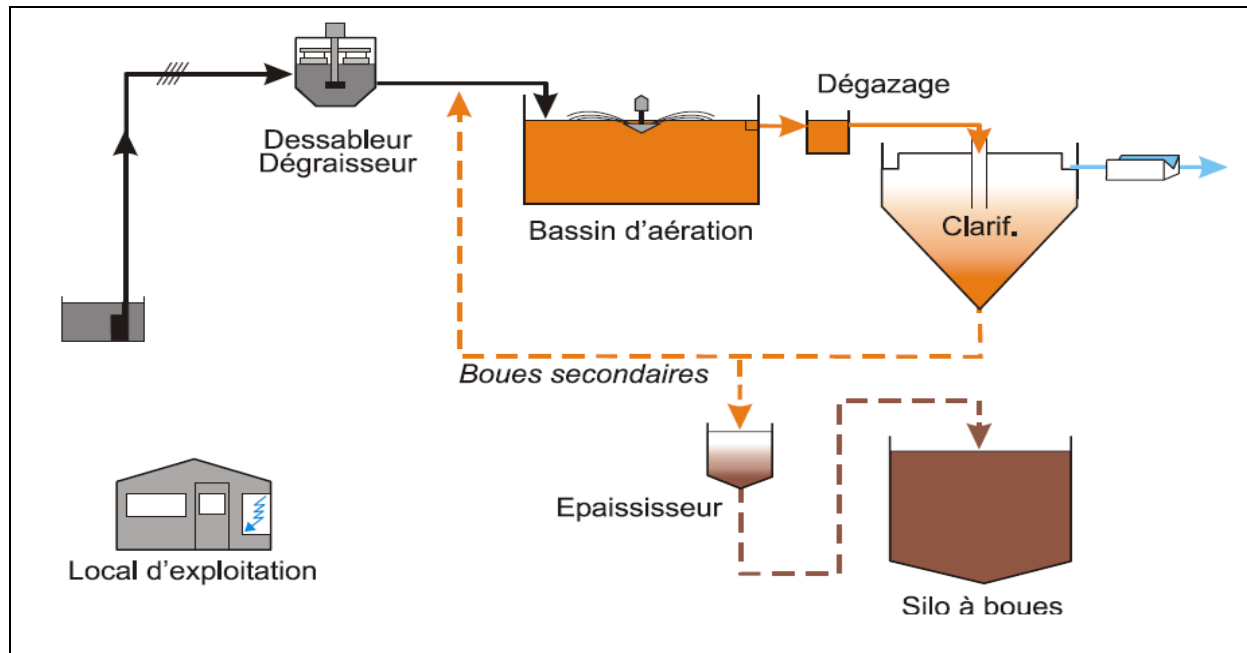


Figure 1: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par boues activées.

(<https://fr.scribd.com/document/549397180>)

- **Biofiltres ou lits bactériens**

Les biofiltres ou lits bactériens (figure 2) constituent une méthode efficace de traitement biologique. Les micro-organismes y sont fixés sur un support solide, tel que des granulats ou des matériaux synthétiques, augmentant ainsi la surface de contact entre les bactéries et la matière organique. L'eau traverse le filtre, où cette flore fixée assure la dégradation des polluants (Tchobanoglous *et al.*, 2014).

La majorité des micro-organismes présents sont des bactéries aérobies fixées, en particulier les *Proteobacteria*, qui contribuent à l'élimination du carbone organique dissous. Parmi elles, on trouve des bactéries nitrifiantes telles que *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* et *Nitrospira*. Des archées oxydant l'ammoniac, comme *Nitrosopumilus*, ainsi que divers protozoaires et parfois des champignons, peuvent également être présents selon les conditions du milieu (Bai *et al.*, 2022).

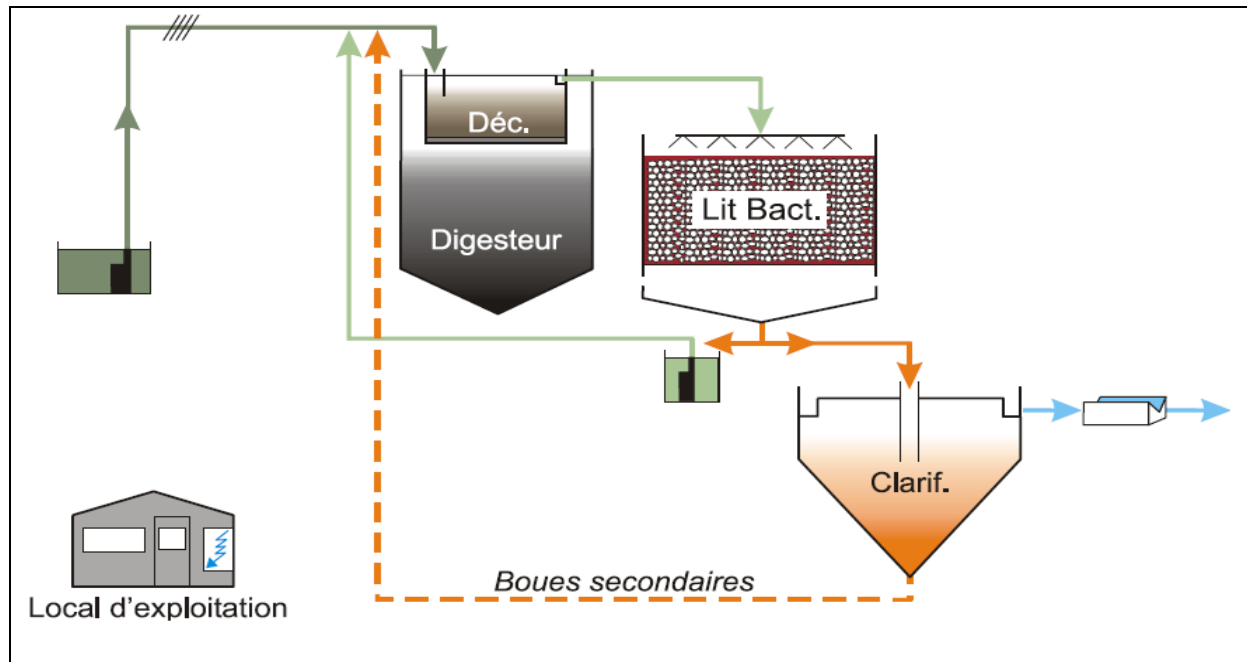


Figure 2: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par lits bactériens.

(<https://fr.scribd.com/document/549397180>)

- **Disques biologiques rotatifs**

Les disques biologiques rotatifs (figure 3) sont un procédé offrant une grande stabilité face aux variations de charge hydraulique. Le système est composé de disques fixés sur des axes rotatifs, partiellement immergés dans les eaux usées. Lors de la rotation, les micro-organismes fixés sont exposés successivement à l'eau et à l'air, ce qui favorise leur activité biologique (Tchobanoglous *et al.*, 2014).

Ces micro-organismes forment un biofilm structuré, composé principalement de bactéries aérobies, tels que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Des bactéries hétérotrophes responsables de la dégradation de la matière organique y coexistent, ainsi que des bactéries dénitrifiantes. Dans certains cas, des bactéries anaérobies oxydant l'ammonium, comme *Candidatus Brocadia*. Ce biofilm peut aussi héberger d'autres groupes tels que des protozoaires, des champignons et parfois des microalgues, qui participent collectivement à l'épuration des eaux usées (Waqas *et al.*, 2023 ; Sonthiphand *et al.*, 2022).

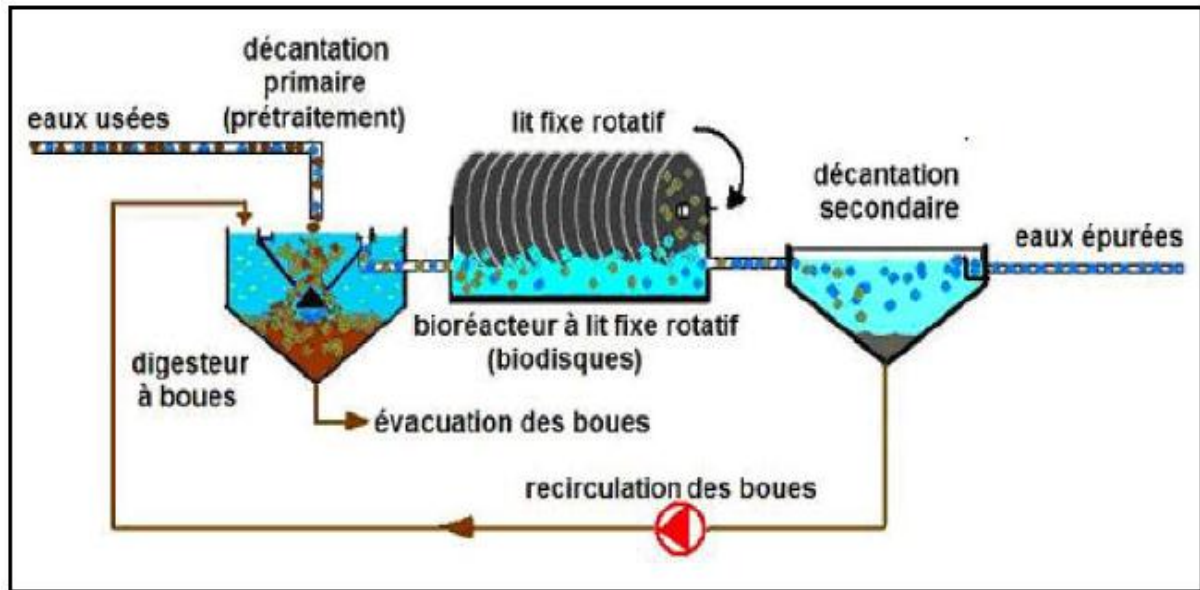


Figure 3: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par disques biologiques rotatifs (Telli, 2013).

Afin de mieux comprendre les différences entre les principaux procédés de traitement biologique des eaux usées, le tableau 1 est présenté ci-dessous. Il résume les caractéristiques principales des systèmes à boues activées, des biofiltres (ou lits bactériens) et des disques biologiques rotatif.

Tableau 1: Comparaison des procédés de traitement biologique des eaux uséesAdapté de (Tchobanoglous *et al.*, 2014) .

Critères	Boues activées	Biofiltres (lits bactériens)	Disques biologiques rotatifs
Principe	Aération d'un mélange d'eaux usées et de boues contenant des microorganismes en suspension.	Les eaux usées ruissellent sur un lit fixe rempli de matériaux supportant des bactéries.	Les eaux usées passent partiellement immergées sur des disques tournants couverts de biofilm bactérien.
Type de culture	Culture en suspension (bactéries aérobies, bactéries hétérotrophes, bactéries nitrifiantes, archées méthanogènes, protozoaires).	Culture fixée (bactéries aérobies, bactéries nitrifiantes, archées champignons, protozoaires).	Culture fixée sur support rotatif (bactéries aérobies, bactéries hétérotrophes, bactéries anaérobies, bactéries dénitrifiantes, microalgues, champignons et protozoaires)
Efficacité d'élimination de la DBO ₅	(> 90 %).	(70–90 %).	(80–90 %).
Besoin en énergie	Élevé (pompes et aérateurs).	Faible à modéré	Modéré (moteur pour la rotation des disques).
Surface requise	Relativement grande.	Plus compacte que les boues activées.	Très compacte.
Maintenance	Relativement exigeante (gestion de la biomasse, contrôle de l'oxygénation).	Simple (nettoyage périodique du lit).	Simple (surveillance de l'état des disques).
Applications typiques	Stations urbaines et industrielles de moyenne à grande capacité.	Petites à moyennes collectivités ou industries.	Petites collectivités, stations décentralisées.

1.3.2. Stations à traitement physico-chimique

Les stations à traitement physico-chimique appliquent des procédés tels que la coagulation-floculation, la précipitation chimique ou la neutralisation. Ces traitements visent principalement à éliminer les particules en suspension et certains polluants spécifiques, notamment dans les eaux industrielles contenant des substances chimiques difficiles à dégrader biologiquement (Bratby, 2016).

1.3.3. Stations de lagunage

Le lagunage naturel (figure 4) est une technique extensive de traitement des eaux usées utilisant de grands bassins peu profonds. L'épuration est assurée par des processus biologique combinant activité bactérienne et la photosynthèse des algues. Ce procédé est particulièrement adapté aux petites collectivités rurales en raison de son faible coût d'exploitation, bien qu'il nécessite des surfaces importantes pour son implantation (Racault et Boutin, 2004).

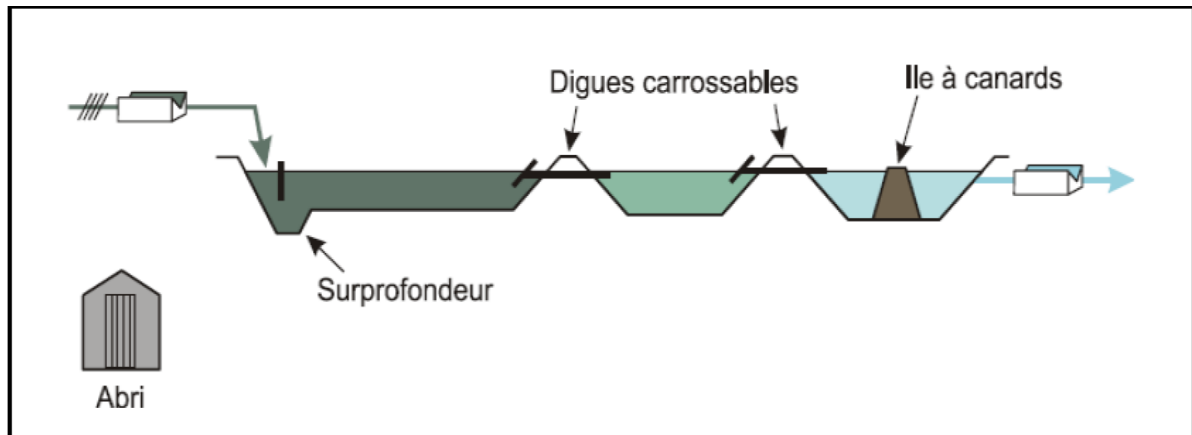


Figure 4: Schéma représentant le principe de fonctionnement de l'épuration par lagunage.

(<https://fr.scribd.com/document/549397180>)

1.3.4. Stations hybrides

Les stations hybrides sont des installations qui intègrent plusieurs technologies de traitement des eaux usées telles que des procédés biologique, physico-chimique et extensifs. Cette combinaison vise à mieux répondre aux spécificités des charges polluantes et atteindre des objectifs de qualité plus élevés. En effet, ces systèmes permettent de pallier les limitations inhérentes à chaque procédé pris individuellement et d'optimiser la performance globale de l'épuration (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

1.4. Les étapes du traitement des eaux usées (Figure 5)

1.4.1. Prétraitement

Le prétraitement constitue la première étape essentielle du processus de traitement des eaux usées. Il vise principalement à éliminer les solides grossiers, les sables et les huiles qui risquent de perturber ou d'endommager les équipements situés en aval. Bien qu'il n'assure qu'une faible réduction de la charge organique, il demeure indispensable pour préserver l'efficacité et la durabilité des étapes suivantes (Tilley *et al.*, 2014).

- **Criblage**

Le criblage a pour but de retenir les déchets solides flottants ou immergés de grande taille à l'aide de grilles installées à l'entrée de la station. Selon leur ouverture, ces grilles sont classées en : grossières (25–150 mm), intermédiaires (10–25 mm) ou fines (1,5–10 mm). Dans les stations modernes, les grilles fines associées à un nettoyage mécanique sont privilégiées pour optimiser l'efficacité (Qasim et Zhu, 2018).

- **Dessablage**

Le dessablage consiste à éliminer les particules minérales lourdes telles que le sable, les graviers et parfois les fragments de verre, afin de prévenir l'usure des équipements. Les bassins de dessablage, conçus pour ralentir l'écoulement, permettent la décantation des particules denses tandis que les matières organiques restent en suspension. Dans certains cas, une aération est appliquée pour éviter la décantation des matières organiques et faciliter la séparation des graisses (Kolosovska et Bauer, 2022).

- **Déshuilage**

Le déshuilage a pour objectif d'éliminer les huiles, graisses et hydrocarbures en surface, car ils peuvent nuire aux traitements biologiques et engendrer des nuisances olfactives. Il repose sur la séparation gravitaire dans des bassins où les matières flottantes sont raclées en surface. L'aération peut être utilisée pour favoriser la remontée des graisses et améliorer l'efficacité du processus (Abuhasel *et al.*, 2021).

1.4.2. Traitement primaire

Le traitement primaire constitue la deuxième étape dans le processus d'épuration des eaux usées. Il s'agit d'un procédé physique visant à éliminer une partie importante des matières en suspension (MES) et de la matière organique particulaire par sédimentation. Cette étape, réalisée avant le traitement biologique, permet de réduire significativement la charge polluante globale (Liu *et al.*, 2019).

- **Décantation primaire**

La décantation primaire repose sur la sédimentation gravitaire dans des bassins conçus pour ralentir l'écoulement des eaux usées. Les particules lourdes se déposent au fond sous forme de boues primaires, tandis que les graisses et huiles flottent à la surface. Cette étape permet d'éliminer en moyenne 50 à 70 % des matières en suspension, 25 à 40 % de la DBO5 et 10 à 20 % de l'azote total. Toutefois, elle reste peu efficace pour les substances dissoutes,

les agents pathogènes et les nutriments, nécessitant un traitement biologique complémentaire (Jover-Smet *et al.*, 2017).

1.4.3. Traitement secondaire

Le traitement secondaire est un traitement biologique qui vise à éliminer la matière organique dissoute ou colloïdale restante, grâce à l'action de micro-organismes en conditions aérobies contrôlées. Il repose sur des procédés classés en deux catégories : les systèmes à croissance en suspension (ex. boues activées) et ceux à croissance fixée (ex. biofiltres et disques biologiques rotatifs). Bien conçus, ces procédés permettent d'éliminer plus de 85 % de la DBO₅ et une part notable des solides en suspension, avec parfois une réduction partielle de l'azote et du phosphore (Johnson et Mehrvar, 2023).

1.4.4. Traitement tertiaire

Le traitement tertiaire, ou avancé, est la dernière étape du processus d'épuration. Il vise à éliminer les polluants résiduels non éliminés lors des traitements primaire et secondaire, notamment lorsque des normes strictes s'appliquent ou que l'eau est destinée à la réutilisation agricole, industrielle ou urbaine (Zagklis et Bampos, 2022)

➤ Filtration

Cette étape permet de retenir les particules fines encore présentes après le traitement secondaire. Elle utilise divers supports comme les filtres à sable, à disques ou à membranes, contribuant ainsi à réduire la turbidité et à améliorer la clarté de l'eau (Mortula *et al.*, 2022).

➤ Désinfection

Elle vise à éliminer les micro-organismes pathogènes afin de protéger la santé publique, en particulier lorsque l'eau est réutilisée ou rejetée dans des milieux sensibles. Les procédés les plus courants incluent la chloration, l'ozonation et les rayons ultraviolets (UV) (Kong *et al.*, 2021).

