

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة فرحات عباس - سطيف

Université "Ferhat ABBAS" - Sétif

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT D'ÉTAT

EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Option : Microbiologie

Soutenue par :

Salah HABI

le :

THÈME

**Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance
des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la
Région de Sétif**

Devant le jury :

Président :	NANCIB N.	Professeur
Rapporteur :	DABBA H.	Maitre de conférences
Examineurs :	BENALLAOUA S.	Professeur
	MAAMACHE B.	Maitre de conférences

Remerciements

Avant tout je tiens à dédier ce travail à la mémoire du défunt Pr. Ali Chikhi que Allah ai pitié de son âme. Il fut le premier rapporteur de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Hocine Dabba, Maître de Conférences au Département de Biologie de l'Université Ferhat Abbas, d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et pour l'aide qu'il m'a fourni au cours de la rédaction d'un article et de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Pr. Nabil Nancib d'avoir bien voulu juger ce travail, accepter de présider le jury de cette thèse et pour ses aides et encouragements pour finaliser ce travail.

Je remercie vivement le Pr Said Benallaoua de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Béjaia. Je lui exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude pour avoir accepté spontanément de juger ce travail et de participer à ce jury.

Mes vifs remerciements vont également au Dr Bakir Maameche, Maître de conférences à la Faculté d'Agronomie de l'Université de Batna, d'avoir accepté spontanément de juger ce travail et de participer à ce jury. Je lui témoigne toute ma considération et ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Michel Cormier pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique à l'Université Rennes I. J'ai ainsi pu trouver toutes les compétences humaines et matérielles au cours de mes stages de recherche.

J'exprime toute ma gratitude pour le Pr Jacqueline Segalen du Laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Rennes I pour l'aide qu'elle m'a apporté pour l'examen des bactéries par microscopie électronique à Transmission.

Je remercie également le Pr Jean Pierre Anger de la Faculté de pharmacie de Rennes I d'avoir bien voulu m'accepter dans son laboratoire de toxicologie et de m'avoir aidé à doser le plomb dans les échantillons destinés aux essais d'accumulation par absorption atomique.

Je ne saurais oublier dans mes remerciements le Dr Miloud Hafsi pour ses encouragements et pour l'aide et les conseils qu'il m'a prodigué dans les tests statistiques.

Mes plus profonds remerciements vont à ma femme et à ma fille Wissal. Je leur exprime toute mon affection pour leur patience et encouragement qu'elles ont eu à mon égard au cours de la finalisation de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont encouragé, matériellement ou moralement, pour finaliser ce travail et je suis désolé de ne pas mentionner leurs noms car elles sont nombreuses.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1-Sources de pollution du milieu aquatique par les métaux lourds	5
1-1-Définition des métaux lourds	5
1-2-Origines des pollutions	5
1-2-1-Plomb	5
1-2-2-Mercure	6
1-2-3-Cadmium	7
2-Les entérobactéries	7
2-1-Caractéristiques	8
2-2-Classification	8
2-3-Habitat et pouvoir pathogène	9
3-La résistance des bactéries aux métaux lourds	9
3-1-Notion de toxicité, résistance et tolérance.	9
3-2-Sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds	10
3-3-Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la toxicité des métaux lourds	12
3-3-1-Facteurs biotiques	12
3-3-1-1-Présence d'autres bactéries	12
3-3-1-2-Facteurs abiotiques	12
3-3-1-2-1-Fixation aux composés environnementaux	12
3-3-1-2-2-Matière organique	13
3-3-1-2-3-Les argiles	13
3-3-1-2-4-pH	14
3-3-1-2-5-Température	14
3-3-1-2-6-NaCl	15
3-3-1-2-7-Facteurs intrinsèques des métaux	15
3-3-1-2-8-Les espèces microbiennes	16
3-3-1-2-9-Cations et anions.	16
3-4-Mécanismes de résistance aux métaux lourds	17
4-La résistance des entérobactéries aux antibiotiques	19
4-1-Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries d'origine aquatique	19
4-1-1-Origine et support génétique de la résistance aux antibiotiques	19

4-2-Fréquence de la résistance aux antibiotiques au niveau de l'environnement aquatique	22
4-3-Relation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds.	23
5-Croissance bactérienne et toxicité des métaux lourds : importance des facteurs physico-chimiques (pH, température, salinité)	24
5.1-Température	24
5-2-pH	26
5-3-NaCl	27
5-4-Nutriments	27
6-Survie des bactéries en milieu aquatique	28
7-Halotolérance des entérobactéries	33
 MATERIEL ET METHODES	 34
1- Sites d'échantillonnage et technique de prélèvement	34
2- Isolement et identification des souches	37
3- Détermination de la résistance aux métaux lourds	37
4- Détermination de la résistance aux antibiotiques	38
5- Extraction et électrophorèse des plasmides	39
5-1-Première phase	39
5-2-Deuxième phase	40
5-3-Electrophorèse	41
6- Survie	41
7- Etude de l'halotolérance (détermination de la CMI)	42
7-1-Préparation du milieu M63	42
7-2-Préparation de l'inoculum	42
7-3-Ensemencement, incubation, et lecture	43
8-Etude de la croissance de <i>E. coli</i> résistante et sensible au Pb (NO ₃) ₂	
influence des facteurs abiotiques	43
8-1-Souches utilisées	43
8-2-Milieu utilisé	43
8-3-Préparation des solutions de nitrate de plomb	44
8-4-Préparation de l'inoculum	44
8-5-Préparation des milieux	44
8-6-Inoculation des tubes et évaluation de la croissance	45
9- Etude de l'accumulation du Plomb	45
9-1-Préparation des échantillons	46

9-2-Préparation de l'inoculum	46
9-3- Minéralisation et analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique	46
10- Microscopie électronique à transmission (M.E.T.)	47
10-1-1 ^{ère} fixation et lavage	47
10-2-2 ^{ème} fixation et lavage	47
10-4-Déshydratation, imprégnation et inclusion	48
10-7-Coupes et Contraste	48
RESULTATS	49
1-Identification	49
2- Résistance aux métaux lourds	49
2-1-Seuil de tolérance aux métaux	49
2-2-Profil de résistance aux métaux (phénotypes de résistance)	49
2-3- Mono-résistance, multiple-résistance et résistance cumulée aux métaux lourds	50
3- Résistance aux antibiotiques	54
4-Analyse du profil plasmidique	58
4-1-Distribution des plasmides	58
4-2-Corrélation entre la résistance aux métaux et la présence des plasmides	58
5-Etude de la survie de deux souches d' <i>E. coli</i> (sensible et résistance au Pb(NO ₃) ₂)	63
6-Seuil d'halotolérance	66
7- Etude de la croissance	68
8-Accumulation du plomb	73
DISCUSSION	79
CONCLUSION	89
REFERENCES	91
ANNEXES	102

FIGURES

Figure 1 : Localisation des stations de prélèvement	36
Figure 2. Distribution des CMI du mercure, du cadmium, et du plomb chez 373 souches d'entérobactéries	51
Figure3. Profil plasmidique des différentes souches <i>E. coli</i> traitées par le marqueur de taille 1	59
Figure 4. Profil plasmidique des différentes souches <i>E. coli</i> traitées par le marqueur de taille 1	60
Figure 5. Profil plasmidique des différentes souches <i>E. coli</i> traitées par le marqueur de taille 1	60
Figure 6. Profil plasmidique des différentes souches <i>E. coli</i> traitées par le marqueur de taille 2	61
Figure7. Profil plasmidique des différentes souches <i>E. coli</i> traitées par le marqueur de taille 2	61
Figure 8. Evolution du nombre de germes survivants chez <i>E. coli</i> Pb ^R	64
Figure 9. Evolution du nombre de germes survivants chez <i>E. coli</i> Pb ^S	64
Figure 10. Constante d'élimination (K) moyenne de <i>E. coli</i> Pb ^S et <i>E. coli</i> Pb ^R	65
Figure 11. Distribution des seuils d'halotolérance des souches de <i>E. coli</i> au niveau des différentes stations	67
Figure 12. Seuil d'halotolérance moyen des souches d' <i>E. coli</i> au niveau des différentes stations	67
Figure 13. Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^R en fonction de la salinité	69
Figure 14. Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^R en fonction du pH	71
Figure 15 : Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^R en fonction de la température	71
Figure 16. Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^S en fonction de la salinité	72
Figure 17. Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^S en fonction du pH.	75
Figure 18. Effet de la concentration en Pb(NO ₃) ₂ sur la croissance de <i>E. coli</i> Pb ^S en fonction de la température	75
Figure 19. Accumulation du plomb chez <i>E. coli</i> Pb ^R et <i>E. coli</i> Pb ^S	76

Figure 20a : Micrographie (x 27000) au MET de cellules <i>E. coli</i> Pb ^S incubée en présence de 10 mg/l de Pb(NO ₃) ₂ , non colorées	77
Figure 20 b : Histogramme de distribution des pixels chez <i>E. coli</i> Pb ^S	77
Figure 21a : Micrographie (x 10000) au MET de la souche <i>E. coli</i> Pb ^R incubée en présence de 10 mg/l de Pb(NO ₃) ₂ , colorée à l'acétate d'uranyle	78
Figure 21b :Histogramme de distribution des pixels chez <i>E. coli</i> Pb ^R	78