➤ Élimination de l'azote

L'azote, sous forme ammoniacale ou nitrate, est responsable de phénomènes d'eutrophisation. Il est éliminé par des procédés biologiques spécifiques tels que la nitrification et la dénitrification (Visnevschi et Povar, 2025).

➤ Élimination du phosphore

Le phosphore est souvent éliminé par précipitation chimique à l'aide de sels métalliques (fer ou aluminium), afin de prévenir la prolifération des algues dans les milieux aquatiques (Ojo et Ifelebuegu, 2018).

1.5. Traitement des boues (Šalva *et al.*, 2025)

Le traitement des boues représente une étape essentielle dans le fonctionnement des stations d'épuration, car les boues issues des traitements primaires et secondaires constituent le principal sous-produit du processus. Ce traitement vise à réduire leur volume, stabiliser la matière organique, limiter les risques sanitaires et faciliter leur valorisation ou élimination.

1.5.1. Épaississement

Cette étape consiste à concentrer les boues en diminuant leur teneur en eau, grâce à des procédés physiques tels que l'épaississement par gravité, flottation ou centrifugation.

1.5.2. Digestion

La digestion, généralement anaérobie, a pour objectif de stabiliser la matière organique, de réduire les odeurs et la charge pathogène, et de produire du biogaz valorisable. La digestion aérobie est également utilisée, mais reste moins répandue.

1.5.3. Déshydratation

Elle permet d'extraire davantage d'eau des boues stabilisées afin de faciliter leur transport ou élimination. Elle s'effectue à l'aide d'équipements comme les centrifugeuses, filtres-presses ou lits de séchage.

1.5.4. Valorisation

Les boues traitées peuvent être valorisées sous forme d'amendement agricole, de production d'énergie (biogaz, incinération) ou intégrées dans certains matériaux, sous réserve de respecter les normes sanitaires et environnementales.

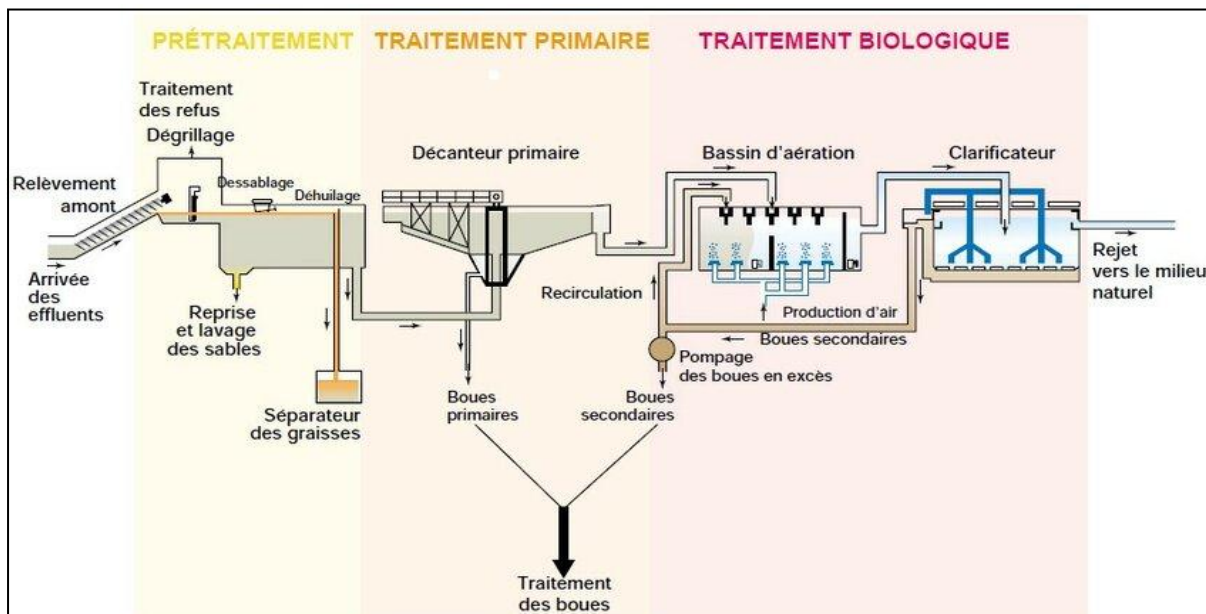


Figure 5: Représentation schématique d'une station d'épuration (Aussel *et al.*, 2004).

1.6. Limites et défis des stations d'épuration

1.6.1. Impact écologique et risques sanitaires

Les stations d'épuration jouent un rôle crucial dans la protection de l'environnement et de la santé publique. Cependant, lorsqu'elles sont mal conçues ou mal gérées, elles peuvent engendrer des impacts négatifs notables. Sur le plan écologique, elles sont souvent associées à une consommation énergétique importante, des émissions de gaz à effet de serre, et des nuisances olfactives. Du point de vue sanitaire, les défaillances dans le traitement de l'eau peuvent entraîner de graves conséquences. Un exemple marquant est celui de la catastrophe de Walkerton (Canada, 2000), où une contamination de l'eau potable par des agents pathogènes a provoqué 2 300 cas d'intoxication et 7 décès. Ces événements soulignent l'importance d'un contrôle rigoureux et continu du fonctionnement des stations d'épuration (Herrera-Navarrete *et al.*, 2021).

1.6.2. Gestion et valorisation des boues

Les boues issues du traitement biologique des eaux usées représentent un défi environnemental et sanitaire majeur. Elles accumulent une grande partie des polluants présents dans les effluents, notamment des composés organiques persistants et des agents pathogènes. Lors de la valorisation de ces boues par épandage, il existe un risque de relargage de ces contaminants dans l'environnement, ce qui pourrait entraîner des effets écotoxicologiques si des mesures de gestion adaptées ne sont pas mises en place (Sim *et al.*, 2010).

1.6.3. Rejets d'antibiotiques et gènes de résistance

Les effluents traités dans les stations d'épuration contiennent souvent des médicaments, y compris des antibiotiques, qui peuvent persister même après le traitement. Cette persistance constitue un facteur de risque pour la santé publique et les écosystèmes. Sim et ses collaborateurs ont montré que ces composés peuvent subsister dans les eaux usées traitées, illustrant la difficulté à éliminer certains contaminants biologiquement actifs (Sim *et al.*, 2010). Cette cooccurrence de composés dans un même environnement peut favoriser la co-sélection de gènes de résistance. De plus, selon Berendonk et ses collaborateurs et l'Organisation mondiale de la santé, les stations d'épuration sont identifiées comme des "hotspots" pour la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. La faible élimination des résidus d'antibiotiques crée une pression de sélection favorable au transfert horizontal de ces gènes entre différentes espèces bactériennes (Berendonk *et al.*, 2015 ; OMS, 2017).

1.6.4. Persistance des bactéries résistantes

Malgré les améliorations dans les technologies de traitement, les stations d'épuration ne parviennent pas toujours à éliminer totalement les bactéries résistantes aux antibiotiques. Ces microorganismes peuvent survivre au traitement biologique classique et être relâchés dans les milieux aquatiques. Cette persistance est renforcée par la forte densité microbienne et la présence de résidus antimicrobiens dans les eaux usées traitées. Selon l'Organisation mondiale de la santé et Berendonk et ses collaborateurs, ces conditions contribuent à la dissémination environnementale des bactéries résistantes aux antibiotiques, constituant un enjeu majeur pour la santé publique (Berendonk *et al.*, 2015 ; OMS, 2017).

1.7. Innovations et perspectives d'amélioration

1.7.1. Les technologies membranaires dans le traitement des eaux usées

Les technologies membranaires constituent une avancée significative dans le domaine du traitement des eaux usées. Ces procédés innovants permettent une purification efficace et favorisent la réutilisation des eaux grâce à leur capacité de séparation sélective des constituants indésirables. Leur développement répond aux exigences croissantes en matière de qualité de l'eau, de protection de l'environnement et de durabilité des ressources hydriques (Ezugbe et Rathilal, 2020).

Parmi les principales technologies membranaires utilisées dans ce contexte, on distingue notamment : la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration, l'osmose inverse et l'osmose directe.

1.7.2. Réduction de la résistance bactérienne en station d'épuration

La problématique croissante de la résistance aux antimicrobiens dans les stations d'épuration stimule le développement de solutions innovantes. Les nanomatériaux fonctionnalisés présentent des propriétés antibactériennes intéressantes contre divers pathogènes préoccupants (Jain *et al.*, 2021). De plus, les récentes innovations en matière de détection moléculaire permettent désormais une surveillance plus efficace des déterminants génétiques de résistance, contribuant ainsi à une meilleure gestion des risques sanitaires.

❖ Désinfection et détection par nanomatériaux

Selon l'Organisation mondiale de la santé, près de 80 % des maladies dans les pays en développement sont dues à la consommation d'une eau contaminée par divers agents pathogènes, notamment des bactéries, des virus, des protozoaires, des champignons et des

prions. Cette réalité sanitaire alarmante fait de la désinfection et du contrôle microbiologique des eaux usées une priorité majeure dans les stations d'épuration (Jain *et al.*, 2021).

Dans ce cadre, les nanomatériaux se sont imposés comme une solution innovante grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières : grande surface spécifique, réactivité élevée et polyvalence fonctionnelle. Ils sont utilisés non seulement pour l'inactivation des agents pathogènes, mais aussi pour la détection des antibiotiques et des gènes de résistance dans les eaux usées. Plusieurs types sont couramment étudiés : les nanoparticules d'argent (AgNPs), les oxydes métalliques comme ZnO, CuO et TiO₂, ainsi que les nanotubes de carbone (CNTs).

Les principaux mécanismes de désinfection par nanomatériaux comprennent (figure 6)

- Interaction électrostatique avec la membrane cellulaire
- Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)
- Détérioration de la paroi cellulaire bactérienne
- Altération de l'ADN ou des enzymes intracellulaires
- Effets photochimiques sous irradiation (dans le cas du TiO₂, par exemple)

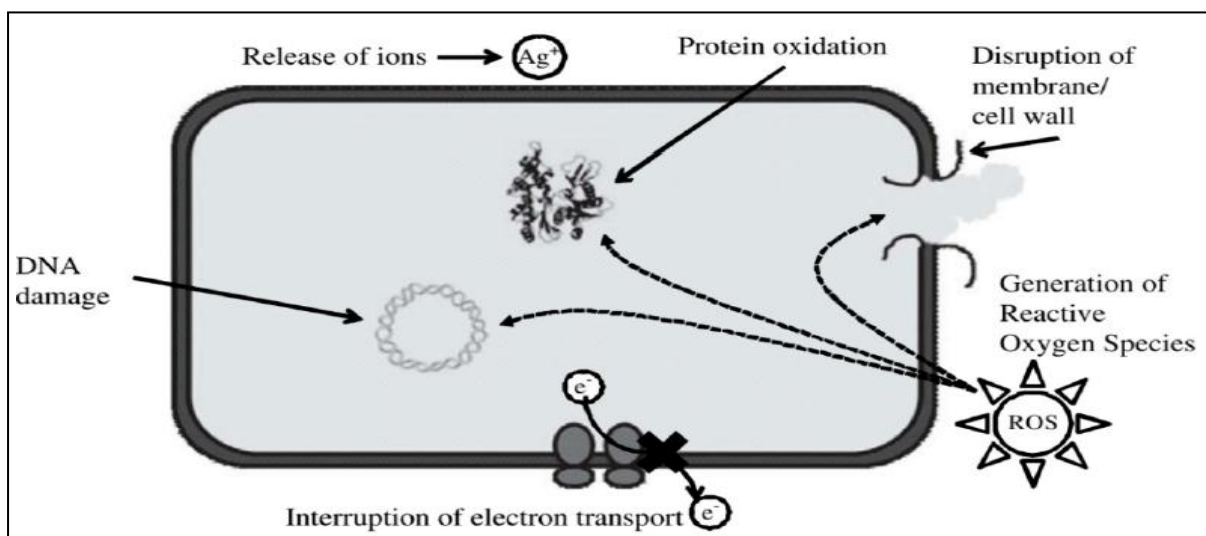


Figure 6: Schéma illustrant les mécanismes d'inactivation microbienne induits par les nanomatériaux (Jain *et al.*, 2021).

Certaines plateformes à base de nanomatériaux sont également capables de détecter des gènes spécifiques de résistance, comme *mecA* chez les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), ce qui renforce leur utilité dans la gestion des risques sanitaires liés à l'antibiorésistance (Jain *et al.*, 2021).

❖ **Autres stratégies de gestion technique pour limiter la dissémination de l'antibiorésistance**

La réduction de la résistance bactérienne dans les stations d'épuration ne dépend pas uniquement des technologies avancées, mais aussi de la configuration et des conditions de fonctionnement des systèmes biologiques existants. Leiva et ses collaborateurs soulignent plusieurs leviers techniques et opérationnels qui peuvent être mobilisés pour limiter la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques et des gènes de résistance dans les effluents traités (Leiva *et al.*, 2021).

- **Prolongation du temps de rétention hydraulique (HRT) :** un temps de séjour plus long permet une meilleure dégradation biologique, limitant la survie des bactéries résistantes.
- **Contrôle des charges de polluants, y compris les antibiotiques :** une charge plus faible réduit la pression de sélection qui favorise les souches résistantes.
- **Température de fonctionnement :** elle influence l'activité microbienne et l'efficacité de la dégradation des contaminants.
- **Type de traitement biologique appliqué (aérobies, anaérobies, boues activées...) :** certains systèmes permettent une meilleure réduction des bactéries et de gènes de résistances selon leur conception.
- **Stabilité et performance du procédé :** des conditions fluctuantes favorisent l'adaptation et la sélection de souches résistantes, une exploitation stable est donc essentielle.

Selon les auteurs, l'amélioration de ces paramètres permettrait de limiter significativement la persistance et la dissémination des bactéries résistantes dans les eaux usées traitées (Leiva *et al.*, 2021).

2. les bactéries résistantes aux antibiotiques

2.1. Définition

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qui compromet l'efficacité des traitements antimicrobiens et constitue un défi majeur en santé publique. Elle désigne la capacité des bactéries à survivre et à se multiplier en présence d'un antibiotique qui était auparavant efficace contre elles. Il existe deux grandes catégories de résistance bactérienne aux antibiotiques : l'une naturelle, l'autre acquise (Jovanovic *et al.*, 2021).

2.1.1. Résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque désigne la capacité naturelle de certaines espèces bactériennes à résister à certaines classes d'antibiotiques, indépendamment d'une exposition antérieure. Cette résistance repose souvent sur des caractéristiques structurales ou biochimiques spécifiques, telles que l'absence de la cible de l'antibiotique ou la présence de mécanismes d'expulsion actifs comme les pompes d'efflux (Mancuso *et al.*, 2021).

2.1.2. Résistance acquise

Contrairement à la résistance intrinsèque, qui est une propriété naturelle de certaines bactéries, la résistance acquise se développe lorsque des bactéries, initialement sensibles, deviennent résistantes à un antibiotique. Ce phénomène peut résulter de mutations génétiques qui altèrent la cible de l'antibiotique, réduisant ainsi son efficacité ou de l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal de gènes (Mancuso *et al.*, 2021).

Ce transfert peut s'effectuer via différents vecteurs génétiques, notamment les plasmides, les bactériophages et l'ADN extracellulaire. Ces éléments génétiques mobiles jouent un rôle clé dans la dissémination des gènes de résistance et contribuent à l'apparition de souches multi-résistantes. Le transfert horizontal de gènes est un mécanisme majeur de propagation de la résistance aux antibiotiques. Il repose sur trois modes principaux : la transformation, la transduction et la conjugaison (Liu *et al.*, 2024).

2.2. Mécanismes de résistance bactérienne

La résistance des bactéries aux antibiotiques repose sur plusieurs mécanismes naturels ou acquis qui leur permettent de survivre face aux traitements. Ces mécanismes incluent la réduction de la perméabilité de la membrane, l'activation de pompes d'efflux, la modification de la cible de l'antibiotique, ainsi que la production d'enzymes capables d'inactiver ces molécules (Munita et Arias, 2016).

2.2.1. Réduction de l'imperméabilité

La résistance aux antibiotiques peut résulter d'une diminution ou d'une perte de l'expression des gènes codant pour les porines, protéines situées dans la membrane externe des bacilles à Gram négatif. Ces porines forment des canaux, spécifiques ou non spécifiques, permettant le transport passif de petites molécules hydrophiles, y compris certains antibiotiques. Lorsqu'elles sont altérées ou absentes, la diffusion des composés antimicrobiens est réduite, limitant ainsi leur accès aux cibles intracellulaires. Ce mécanisme joue un rôle important dans la résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones chez des espèces telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Pagès *et al.*, 2008).

Plus particulièrement, la perte fonctionnelle de la porine OprD induit une résistance de haut niveau à l'imipénème. Cette altération est souvent due à des mutations affectant les boucles 2 et 3 du canal, ces modifications changent sa conformation, empêchant l'entrée du carbapénème. Ce mécanisme est l'un des plus fréquents dans la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 2012).

2.2.2. Pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires actifs qui expulsent une large variété de composés toxiques, y compris les antibiotiques, hors de la cellule bactérienne. Ce mécanisme permet de réduire la concentration intracellulaire des agents antimicrobiens, compromettant ainsi leur efficacité. Chez les bacilles à Gram négatif, le système MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa*, joue un rôle central dans la résistance aux β -lactamines, fluoroquinolones, chloramphénicol et autres agents. Ces pompes peuvent être constitutives ou induites en réponse à des stress environnementaux, ce qui contribue à l'émergence de phénotypes multirésistants. En raison de leur rôle clé dans la tolérance bactérienne, les pompes d'efflux représentent une cible prometteuse pour le développement d'inhibiteurs capables de restaurer l'efficacité des antibiotiques existants (Gaurav *et al.*, 2023).

2.2.3. Modification de la cible

Ce mécanisme est principalement dû à une mutation au niveau du gène qui code pour la cible, entraînant une modification structurale de la protéine et une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour celle-ci. Chez les entérobactéries, la modification des protéines fixant la pénicilline PBP compromet l'action des β -lactamines. La résistance aux fluoroquinolones résulte souvent de mutations affectant l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV, deux enzymes clés dans la réplication de l'ADN. Par ailleurs, la méthylation du 23S ARNr, constituant

majeur de la sous-unité 50s du ribosome, empêche la liaison des macrolides à leur site d'action, bloquant ainsi leur effet inhibiteur sur la synthèse protéique (Munita et Arias, 2016).

2.2.4. Mécanisme enzymatique

Le mécanisme enzymatique est le mécanisme le plus courant de résistance bactérienne. Il repose sur la production d'enzymes spécifiques, principalement les β -lactamases, qui hydrolysent l'anneau β -lactame des antibiotiques, les rendant inactifs (Bush et Jacoby, 2010).