TABLEAUX

Tableau 1. Distribution des espèces d'entérobactéries isolées des différentes stations	51
Tableau 2. Distribution des phénotypes de résistance aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries	52
Table 3. Fréquence de la mono-résistance et de la multi-résistance aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries	53
Table 4. Fréquence de la résistance cumulée aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries	53
Tableau 5. Incidence de la résistance aux antibiotiques pour les souches d'entérobactéries	56
Table 6. Coefficients de corrélation de Sperman entre les scores et les variables sur les axes des composantes principales 1 et 2	56
Table 7. Différences établies entre les scores des composantes principales 1 et 2 par rapport aux caractéristiques des stations et suivant les tests statistiques utilisés	57
Tableau 8. Fréquence de la distribution des plasmides pour les souches d' <i>E. coli</i> isolées des différentes stations	59
Table 9. Corrélation métaux lourds et plasmides	62
Tableau 10 : Constantes d'élimination (K) et T_{90} des souches <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> Pb ^S . <i>E. coli</i> Pb ^R)	65
Tableau 11 : Teneurs en plomb accumulées par <i>E. coli</i> Pb ^R et <i>E. coli</i> Pb ^S	76

PRINCIPALES ABBRÉVIATIONS UTILISÉES

ppm :	partie par million
YED :	yeast extact dextrose
IC :	concentration inhibitrice
VNC :	viable mais non cultivable
UFC :	unité formant colonie
ATCC :	Ameican Type Culture Collection
BHI :	brain heart infusion
SDS :	Sodium Dodecyl Sulphate
rpm :	revolutions per minute
TS :	bouillon trypticase soja
M.E.T :	Microscopie électronique à transmission
DMP :	dimethyl amino methyl phenols
ACP	analyse des composantes principales
EC50	mediane effective concentration

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Actuellement, le développement durable prend de plus en plus de place dans les politiques de développement à l'échelle mondiale. Par conséquent, il est hautement incompatible avec un environnement pollué par des composés toxiques comme les métaux lourds

Les métaux lourds, composés stables et hautement persistants, sont des contaminants de l'environnement; qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (DeForest et al., 2007, Croteau *et al.*, 2005).

Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration (Mills and Colwell, 1977) et les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (Giller *et al.*, 1998). Ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (Morozzi *et al.*, 1982), l'inhibition des activités enzymatiques (Nweke *et al.*, 2007), l'altération de la structure de l'ADN (Bruins *et al.*, 2000; Rathnayake *et al.*, 2009), la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes (Kozdrój and van Elsas, 2001; Satchanska *et al.*, 2005), et la réduction de la diversité microbienne (Sandaa *et al.*, 1999). Du fait que les bactéries jouent un rôle clé dans l'environnement, les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes et par conséquent leur pérennité

Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (Silver, 1996). Ces plasmides qui codent pour la résistance aux antibiotiques peuvent aussi véhiculer des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (Karbasizaed *et al.*, 2003). Ces caractères de résistance sont généralement associés à des plasmides transmissibles (Karbasizaed *et al.*,

2003; Ünalı Coral *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2000), donc leur dissémination nécessite une surveillance. La dissémination de la résistance aux métaux lourds représente un avantage écologique pour les bactéries spécialement dans les environnements pollués par les métaux lourds. Par contre, la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques, directement à travers l'usage des antibiotiques ou indirectement via la sélection par la pollution métallique, présente un risque potentiel pour la santé publique en raison des échecs thérapeutiques.

L'impact des fluides de dilution (eau douce ou eau usée urbaine) sur la pollution métallique a été très peu exploré. A Sétif, l'usine de fabrication des batteries rejette dans les eaux usées des effluents résultants d'un procédé de traitement par la chaux. Aucune information sur le risque environnemental de ces rejets n'existe actuellement. Aussi l'influence du niveau ou du degré de pollution fécale ou de l'origine de l'eau (douce ou usée) sur la résistance bactérienne aux métaux lourds et aux antibiotiques a été très peu étudiée.

L'idée que les bactéries porteuses de plasmides survivent mieux que les bactéries démunies a été acceptée et étudiée par certains auteurs (Barcina *et al.*, 1997, Arana *et al.*, 1997) en raison des multiples propriétés véhiculées par ces éléments génétiques (Grinsted and Bennett, 1988; Elmerich, 1990; Foster, 1983) dont l'avantage écologique qu'elles peuvent conférer aux bactéries dépend de la nature du milieu. De même le largage de bactéries génétiquement modifiées et la possibilité de leur survie ou du transfert de leur caractères de résistance dans l'environnement extérieur a inquiété la communauté scientifique, à cause des risques écologiques et sanitaires, et a enclenchée la recherche expérimentale sur ces sujets (Endo *et al.*, 2002, Alvarez *et al.*, 1996). La présence métaux lourds dans le milieu aquatique est fréquemment rapportée dans la littérature scientifique, et il est surprenant qu'aucune étude comparée de la survie, *in situ* ou *in vitro*, de bactéries

sensibles ou résistantes aux métaux lourds n'a pas reçu l'importance qu'elle mérite.

Pour déterminer des concentrations minimales inhibitrices (CMI), étudier la toxicité, ou mesurer l'accumulation des métaux lourds chez les bactéries, il est pratiquement impossible d'échapper aux problèmes de complexation (ou de chélation) et de précipitation provoqués par l'interaction entre les composants organiques ou minéraux des milieux de cultures et les métaux lourds. Les chercheurs, chacun à sa manière, ont recours à des artifices divers qui consistent à tamponner les milieux, à diminuer le pH du milieu, à réduire la concentration des composés organiques du milieu ou à éliminer certains composants, et à la mise au point de milieux adaptés ou de méthodes diverses basées sur la mesure de l'activité respiratoire, l'observation au microscopique à épifluorescence, la bioluminescence, ou la mesure de la consommation de substrats marqués, etc...(Rathnayake *et al.*, 2009; Poirier *et al.*, 2008; Petala *et al.*, 2005; Konopka and Zakhorova, 1999; Roane, 1999; Díaz-Raviña *et al.*, 1994; Jeanthon and Prieur, 1990; Podbielski *et al.*, 1989; Aickin and Dean, 1979; Zelibor *et al.*, 1987a). Aucune étude comparative approfondie de la croissance de souches sensibles et résistantes au plomb n'a été testée sur le ou les milieux formulés en présence et en absence de concentrations sub-inhibitrices et inhibitrices de plomb.

Cette étude a plusieurs objectifs

- i) Détermination des concentrations critiques de certains métaux lourds permettant de différencier entre bactéries sensibles et résistantes;
- ii) Comparaison de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds des bactéries isolées des eaux usées, et des eaux douces soumises à une pollution métallique et/ou fécale ;
- iii) Détermination de la distribution des plasmides dans différents oueds, dans les eaux usées urbaines et de la relation entre la résistance aux métaux lourds et les plasmides;

- iv) Evaluer *in vitro* la survie de deux souches d'*E. coli* sensible et résistance au plomb dans l'eau autoclavée du barrage Ain Zadda ;
- v) Comparer la croissance de deux souches d'*E. coli* sensible et résistance au plomb, en milieu riche, en absence et en présence de concentrations sub-inhibitrice et inhibitrice de plomb et de déterminer les facteurs qui modulent cette croissance ;
- vi) Evaluer l'accumulation du plomb chez les deux souches dans différents échantillons d'incubation ;
- vii) Comparer le seuil de tolérance au NaCl des souches d'*E. coli* isolées des différentes stations.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1-Sources de pollution du milieu aquatique par les métaux lourds

1-1-Définition des métaux lourds

Les éléments de la table périodique peuvent être classés, en fonction de certaines caractéristiques physiques et chimiques, en métaux et non métaux, à l'exception d'un petit nombre qualifié de métalloïdes. Le terme métaux lourds est un mot ambigu et dont la définition varie d'une source à l'autre. Jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale. mais selon Nies (1999) et Gadd (1992), les métaux lourds regroupent les 53 métaux dont la densité est supérieure à 4-5 g/cm³. En fait, dans la plupart des cas beaucoup d'auteurs utilisent ce terme, à tort et à travers, pour caractériser les éléments toxiques. Ces éléments peuvent être classés en différents groupes sur la base de leurs caractéristiques (fonctions, propriétés électrochimiques).

1-2-Origines des pollutions

La pollution métallique en milieu aquatique peut résulter de processus dits naturels (érosion et volcans) ou provenir des différentes activités anthropogènes. Nous nous limitons à décrire seulement les sources liées au plomb, au mercure et au cadmium.

1-2-1-Plomb

Le plomb se trouve naturellement à l'état de trace: La concentration moyenne dans la croûte terrestre est approximativement de 20 ppm. L'érosion et les émissions volcaniques comptent pour la plupart des processus naturels mobilisateurs de Pb, mais les activités humaines sont de loin beaucoup plus significatives dans la mobilisation de Pb que les processus naturels (Wright and Welbourn, 2002).

L'histoire de l'utilisation humaine du plomb remonte à 4000 ans. Les records d'utilisation

de ce métal doux et facilement malléable remontent à l'époque des Egyptiens et des Babyloniens. Les premiers usages incluent la construction et l'utilisation des tuyaux pour la collecte, le transport et la distribution de l'eau. À travers le Moyen-âge et au-delà, le plomb est utilisé pour couvrir les matériaux. L'usage le plus marqué de ce produit est l'emploi du tétraéthyl de plomb, comme anti-détonnant, dans les carburants. D'autres usages du plomb incluent : acétate de plomb (édulcorant), sels de plomb (pigments), soudure (conserves), batteries, bouclier pour la protection contre la radioactivité, et l'arséniate de plomb (insecticide). Le plomb est également utilisé dans les industries de la céramique et du cristal (aspect vitreux). Le plomb est actuellement le 5^{ème} métal le plus communément utilisé dans le monde (Wixson and Davies, 1993 ; Wright and Welbourn, 2002, Shotyk and Roux. 2005).

1-2-2-Mercure

L'abondance de mercure dans la croûte terrestre atteint 0,08 ppm. Sa concentration dans les sols non contaminés se situe à 0.007 ppm et dans les eaux douces peut varier de 0,01 à 10 ppm, bien que des concentrations aussi élevées que 1600 ppm ont été mesurées dans des eaux au contact avec les dépôts du cuivre dans l'Oural du sud (Ehrlich, 2001). Dans la nature, le mercure peut exister comme métal ou incorporé à des composés inorganiques et organiques. Le métal est liquide à température ambiante et a une pression de vapeur significative ($1,2 \cdot 10^{-3}$ mm Hg à 20 °C) et une chaleur de vaporisation de 14,7 cal. mol⁻¹ à 25 °C.

Le minéral le plus abondant à base de mercure est le cinabre (HgS) (Ehrlich, 2001). Le mercure présent dans l'environnement résulte de processus naturels (émissions volcaniques). Les usages du mercure sont multiples et contribuent pour une grande part à

la pollution de l'environnement. Il est employé comme électrode dans la préparation de la soude. Il est aussi utilisé comme catalyseur dans l'industrie chimique. Le mercure est également employé en cosmétique, en pharmacie (mercurochrome, mercyl, etc.), dans les peintures antifongiques destinées au traitement des bois de construction (revêtements, charpentes, etc...). Les fongicides organomercuriels utilisés pour le contrôle des moisissures et divers agents phytopathogènes sont aussi une source importante de contamination de l'environnement. La combustion des énergies fossiles représente une source majeure de contamination de la biosphère (Ehrlich, 2001, Wright and Welbourn, 2002).

1-2-3-Cadmium

Le cadmium, un métal à l'état de trace et relativement rare, a pris de l'importance comme contaminant de l'environnement seulement au cours des 60 dernières années voire plus. C'est un sous-produit commun de l'exploitation minière et des opérations de fusion du zinc, et d'autres métaux non ferreux. Les usages du cadmium se situent principalement en électricité (accumulateurs NiCd), en électronique (photopiles), et en métallurgie (traitement des surfaces par cadmiage électrolytique et galvanoplastie). Aussi, l'industrie des matières plastiques emploie, toute proportion gardée, des quantités relativement importantes de cadmium comme pigment. Le stéarate de cadmium est employé comme agent stabilisateur de certains polymères. Les énergies fossiles et leurs dérivés, comme pour le mercure et le plomb, l'incinération des déchets, et la fabrication de l'acier constituent des sources non négligeables de la pollution de l'environnement (Wright and Welbourn, 2002).

2-Les entérobactéries

2-1-Caractéristiques

La famille des entérobactéries regroupe l'ensemble des bacilles droits, ayant un diamètre de 0,3-1,8 µm. Les cellules prennent une coloration à Gram négatif étant mobiles (flagelles péritriches) ou immobiles. Ce sont des germes anaérobies facultatifs et chimioorganotrophes ayant un métabolisme simultanément de type fermentatif et respiratoire. De type oxydase négative et catalase positive, la plupart réduisent les nitrates, excepté certains genres ou espèces.

2-2-Classification

La définition de la famille est circonscrite biochimiquement et génétiquement à un large groupe apparenté qui présente une hétérogénéité substantielle du point de vue écologique, éventail d'hôtes, et du pouvoir pathogène pour l'homme, les animaux, les insectes et les plantes. La position phylogénétique des entérobactéries se trouve parmi les *Gammaproteobacteria*. Leurs proches voisins sont les familles *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*, et *Pasteurellaceae*. Les relations phylogénétiques entre genres au sein de la famille *Enterobacteriaceae* sont basées sur l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et ces séquences permettent de placer la famille des *Enterobacteriaceae* dans le Domaine ou Empire: *Bacteria* ou *Eubacteria*, Phylum ou Division: *Proteobacteria*, Classe: *Gammaproteobacteria*, Ordre: *Enterobacteriales*.

La nouvelle édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2^{ème} ed.) comparée à la 1^{ère} édition du Manual of Systematic Bacteriology et de la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Determinative of Bacteriology, contient des changements au niveau de la nomenclature avec apparition de nouveaux genres et de nouvelles espèces (Dworkin *et al.* 2006; Brenner *et al.*, 2005).

2-3-Habitat et pouvoir pathogène

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires avec un habitat très large : eau douce, sol, végétaux, animaux (insectes jusqu'à l'homme) et peuvent contaminer des denrées alimentaires. Certaines espèces sont responsables de diarrhées et/ou d'infections opportunistes (infections urinaires, infections respiratoires, surinfections des plaies, septicémies, méningites.). Chez l'homme, les entérobactéries, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. et *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, sont responsables d'environ 50 % des infections nosocomiales (Logan, 1994; Dworkin *et al.*, 2006, Brenner *et al.*, 2005)

3-La résistance des bactéries aux métaux lourds

3-1-Notion de toxicité, résistance et tolérance.

Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui-même et sur sa progéniture (Sasseville, 1980).

Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations en métaux lourds, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance. Il est très difficile de distinguer une différence entre les deux termes. Cependant, le Conseil de la Recherche National de Canada définit globalement résistance et tolérance comme " la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment" (Wright and Welbourn., 2002).

Pratiquement ou techniquement, la résistance, la sensibilité et/ou la tolérance à un composé inhibiteur ou toxique donné, chez une population bactérienne, peuvent être visualisés en traçant la courbe de distribution d'une population de souches bactériennes (%) en fonction des concentrations minimales inhibitrices (CMI) aux métaux lourds correspondantes. La forme de cette courbe renseigne si cette population présente ou non une communauté tolérante. Si la courbe est de type modale, la population présente trois communautés (sensible, tolérante, résistance). Par contre, si elle est de type bimodale, cette population ne présente que deux communautés (sensible, et résistante).

3-2-Sensibilité des entérobactéries aux métaux lourds

Depuis l'apparition des cas d'intoxication par le mercure de la baie Minamata et de la maladie Itai-Itai pour le cadmium, la sensibilité des bactéries aux métaux lourds est suivie régulièrement. Celle-ci varie, globalement, en fonction des sels de métaux lourds, des milieux de culture, des méthodes utilisées et du lieu d'isolement des souches bactériennes. Comme il n'existe pas de valeur stricte qui permet de différencier une souche résistante d'une souche sensible à un métal donné, Brocklehurst *et al.* (2000) ont étudié le profil de transcription du génome chez *E. coli* préalablement adaptée à des concentrations élevées de métaux lourds. En le comparant à celui de la souche sauvage, ces auteurs remarquèrent d'une part une augmentation du degré de transcription de certains gènes associés fonctionnellement aux métaux lourds (Ni^{2+} export, chélate-Fe export, biotine sulfoxyde réductase). D'autre part, une diminution de gènes (stimulateur de translation, putative pseudouridylate synthase) impliqués potentiellement dans la translation de gènes codant pour la tryptophanase et l'aspartase, ainsi que des gènes qui codent pour les porines de la membrane externe.

Des souches bactériennes d'origine bovine ont présenté une CMI $\geq 0,1$ mM pour le mercure, et toutes les souches ont résisté à 1 mM de nitrate de plomb et de chlorure de cadmium mais sont restées sensibles à 10 mM (Harnett and Gyles, 1984). Kanwal *et al.* (2004) ont testé la résistance de souches d'*E. coli* et de *Bacillus* au plomb et à d'autres métaux. Ces auteurs ont remarqué que les souches d'*E. coli* étaient capables de croître à des concentrations de Plomb atteignant 8 ppm.

Des souches d'entérobactéries nosocomiales et de fèces humains ont produit des CMI de 200, 3200, et 54,3 $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour le cadmium, le plomb et le mercure (Karbasizaed *et al.* 2003). La résistance aux métaux lourds de *E. coli* K12 et d'autres espèces d'entérobactéries évaluée en milieu liquide a révélée des CMI de 0,2 et 0,4-0,5 mM respectivement au cadmium et au mercure (Hassen *et al.* 1998). Podbielski *et al.* (1989) testèrent la résistance au plomb, au cadmium, au mercure et à d'autres métaux lourds de 9 souches de *Klebsiella pneumoniae* par micro-dilution en utilisant nouveau milieu; ces auteurs observèrent des valeurs de CMI de 1280, 40, et 40-80 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Calomiris *et al.* (1984) ont pu établir des CMI au plomb, au cadmium et à d'autres métaux qui permettent de différencier les bactéries tolérantes des bactéries non tolérantes à ces métaux. Ces CMI ont été de l'ordre de 200 $\mu\text{g/ml}$ pour le cadmium et 3200 $\mu\text{g/ml}$ pour le plomb.