Ces enzymes sont classées selon la classification moléculaire d'Ambler en quatre classes

- La classe A regroupe les β -lactamases à spectre étendu (BLSE), telles que TEM, SHV et CTX-M, retrouvées couramment chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.
- La classe B inclut les métallob- β -lactamases (NDM, VIM, IMP) nécessitant des ions métalliques et présents chez de nombreuses entérobactéries.
- La classe C comprend les céphalosporinases de type AmpC, naturellement présentes chez *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* ou *Serratia marcescens*.
- La classe D regroupe les oxacillinasés (comme OXA-48), fréquentes chez *Acinetobacter baumannii* et certaines entérobactéries (Bush et Jacoby, 2010 ; Poirel *et al.*, 2008).

Outre les β -lactamases, d'autres enzymes contribuent à la résistance, notamment celles modifiant les aminosides, telles que les acétyltransférases (AAC), nucléotidyltransférases (ANT) et phosphotransférases (APH), détectées respectivement chez *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Ramirez et Tolmasky, 2010).

Ces enzymes sont souvent codées par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, les transposons et les intégrons, ce qui facilite leur transfert horizontal entre bactéries. Cette mobilité génétique favorise une dissémination rapide de la résistance, notamment dans les milieux hospitaliers et environnementaux (Poirel *et al.*, 2008).

2.3. Impact en santé publique et en microbiologie environnementale

Il ne s'agit pas seulement d'un phénomène biologique, mais d'un véritable problème de santé publique et environnemental. Selon l'Organisation mondiale de la santé, elle pourrait causer jusqu'à 10 millions de décès par an d'ici 2050, en raison de l'échec des traitements contre les infections résistantes. Les infections associées aux soins de santé, souvent contractées via des dispositifs médicaux ou des interventions chirurgicales, sont aggravées par la présence de bactéries multi-résistantes, ce qui complique leur prise en charge et augmente les coûts de santé.

Par ailleurs, l'impact environnemental de la résistance aux antibiotiques est tout aussi préoccupant. Les antibiotiques ne sont pas entièrement métabolisés par le corps humain et sont excrétés dans les eaux usées, favorisant la dissémination de bactéries résistantes. Les rejets des stations d'épuration contribuent à l'accumulation de bactéries résistantes et de gènes de résistance aux antibiotiques dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, augmentant ainsi le risque de contamination de la faune, de la flore et des populations humaines (Sun *et al.*, 2022).

2.4. Origines des bactéries résistantes

2.4.1. Usage médical des antibiotiques

Les études indiquent que l'utilisation intensive des antibiotiques dans les environnements médicaux, tels que les hôpitaux et les établissements de soins, joue un rôle clé dans la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques. L'exposition professionnelle dans les hôpitaux et les voyages ont été identifiés comme les voies de transmission les plus courantes (Godijk *et al.*, 2022). De plus, les eaux usées hospitalières contiennent des concentrations élevées d'antibiotiques tels que la ciprofloxacine, le méropénem et la ceftazidime, contribuant ainsi à la propagation des bactéries résistantes, notamment celles produisant BLSE et les bactéries résistantes aux carbapénèmes (Voigt *et al.*, 2022).

2.4.2. Usage vétérinaire des antibiotiques

En médecine vétérinaire, les antibiotiques sont largement utilisés pour prévenir et traiter les infections chez les animaux d'élevage, ce qui peut entraîner l'apparition de souches résistantes transmissibles à l'homme. Ces agents antimicrobiens peuvent atteindre les sols et les eaux de surface via les déjections animales, propageant ainsi la résistance dans l'environnement (Xie *et al.*, 2018).

2.4.3. Agriculture et aquaculture

L'agriculture et l'aquaculture contribuent également à la dissémination des bactéries résistantes. Les engrais organiques d'origine animale, ainsi que l'usage d'antibiotiques dans les fermes aquacoles, favorisent la persistance de gènes de résistance dans les sols et les milieux aquatiques. Ces environnements contaminés deviennent ainsi des réservoirs bactériens susceptibles de transmettre la résistance aux humains et aux animaux (Yuan *et al.*, 2023).

2.4.4. Déversements industriels et hospitaliers

Les rejets industriels et hospitaliers, en particulier ceux non traités ou partiellement épurés, sont une source importante de pollution antimicrobienne. Les effluents hospitaliers contiennent souvent des concentrations significatives d'antibiotiques actifs, favorisant la sélection naturelle de bactéries résistantes, notamment celles capables de produire des enzymes comme les BLSE (Zhang *et al.*, 2020).

2.4.5. Stations d'épuration et sélection des bactéries résistantes

Les stations de traitement des eaux usées jouent un rôle ambivalent dans la gestion des bactéries résistantes aux antibiotiques. Bien qu'elles réduisent la charge bactérienne globale, elles ne parviennent pas toujours à éliminer totalement les bactéries résistantes ni leurs gènes de résistance. Par exemple, certaines souches résistantes, comme *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux céphalosporines de troisième génération, peuvent subsister dans les eaux traitées et se disséminer dans les milieux aquatiques (Godijk *et al.*, 2022). En outre, la présence d'antibiotiques résiduels dans ces eaux peut exercer une pression sélective favorisant la persistance et la propagation des souches résistantes, augmentant ainsi le risque de contamination des écosystèmes environnants (Voigt *et al.*, 2022).

2.5. Les bactéries résistantes aux antibiotiques isolées à partir des stations d'épuration

Les stations d'épuration des eaux usées sont de plus en plus reconnues comme des réservoirs actifs de bactéries résistantes aux antibiotiques et de gènes de résistance. Diverses études menées à l'échelle nationale et internationale confirment la présence persistante de ces éléments, malgré les processus de traitement conventionnels (Mosaka *et al.*, 2023).

En Algérie, Une étude menée à la station d'épuration « East » de Tizi-Ouzou a révélé la présence de souches résistantes parmi les entérobactéries et entérocoques dans les eaux traitées. Ces bactéries montraient une forte résistance aux β -lactamines, et plusieurs gènes de résistance y compris le gène d'intégrase de classe 1, ont été détectés, suggérant un risque de transfert horizontal (Mazi *et al.*, 2025).

Une autre étude dans le nord-ouest algérien, portant sur trois types de STEP (boues activées, lagunes aérobie, lagunes naturelles), a permis l'isolement de souches à Gram négatif comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Serratia marcescens*. Ces bactéries ont montré une multirésistance, notamment dans les lagunes naturelles, avec une production confirmée de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) de type CTX (Mokeddem *et al.*, 2025).

Dans la wilaya de Batna, *Escherichia coli* a été identifiée avec une double résistance préoccupante aux carbapénèmes et à la colistine. Les mécanismes moléculaires comprenaient la production d'OXA-48 et la présence du gène mcr-1, ce qui renforce le potentiel de dissémination environnementale de ces souches (Cherak *et al.*, 2022).

À l'échelle internationale, des recherches ont démontré que des souches environnementales telles que *Pseudomonas spp* et *Chromobacterium spp*, peuvent présenter une résistance aux carbapénèmes sans gènes acquis, reposant sur des mécanismes intrinsèques comme la perte de porines ou la surexpression des pompes à efflux. D'autres souches pathogènes comme *Escherichia coli*, *Citrobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Aeromonas spp*, portaient des gènes de résistance acquis tels que bla_KPC, bla_NDM, bla_VIM, et mcr-9, impliqués dans la résistance aux β -lactamines et à la colistine (Oliveira *et al.*, 2021).

Une étude conduite en Allemagne, aux Pays-Bas et en Roumanie, a mis en évidence la présence d'*Escherichia coli* productrices de BLSE et d'entérobactéries porteuses de carbapénémases dans les effluents traités, les eaux de surface et même l'air ambiant. Ces bactéries étaient résistantes aux carbapénèmes (imipénème, méropénème) via les enzymes KPC, NDM, VIM et OXA. La présence de gènes d'intégrase de classe 1 corrobore le risque de dissémination par transfert horizontal (Wengenroth *et al.*, 2021).

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Milieux de culture

1.1.1. Milieux de culture liquides

- Bouillon nutritif (BN)
- Bouillon cœur-cerveau enrichi (BHIB)
- Mueller Hinton
- Bouillon trypticase soja (TSB)

1.1.2. Milieux de culture solides

- MacConkey
- Gélose nutritive (GN)
- Gélose TSI
- Mueller Hinton (MH)

1.2. Tests biochimiques

- Galerie API 20 E et API 20 NE
- Test d'oxydase (Cypress Diagnostics)

1.3. Antibiotiques

1.3.1. En disques

- β -lactamines
 - Pénicillines : ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, amoxicilline + acide clavulanique.
 - Céphalosporines : ceftazidime (de 3^{ème} génération), céfotaxime (de 3^{ème} génération), cefpodoxime (de 3^{ème} génération) et céfoxitine (de 2^{ème} génération)
 - Carbapénèmes : imipénème et méropénème
- Aminosides : gentamicine, tobramycine et kanamycine.
- Fluoroquinolones : norfloxacin
- Sulfamides : triméthoprim + sulfaméthoxazole.

1.3.2. En poudre

- Ertapénème
- Céfotaxime
- Imipénème

1.4. Solutions et colorants

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Violet de gentiane
- Lugol
- Alcool éthylique
- Fuchsine
- Solution saline stérile (NaCl 0,96 %)
- Huile de paraffine
- Huile à immersion

2. Méthodes

2.1. Lieu d'étude

Cette étude, réalisée durant la période allant du 1er Mars au 27 Mai 2025, porte sur la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées des eaux usées traitées. Elle a été conduite dans la wilaya de Tlemcen, au niveau de deux sites : la station d'épuration d'Aïn El Hout, relevant de l'Office National de l'Assainissement ONA, ainsi que le site de l'ONID (Office National d'Irrigation et de Drainage), point de distribution des eaux traitées destinées à l'irrigation. L'ensemble des analyses microbiologiques a été effectué au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université de Tlemcen.

2.2. Présentation des sites de prélèvement

2.2.1. Station d'épuration d'Aïn El Hout

La station d'épuration de Tlemcen, gérée par l'Office National de l'Assainissement (ONA), est une installation de type boues activées à faible charge conçue pour traiter les eaux usées domestiques de la ville. Dimensionnée pour une population équivalente de 150 000 habitants, elle a une capacité de traitement de 30 000 m³/jour, avec un débit de pointe horaire de 3 800 m³/h.

❖ Procédé de traitement

Le traitement repose sur un procédé aérobie utilisant des microorganismes hétérotrophes pour dégrader les matières organiques (figure7). Les étapes clés sont :

- Prétraitement
 - Dégrillage grossier (écartement de 50 mm) et fin (écartement de 20 mm).
 - Dessablage-déshuilage via deux unités trapézoïdales équipées de ponts suceurs (dimensions : 4 m × 26 m).
- Traitement biologique
 - Quatre bassins d'aération (volume unitaire : 4 723 m³) équipés de 12 aérateurs de surface (75 kW chacun) et de 4 sondes d'oxygène dissous.
 - Formation de bioflocs (agrégats bactériens) dans une liqueur mixte maintenue en turbulence pour optimiser l'oxydation.
- Décantation secondaire

- Deux décanteurs circulaires (diamètre : 46 m) avec racleurs mécanisés (vitesse : 0,04 m/s).

- Désinfection

- Chloration via un bassin de 700 m³ et sept (7) tanks de chlore gazeux (capacité totale : 7 000 kg).

- ❖ **Caractéristiques techniques**

- Données de base de dimensionnement :
 - horizon : 2005
 - Type de réseau : unitaire
 - Nature des eaux brutes : domestiques
 - Population équivalente : 150 000 EQ/HAB
 - Équivalence calculée sur la DBO₅ : 172 000 EH
 - Débit journalier : 30 000 m³/j
 - Débit de pointe horaire admis au traitement : 3 800 m³/h
 - Charge en DBO₅ : 9 300 kg/j
 - Charge en MES : 13 950 kg/j
 - Azote à nitrifier : 1 980 kg
 - L'équivalence calculée sur la DBO : 172 000 EQ/HAB
- Caractéristiques des rejets après traitement (moyenne sur 24 h)
 - MES (matières en suspension) : 30 mg/l
 - Matières sédimentables : 0,5 cm³/l
 - DBO₅ : 20 mg/l
 - DBO₅ en pointe (2 h) : 30 mg/l
 - DCO : 120 mg/l
 - Azote ammoniacal (N-NH₄⁺) : 3 – 5 mg/l
 - Azote nitrique (N-NO₃⁻) : 8 – 10 mg/l
 - Huiles et graisses végétales : 20 mg/l
 - Coliformes totaux : 20 000 /100 ml
 - Coliformes fécaux : 12 000 /100 ml
 - Streptocoques fécaux : 2 000 /100 ml

- ❖ **Traitement des boues**

- Épaississement : Un épaisseur (diamètre: 14 m) concentre les boues avant déshydratation.

- Séchage : Quatorze lits de séchage traitent les boues excédentaires.
- Recyclage : Une partie des boues est réinjectée dans les bassins d'aération pour maintenir la biomasse microbienne.

❖ Infrastructure et énergie

- Bâtiments : Bâtiment d'exploitation et de chloration.
- Énergie : Deux transformateurs de 800 kVA (tension : 30 kV/400 V).

❖ Performances environnementales

La station garantit une réduction significative des polluants, conformément aux normes algériennes, avec un rejet final respectant les seuils stricts pour les matières organiques, les pathogènes (coliformes) et les nutriments (azote).

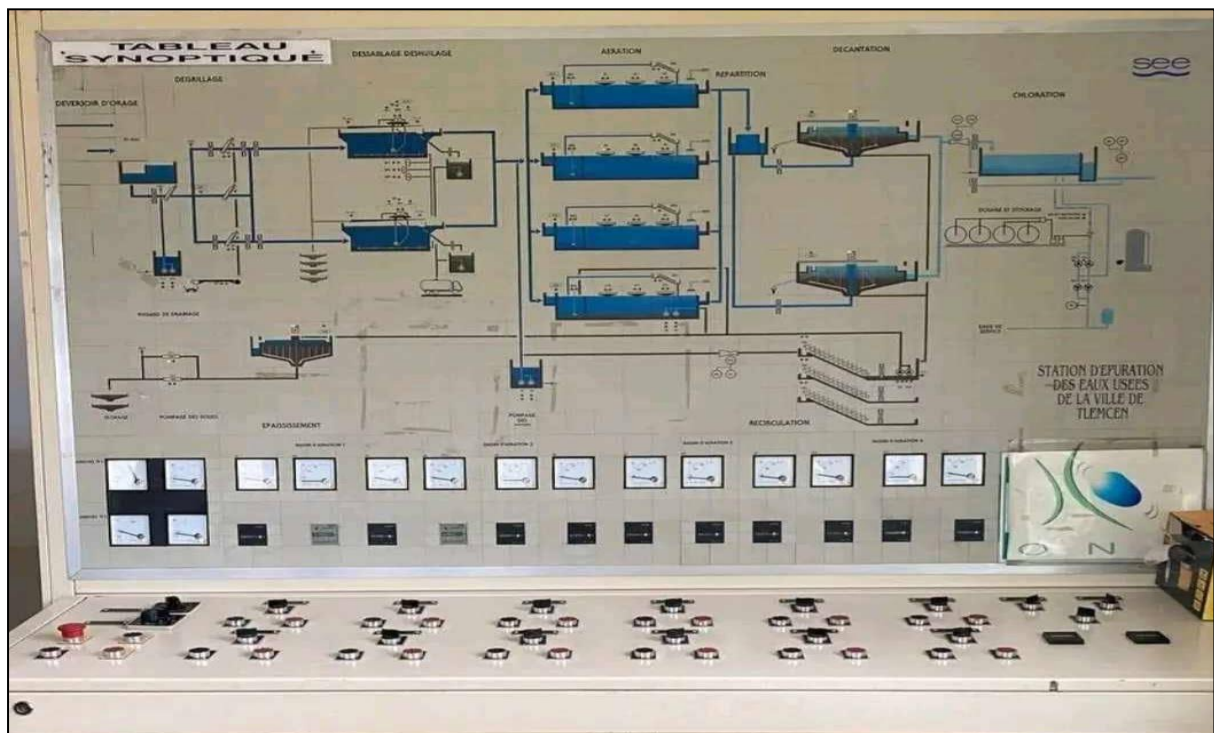


Figure 7: Tableau synoptique de la station d'épuration de Tlemcen.

Consulter le 10 Mars 2025

2.2.2. Le site ONID

Il s'agit d'un bassin de récolte des eaux usées traitées, relevant de l'Office National d'Irrigation et de Drainage (ONID), situé dans la commune de Chetouane (wilaya de Tlemcen). Ce site reçoit les eaux traitées provenant directement de la station d'épuration d'Aïn El Hout et représente le point de distribution final des eaux traitées destinées à l'irrigation agricole (figure 8).



Figure 8: Bassin de récolte des eaux traitées relevant de l'ONID.

Consulter le 09 Mars 2025

2.3. Prélèvement

13 prélèvements ont été réalisés : 5 échantillons d'eau traitée et 2 de boues activées ont été prélevés au niveau du bassin de sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout, tandis que 6 échantillons d'eau ont été collectés à partir de différents points du bassin de récolte du site ONID.

Les échantillons d'eau ont été prélevés dans des flacons en verre stériles de 250 mL, en les immergeant directement dans le milieu de collecte afin d'éviter toute contamination. De

la même manière, les boues activées, présentes en suspension dans l'eau, ont été prélevées dans des pots stériles, également plongées directement dans le bassin de sortie.

Après prélèvement, les échantillons ont été conservés dans une glacière isotherme à une température comprise entre 2 et 5 °C, puis transportés rapidement vers le laboratoire pour traitement.

Tableau 2: Sites et dates des prélèvements

Date du prélèvement	Site et lieu de prélèvement	Type d'échantillon	Nombre de prélèvements
09/03/2025	ONID – Bassin de récolte des eaux traitées	Eau traitée pour irrigation	6 flacons
10/03/2025	ONA – Bassin de sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout	Eau traitée	5 flacons
10/03/2025	ONA – Bassin de sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout	Boues activées	2 pots

2.4. Recherche de bacilles à Gram négatif résistants aux antibiotiques

2.4.1. Enrichissement

Afin d'enrichir les bactéries potentiellement résistantes présentes dans les échantillons, un total de 13 flacons stériles contenant chacun 50 mL de bouillon nutritif ont été préparés. À chaque flacon, 50 mL de l'échantillon d'eau usée ou de boue activée ont été ajoutés, après agitation, de manière aseptique. Les flacons ont été ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures.

2.4.2. Isolement et purification

Les cultures positives ont étéensemencées sur deux boîtes de Pétri, l'une contenant le milieu MacConkey additionné d'ertapénème à une concentration finale de 0,5 µg/mL, et l'autre le même milieu additionné de céfotaxime à une concentration finale de 2 µg/mL, afin d'isoler respectivement les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes et aux céphalosporines de 3^{ème} génération (Annexe 1).

Les colonies obtenues ont été repiquées de manière successive sur milieu MacConkey pour obtenir des souches pures.

2.5. Identification des souches bactériennes

L'identification des souches isolées a reposé sur une série de tests morphologiques, biochimiques et enzymatiques, permettant de caractériser les bacilles à Gram négatif.