Piotrowska-Segeta *et al.* (2005) ont isolés, à partir de sols pollués par des métaux lourds, deux souches d'entérobactéries, *Serratia fonticola* et *Providencia stuartii*. Ces souches présentèrent des CMI au cadmium et au plomb respectivement de 0,1-0,3 et 0,3-0,4mM. Alors que Attrassi *et al.* (1992) remarquèrent que les souches *Salmonella paratyphi* et *Aeromonas* M1/11 isolées à partir de moules provenant du littoral marocain

montrèrent des CMI de 400 et 100 ppm respectivement au cadmium et au mercure.

3-3-Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la toxicité des métaux lourds

La toxicité des métaux lourds n'est pas un processus absolu mais dépend de plusieurs paramètres et phénomènes. Il est bien admis actuellement que la toxicité des métaux est fortement influencée par la présence d'ions à l'état libre. En effet, les cations métalliques ont une grande affinité en se fixant aux groupements électronégatifs des composés cellulaires (S^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- , COO^-).

3-3-1-Facteurs biotiques

3-3-1-1-Présence d'autres bactéries

En s'intéressant à la décontamination des sols industriels, militaires et miniers pollués par des métaux lourds, Stephen *et al.* (1999) ont étudié la supplémentation des sols par un mélange de métaux à l'état de chlorures (Cd, Co, Cs, Sr) et son influence sur la structure et la taille des bactéries oxydant les ions ammoniums (sous-groupe β des protéobactéries) en présence et en absence d'inoculation par des bactéries hétérotrophes résistants aux métaux. Les résultats montrent un changement de la structure de la population de bactéries oxydant les ions ammonium en présence des métaux. L'ajout d'un inoculum de bactéries résistantes aux métaux abolit ce changement de structure de la population.

3-3-1-2-Facteurs abiotiques

3-3-1-2-1-Fixation aux composés environnementaux

L'un des plus importants facteurs qui détermine la biodisponibilité des métaux lourds dans un système donné est leur fixation aux constituants environnementaux. Si un

métal est partiellement ou complètement retenu par chélation, il s'ensuit une diminution ou une élimination complète des effets toxiques. Par ailleurs, ces constituants environnementaux agissent soit comme agents protecteurs soit comme éléments nutritifs. La chélation, la complexation ou la fixation des métaux lourds à certaines substances ou matériaux réduisent grandement la disponibilité des métaux lourds et donc leur toxicité vis-à-vis des microorganismes.

3-3-1-2-2-Matière organique

L'effet du mercure sur la respiration de *Pseudomonas fluorescens* a été évalué par Farrell *et al.* (1993) dans un milieu synthétique supplémenté par du glycérol (0,1%) et différents hydrolysats de protéines. L'évaluation de la toxicité du mercure à travers IC₅₀ (concentration inhibant 50%) a montré que celle-ci décroît dans les différents milieux selon l'ordre suivant : hydrolysate de caséine >> peptone > extrait de viande >> tryptone > soytone >>> extrait de levure.

Une concentration élevée en carbone dans un milieu nutritif accroît fortement la toxicité des métaux lourds (Brynhildsen *et al.* 1988). Hallas *et al.* (1982) ont étudié l'effet des agents gélifiants et de certains agents chélateurs (cystéine, sérine, 3- hydroxyflavone, acides humiques, gélatine) sur la toxicité de l'étain chez les microorganismes. Les résultats de cette étude ont révélé que la toxicité de L'étain (Sn) est plus prononcée en présence de sérine, du 3-hydroxyflavone et de l'agar purifié ou non. La cystéine n'a aucun effet, alors que les acides humiques et la gélatine réduisent cette toxicité.

3-3-1-2-3-Les argiles

La présence de particules argileuses dans l'environnement aquatique procure aux microorganismes un pouvoir protecteur à l'égard des métaux lourds du fait de leur capacité d'échange ionique (C.E.I.). En étudiant l'effet du cadmium sur la croissance des champignons dans un sol additionné de kaolinite ou de montmorillonite, Bachich and Stotzsky (1977b) ont remarqué que la montmorillonite réduit efficacement la toxicité du cadmium vis-à-vis des champignons.

3-3-1-2-4-pH

L'effet du pH sur la sensibilité au Cd de plusieurs bactéries, des actinomycètes et des champignons a été étudié par Bachich and Stotzsky (1977a). Ils remarquèrent que la toxicité du Cd décroît à pH alcalin pour la plupart des microorganismes testés. De même, Bachich et Stotzsky (1979) évaluèrent la toxicité du Pb chez les champignons et observèrent que cette toxicité diminue quand le pH augmente de 5 à 9 et que la faible toxicité à pH alcalin est plutôt liée à la formation de $PbOH^+$ qui est moins toxique que la forme libre Pb^{2+} . Par contre, en testant la résistance de *Vibrio parahaemolyticus* au cadmium, Clement *et al* (1989) ont noté que la résistance de cette souche augmente avec l'acidification du milieu. Ainsi la CMI est passée de 40 mg/l à pH 8,5 à 340 mg/l à pH 6,5.

3-3-1-2-5-Température

La température régit tous les processus biologiques (croissance, activité enzymatique, etc...). L'augmentation de la température, que ce soit du point de vue chimique ou physiologique, a pour effet d'intensifier l'action des substances toxiques, en facilitant le contact entre les microorganismes et les substances toxiques d'une part, et d'autre part en stimulant l'activité métabolique. Les microorganismes vont absorber ainsi, dans l'unité de temps, une plus forte quantité de substance toxique.

Une résistance marquée au Hg et au Cd a été observée à 37°C chez des souches de *Staphylococcus* porteuses de plasmide pénicillinase, comparée aux souches de *Staphylococcus* non porteuses de plasmide. Cependant à 4 °C, une sensibilité à ces métaux est constatée chez les souches porteuses ou non de plasmide (Kondo *et al.* 1974). Selon Clement *et al.* (1989), la résistance décroît quand la température augmente de 27°C à 37°C. Boivin *et al.* (1985) ont étudié l'influence de la température sur la tolérance au cuivre chez les communautés de microorganismes d'un biofilm exposé à 3 µM de ou non en utilisant la méthode des substrats organiques consommés (Biolog). Chez le biofilm témoin, non exposé (0 µM Cu²⁺), la concentration médiane des substrats consommés exprimée en mg/l (EC₅₀) est de 1,1 mg/l. L'exposition du biofilm à 3 µM de Cu²⁺ et incubé à 10 ou à 14 °C, accroît le EC₅₀ (3,7-3,0 mg/l) d'un facteur 3. Par contre le même biofilm exposé à la même dose de Cu²⁺, mais incubé à 20°C relève le EC₅₀ (6,4 mg/l) d'un facteur 6.

3-3-1-2-6-NaCl

L'effet de salinité sur la résistance au cadmium chez *Vibrio parahaemolyticus* a été testé par Clement *et al.* (1989). Les résultats ont montré que la résistance augmente avec la salinité du milieu, passant d'une CMI de 50 mg Cd/l à 5 g NaCl/l à une CMI de l'ordre de 140 mg Cd/l pour les autres salinités étudiées (30-75 g NaCl/l). Onishi *et al.*, 1984 ont observé pour une souche de *Pseudomonas* sp halophile modérée, une réduction de la toxicité au cadmium quand la concentration en NaCl augmente de 1 à 3 M. L'effet de la salinité sur la toxicité du zinc chez *Aspergillus niger* et *Escherichia coli* a révélée que celle-ci augmente fortement avec la concentration en NaCl (Babich and Stotzsky, 1978)

3-3-1-2-7-Facteurs intrinsèques des métaux

L'activité des métaux lourds dans l'environnement et leur impact sur les

microorganismes dépend de l'état d'oxydation du métal, de sa solubilité et du caractère de son sel (organique ou inorganique). La nature des populations microbiennes varie en fonction des métaux et suivant leur concentration. Farrell *et al*, (1993) ont étudié l'effet des formes chimiques dans le milieu de culture sur la toxicité du mercure. Ces auteurs ont noté que les IC₅₀s sont liées aux espèces chimiques du mercure Hg(II) et qu'une corrélation négative significative a été observée entre le IC₅₀ et la fraction molaire du Hg(II) liée dans les complexes Hg-chlorures.

3-3-1-2-8-Les espèces microbiennes

La résistance aux métaux lourds dans un environnement donné dépend aussi bien des types microbiens, des genres et des espèces testées. Bachich and Stotzsky (1977a) remarquèrent, en général, que les actinomycètes sont plus tolérantes au cadmium que les eubactéries, les eubactéries à Gram négatif sont elles mêmes plus tolérantes que les eubactéries à Gram positif. De même, la résistance au cadmium chez les actinomycètes, les bactéries à Gram positif et à Gram négatif varie en fonction des genres et des espèces. Par ailleurs, certaines communautés bactériennes tolèrent plus que d'autres les environnements contaminés par les métaux lourds. Ainsi les bactéries à Gram négatif sont plus répandues que les bactéries à Gram positif dans les sols contaminés par les métaux lourds (Pennanen *et al.*, 1996).

3-3-1-2-9-Cations et anions.

L'action des cations ou des anions sur la toxicité des métaux lourds est liée respectivement au phénomène de compétition pour les sites cellulaires spécifiques et à la formation de complexes de coordination.

L'influence des ligands inorganiques sur la toxicité de l'étain chez les microorganismes a été entreprise par Hallas *et al.* (1982). Cette étude a montré que la substitution du MgSO_4 par MgNO_3 , à double ou à quintuple concentration, dans le milieu n'affecte pas la toxicité de l'étain (Tin). Par contre, le remplacement du NaCl et du KCl par le NaNO_3 et le KNO_3 respectivement entraîne un triplement du nombre de germes en présence de l'étain. Ceci indique que le NO_3^- ou le complexe Sn-NO_3 , individuellement ou ensemble inhibent la toxicité de l'étain.

La toxicité de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Pb remarquée chez *Fusarium solani* et *Aspergillus giganteus* cultivés sur gélose Sabouraud glucosée peut être réduite par l'incorporation de 10^{-3} M d'ions PO_4^{3-} ou CO_3^{2-} . L'addition de ces ions provoque probablement la précipitation du plomb sous forme de composés moins solubles ($\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$ ou PbCO_3) donc moins toxiques (Bachich and Stotzsky, 1979).

3-4-Mécanismes de résistance aux métaux lourds

La résistance bactérienne aux ions métalliques est apparue probablement tôt dans l'évolution due à la dispersion des métaux par un événement géologique. Deux mots sont communément utilisés pour décrire la direction de transport d'un ion par une cellule: absorption et efflux. L'absorption signifie que les ions toxiques entrent dans la cellule alors que l'efflux décrit l'expulsion de ces ions par la cellule.

La résistance à un métal donné peut être inductible ou constitutive. Beaucoup d'auteurs ont trouvé deux types de système d'absorption pour les ions métalliques dont l'expression est inductible ou constitutive. L'un est rapide, non spécifique et généralement conduit par le gradient chimiosmotique (gradient du potentiel membranaire, habituellement 200 mV) à travers la membrane cytoplasmique des bactéries (constitutif), alors que l'autre

est plus lent et a une haute spécificité du substrat. Ce dernier utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, ce qui revient plus coûteux à la cellule en cas de besoin ou de privation de nourriture (inductible).

Hobman *et al.*, (2007) et Bruins *et al.*, (2000) distinguent 4 mécanismes de résistance bactérienne aux métaux :

1-Exclusion du métal par la barrière de la perméabilité ou maintient de l'ion toxique hors de la cellule (réduction de l'absorption);

2-Pompage par efflux très spécifique (élimination des ions toxiques qui sont entrés dans cellule au moyen de systèmes impliqués dans le transport de cations ou de anions). Les pompes efflux peuvent être des ATPases ou des canaux chimiosmotiques. Les ATPases sont des enzymes qui utilisent l'énergie chimique de scission de la liaison haute énergie phospho-ester de l'ATP, conduisant à la formation d'un gradient de concentration;

3-Séquestration intracellulaire ou extracellulaire par des composants fixateurs d'ions métalliques spécifiques (par exemple: métallothionéine) et/ou ségrégation en composés complexes;

4-Détoxification enzymatique (oxydoréduction) qui convertit un ion très toxique en un ion moins toxique.

Les deux premiers mécanismes peuvent être groupés sous le terme éloignement (maintenir à distance) alors que les deux derniers sont connus comme des mécanismes de séquestration. Les pressions sélectives exercées par les environnements chargés de métaux ont entraîné le développement de systèmes de résistance pour la plupart des métaux. Ces systèmes sont surtout de type plasmidique, très spécifiques et sont présents virtuellement chez tous les groupes d'eubactéries.

Les modifications dans la paroi cellulaire, la membrane, ou l'enveloppe d'un micro-

organisme sont des exemples d'exclusion du métal par la barrière de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux, Un exemple frappant est l'exclusion de Cu^{2+} résultant de l'altération de la production de la protéine porine au niveau du canal membranaire chez *E. coli* (Rouch *et al.*, 1995).

4-La résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Les entérobactéries sont impliquées dans les infections nosocomiales et les infections transmises par voie alimentaire incluant certaines bactéries pathogènes parmi les plus mortelles. En conséquence, leur résistance aux antibiotiques a des implications cliniques profondes. La prolifération de la résistance aux antibiotiques chez les souches bactériennes est une conséquence directe de l'usage des antibiotiques chez les êtres humains et les animaux, que cet usage soit approprié ou inapproprié (prophylactique). La surveillance et le suivi régulier de la résistance bactérienne au niveau de l'environnement, chez la population humaine et en milieu hospitalier permet aux cliniciens d'adapter les traitements par les antibiotiques en fonction des bactéries impliquées dans les infections.

4-1-Sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries d'origine aquatique

4-1-1-Origine et support génétique de la résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles produites par des micro-organismes, bactéries ou champignons, et capables de tuer (bactéricide) des micro-organismes sensibles ou d'inhiber (bactériostatique) leur croissance.

La résistance aux antibiotiques, composés qui représentent relativement une structure étroite avec les substances produites par les bactéries du sol et les champignons,

aurait probablement été développée bien avant les usages des agents antimicrobiens en médecine humaine et vétérinaire (Schwarz *et al.*, 2001). C'est ainsi que les bactéries des eaux naturelles provenant de lacs de montagne situés loin des rejets dérivant des activités humaines ou animales portaient des niveaux de résistance significatifs (Jones *et al.*, 1986). L'auteur explique ce phénomène de résistance par l'implication des plasmides de résistance, par un contact avec des organismes producteurs d'antibiotiques (actinomycètes et champignons), par une résistance intrinsèque ou que cette résistance est associée à la croissance dans les environnements oligotrophes.

Cette hypothèse peut être appuyée par les résultats d'une étude récente conduite par Boon and Cattanach (1999), et visant à mesurer l'incidence de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries autochtones et fécales isolées de plusieurs systèmes aquatiques (rivière, réservoirs, stations de traitement d'eaux usées). Ces auteurs ont noté un niveau d'antibiorésistance plus élevé chez les bactéries isolées de sites apparemment dépourvus d'impact humain ou animal. Ainsi il existerait déjà dans l'environnement, bien avant l'avènement des antibiotiques dans la pratique médicale, un pool de gènes de résistance aux antibiotiques et qui serait en relation avec l'excrétion de ces substances par les organismes producteurs (actinomycètes et champignons). De ce fait, à côté de la résistance intrinsèque ou naturelle des souches, plusieurs pratiques de société : alimentaires (antibiotiques dans les aliments, l'eau et les plantes), médicales (utilisation inappropriée des antibiotiques dans l'environnement médical) et agricoles (utilisation non discriminative des antibiotiques dans la pratique agricole et vétérinaire) ont contribué et accrue largement au développement de la résistance et de la

multirésistance (résistance acquise) (Todar, 2008).

Le problème de la résistance aux antibiotiques est tellement alarmant que Martinez (2009) n'hésite pas à caractériser ce phénomène d'une véritable pollution. Après l'introduction de la pénicilline en 1946, déjà les premiers signes de résistance sont apparus chez certaines souches de *staphylococcus*. Également, la résistance à la streptomycine, au chloramphénicol et à la tétracycline furent notée très bientôt après leur introduction durant la fin des années quarante. En 1953, pendant une première manifestation de *Shigella* au Japon, une souche de la dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*) multirésistante a été isolée. Cette souche s'était révélée résistante au chloramphénicol, à la tétracycline, à la streptomycine et aux sulphonamides (Todar, 2008).

Vue l'importance de ces molécules pour combattre les maladies infectieuses, un réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques au niveau de l'environnement a été mis en œuvre dans la plupart des pays développés, et vise à collecter, à analyser et à reporter les données. Cette surveillance n'implique pas seulement à récolter les données concernant les bactéries pathogènes mais également tous les microorganismes de l'écosystème affecté (Anonyme, 1999).

La vitesse à laquelle se propage la résistance aux antibiotiques et la fréquence élevée de germes multirésistants chez les bactéries pathogènes, plus particulièrement au niveau de l'environnement, ont stimulé beaucoup de créneaux de recherche pour élucider ce phénomène. Les résultats de ces études ont révélées que cette résistance est généralement codée par différents éléments génétiques, chromosome (Martinez, 2009; Lin

and Biyela, 2005), des transposons (Courvalin, 2008, Georgopapadakou , 2008), des intégrons (Georgopapadakou, 2008; Courvalin, 2008, Lin and Biyela, 2005) ou des plasmides (Martinez, 2009; Georgopapadakou, 2008, Lin and Biyela, 2005) et que des les phénomènes de transfert de gènes de résistance ont lieu entre des bactéries que soit *in situ* ou *in vitro* (Courvalin, 2008 ; Courvalin, 1994 ; Speer *et al.*, 1992).

4-2- Fréquence de la résistance aux antibiotiques au niveau de l'environnement aquatique.

Les études liées au suivi de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries isolées de l'environnement aquatique sont abondantes. Ce travail se limitera à exposer plus particulièrement les résultats de certaines études concernant les eaux usées et les eaux douces.

Sharma *et al.* (2010) a étudié l'antibiogramme de 40 souches de *Shigella* provenant d'une rivière en Inde. L'analyse des phénotypes de résistants a montré que sur les 7 souches de *S. dysenteriae*, la majorité sont résistantes à l'amikacine, à la streptomycine, à la tétracycline et toutes sont sensibles au chloramphenicol et à la triméthoprine, Egalement, la plupart des 10 souches de *S. sonnei*, sont sensibles à l'amikacine, au chloramphenicol, à la streptomycine. De même sur les 23 souches de *S. flexneri*, la plupart ont manifesté une résistance au triméthoprine, à la tétracycline et ont été sensibles à l'amikacine.