2.5.1. Coloration de Gram (Smith et Hussey, 2005)

- **Principe**

La coloration de Gram est une technique différentielle essentielle en bactériologie, utilisée pour classer les bactéries en deux groupes principaux : les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Cette méthode repose sur la structure de la paroi cellulaire et leur affinité pour les colorants.

- **Technique**

- Préparer un frottis à partir d'une colonie pure sur une lame propre.
- Fixer le frottis par passage à la flamme.
- Recouvrir la lame avec le violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rincer à l'eau distillée.
- Appliquer le lugol pendant 1 minute, puis rincer.
- Décolorer à l'alcool (éthanol à 96 %) pendant 30 secondes, puis rincer immédiatement.
- Colorer avec de la fuchsine pendant 1 minute.
- Laver à l'eau et sécher entre deux papiers buvards.
- Observer au microscope à l'objectif (x100), après ajout d'une goutte d'huile à immersion.

- **Lecture**

- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet.
 - Les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose.

2.5.2. Test de la catalase (MacFaddin, 2000)

- **Principe**

La catalase est une enzyme produite par certaines bactéries, qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un composé toxique, en eau et en oxygène gazeux selon la réaction suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

- **Technique**

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une petite quantité de colonie bactérienne a été prélevée puis déposée sur une lame de microscope contenant une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

- **Lecture**

- L'apparition rapide de bulles gazeuses indique une réaction positive, témoignant de la présence de l'enzyme catalase dans la souche testée.
- En l'absence de bulles, le test est considéré comme négatif.

2.5.3. Test de l'oxydase (Shields et Cathcart, 2010)

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence la présence de cytochrome oxydase, une enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire des bactéries aérobies.

- **Technique**

À l'aide d'une anse stérile, une colonie bactérienne fraîchement isolée a été directement frottée sur la zone réactive d'une bandelette d'oxydase commerciale (prête à l'emploi).

- **Lecture**

- Un changement rapide de couleur vers le violet (en moins de 30 secondes) indique un résultat positif, signifiant la présence de l'enzyme oxydase.
- En l'absence de coloration ou en cas de réaction retardée, le test est considéré comme négatif.

2.5.4. Test de TSI (Triple Sugar Iron) (Lehman, 2005)

- **Principe**

Le milieu TSI est un outil de diagnostic différentiel pour les bacilles à Gram négatif. Il permet de tester la fermentation de trois sucres (glucose, lactose et saccharose), la production de gaz, ainsi que la production d' H_2S .

- **Technique**

- À l'aide d'une anse stérile, une colonie bactérienne a été inoculée dans un tube TSI par piquûre verticale au centre du culot (partie profonde) du milieu, suivie des stries en surface de la pente.
- L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

- Pente et fond jaunes : fermentation du glucose et du lactose/saccharose.
- Pente rouge, fond jaune : fermentation du glucose uniquement.
- Noircissement du fond : production de H₂S.
- Fissures ou soulèvement du milieu : production de gaz.

2.5.5. Galerie API 20 E

- **Principe**

La galerie API 20 E est conçue pour l'identification rapide des entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif non exigeants. Elle repose sur 20 microtubes contenant des substrats biochimiques déshydratés permettant l'évaluation de différentes activités enzymatiques ou de fermentation.

- **Technique**

- Préparation de la suspension bactérienne

- Prélever une colonie pure et jeune (18–24 h) à partir d'un milieu gélosé.
- Préparer une suspension trouble dans de l'eau distillée stérile (équivalente à 0,5 McFarland).

- Inoculation de la galerie

- Aspirer la suspension préparée à l'aide d'une pipette stérile.
- Remplir les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL (nécessitent une lecture en surface et en profondeur).
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.

- Création de l'anaérobiose

- Ajouter une goutte de paraffine stérile dans les cupules des tests suivants ADH, LDC, ODC, URE, H₂S pour assurer une atmosphère anaérobie.

- Incubation

- Placer la galerie dans une boîte fermée.
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 2) et l'identification des souches est obtenue à l'aide du logiciel Bacterial Identification Program.

2.5.6. Galerie API 20 NE

- **Principe**

Le système API 20 NE est destiné à l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non exigeants, tels que *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.*, etc

- **Technique**

- Préparation de la suspension bactérienne

- Prélever une colonie jeune (18-24 h) issue d'un milieu gélosé.
- Préparer une suspension dans de l'eau distillée stérile ou une solution saline (NaCl 0,96 %) jusqu'à obtention d'une turbidité équivalente à 0,5 McFarland.

- Préparation de la galerie

- Ajouter 0,2 mL de la suspension préparée dans le tube d'API Medium.
- Aspirer ce mélange pour inoculer tous les microtubes de la galerie API 20 NE.

- Inoculation des tests

- Inoculer uniquement le fond des tubes pour les tests allant de NO₃ à PNPG (ne pas remplir les cupules).
- Ajouter une goutte de vaseline stérile dans les cupules des tests GLU, ADH, et URE pour créer une atmosphère anaérobie.

- Incubation

- Placer la galerie dans une boîte.
- Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 heures selon les recommandations du fabricant.

- **Lecture**

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (Annexe 3) et l'identification des souches est obtenue à l'aide du logiciel Bacterial Identification Program.

2.6. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4 °C sur gélose incliné ou gélose profonde pour une utilisation à court terme, et à -80 °C dans des cryobilles pour une conservation à long terme.

2.7. Étude de la sensibilité des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques

2.7.1. Antibiogramme (CA-SFM, 2024)

- **Principe**

L'antibiogramme est un examen microbiologique permettant d'évaluer l'interaction entre une souche bactérienne et différents antibiotiques. Il permet de déterminer si la souche est sensible, résistante ou intermédiaire à ces agents, ce qui est essentiel pour orienter le choix d'un traitement antibiotique adapté.

- **Technique**

- Préparation de l'inoculum

- L'inoculum bactérien est préparé à partir de colonies pures âgées de 18 à 24 heures, cultivées sur un milieu solide. Deux à trois colonies sont prélevées avec une anse stérile et mises en suspension dans 5 mL de l'eau physiologique stérile. La densité de la suspension est ajustée à 0,5 McFarland.

- Ensemencement et dépôt des disques

- L'ensemencement est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension normalisée, puis étalé de manière uniforme sur toute la surface de la gélose Mueller-Hinton en effectuant trois passages croisés à 60°, afin d'assurer une répartition homogène. Après séchage de la surface pendant quelques minutes à température ambiante, les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide de pinces stériles. La liste des antibiotiques utilisés est présentée dans (Annexe 4).

- Incubation

- Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

La lecture et l'interprétation des résultats de l'antibiogramme se font en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en suivant les normes recommandées par le CA-SFM (2024) (Annexe 5).

7.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (CA-SFM, 2024)

- **Principe**

La méthode de microdilution en milieu liquide sur des microplaques à 96 puits repose sur l'évaluation de la croissance bactérienne en présence de concentrations décroissantes d'un

antibiotique, permettant d'identifier la plus faible concentration inhibant toute croissance visible.

Les CMI ont été déterminées pour les souches ayant présenté une résistance à l'ertapénème et à l'imipénème lors de l'antibiogramme.

- **Technique**

- Une solution mère de chaque antibiotique a été préparée à une concentration de 128 µg/mL.
- 50 µL de bouillon Mueller-Hinton ont été distribués dans tous les puits de chaque ligne de la microplaque (du puits 1 au puits 12).
- 50 µL de la solution d'antibiotique ont été ajoutés dans le puits n°2, puis bien homogénéisés.
- Une série de dilutions géométriques de raison ½ a été réalisée en transférant 50 µL du puits n°2 au puits n°3, puis du puits n°3 au puits n°4, et ainsi de suite jusqu'au puits n°11. Les 50 µL restants dans le dernier puits ont été éliminés pour maintenir un volume constant.
- Ensuite, 50 µL d'une suspension bactérienne standardisée à 0,5 McFarland ont été ajoutés dans chaque puits (sauf le puits n°1, témoin négatif).
- Le puits n°1 (témoin négatif) contient 50 µL de bouillon Mueller-Hinton et 50 µL l'antibiotique, sans bactérie.
- Le puits n°12 (témoin positif) contient 50 µL de bouillon Mueller-Hinton et 50 µL de la suspension bactérienne, sans antibiotique.
- Cette opération a permis d'obtenir une gamme de concentrations allant de 32 µg/mL à 0,0625 µg/mL.
- Les plaques ont été scellées et incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible par rapport au témoin.

2.8. Étude des phénotypes de résistance aux β -lactamines

2.8.1. Recherche de la production de carbapénémases par test de CIM (Carbapenem Inactivation Method) (Van der Zwaluw *et al.*, 2015)

- **Principe**

La méthode CIM (Carbapenem Inactivation Method) est une technique phénotypique recommandée pour la détection de la production de carbapénémases chez les bacilles à Gram négatif. Elle repose sur la capacité d'une souche testée à inactiver un disque de carbapénème (méro pénem), suivie de l'évaluation de l'activité résiduelle de cet antibiotique sur une souche indicatrice standard (*Escherichia coli* ATCC 25922) ensemencée sur gélose Mueller-Hinton.

- **Technique**

- Cultiver la souche à tester dans du bouillon trypticase soja TSB (Tryptic Soy Broth) pendant 24 heures à 37 °C.
- Ajuster la densité de la culture à 0,5 de l'échelle de McFarland.
- À l'aide d'une anse stérile en plastique, prélever une aliquote de la culture.
- Introduire l'échantillon dans un tube Eppendorf stérile contenant 2 mL de TSB.
- Ajouter un disque de méropénem (10 μ g) dans le même tube.
- Incuber à 37 °C pendant 2 heures.
- Préparer une suspension de (*E. coli* ATCC 25922) ajustée à 0,5 McFarland.
- Ensemencer une boîte de gélose Mueller-Hinton par écouvillonnage de la souche indicatrice.
- Égoutter délicatement le disque de méropénem pour retirer l'excès de liquide avant de le placer sur la gélose.
- Déposer le disque incubé au centre de la gélose à l'aide d'une pince stérile (figure 9).
- Incuber la boîte à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- **Interprétation des résultats**

- Zone d'inhibition ≤ 15 mm : test positif $\rightarrow$ production probable de carbapénémase.
- Zone d'inhibition ≥ 19 mm : test négatif $\rightarrow$ absence de production de carbapénémase.
- Zone de 16 à 18 mm : résultat douteux $\rightarrow$ nécessité de tests complémentaires.

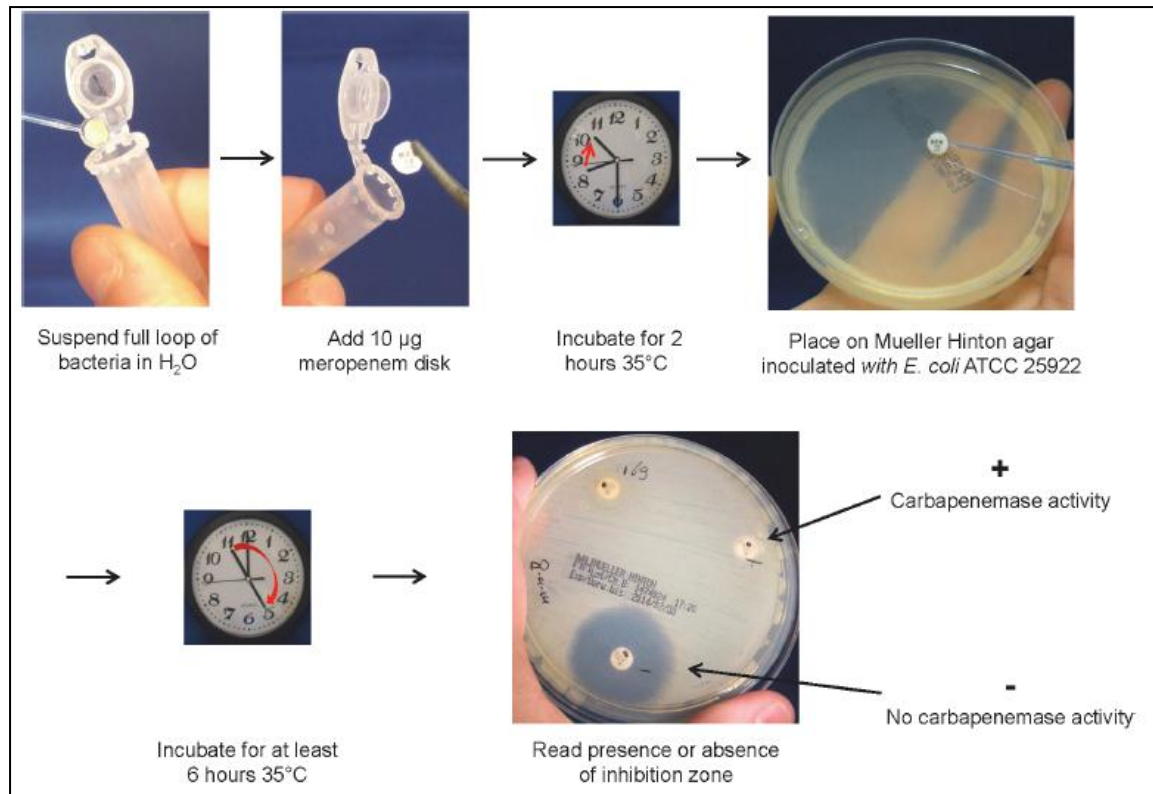


Figure 9: Test CIM (Van der Zwaluw *et al.*, 2015)

2.8.2. Test de Hodge (Lee *et al.*, 2003)

- **Principe**

Il consiste à mettre en évidence l'hydrolyse de l'imipénème à l'aide d'une bactérie indicatrice sensible (*Escherichia coli* ATCC 25922).

- **Technique**

- Ensemencer par écouvillonnage une gélose MacConkey par une suspension d'*E. coli* (ATCC 25922) de 10⁸ UFC/mL.
- A partir d'un bouillon de 24 h de la souche à tester, faire une lourde strie du centre de la boîte vers la périphérie.
- Sécher les boîtes 15 minutes à l'étuve.
- Déposer un disque d'imipénème au centre de la boîte (à l'extrémité de la strie)
- Incuber 18 heures à 37 °C.

- **Lecture**

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche testée se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche indicatrice *E. coli* ATCC 25922 (figure 10).

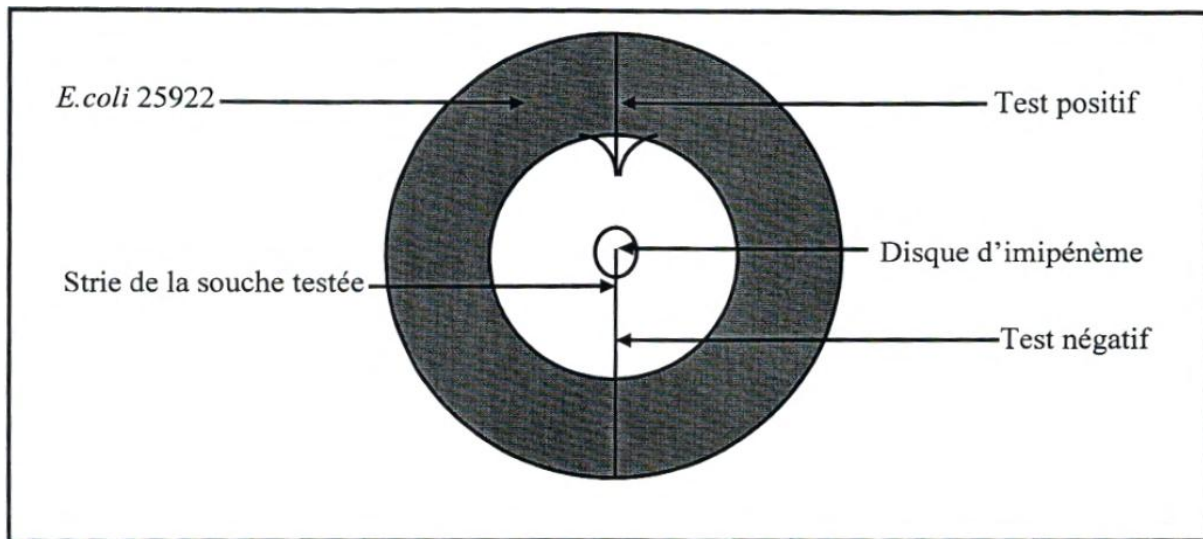


Figure 10: Test de Hodge

2.8.3. Test de synergie

- **Principe**

La détection phénotypique de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), est basée sur la mise en évidence d'une image de synergie entre un disque de céphalosporine de troisième génération et l'acide clavulanique (Philippon et Arlet, 2006).

- **Technique**

Sur une gélose Mueller-Hinton préalablementensemencée par la souche à tester, disposer les disques en ligne droite ceftazidime (10 μ g), ticarcilline + acide clavulanique (75 μ g/10 μ g) et de céfotaxime (5 μ g), en respectant une distance de 2,5 cm (centre à centre) entre chaque disque. Ensuite, placer un deuxième disque de céfotaxime (5 μ g) à 2 cm en dessous du disque de ticarcilline + acide clavulanique (TCC), de manière centrée verticalement (Jarlier *et al.*, 1988).

- **Lecture**

La positivité de ce test est matérialisée par un aspect dit « bouchon de champagne » (Sirot, 1996).

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Répartition des souches identifiées

Durant la période d'étude, 24 souches de bacilles à Gram négatif résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et/ou au carbapénèmes ont été isolées et identifiées. Parmi celles-ci, (14/24) souches (58,3 %) ont été isolées de la station d'épuration d'Aïn El Hout (ONA), tandis que (10/24) souches (41,7 %) provenaient du bassin de récolte de site ONID (figure 11).

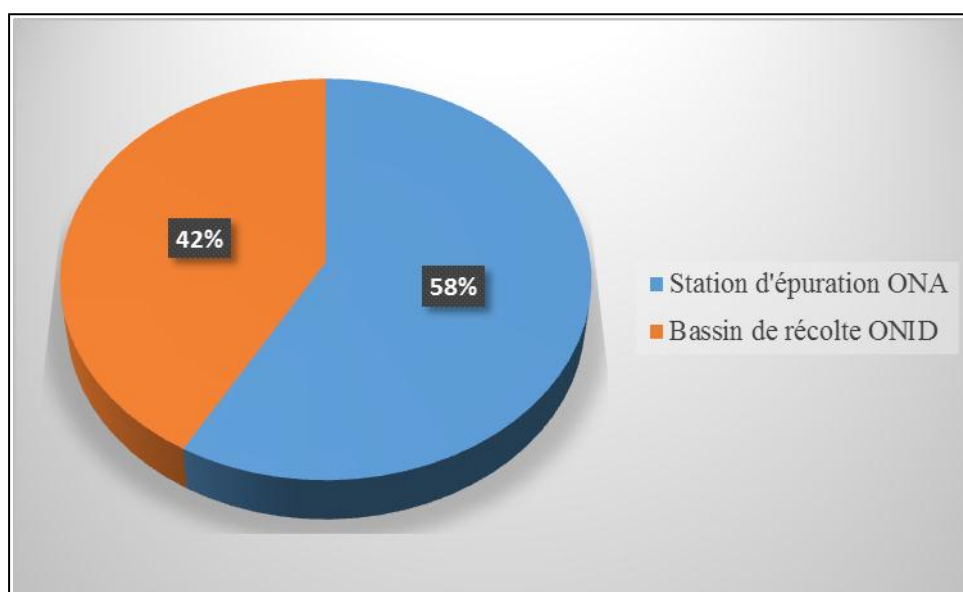


Figure 11: Répartition des souches identifiées selon le lieu de prélèvement.