Lösch *et al.* (2008) remarquèrent que seulement 5,9% et 4,4% des *E. coli* isolées des eaux douces (eaux de surface, eaux souterraines et eaux d'alimentation) ont développé une résistance respectivement au sulfaméthoxazole-triméthoprine et au chloramphénicol.

Servais et Passerat (2009) ont isolés 214 souches de *E. coli* à partir de différents échantillons d'eaux (eau de rivière et eau usée urbaine). Les résultats de leur antibiogramme ont montré que 27 et 16% des *E. coli* isolées de rivière sont résistantes respectivement à la tétracycline et au sulfaméthoxazole-triméthoprim, et toutes ont été sensibles à l'amikacine. Pour les *E. coli* provenant des eaux usées urbaines, 27, 18, et 1% sont résistantes respectivement à la tétracycline, au sulfaméthoxazole-triméthoprim, et à l'amikacine.

4-3-Relation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds

La propagation de la résistance aux antibiotiques n'est pas seulement le fruit d'une utilisation appropriée ou inappropriée des antibiotiques par l'homme, mais peut être la cause de l'impact d'autres activités anthropogènes. En effet certains polluants de l'environnement tels que les métaux lourds, composés hautement persistants et non biodégradables, engendrés par des activités diverses, se sont révélés un véritable fléau aussi bien sur le plan toxicologique mais également sur le plan écologique. Donc la pollution métallique peut avoir un rôle important dans le maintien et la prolifération de la résistance aux antibiotiques (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Les souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif isolées sur des milieux contenant le cobalt, le plomb, le mercure et le molybdène démontrèrent une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol, à l'inverse peu de souches isolées des milieux additionnés de plomb ou de molybdène ont été résistantes à la gentamycine (Allen *et al.*, 1977).

Calomiris *et al.* (1984) a étudié sur des souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif, l'association entre la résistance aux métaux (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} Al^{3+}) et la résistance aux antibiotiques en utilisant la technique des répliques. Ils ont

observé que la multi-tolérance au Cu^{2+} , au Pb^{2+} , et au Zn^{2+} est associée de manière significative aux germes multi-résistants aux antibiotiques mais pas aux germes sensibles. De même, la résistance à la kanamycine est liée à la tolérance au Cu^{2+} , au Pb^{2+} , et au Zn^{2+} . Des souches de *Staphylococcus pasteurii* isolées du système de distribution d'eau se sont révélées simultanément résistantes au Hg et aux β -lactamines (Faria *et al.*, 2009).

Harnett and Gyles (1984) ont rapporté que pour les souches d'*E. coli*, la résistance au mercure est véhiculée par un même plasmide qui code pour la multirésistance aux antibiotiques. Karbasizadeh *et al.* (2003) ont étudié des souches d'entérobactéries impliquées dans des infections nosocomiales et ont pu isoler un plasmide conjugatif (>56.4 kb) qui véhicule la résistance à la triméthoprim-sulphaméthoxazole, à l'ampicilline, et à la tétracycline. Le transfert de ce plasmide aux cellules réceptrices s'est traduit par une augmentation des valeurs des CMI de 5, 4, et 2 fois respectivement pour le mercure, le plomb, et le cadmium.

5- Croissance bactérienne et toxicité des métaux lourds : importance des facteurs

physico-chimiques (pH, température, salinité, nutriments)

La quantification de la croissance microbienne est une caractéristique importante lors du travail avec des microorganismes, en particulier quand on opère avec l'inhibition de la croissance microbienne. La quantification de cette croissance peut être évaluée de différentes manières : comptage microscopique direct, comptage des cellules viables par étalement sur milieu solide, mesure de la biomasse cellulaire, et mesure de la turbidité ou mesure de l'émission de la lumière émise par certaines bactéries. La mesure de la turbidité offre un simple moyen d'estimer la quantité de cellules présente dans un échantillon.

5.1-Température

La température est l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui

déterminent la croissance et la survie des microorganismes. Chaque organisme a un intervalle caractéristique de croissance avec des valeurs de température minimum, optimum, et maximum.

Les micro-organismes peuvent exister dans les environnements à des températures en dessous de zéro (-5 °C minimum) au point d'ébullition de l'eau et au-dessus (113 °C maximum), et peuvent être classés en trois groupes majeurs : psychrophiles, thermophiles, et mésophiles selon leurs exigences de température. Nedwell (1999) a suggéré qu'aux basses températures, les membranes des cellules bactériennes deviennent plus rigides, lequel surtout influence le transport actif d'éléments nutritifs à travers la membrane. La perméabilité de la membrane pourrait affecter aussi la vitesse d'absorption des métaux lourds par les cellules, affectant ainsi la toxicité des métaux. Hossain *et al.* (2006) ont cultivé *E. coli* à différentes températures (20, 30, 40, et 50 °C) pendant 60 h en présence de 600 ppm de Pb. Ces auteurs remarquèrent que la croissance est maximale à 40 °C.

La croissance de *Aspergillus niger* a été testée en absence et en présence de différentes concentrations (0,01, 0,1, 1 et 10 mM) de Zn^{2+} en fonction de la température (25 et 37 °C) (Babich and Stotzky, 1978). Ces auteurs constatèrent qu'en absence ou en présence de zinc, la croissance est plus élevée à 37 °C qu'à 25 °C. Aussi, les concentrations en zinc inférieures à 1 mM, que ce soit à 25 ou à 37°C, ne diminuent pas significativement la vitesse de croissance de *Aspergillus niger*. Par contre à 10 mM de Zn^{2+} , la vitesse de croissance est réduite de 50% par rapport à celle du témoin (absence de Zn^{2+}).

Les souches *Staphylococcus aureus* porteuses du plasmide pénicillinase ont montré

une croissance prononcée (en V) en présence du mercure à 37 °C comparativement aux souches non porteuses de plasmide pénicillinase. Alors qu'à 4 °C, un déclin graduel de la croissance est observée pour les souches *Staphylococcus aureus* porteuses ou non de plasmide (Kondo *et al.*, 1974). En vérifiant un modèle de simulation de la croissance à l'aide de monoculture de *Pseudomonas* sp. en absence et en présence de Zn^{2+} Gikas *et al.* (2009) remarquèrent aucune phase de latence à 35 °C. A 10 °C, celle-ci a atteint 10 heures. Par contre à 10 °C et en présence de 0,01 mM , la phase de latence s'est accrue de 6 heures.

5-2-pH

Les microbes peuvent exister dans les environnements extrêmement acides (jusqu'à pH 0) aux environnements très alcalins (aussi haut que pH 12), et se classent dans trois groupes principaux - acidophiles (intervalle de croissance pH 0-5.5), neutrophiles (pH 5.5-8.5), et alcalophiles (pH 8.5-12.0).

Selon Sigee (2005), les ions hydrogène influencent la toxicité des métaux lourds, soit en affectant leur valence (état) chimique dans l'eau ou par compétition avec les métaux essentiels pour les sites sur les membranes biologiques. La croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de cadmium semble plus prononcée à pH 7 qu'à pH 8. Hart and Scaife (1977) ont suggéré que l'élimination du cadmium du milieu de culture et sa précipitation simultanée à l'intérieur de la cellule pourrait être un processus dépendant du pH. Cependant, Babich et Stotzky (1977a) remarquèrent que la réduction de croissance n'est pas différente chez *Aspergillus fischeri* en présence de 250 µg de Cd^{2+} /g de sol que la valeur du pH soit 5,1 ou ajustée à pH 7,2.

5-3-NaCl

Le sel ou le stress osmotique est étroitement relié au stress hydrique parce que les solutés affectent fortement l'activité de l'eau. En explorant l'influence du NaCl sur la croissance d'une nouvelle souche de *Klebsiella planticola* en absence et en présence de Cd, Sharma *et al.* (2000) remarquèrent que 10 à 40 mM de NaCl réduisent le temps de latence ou accélèrent la vitesse de croissance en présence de 1 mM de Cd²⁺.

Gupta *et al.* (1998) ont étudié l'effet du NaCl sur la croissance de deux souches de *E. coli*, sensible et résistante à l'argent. Ils observèrent que 40 g/l de NaCl, sans addition de Ag⁺, réduit la croissance de la souche résistante, alors que celle de la souche sensible n'est pas affectée. En absence de NaCl et en présence de Ag⁺, la souche sensible croît jusqu'à 100 µM, tandis que la souche résistante croît jusqu'à 600 µM. En présence de NaCl et de Ag⁺, la souche sensible croît jusqu'à 50 µM de Ag⁺ à 10 g/l de NaCl, mais aucune croissance n'est observée à 50 µM de Ag⁺ et aux concentrations élevées de NaCl (20, 30, 40, 50 et 60 g/l). Concernant la souche résistante, la croissance est à peine affectée à 600 µM de Ag⁺ et à 10 g/l de NaCl ; alors qu'à 20 g/l de NaCl, la croissance est nulle à 50 µM de Ag⁺.

5-4-Nutriments

L'état nutritionnel d'un organisme peut influencer sa sensibilité aux métaux et par conséquent sa croissance. Les métaux pris par le système du transport énergie-dépendant peuvent s'accumuler plus rapidement quand les concentrations des sources d'énergie sont élevées (Brynhildsen *et al.*, 1988).

Mariano-da-Silva *et al.* (2009) ont testé l'effet de certains constituants du milieu

extrait de levure glucosé (YED) sur la toxicité du cadmium chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces auteurs ont noté qu'il existe une forte corrélation entre l'effet du cadmium et la dilution du milieu de croissance. La culture *S. cerevisiae* dans le milieu non dilué, en présence de la totalité de l'extrait de levure (1%), 0,05 mM de Cd^{2+} affectent significativement la croissance et une dilution du milieu au $\frac{1}{2}$ (0,5 % extrait de levure) ou au $\frac{1}{4}$ (0,25 % extrait de levure) provoque une inhibition totale de la croissance. De même la diminution du contenu en glucose du milieu réduit la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* au cadmium

Une étude a été menée par Farrel *et al.* (1993) sur l'effet de la composition chimique du milieu sur la toxicité du mercure II (Hg^{2+}). Ces auteurs ont noté une tendance apparente de l'accroissement de la concentration inhibitrice 50% (IC_{50}) quand le potentiel du milieu de culture supportant la croissance augmente. Cependant, aucune corrélation significative n'était observée entre les IC_{50} et les quantités de CO_2 produites par les cultures bactériennes.

6-Survie des bactéries en milieu aquatique

Dans l'environnement aquatique, la survie des bactéries allochtones est affectée par des stress environnementaux complexes et des agents mortels qui actionnent les réponses cellulaires encore faiblement élucidées (Barcina *et al.*, 1997).

Avant d'aborder la survie, il convient de définir auparavant la viabilité car les deux termes sont liés. La viabilité chez les bactéries est définie comme étant l'aptitude à se reproduire dans des conditions optimales ou à former des colonies sur des milieux solides (Roszak and Colwell, 1987) alors que la survie représente l'aptitude à maintenir la viabilité dans des conditions défavorables (Roszak and Colwell, 1987). Cependant, cette définition

souffre d'une exception, l'état viable mais non cultivable dont le concept fut introduit d'abord par Xu *et al.* (1982) ainsi que par Roskak *et al.* (1984). Cette définition a été par la suite critiquée car son introduction dans le jargon scientifique a entraîné beaucoup plus une confusion qu'une connaissance sur l'état dormant des bactéries dans le milieu naturel.

Ainsi dans son éditorial, une étude introspective sur l'état viable mais non cultivable (VNC) des bactéries fut publiée par le Journal of Medical Microbiology. Il ressort de cette étude qu'il n'y a pas de consensus scientifique sur l'état VNC. En effet, l'état VNC est vécu comme un phénomène où les cellules sont classées comme non cultivables ou sont en état de stress. Classiquement, de telles cellules peuvent être reconnues par leur incapacité à se développer sur les milieux sélectifs et la récupération ou la réparation entraînerait la restauration de cette propriété particulière qui est la croissance. Dans ce contexte, le milieu de récupération à travers lequel les cellules retournent à leur état cultivable devient critiquable (Barer, 1997).

La connaissance des facteurs régissant la survie d'*Escherichia coli* en milieu naturel est un point capital en raison d'une part de l'importance de ces bactéries comme indicateurs de pollution fécale (Wcislo and Chróst, 2000). D'autre part, la capacité de certains membres à engendrer des maladies chez l'homme et les animaux (Brenner and Farmer, 1980), nous interpellent pour mettre en place des stratégies visant à les éliminer au cours des traitements d'eau, ou si elles passent cette barrière, à émettre des signaux préventifs à l'égard des populations humaines visant à les prémunir contre les risques liés aux maladies à transmission hydriques.

Escherichia coli, qui est le représentant de cette famille de bactéries, est un germe associé aux animaux à sang chaud. Une fois excrété, hors de son habitat traditionnel, il est

confronté à la survie. Le maintien ou la persistance d'*Escherichia coli* dans un environnement, aussi hostile et stressant, tel que le milieu aquatique, est un challenge que ne peuvent relever que les organismes possédant un "bagage" génétique adapté ou "élastique". Aucune étude synthétique ou expérimentale n'a été menée jusqu'à présent pour clarifier le poids de chacun des facteurs qui gouvernent la survie des bactéries en milieu environnemental. En pratique et dans les études de survie *in situ*, il est très difficile de faire la part des choses, car tous les facteurs, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, agissent de concert.

Plusieurs facteurs concourant à l'élimination des entérobactéries, et plus spécifiquement d'*E. coli*, dans l'environnement aquatique sont cités dans les travaux se rapportant à la survie de ces bactéries comme la prédation, la compétition, le parasitisme, l'hébergement de plasmides, le pH, la température, le rayonnement solaire, la présence de métaux lourds, la disponibilité des nutriments et le niveau nutritionnel ainsi que la salinité (Chedad and Assobhei, 2007; Tappeser *et al.*, 1998; Wang, and Doyle, 1998; Garcia-Lara *et al.*, 1993; De-Toni *et al.*, 2009; Wcislo and Chróst, 2000; Davies and Evison, 1991).

La section suivante se limitera à l'influence de la température sur la survie des souches bactériennes.

La température maximale de croissance d'*E. coli* se situe à 50 °C avec une température optimale comprise entre 30 et 45 °C et une température minimale de 15 °C (Dworkin *et al.* 2006).

L'étude de la survie de *E. coli* a été effectuée en eau de rivière stérile à 4 et 20 °C et a montré que les dénombrements restaient constants pendant plus de 50 jours (Bogosian *et*

al., 1996). Anderson *et al.*, (2005) ont étudié la survie des *E. coli* en simulant *in situ* les conditions naturelles dans un mésocosme expérimentale (eau douce ou saline avec leurs sédiments inoculés soit : de fécès de chien, ou d'eau usée hospitalière, ou de sol de cours contaminé par des matières fécales). L'analyse de l'ADN ribosomale (ribotype) de souches d'*E. coli* isolées au cours de l'échantillonnage a montré d'une part que certaines souches persistent plus que d'autres, surtout dans le mésocosme inoculé avec de l'eau usée. D'autre part la diversité de l'ADN ribosomale des souches d'*E. coli* (ribotypes) échantillonnées du mésocosme inoculé avec de l'eau usée est plus diversifiée que celui inoculé avec du sol contaminé qui est lui-même plus riche que celui inoculé avec les fécès de chien.

Selon Lewis (2000), il existe plusieurs gènes régulateurs (*hip*, high persistence) qui affecteraient dramatiquement la survie cellulaire d'*E. coli* sans influencer la capacité des cellules de croître en présence d'un facteur létal.

Une souche d'*E. coli*, incubée *in situ* dans une eau de rivière a survécu plus de 260 jours, sans perdre sa viabilité dans l'intervalle de température 4-25 °C. Sa survie était inversement proportionnelle à la température 4>15>25>35 °C, quelque soit l'échantillon d'eau considéré, autoclavé, filtré, polluée ou non (Flint, 1987).

Vernozy-Rozand *et al.* (2002) rapportèrent qu'*E. coli* O157:H7 inoculée dans l'eau des abreuvoirs de certaines fermes aux USA peut survivre pendant au moins 4 mois. Aussi la même souche inoculée dans l'eau d'un étang d'une ferme est capable de survivre pendant au moins 21 jours à 13 °C.

Lessard *et al.*, (1983) notèrent, dans des cultures en batch en eau de mer, qu'il

n'existe aucune relation entre la survie d'*E. coli* et la température. Cependant selon ces mêmes auteurs, plusieurs études conduites en laboratoire ont montré que le temps de survie des cultures pures de coliformes, en eau douce ou en eau de mer, décroît quand la température augmente. De même Craig *et al.* (2002) étudièrent la survie d'*E. coli* dans des microcosmes chargés d'eau et/ou de sédiments à 10, 20 et 30 °C. Ces auteurs constatèrent qu'il existe une relation inverse entre la température et la survie d'*E. coli* et le déclin le plus élevé a été observé dans la colonne d'eau incubée à 30 °C.

Les bactéries non adaptées aux conditions environnementales, comme les microorganismes entéropathogènes typiques (tels qu'*E. coli* et d'autres bactéries) se sont révélés non seulement capables de survivre à l'intérieur de leurs hôtes à la température du corps, mais se sont montrés aptes aussi à persister à l'état cultivable pendant des semaines au niveau de l'environnement aquatique à des températures variants entre 6 et 16 °C (Terzieva and McFeters, 1991).

La survie de *Salmonella* a été évaluée en eau de mer et douce stériles, sans addition de nutriments, à température ambiante (30 ± 2 °C) et réfrigérée (5 ± 1 °C). Quand la souche est inoculée avec une densité bactérienne élevée ($7,5 \log \text{ UFC ml}^{-1}$), *Salmonella* survit plus de 6 et 24 semaines respectivement en eau de mer et en eau douce à température ambiante. A basse température, les cellules pourraient survivre pendant 48 semaines en eau de mer et 58 semaines en eau douce. Toutefois, l'inoculation avec une densité bactérienne faible ($3.1 \log \text{ UFC ml}^{-1}$) a révélé que la vitesse de déclin est plus rapide avec une survie maximale de 13 semaines à 5 °C (Sugumar and Mariappan, 2003).