1.2. Répartition des souches selon les espèces

L'analyse des 24 souches bactériennes isolées (tableau 3) (figures 13 et 14) a permis d'identifier plusieurs espèces. *Klebsiella pneumoniae* était la plus représentée avec 8 souches (33,3 %), suivie de *Pseudomonas fluorescens/putida* avec 4 souches (16,7 %), *Pseudomonas aeruginosa* avec 3 souches (12,5 %) et *Escherichia coli* également avec 3 souches (12,5 %). Deux souches de *Burkholderia cepacia* (8,3 %) ont été identifiées et 1 souche de *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Proteus pennerii* et *Non fermentaire spp* (4,2 % pour chacune) (figure 12)

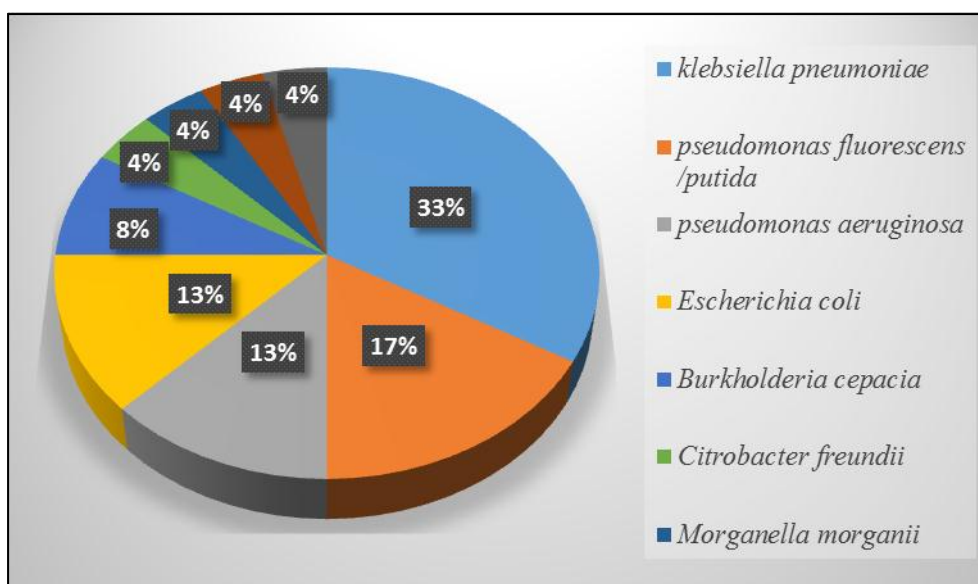
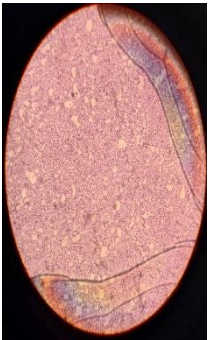
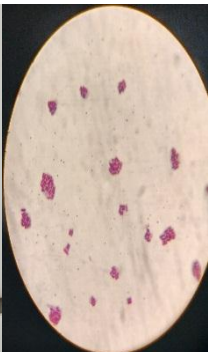
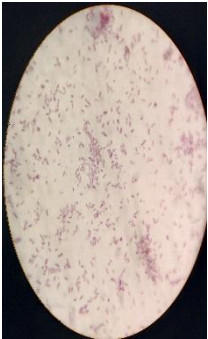
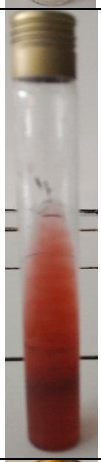
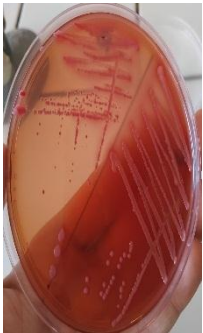
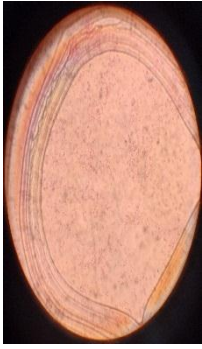
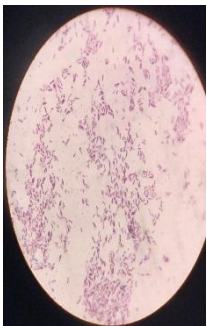


Figure 12: Répartition des souches isolées selon les espèces.

Tableau 3: Résultats des tests d'identification des souches étudiées.

Souche	Observation macroscopique	Observation microscopique	Test de catalase	Test d'oxydase	TSI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>					

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Burkholderia cepacia</i>					
<i>Citrobacter freundii</i>					

<i>Morganella morganii</i>					
<i>Proteus penneri</i>					
<i>Non fermentaire spp</i>					

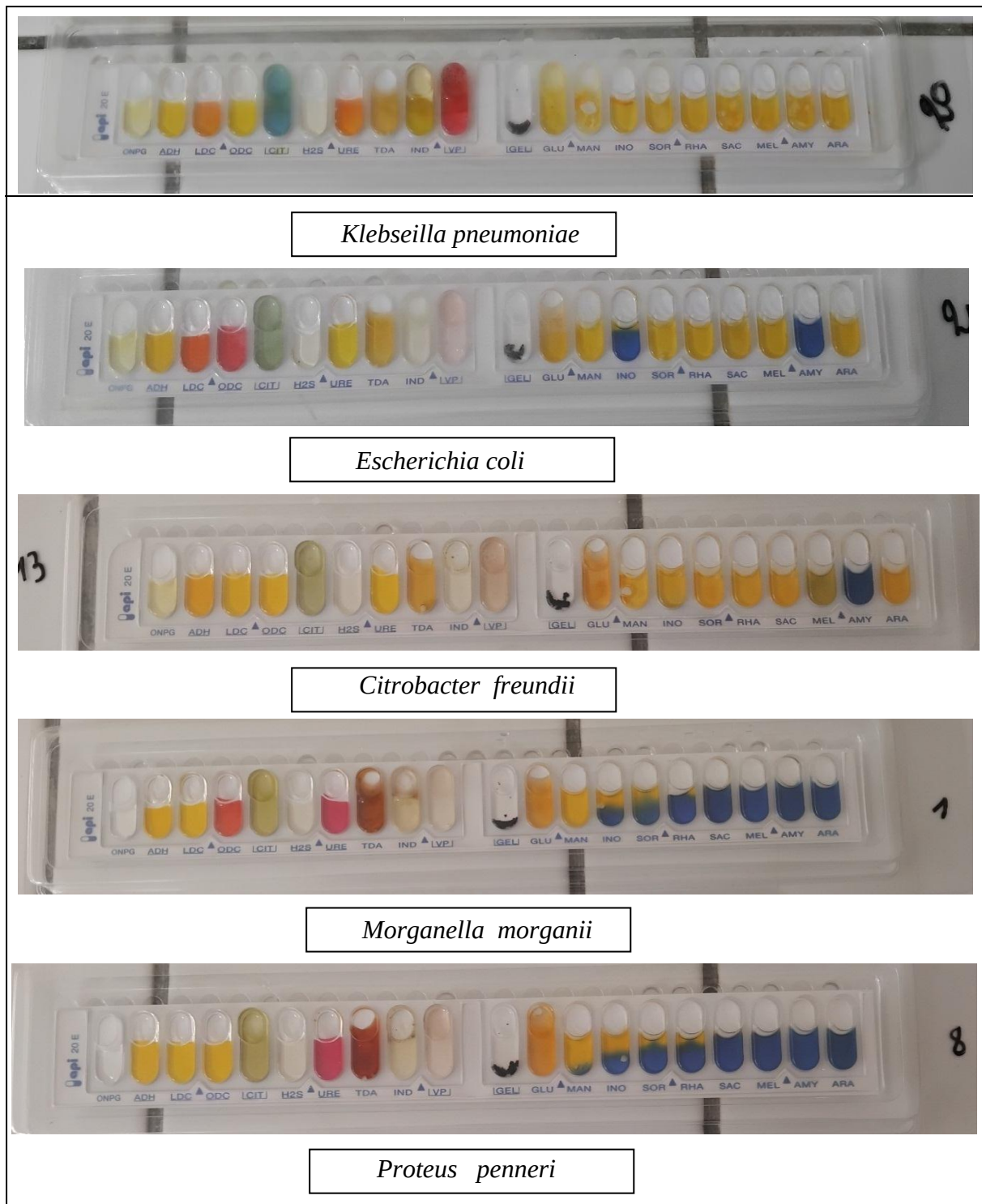


Figure 13: Identification des entérobactéries par galerie API 20E.

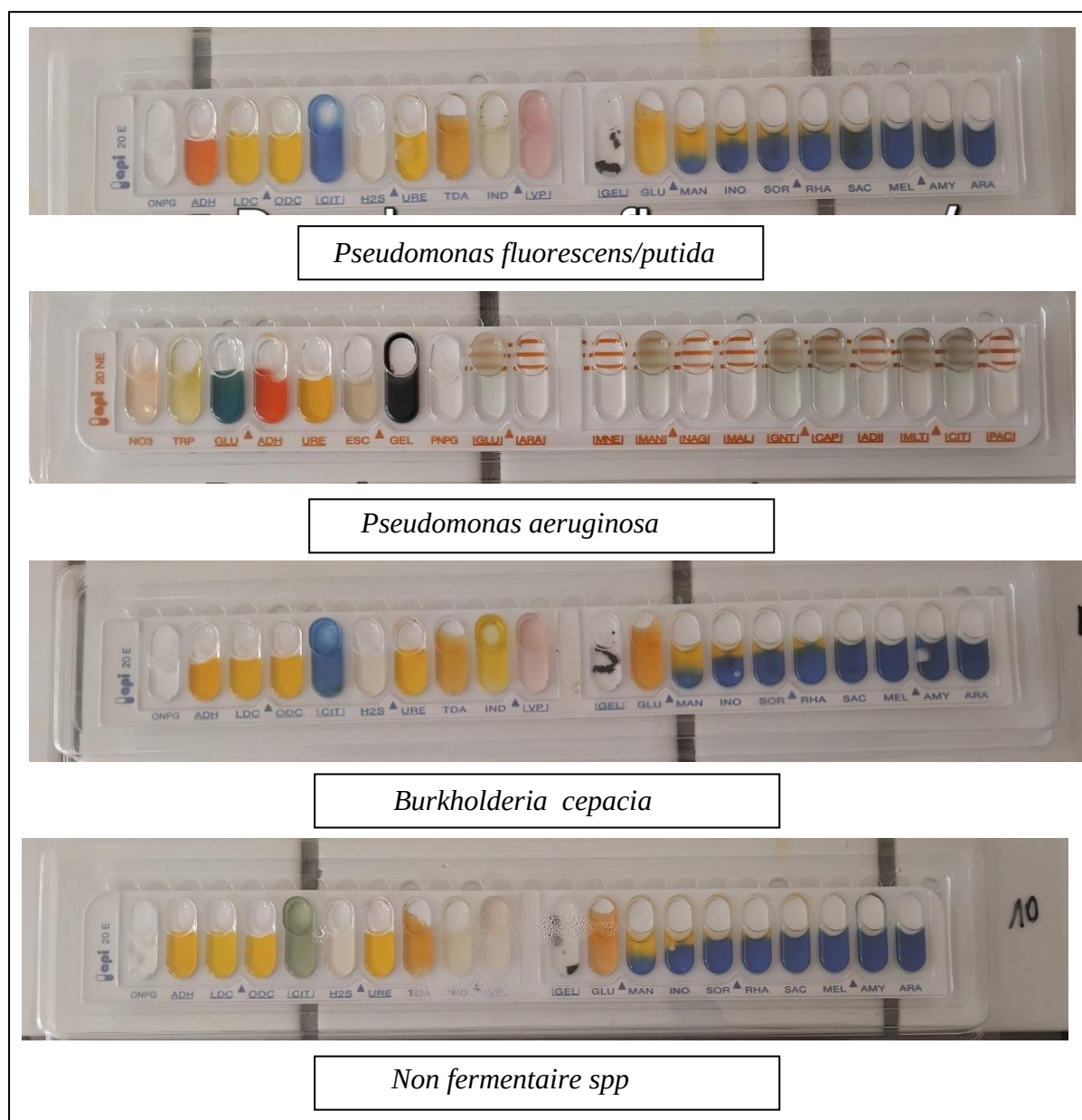


Figure 14: Identification des BGN non fermentaire par galerie API 20 E et API 20 NE.

1.3.1. Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Pour l'ensemble des entérobactéries isolées, les résultats de l'antibiogramme révèlent des taux de résistance variables selon les antibiotiques testés (figure 15). Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés avec la cefotaxime et l'amoxicilline-acide clavulanique, avec un taux de 100 %, suivis de la ceftazidime à 92,86 % et de la tobramycine

à 85,71 %. Un taux relativement élevé a également été noté pour le triméthoprim-sulfaméthoxazole à 71,43 % ainsi que pour la kanamycine à 64,29 %.

En revanche, des résistances moindres ont été enregistrées pour l'imipénème avec 42,86 %, la gentamicine à 50 %, le céfoxitine, la norfloxacine et le méropénème, chacun avec un taux de 35,71 %. Ces résultats mettent en évidence une multi-résistance marquée, notamment vis-à-vis des bêta-lactamines et des aminosides, et soulignent la nécessité d'une surveillance rigoureuse de la résistance chez ces entérobactéries.

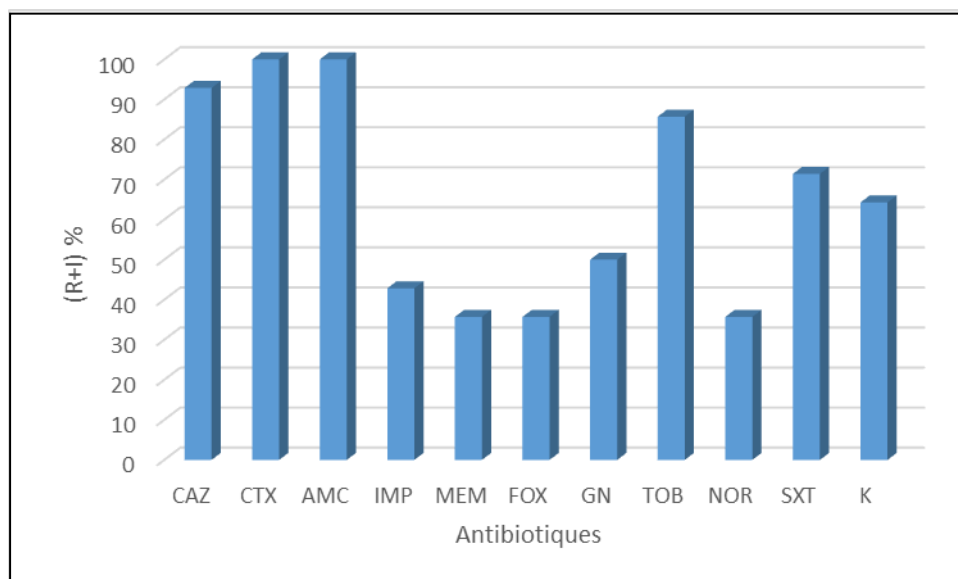


Figure 15: Taux de résistance des entérobactéries aux antibiotiques.

Une comparaison des profils de résistance des entérobactéries isolées des deux sites de prélèvement, à savoir la sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout et le bassin de récolte, révèle des taux globalement similaires, bien que quelques variations soient observées (figure 16). Il est à noter que le nombre de souches analysées reste relativement comparable entre les deux sites (8 pour la sortie de la station d'épuration et 6 pour le bassin de récolte), ce qui permet une évaluation descriptive des écarts.

Dans les deux sites, une résistance de 100 % est observée vis-à-vis de la cefotaxime et de l'amoxicilline-acide clavulanique. Une résistance élevée est également notée pour la ceftazidime, avec 87,5 % à la sortie de la station d'épuration contre 100 % au bassin de récolte. La tobramycine présente un taux de résistance de 75 % à la sortie de la station et de 100 % au bassin, tandis que le triméthoprim-sulfaméthoxazole montre des taux proches : 75 % à la sortie de la station et 66,67 % au bassin.

Des différences plus marquées apparaissent pour certains antibiotiques. Par exemple, l'imipénème affiche un taux de résistance plus faible à la sortie de la station (25 %) qu'au bassin (66,67 %). De même, la céfoxitine montre une résistance de 25 % à la sortie de la station contre 50 % au bassin. La norfloxacine est moins efficace au bassin (50 %) qu'à la sortie de la station (25 %). En revanche, la gentamicine et la kanamycine présentent des taux de résistance similaires dans les deux sites, respectivement à 50 % et environ 62–66 %.

Ces résultats suggèrent que, malgré quelques écarts ponctuels, les profils de résistance des entérobactéries sont globalement comparables entre les deux sites, traduisant probablement des pressions de sélection similaires dans les milieux aquatiques étudiés.

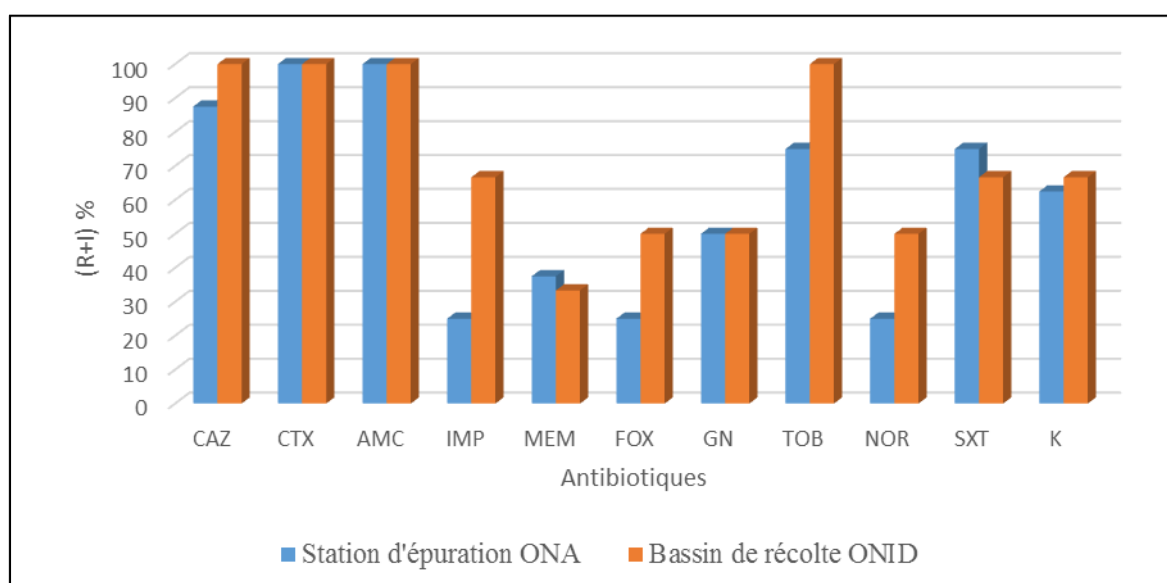


Figure 16: Résistance des entérobactéries aux antibiotiques au niveau des deux sites de prélèvement.

1.3.2. Résistance des bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques

Pour l'ensemble des bacilles à Gram négatif non fermentaires isolés, les résultats de l'antibiogramme indiquent des niveaux de résistance élevés pour plusieurs antibiotiques (figure 17). Une résistance de 100 % a été observée à la ceftazidime, à la céfpodoxime, à la céfoxitine ainsi qu'à la ticarcilline-clavulanate, traduisant une inefficacité marquée de ces molécules face aux souches isolées. Des taux de résistance tout aussi préoccupants ont été enregistrés pour l'imipénème, la ticarcilline et la tobramycine (70 % chacun), suivis du triméthoprim-sulfaméthoxazole (90 %), de la kanamycine (60 %), de la norfloxacine (30 %)

et de la gentamicine (20 %). Le méropénème a présenté le taux de résistance le plus faible, avec seulement 10 % de souches résistantes.

Ces données mettent en évidence un profil de multi-résistance préoccupant chez les BGN non fermentaires et appellent à une vigilance accrue dans le choix thérapeutique et la surveillance épidémiologique.

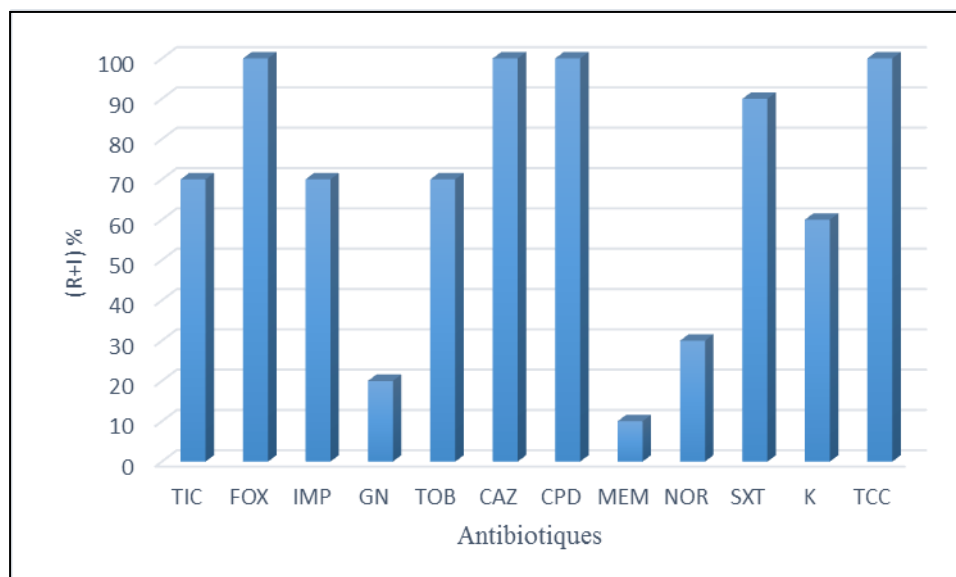


Figure 17: Taux de résistances des BGN non fermentaire aux antibiotiques.

L'analyse comparative des profils de résistance des bacilles à Gram négatif non fermentaires isolés des deux sites de prélèvement, à savoir la sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout et le bassin de récolte, révèle des tendances majoritairement concordantes, bien que certaines différences notables soient observées (figure 18). Le nombre de souches analysées étant comparable entre les deux sites, la comparaison permet une évaluation descriptive pertinente.

Dans les deux sites, une résistance de 100 % est observée vis-à-vis de la céfoxitine, de la ceftazidime, de la céfpodoxime et de la ticarcilline-clavulanate. Par ailleurs, une résistance complète à la ticarcilline et à l'imipénème est notée au bassin de récolte (100 %), contre des taux moindres à la sortie de la station (50 % chacun). Le triméthoprim-sulfaméthoxazole montre également une augmentation de la résistance au bassin (100 %) comparé à la station (83,33 %), tout comme la kanamycine (75 % au bassin contre 50 % à la station) et la tobramycine (75 % contre 66,67 %).

À l'inverse, certains antibiotiques présentent des taux de résistance plus faibles au bassin qu'à la station. C'est le cas du méropénème (0 % au bassin contre 16,67 % à la station) et de la norfloxacine (0 % au bassin contre 50 % à la station). La gentamicine montre des taux de résistance modérés dans les deux sites, avec 25 % au bassin et 16,67 % à la station.

Ces résultats indiquent que, bien que les profils de résistance soient globalement élevés dans les deux environnements, certaines molécules présentent des variations notables, pouvant refléter des pressions de sélection différentes selon les caractéristiques physico-chimiques ou la nature des contaminants présents dans chaque site.

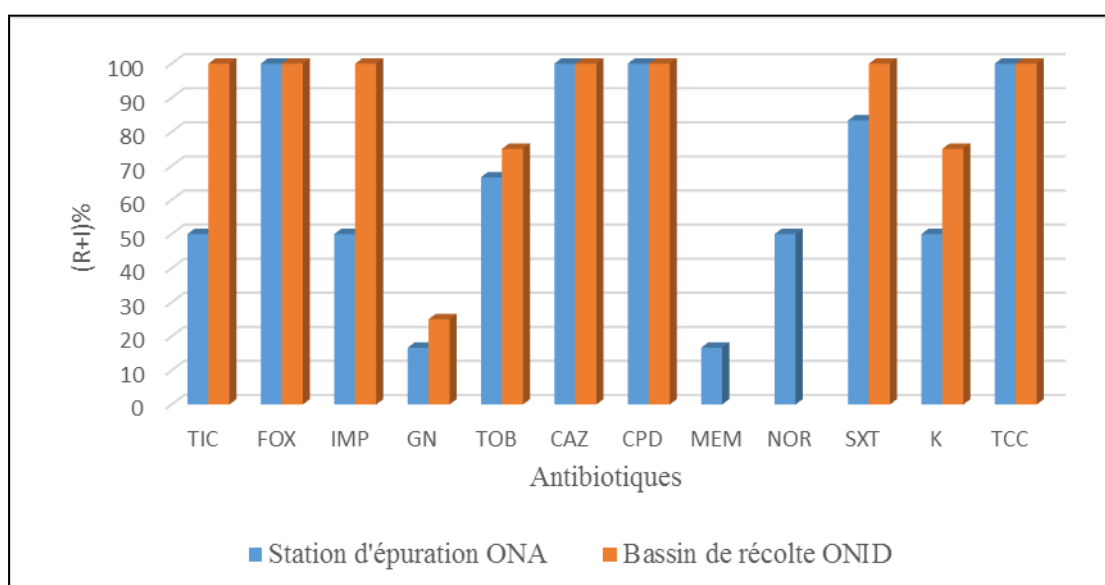


Figure 18: Résistance des BGN non fermentaires aux antibiotiques au niveau des deux sites de prélèvement.

1.4. Concentrations minimales inhibitrices

Les tests de CMI ont été réalisés sur un ensemble de souches présentant une résistance aux carbapénèmes. Plus précisément, ils ont été effectués sur 4 souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à l'ertapénème, dont 3 souches également résistantes à l'imipénème. En complément, les CMI ont également été déterminées pour 7 bacilles à Gram négatif non fermentaires présentant une résistance à au moins un des carbapénèmes testés (imipénème ou méropénème).

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (Tableau 4 ; figure 19) révèlent des niveaux élevés de résistance parmi les souches testées. Pour l'ertapénème, les *Klebsiella*

pneumoniae analysées présentent des CMI comprises entre 16 µg/mL et 32 µg/mL ce qui témoigne d'une forte résistance à cet antibiotique.

Concernant l'imipénème, les souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à cet antibiotique montrent des CMI supérieures à 32 µg/mL, indiquant une résistance très marquée.

Chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires, les valeurs de CMI pour l'imipénème étaient variables avec des CMI allant de 1 µg/mL à 16 µg/mL. Ces données montrent que certaines souches conservent une sensibilité partielle, tandis que d'autres expriment des niveaux de résistance cliniquement préoccupants.

Tableau 4: Résultats des CMI pour Ertapénème et Imipénème

Code souche	Espèce Bactérienne	Site de prélèvement	Origine de prélèvement	CMI Ertapénème (µg/ml)	CMI Imipénème (µg/ml)
Kp4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sortie de la station d'épuration ONA	Eau traitée	16 µg/mL	> 32 µg/mL
Kp5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sortie de la station d'épuration ONA	Boues activées	16 µg/mL	/
Kp6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	32 µg/mL	> 32 µg/mL
Kp1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	32 µg/mL	> 32 µg/mL
Pfp1	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	Sortie de la station d'épuration ONA	Eau traitée	/	2 µg/mL

Pfp2	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	Sortie de la station d'épuration ONA	Boues activées	/	2 µg/mL
Pfp3	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	Sortie de la station d'épuration ONA	Boues activées	/	2 µg/mL
Pfp4	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	/	1 µg/mL
Pa1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	/	8 µg/mL
Pa2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	/	16 µg/mL
Pa3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bassin de récolte ONID	Eau traitée	/	8 µg/mL

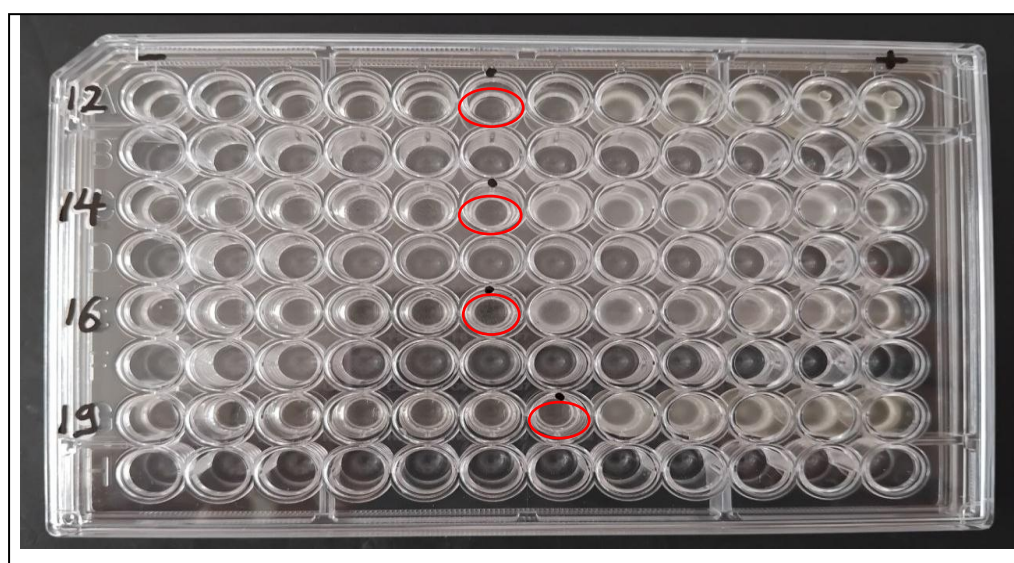


Figure 19: Résultats des CMI sur une microplaque.

1.5. Phénotype de résistance aux β -lactamines

1.5.1. Résultats de test CIM (Carbapenem Inactivation Method)

Le test CIM a été réalisé afin de détecter le potentiel de production de carbapénémases chez les souches présentant une résistance à au moins une carbapénème. Au total, sept souches ont été testées, dont 4 entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*) et 3 bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Les résultats montrent que le test CIM s'est révélé positif pour les quatre entérobactéries, indiquant la production probable de carbapénémases comme mécanisme de résistance.

En revanche, les trois BGN non fermentaires ont donné un résultat négatif, suggérant que la résistance observée à l'imipénème ou au méropénème pourrait être liée à d'autres mécanismes non enzymatiques (figure 20).

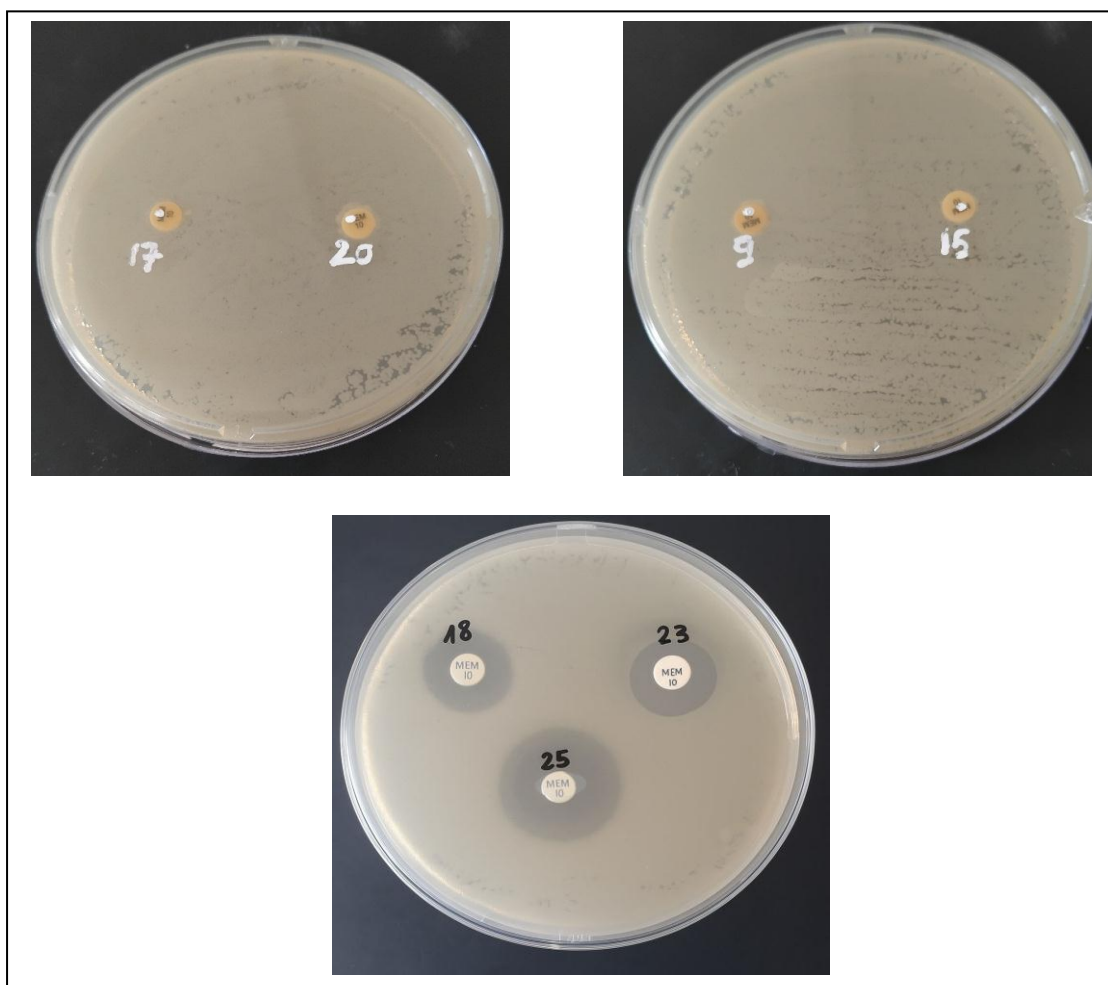


Figure 20 : Résultats de test CIM.

1.5.2. Résultats de test de Hodge

Le test de Hodge a été réalisé sur les quatre souches d'entérobactéries présentant un test CIM positif, afin de détecter une éventuelle production de métallobactamases, enzymes responsables de la résistance aux carbapénèmes. Les résultats se sont révélés négatifs pour toutes les souches testées, ce qui suggère l'absence de production de ces enzymes spécifiques (figure 21).

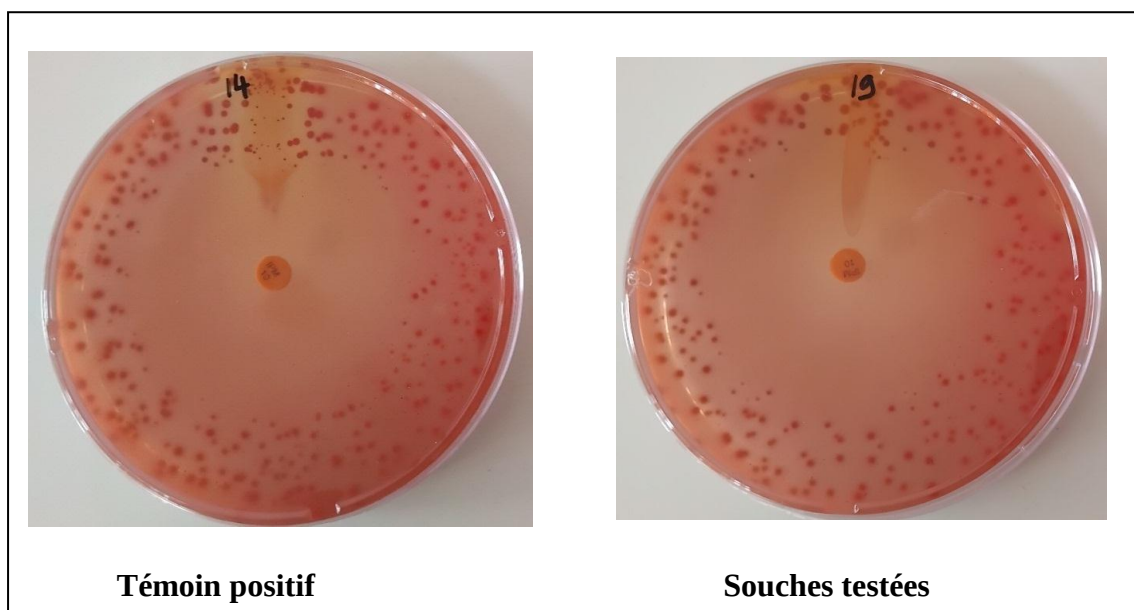


Figure 20: Résultats de test de Hodge.

1.5.3. Résultats du test de synergie

Le test de synergie a été réalisé sur quatre souches d'entérobactéries. Une souche d'*Escherichia coli* a montré une image de synergie en bouchon de champagne entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de troisième génération, notamment la ceftazidime (CAZ), indiquant la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Une synergie, bien que moins marquée, a également été observée entre l'acide clavulanique et la cefotaxime (CTX) (figure 22).

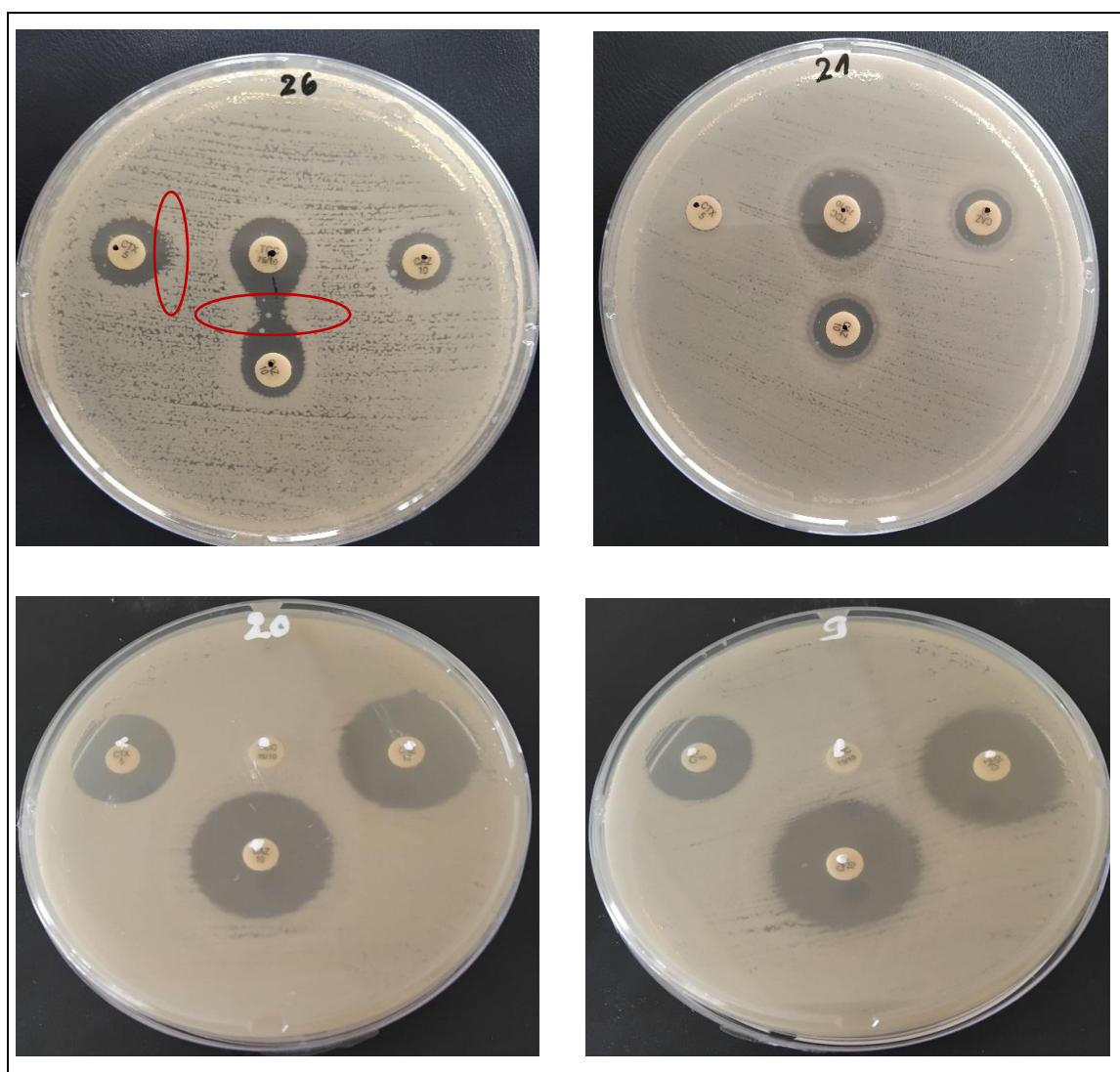


Figure 21: Résultats du test de synergie.

2. Discussion

La dissémination de bactéries multirésistantes dans les milieux aquatiques constitue un enjeu majeur de santé publique, notamment lorsqu'il s'agit de souches opportunistes résistantes aux antibiotiques critiques comme les carbapénèmes ou les céphalosporines de 3^{ème} génération. Les stations d'épuration, bien qu'essentielles au traitement des eaux usées, peuvent représenter un vecteur potentiel de diffusion de ces microorganismes dans l'environnement. Dans ce contexte, l'analyse des profils microbiologiques et de la résistance aux antibiotiques dans les effluents traités devient cruciale pour évaluer le niveau de risque et orienter les mesures de contrôle.

Entre Mars et Mai 2025, 24 bacilles à Gram négatif résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes ont été isolés à partir des eaux traitées issues de deux sites de prélèvement situés dans la wilaya de Tlemcen, la station d'épuration d'Aïn El Hout ONA et le bassin de récolte de l'ONID. Une différence a été observée dans la répartition des souches isolées entre les deux sites d'échantillonnage qui pourrait s'expliquer par des facteurs environnementaux spécifiques à chaque site. Bien que les deux points concernent des eaux usées traitées, le bassin de l'ONID agit comme un réservoir de stockage, où la stagnation prolongée, la sédimentation naturelle et les apports environnementaux externes (ruissellement, pollution diffuse) peuvent influencer la dynamique microbienne. Selon Leão et ses collaborateurs, les bassins de stabilisation post-traitement présentent souvent une composition microbienne distincte de celle observée à la sortie immédiate des stations d'épuration, en raison des processus physiques et des conditions écologiques spécifiques qui s'y développent (Leão *et al.*, 2023).

Cette étude a révélé une fréquence d'isolement de 58,33 % pour les entérobactéries, et 41,67 % pour les bacilles non fermentaires, traduisant une prédominance des entérobactéries. Ce résultat est en accord avec les données rapportées par Cherak et ses collaborateurs qui ont identifié 73,78 % d'entérobactéries et 26,21 % de BGN non fermentaires dans des échantillons d'eaux traitées à Batna (Cherak *et al.*, 2022). Parmi les entérobactéries identifiées, on note la dominance de *Klebsiella pneumoniae* (57,1 %) suivie d'*Escherichia coli* (21,4 %). Ces proportions sont proches de celles rapportées dans une étude comparative menée sur trois stations d'épuration dans le nord-ouest de l'Algérie, où *Klebsiella pneumoniae* représentait environ 60 % des entérobactéries isolées, et *Escherichia coli* environ 23 % (Mokeddem *et al.*, 2025). Cette convergence confirme la prédominance de ces espèces dans les eaux traitées à l'échelle nationale.

En ce qui concerne les bacilles à Gram négatif non fermentaires, l'espèce dominante est *Pseudomonas fluorescens/putida* (40 %) suivie de *Pseudomonas aeruginosa* (30 %). Une étude similaire menée à Batna a également observé une forte prévalence de *Pseudomonas*, bien que les proportions diffèrent, ce qui souligne une tendance écologique constante du genre dans les milieux aqueux (Cherak *et al.*, (2022).

La pression de sélection exercée par les résidus d'antibiotiques et de métaux lourds, en particulier d'origine hospitalière et industrielle, pourrait expliquer la persistance de ces souches multirésistantes. Djouadi et ses collaborateurs ont souligné que les milieux aquatiques anthropisés constituent des réservoirs importants de gènes de résistance transmissibles via plasmides et intégrons (Djouadi *et al.*, 2017).

Les résultats de l'antibiogramme ont révélé des niveaux de résistance alarmants. Chez les entérobactéries, 100 % des souches étaient résistantes à la cefotaxime et à l'amoxicilline/acide clavulanique, et plus de 85 % à la tobramycine, à la ceftazidime et aux carbapénèmes 42,9 % à l'imipénème et 35,7% au méropénème. Les bacilles non fermentaires ont également présenté des profils préoccupants, avec une résistance de 100 % à l'imipénème, à la ticarcilline et à la ceftazidime, et 66,7 % à la tobramycine. Ces observations sont en accord avec celles rapportées dans une étude menée à la station d'épuration de Tizi-Ouzou (Algérie), où une proportion élevée de bactéries résistantes aux β -lactamines a été observée dans les effluents traités (Mazi *et al.*, 2024). De plus, les auteurs ont noté une augmentation de la fraction de bactéries hétérotrophes résistantes à l'imipénème après traitement, ainsi qu'une présence persistante de souches résistantes à la gentamicine et à d'autres antibiotiques couramment utilisés. Ces données confirment la persistance préoccupante de bactéries multirésistantes dans les eaux traitées, en cohérence avec les taux observés dans la présente étude. Cette situation renforce l'idée que les eaux traitées représentent un vecteur de dissémination de résistances critiques (Rizzo *et al.*, 2013)

Les résultats de CMI ont révélé une résistance marquée de *Klebsiella pneumoniae* aux carbapénèmes, avec des CMI allant jusqu'au 32 $\mu\text{g/mL}$ et supérieur à 32 $\mu\text{g/mL}$ pour l'ertapénème et l'imipénème respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celles rapportées dans une étude Mexicaine, où les souches isolées des effluents d'eau traitée présentaient des CMI de 1 à 16 $\mu\text{g/mL}$ pour l'imipénème et supérieure 8 $\mu\text{g/mL}$ pour l'ertapénème (Galarde-López *et al.*, 2022).

Par ailleurs, les valeurs de CMI obtenues chez *Pseudomonas spp* variaient entre 1 et 16 µg/mL pour l'imipénème, traduisant une hétérogénéité notable du niveau de résistance, avec certains isolats hautement résistants et d'autres modérément sensibles. Cette variabilité peut s'expliquer par la grande capacité d'adaptation de ces bactéries aux conditions environnementales des stations d'épuration. Selon Luczkiewicz et ses collaborateurs, des espèces telles que *Pseudomonas putida* développent fréquemment des profils multirésistants après le traitement des eaux usées, en réponse à la pression sélective exercée par les résidus d'antibiotiques, ce qui favorise l'émergence de souches plus tolérantes (Luczkiewicz *et al.*, 2015).

La production de carbapénémases était détectée uniquement chez quatre souches de *Klebsiella pneumoniae*, tandis que chez les non fermentaires, l'absence d'enzymes détectables suggère des mécanismes alternatifs comme la réduction de la perméabilité membranaire ou l'activation de pompes d'efflux. Ce constat rejoint les observations de Van der Zwaluw et ses collaborateurs, qui ont souligné que ces mécanismes non enzymatiques sont fréquemment impliqués dans la résistance des espèces non fermentaires, notamment *Pseudomonas aeruginosa* (Van der Zwaluw *et al.*, 2015).

Le test de synergie a confirmé la présence d'une souche d'*Escherichia coli* productrice de BLSE en l'absence de carbapénémase selon le test de Hodge. Une situation similaire a été rapportée dans une étude menée sur des eaux usées de la ville de Bordj Bou Arréridj (Algérie), où 4 souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE ont été isolées (Khouchane *et Saci* 2024), reflétant la circulation environnementale préoccupante de ce type de résistance dans les milieux hydriques et soulignant l'importance du suivi microbiologique dans les effluents traités.

Enfin, L'ensemble des résultats de cette étude met en lumière la présence significative de bactéries multirésistantes aux antibiotiques critiques dans les eaux usées traitées, avec des mécanismes enzymatiques tels que les BLSE ou les carbapénémases, particulièrement préoccupants sur le plan de la santé publique. Ces constats appellent à un renforcement des protocoles de traitement et de surveillance microbiologique des effluents, et à une régulation plus stricte de l'usage des antibiotiques en amont. Des recherches futures intégrant l'analyse moléculaire des gènes de résistance et la métagénomique environnementale seraient essentielles pour mieux comprendre les dynamiques de dissémination et proposer des stratégies de lutte adaptées.

Conclusion

La présence de bacilles à Gram négatif multirésistants dans les eaux usées traitées représente une problématique environnementale et de santé publique préoccupante. L'étude menée dans la wilaya de Tlemcen, à partir d'échantillons collectés entre Mars et Mai 2025, a permis d'isoler 24 souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération et/ou aux carbapénèmes, réparties entre la sortie de la station d'épuration d'Aïn El Hout ONA et le bassin de récolte de l'ONID. Les entérobactéries, notamment *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, ont été les espèces les plus fréquemment isolées, suivies par des bacilles non fermentaires tels que *Pseudomonas fluorescens/putida* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les profils de résistance observés à travers cette étude révèlent une diffusion marquée de souches hautement résistantes, avec des taux préoccupants de résistance aux carbapénèmes, aux aminosides et aux fluoroquinolones. Les tests phénotypiques ont mis en évidence la production probable de carbapénémases chez les entérobactéries, ainsi qu'un profil enzymatique de type BLSE chez une souche d'*Escherichia coli*, ce qui confirme ainsi l'implantation de mécanismes de résistance spécifiques dans l'environnement hydrique. Chez *Klebsiella pneumoniae*, des valeurs élevées de CMI ont été observées, dépassant les 32 µg/mL pour l'imipénème et l'ertapénème, témoignant d'une résistance de haut niveau.

En revanche, la résistance chez les bacilles non fermentaires semble plutôt liée à des mécanismes non enzymatiques tels que la perméabilité réduite ou l'activation des pompes d'efflux.

La détection de ces souches dans des eaux destinées à la réutilisation agricole ou au rejet environnemental souligne l'importance de renforcer les stratégies de traitement, de surveillance microbiologique continue et d'une régulation stricte de l'usage des antibiotiques en amont.

Enfin, cette étude, à caractère phénotypique mérite d'être complétée par des investigations moléculaires approfondies telles que la recherche de gènes de résistance par PCR, l'analyse de la structure des plasmides porteurs et des études de typage moléculaire (PFGE, séquençage) pour mieux comprendre les voies de diffusion de ces souches dans les milieux aquatiques et prévenir leur dissémination à plus grande échelle.

Références bibliographiques

- Abuhasel, K., Kchaou, M., Alquraish, M., Munusamy, Y., & Jeng, Y. T. (2021). Oily wastewater treatment: Overview of conventional and modern methods, challenges, and future opportunities. *Water*, 13(7), 980. <https://doi.org/10.3390/w13070980>
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Arlet G, Philippon A. (2003). Les nouvelles B-lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue française des Laboratoires*, N 352
- Bai, X., Dinkla, I. J. T., & Muyzer, G. (2022). Microbial ecology of biofiltration used for producing safe drinking water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 4769–4784. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12013-x>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., ... & Schwartz, T. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Bratby, J. (2016). *Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment* (3rd ed.). IWAPublishing.
<https://rexresearch1.com/SewageTreatmentLibrary/CoagulationFlocculationwaterwastewatertreatmt.pdf>
- Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., Rolain, J. M., & Drissi, M. (2022). Diversity of Gram-negative bacteria isolated from treated wastewater and their resistance profiles in Batna, Algeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 46789–46799. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16260-7>
- Choudri, B. S., Al-Awadhi, T., Charabi, Y., & Al-Nasiri, N. (2020). Wastewater treatment, reuse, and disposal-associated effects on environment and health. *Water Environment Research*, 92(10), 1595–1602. <https://doi.org/10.1002/wer.1406>
- Demirbas, A., Edris, G., & Alalayah, W. M. (2017). Sludge production from municipal wastewater treatment in sewage treatment plant. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. <https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1283551>
- Djouadi, A., Bouderbala, B., Touati, A., & Mairi, A. (2017). Contribution of anthropogenic aquatic environments to the spread of antibiotic resistance in Algeria. *Journal of Water and Health*, 15(4), 610–620. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.003>

- Galarde-López, M., Rosas, I., & Amézquita-López, B. A. (2022). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater treatment plants in Mexico: CMI profiles and resistance determinants. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 57(2), 123–130. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1992829>
- Godijk, N. G., Bootsma, M. C. J., & Bonten, M. J. M. (2022). Transmission routes of antibiotic resistant bacteria: A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), Article 482, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07360-z>
- Hamidou, O., Yacouba, A., Tapha, O., Moussa, H., Illa Salifou, I., Brah, S., Mamadou, S., & Baba-Moussa, L. S. (2025, March 27). Carbapenemase genes in hospital wastewater in Africa: A systematic review and meta-analysis [Preprint]. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.03.26.25324662>
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2008). *Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design*. IWA Publishing.
- Herrera-Navarrete, R., Martínez-Bastidas, T., Parra, R. E., & Peña, H. (2021). Municipal wastewater treatment plants: Gap, challenges, and opportunities in environmental management. *Environmental Management*, 67(3), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01562-y>
- Jain, K., Patel, A. S., Pardhi, V. P., & Flora, S. J. S. (2021). Nanotechnology in wastewater management: A new paradigm towards wastewater treatment. *Molecules*, 26(6), 1797. <https://doi.org/10.3390/molecules26061797>
- Jaramillo, M. F., & Restrepo, I. (2017). Wastewater reuse in agriculture: A review about its limitations and benefits. *Sustainability*, 9(10), 1734. <https://doi.org/10.3390/su9101734>
- Jarlier V, Nordmann P. (2000). Entérobactéries et b-lactamines . In Freney J, Renand F, Hansen W, Bollet C. *Précis de bactériologie chimique* . Paris : Éditions ESKA _Alexandre Lacassange
- Johnson, M. B., & Mehrvar, M. (2023). Waste Activated Sludge-High Rate (WASHR) Treatment Process: A novel, economically viable, and environmentally sustainable method to co-treat high-strength wastewaters at municipal wastewater treatment plants. *Bioengineering*, 10(9), 1017. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10091017>

- Jovanovic, O., Amábile- Cuevas, C. F., Shang, C., Wang, C., & Ngai, K. W. (2021). What water professionals should know about antibiotics and antibiotic resistance: An overview. *ACS ES&T Water*, 1(6), 1334–1351. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00308>
- Jover- Smet, M., Martín- Pascual, J., & Trapote, A. (2017). Model of suspended solids removal in the primary sedimentation tanks for the treatment of urban wastewater. *Water*, 9(6), 448. <https://doi.org/10.3390/w9060448>
- Khouchane, H., & Saci, H. (2024). Caractérisation phénotypique et moléculaire des entérobactéries productrices de BLSE et carbapénémases isolées des eaux usées à Bordj Bou Arréridj (Algérie). *Revue Algérienne de Microbiologie*, 18(1), 23–31.
- Kolosovska, T., & Bauer, S. K. (2022). Evaluation of grit properties at a medium-capacity wastewater treatment plant: A case study. *Resources, Conservation & Recycling Advances*, 14, 200080. <https://doi.org/10.1016/j.rcradv.2022.200080>
- Kong, J., Lu, Y., Ren, Y., Chen, Z., & Chen, M. (2021). The virus removal in UV irradiation, ozonation and chlorination. *Water Cycle*, 2, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2021.05.001>
- Leão, T. F., Costa, P. M., Araújo, S. I., Barros, A. R., Martins, M. A., Fonseca, S. G., & Tavares, F. (2023). Microbiome and resistome profiles along a sewage-effluent-reservoir trajectory underline the role of natural attenuation in wastewater stabilization reservoirs. *Environmental Microbiome*, 18(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00479-3>
- Lee, K., Lim, Y. S., Yong, D., Yum, J. H., & Chong, Y. (2003). Evaluation of the Hodge test and the imipenem- EDTA double- disk synergy test for differentiating metallo- β - lactamase- producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4623–4629. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4623-4629.2003>
- Lehman, D. (2005, September 30). Triple sugar iron (TSI) agar protocols [PDF]. American Society for Microbiology. <https://asm.org/asm/media/protocol-images/triple-sugar-iron-agar-protocols.pdf?ext=.pdf>
- Leiva, A. M., Piña, B., & Vidal, G. (2021). Antibiotic resistance dissemination in wastewater treatment plants: A challenge for the reuse of treated wastewater in agriculture. *Reviews in*

Environmental Science and Biotechnology, 20, 1043–1072. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09588-8>

Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. International Journal of Medical Microbiology, 302(2–3), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>

Liu, S., Zhang, L., Kong, S., Liu, X., Chen, F., & Zhang, Q. (2019). Performance of an integrated reactor with airlift loop and sedimentation for municipal wastewater treatment: A 150 m³/d pilot case study. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 98(2), 475–483. <https://doi.org/10.1002/cjce.23624>

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

Liu, Z., He, Y., Zhao, J., Zhang, M., & Guo, X. (2024). Occurrence, distribution, and ecological risks of antibiotics and antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants: A global overview. Environmental Science and Ecotechnology, 20, 100351. <https://doi.org/10.1016/j.es.2024.100351>

Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., & Olanczuk-Neyman, K. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. Environmental Science and Pollution Research, 22(24), 19823–19834. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5226-y>

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. Pathogens, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>

Mazi, W., Hamzi, A., Bensalem, F., & Touati, M. (2024). Evaluation de la résistance bactérienne dans les effluents de la station d'épuration de Tizi-Ouzou (Algérie). Revue Africaine de Biotechnologie, 22(3), 112–121.

- Mokeddem, L., Bouzid, D., & Benameur, Q. (2025). Surveillance microbiologique des effluents épurés : étude comparative de trois STEP dans le nord-ouest algérien. *Bulletin Algérien de Microbiologie Appliquée*, 31(1), 45–54.
- Mortula, M. M., Abdelrahman, M., & Tatan, B. (2022). Comparative evaluation of membrane filtration on the tertiary treatment of synthetic secondary effluent. *Separations*, 9(3), 63. <https://doi.org/10.3390/separations9030063>
- Obotey Ezugbe, E., & Rathilal, S. (2020). Membrane technologies in wastewater treatment: A review. *Membranes*, 10(5), 89. <https://doi.org/10.3390/membranes10050089>
- Ojo, P., & Ifelebuegu, A. O. (2018). The impact of aluminium salt dosing for chemical phosphorus removal on the settleability of activated sludge. *Environments*, 5(8), 88. <https://doi.org/10.3390/environments5080088>
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Poirel, L., et al. (2017). The polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Qasim, S. R., & Zhu, G. (2018). Screening. In *Wastewater treatment and reuse: Theory and design examples* (Vol. 1, Chap. 7). CRC Press / Taylor & Francis.
- Racault, Y., & Boutin, C. (2005). *Le lagunage naturel: Conception, dimensionnement, exploitation*. Éditions Tec & Doc.
- Rizzo, L., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, 447, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- Šalva, M., Kukučka, R., Kozáková, K., Šoltés, T., & Šajgalík, M. (2025). Analysis of the current state of sewage sludge treatment from the perspective of current European directives. *Environmental Sciences Europe*, 37, 59. <https://doi.org/10.1186/s12302-025-01097-7>
- Shchegolkova, N. M., Krasnov, G. S., Belova, A. A., Dmitriev, A. A., Kharitonov, S. L., Klimina, K. M., Melnikova, N. V., & Kudryavtseva, A. V. (2016). Microbial community

- structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 90. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090>
- Shields, P., & Cathcart, L. (2010, November 11). Oxidase test protocol [PDF]. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf>
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Shin, S.-K., Song, K.-B., & Oh, J.-E. (2010). Assessment of fates of estrogens in wastewater and sludge from various types of wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 82(10), 1448–1453. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.045>
- Sirot J .(1996) .Détection of extend - spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. *Clin . Microbial. Infect .* 2(1) : 35-9
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005, September 30). Gram stain protocols [PDF]. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- Sonthiphand, P., Panthapa, C., Mhuantong, W., Charanaipayuk, N., Homyok, P., & Limpiyakorn, T. (2022). Characterization of the nitrogen-transforming microbial community in the biofilms of a full-scale rotating biological contactor system treating wastewater from a fresh market building. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 8(7), 1845–1855. <https://doi.org/10.1039/D2EW00204C>
- Sun, G., Zhang, Q., Dong, Z., Dong, D., Fang, H., Wang, C., Dong, Y., Wu, J., Tan, X., Zhu, P., & Wan, Y. (2022). Antibiotic resistant bacteria: A bibliometric review of literature. *Frontiers in Public Health*, 10, Article 1002015. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1002015>
- Tacconelli, E., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tadesse, B. T., et al. (2017). Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 616. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2713-1>
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2003). *Wastewater engineering: Treatment and reuse* (4th ed.). McGraw-Hill Education.
- Tchobanoglous, G., Stensel, H. D., Tsuchihashi, R., & Burton, F. L. (2014). *Wastewater engineering: Treatment and resource recovery* (5th ed.). McGraw-Hill Education.

- Tilley, E., Ulrich, L., Lüthi, C., Reymond, P., & Zurbrugg, C. (2014). Compendium of sanitation systems and technologies (2nd rev. ed.). Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). https://sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/TILLEY%20et%20al%202014%20Compendium%20of%20Sanitation%20Systems%20and%20Technologies%202nd%20Revised%20Edition.pdf
- Tortajada, C. (2020). Contributions of recycled wastewater to clean water and sanitation Sustainable Development Goals. *npj Clean Water*, 3, 22. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0069-3>
- Van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS ONE*, 10(3), e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
- Visnevschi, A., & Povar, I. (2025). New biological treatment method of domestic wastewater with simultaneous nitrification and denitrification based on detached biofilm. *Applied Water Science*, 15, 69. <https://doi.org/10.1007/s13201-025-02408-2>
- Voigt, A. M., Zacharias, N., Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R. M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H. A., & Schreiber, C. (2020). Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater – An evaluation of clinical influences. *Chemosphere*, 241, 125032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125032>
- Waqas, S., Harun, N. Y., Sambudi, N. S., Bilad, M. R., Abioye, K. J., Ali, A., & Abdulrahman, A. (2023). A review of rotating biological contactors for wastewater treatment. *Water*, 15(10), 1913. <https://doi.org/10.3390/w15101913>
- WHO. (2020). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>. 2014
- World Health Organization (WHO). (2017). Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Xie, W.-Y., Shen, Q., & Zhao, F.-J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review. *European Journal of Soil Science*, 69(1), 181–195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12494>

Yuan, Q., Guo, L., Li, B., Zhang, S., Feng, H., ... & Qu, T. (2023). Risk factors and outcomes of inpatients with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections in China: A 9-year trend and multicenter cohort study. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 137811. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1137811>

Zagklis, D., & Bampos, G. (2022). Current trends in wastewater treatment and valorization. *Processes*, 10(11), 2304. <https://doi.org/10.3390/pr10112304>

Zhang, D., He, X., Xu, X., Li, H., Sun, H., Wang, C., & Zhang, G. (2020). Hospital wastewater as a reservoir for antibiotic resistance genes: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, 8, 574968. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>

Annexes

Annexe 1**❖ Préparation des milieux sélectifs****➤ MacConkey + Ertapénème (0,5 µg/ml)**

Selon les recommandations du CASFM/EUCAST, une concentration $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ permet de sélectionner les souches résistantes à l'ertapénème. La préparation a été effectuée comme suit :

- Dissolution de 20 mg d'ertapénème dans 20 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une solution mère à 1 mg/ml.
- Prélèvement de 0,1 ml de cette solution, diluée dans 9,9 ml d'eau distillée stérile pour préparer une solution intermédiaire à 10 µg/ml.
- 1 ml de cette solution a été ajouté dans une boîte de Pétri stérile, suivi de 19 ml de gélose MacConkey fondue (à environ 45–50 °C).
- Le contenu a été homogénéisé près du bec Bunsen, puis laissé à solidifier à température ambiante.

➤ MacConkey + Céfotaxime (CTX) (2 µg/ml)

Pour la céfotaxime, la concentration cible $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ permet la sélection des entérobactéries productrices de bêta-lactamases. La préparation a suivi les étapes suivantes :

- Dissolution de 80 mg de CTX dans 20 ml d'eau distillée stérile pour une solution mère à 4 mg/ml.
- Dilution de 0,1 ml de cette solution dans 9,9 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 40 µg/ml.
- 1 ml de cette solution a été ajouté dans une boîte de Pétri, suivi de 19 ml de gélose MacConkey fondue.
- Homogénéisation du contenu de la boîte, puis solidification à température ambiante.

Annexe 2

Tableau de lecture d'une galerie API 20 E.

Tests	Composants actifs	Réactions enzymatique	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du CITrate	Vert pâle/Jaune	Bleu-vert / Bleu
<u>H2S</u>	Sodium thiosulfate	Production d'H2S	Incolore / Grisâtre	Dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	Urée	UREase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	Jaune	Marron-rougeâtre ^(*)
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	Incolore Vert pâle/ Jaune	Rose ^(*)
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne (Voges Proskauer)	Incolore	Rose/ rouge ^(**)
GEL	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation/ oxidation GLUcose	Bleu/ bleu vert	Jaune / Jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation/ oxidation MANnitrol	Bleu/ bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/ oxidation INOsitol	Bleu/ bleu vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation/ oxidation SORbitol	Bleu/ bleu vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	Fermentation/ oxidation RHAmnose	Bleu/ bleu vert	Jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation/ oxidation SACcharose	Bleu/ bleu vert	Jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation/ oxidation MELibiose	Bleu/ bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/ oxidation AMYgdaline	Bleu/ bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/ oxidation ARABinose	Bleu/ bleu vert	Jaune

(*) : Réaction immédiat ; (**) : VP 1 + VP 2 / 10 minutes

Annexe 3

Tableau de lecture d'une galerie API 20 NE.

Tests	Composants actifs	Reactions/enzymes	Resultats	
			Negatif	Positif
N03	Potassium nitrate	Réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 15 min Incolore Rose-rouge	
		Réduction des Nitrates en azote	Zn 15 min Rose Incolore	
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES 1immédiat Incolore Rose Vert pâle 1jaune	
GLU	D-glucose	Fermentation (GLUCOSE)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine DIHydrolase	Jaune	Orange 1rose 1rouge
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange 1rose 1rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris 1marron 1noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophénylβD-galactopyranoside	β-galactosidase (Para-NitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assimilation (GLUCOSE)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	Assimilation (ARABINOSE)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation (ManNosE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation (MANnitrol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	Assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation (MALtose)	Transparence	Trouble

GNT	Potassium gluconate	Assimilation (potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	Assimilation (acide CAPrique)	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	Assimilation (acide ADIpique)	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	Assimilation (MaLaTe)	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Assimilation (trisodium CITrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	Assimilation (PhénylACétique)	Transparence	Trouble

Annexe 4

Tableau : liste des antibiotiques testés pour les entérobactéries

Antibiotiques	Symboles	Charges (µg)	Familles
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	30	Aminopénicillines
Céfotaxime ou Cefpodoxime	CTX/CPD	10	Céphalosporines de 3e gén.
Céftazidime	CAZ	10	Céphalosporines de 3e gén.
Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporines de 2e gén.
Imipénème	IMP	10	Carbapénèmes
Méropénème	MEM	10	Carbapénèmes
Gentamicine	GN	10	Aminosides
Tobramycine	TOB	10	Aminosides
Norfloxacin	NOR	10	Fluoroquinolones
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	SXT	25	Sulfamides + Diaminopyrimidines
Kanamycine	K	30	Aminosides

Tableau : liste des antibiotiques testés pour les non entérobactéries

Antibiotiques	Symboles	Charges (µg)	Familles
Pipéracilline + Tazobactam	TPZ	36	Pénicillines à large spectre
Amoxicilline + Acide clavulanique	AMC	30	Aminopénicillines
Céfoxitine	FOX	30	Céphalosporines de 2e gén.
Céftazidime	CAZ	10	Céphalosporines de 3e gén.
Cefpodoxime	CPD	10	Céphalosporines de 3e gén.
Imipénème	IMP	10	Carbapénèmes
Méropénème	MEM	10	Carbapénèmes
Gentamicine	GN	10	Aminosides
Tobramycine	TOB	10	Aminosides
Norfloxacin	NOR	10	Fluoroquinolones
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	SXT	25	Sulfamides + Diaminopyrimidines
Kanamycine	K	30	Aminosides

Annexe 5 : Concentration et diamètre critique des antibiotiques utilisés (CA-SFM 2024).

Entérobactéries

Antibiotiques		Symbole	Charge du disque (µg)	Concentrations critiques (mg/l) S ≤ R >		Diamètre critiques (mm) S ≤ R >	
β- lactamines	Céftazidime	CAZ	10	1	4	22	19
	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20-10	8	8	19	19
	Céfotaxime	CTX	5	1	2	20	17
	Imipénème	IMP	10	2	4	22	19
	Méropénème	MEM	10	2	8	22	16
	céfoxitine	FOX	30	8	8	18	18
Aminosides	Gentamicine	GN	10	2	2	17	17
	Tobramycine	TOB	10	2	2	16	16
Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	5	0.25	0.5	17	17
Autres	Triméthoprim -Sulfaméthoxazole	SXT	1.25- 23.75	2	4	14	11

Pseudomonas spp

Antibiotiques		Symbole	Charge du disque (µg)	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètre critiques (mm)	
				S ≤	R >	S ≤	R >
β- lactamines	Ticarcilline	TIC	75	0.001	16	50	18
	Ticarcilline + Acide clavulanique	TCC	75-10	0.001	16	50	18
	Céftazidime	CAZ	10	0.001	8	50	17
	Céfoxitine	FOX	30	0.001	8	50	21
	céfpodoxime	CPD	30	0.001	16	50	18
	Imipénème	IPM	10	0.001	4	50	20
	Méropénème	MEM	10	2	8	20	14
Aminosides	Gentamicine	GN	15	4	4	16	16
	Tobramycine	TOB	10	2	2	18	18
	Kanamycine	K	10	2	2	18	18
Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	5	0.001	0.5	50	26

Acinetobacter spp

Antibiotiques		Symbole	Charge du disque (µg)	Concentrations critiques (mg/l)		Diamètre critiques (mm)	
				S ≤	R >	S ≤	R >
β- lactamines	Ticarcilline	TIC	75	16	64	20	15
	Ticarcilline + Acide clavulanique	TCC	75-10	16	64	20	15
	Céftazidime	CAZ	30	8	16	18	15
	Céfoxitine	FOX	30	8	16	18	15
	Imipénème	IPM	10	2	4	24	21
	Méropénème	MEM	10	2	8	21	15
Aminosides	Gentamicine	GN	10	4	4	17	17
	Tobramycine	TOB	10	4	4	17	17
Fluoroquinolones	Norfloxacin	NOR	5	0.001	0.5	50	26

ملخص

تُعدّ العصيات سالبة الجرام والمتعددة المقاومة في المياه المستعملة المعالجة مصدر قلق متزايد للصحة العامة والبيئة. تهدف هذه الدراسة، التي أُنجزت ما بين شهري مارس وماي 2025 بولاية تلمسان، إلى عزل وتشخيص البكتيريا المقاومة من موقعين: محطة التطهير عين الحوت التابعة للديوان الوطني للتطهير، وحوض التجميع التابع للديوان الوطني للسقي وصرف المياه مثلّت البكتيريا المعوية 58.3% من العزلات، وكانت كليبسيلا الرئوية الأكثر انتشاراً بنسبة 57.1%، تليها الإشيريكية القولونية بنسبة 21.4%. أما العصيات غير المخمرة فشكّلت 41.7% من العزلات، وتصدّرتها الزوائف المضيفة /بوتيدا بنسبة 40%، تليها الزوائف الزنجارية بنسبة 30%. سُجّلت نسب مقاومة مرتفعة تجاه عدة عائلات من المضادات الحيوية، لا سيما البيتا-لاكتام، الكاربابينيمات، الأمينوغليكوزيدات والفلوروكوينولونات. كما تم الكشف عن احتمال وجود إنزيمات الكاربابينيماز والبيتا-لاكتاماز ذات الطيف الموسع لدى بعض العزلات، مما يعكس انتشار آليات مقاومة إنزيمية خطيرة في المياه المعالجة. تؤكد هذه النتائج على الضرورة الملحة لتعزيز مراقبة جودة المياه العادمة المعالجة والمُعاد استخدامها، إلى جانب اعتماد سياسات عقلانية في استخدام المضادات الحيوية، للحد من انتشار المقاومة البكتيرية في الوسط البيئي.

الكلمات المفتاحية: مقاومة، عصيات سالبة الجرام، بكتيريا معوية، مياه مستعملة معالجة، محطة تطهير، تلمسان.

Abstract

The presence of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in treated wastewater represents a growing concern for both public health and the environment. This study, conducted between March and May 2025 in the Tlemcen region, enabled the isolation of 24 bacterial strains from two sampling sites: the Ain El Hout wastewater treatment plant (ONA) and the ONID collection basin. Enterobacteria accounted for 58.3% of the isolates, with *Klebsiella pneumoniae* being the most predominant (57.1%), followed by *Escherichia coli* (21.4%). Non-fermenting bacilli represented 41.7%, mainly *Pseudomonas fluorescens/putida* (40%) and *Pseudomonas aeruginosa* (30%).

High resistance rates were observed against several antibiotic families, notably β -lactams, carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones. The probable presence of carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in some strains highlights the dissemination of concerning enzymatic resistance mechanisms in treated effluents. These findings underscore the urgent need to strengthen surveillance of reused treated water and to promote the rational use of antibiotics to limit the spread of such resistance in the environment.

Key words: resistance, Gram -negative bacilli, Enterobacteria, treated wastewater, wastewater treatment plant, Tlemcen.

Résumé

La présence de bacilles à Gram négatif multirésistants dans les eaux usées traitées constitue un enjeu préoccupant pour la santé publique et l'environnement. Cette étude, réalisée entre mars et mai 2025 dans la wilaya de Tlemcen, a permis l'isolement de 24 souches à partir de deux sites de prélèvement : la station d'épuration d'Aïn El Hout (ONA) et le bassin de récolte de l'ONID. Les entérobactéries représentaient 58,3 % des isolats, dominées par *Klebsiella pneumoniae* (57,1 %) et *Escherichia coli* (21,4 %). Les bacilles non fermentaires constituaient 41,7 %, principalement *Pseudomonas fluorescens/putida* (40 %) et *P. aeruginosa* (30 %).

Des taux élevés de résistance ont été observés envers plusieurs familles d'antibiotiques, notamment les β -lactamines, les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones. La présence probable de carbapénémases et de BLSE chez certaines souches met en évidence la circulation de mécanismes enzymatiques préoccupants dans les effluents traités. Ces résultats soulignent la nécessité de renforcer la surveillance des eaux traitées réutilisées et de promouvoir une gestion raisonnée des antibiotiques afin de limiter la dissémination de telles résistances dans l'environnement.

Mots clés : résistance, Bacilles à Gram négatif, entérobactéries, eaux usées traitées, Station d'épuration, Tlemcen.