Niemela and Vaatanen (1982) ont constaté que pour *Klebsiella pneumoniae* cultivé dans une eau de lac, la relation entre la vitesse de mortalité et la température est très forte.

7-Halotolérance des entérobactéries

Les bactéries répondent différemment vis-à-vis de la concentration en sel présente dans leur milieu. Selon la concentration exigée ou la concentration tolérée en sel pour avoir une croissance, les bactéries peuvent être classées en différents groupes : les non halophiles ($< 0,2$ M), les halophiles faibles ($0,2-1,2$ M), les halophiles modérées ($1,2-2,5$ M) et les halophiles extrêmes ($> 2,5$ M) (Larsen *et al.*, 1987).

Ghoul *et al.* (1989) a évalué l'halotolérance de 16 souches d'*E. coli* dans le milieu M63 et a remarqué que les CMI au NaCl des souches varient entre 0 et 0,68 M.

E. coli peut tolérer une concentration en sel de 35 g/l en milieu minimum (M63) et 85g/l en milieu riche (Jolivet-Gougeon *et al.*, 2000).

Escherichia coli peut croître activement dans un milieu riche jusqu'à une concentration en NaCl de 5 % (Hrenovic and Ivankovic, 2009).

Haichour (1992) a remarqué que les souches d'*E. coli* isolées des eaux de rivières de la région de Sétif tolèrent des concentrations variant entre 0 et 70 g/l, mais les pourcentages de souches halotolérantes observées pour chacune des concentrations testées diffèrent en fonction du milieu utilisé (M63, Bouillon trypticase soja). Des pourcentages élevés de souches halotolérantes sont observés dans le bouillon trypticase soja.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1- Sites d'échantillonnage et technique de prélèvement

Les cours d'eau au niveau de la région de Sétif sont généralement caractérisés par des périodes de crues en hiver et un assèchement partiel ou total en été. Quatre stations de prélèvement ont été choisies localisées au niveau de 4 oueds : Ouricia (station 1), Bousselam (station 2), Echouk (station 3), El-Malah (station 4), (**Fig 1**).

Le choix des stations a été dicté par le degré de pollution fécale, le type de pollution (organique, mixte organique et métallique) et de l'origine de l'eau (usée urbaine et douce). La station 1 ($4^{\circ}24.1.2''$ N latitude, $5^{\circ}25'34.26''$ E longitude) est localisée sur l'oued Ouricia pollué par les eaux usées urbaines de la localité Ouricia et rejoint l'oued Bousselam après un parcours d'environ 500 m. La station 2 ($36^{\circ}12'50,03''$ N latitude, $5^{\circ}22'58.50''$ E longitude), située à 3 km en aval de la source de l'oued Bousselam représentant le principal cours d'eau longeant la ville de Sétif. Cet oued subit une contamination par les eaux usées urbaines des localités Ouricia et Fermatou, les eaux usées provenant des zones Nord et Nord Ouest de la ville de Sétif et des localités avoisinantes, ainsi que les effluents du complexe minoterie-semoulerie Lahmar Cherif. La station 3 ($36^{\circ}9'48'.66''$ N latitude, $5^{\circ}25'34.26''$ E longitude) est située sur le parcours de l'oued Echouk. Ce cours d'eau considéré comme un égout à ciel ouvert reçoit les eaux usées urbaines des zones Nord Est et Sud Est de la ville, ainsi que les effluents industriels pollués par les métaux et les substances minérales et organiques de la zone industrielle (piles et batteries, tannerie, plastiques, carrelage et faïence, etc.). La station 4 au bord de l'oued El Malah ($36^{\circ}3'42.59''$ N latitude, $5^{\circ}25'34.26''$ E longitude) se trouve à 100 m du point de confluence entre les oueds El Mallah et Bousselam. L'oued El Mallah est la résultante de plusieurs ruisseaux qui parcourent des sols salés et reçoit les eaux résiduares urbaines des

localités de Guellal, Sidi Embarek, ainsi que les eaux résiduaires urbaines et industrielles charriées par l'Oued Echouk. Ce cours d'eau rejoint l'oued Bousselam à environ 25 Km de la ville de Sétif pour constituer ensemble les principaux cours d'eaux pourvoyeurs du barrage de Ain Zada.

Les stations de prélèvement ont été classées de la sorte :

Station 1 : faible pollution fécale (oued Ouricia)

Station 2 : pollution fécale modérée (oued Bousselam)

Station 3 : Forte pollution fécale (urbaine et industrielle)

Station 4 : faible pollution fécale et métallique (fécale et métallique)

Concernant la station 3, les échantillons d'eaux sont récoltés à 25 m en aval du point de rejet des effluents chargés de métaux par l'usine ENPEC. Les échantillons sont récupérés au moyen d'une perche à 1 m du bord, dans des flacons stériles, puis transportés au laboratoire dans une glacière thermofuge. Un total de 10 échantillons par station ont été récoltés entre mai 1998 et janvier 2000.

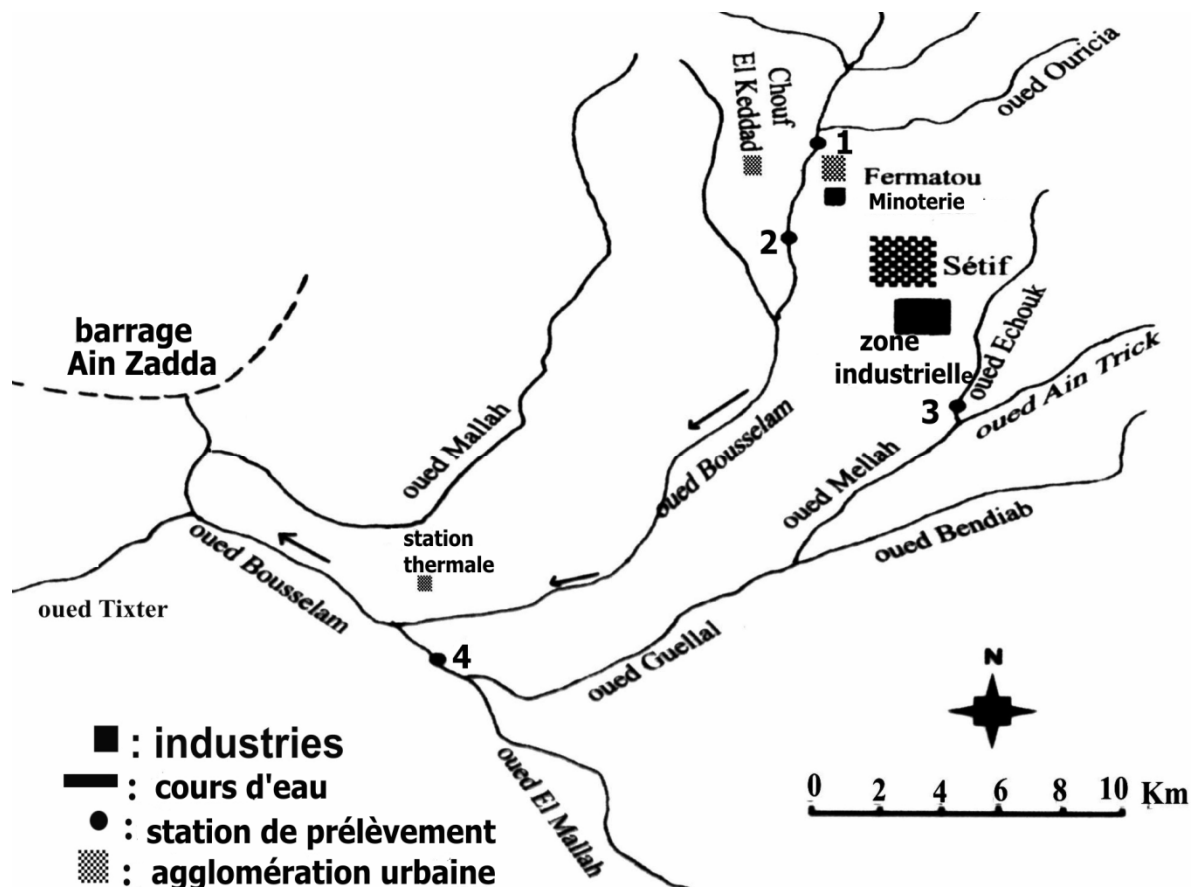


Figure 1 : Localisation des stations de prélèvement

2- Isolement et identification des souches

Des quantités de 0,1 ml d'échantillons d'eau brute et/ou leurs dilutions ont été étalés sur des boîtes de gélose Mac Conkey. Après incubation (18 à 24 H à 37 °C), 10 à 12 colonies lactose positives par échantillon d'eau, ont été prélevées et purifiées sur gélose nutritive. Après purification, la conservation des souches a été effectuée dans du glycérol à -70 °C. L'identification préliminaire des souches purifiées a été basée sur les caractéristiques générales de la famille des *Enterobacteriaceae* selon le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). Ainsi, après confirmation du Gram, de l'oxydase, du type respiratoire et du type métabolique, les souches ont été identifiées au moyen de la galerie API 20E (Bio-Merieux).

3- Détermination de la résistance aux métaux lourds :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux a été évaluée pour toutes les souches isolées par la méthode de dilution en milieu liquide (bouillon Mueller-Hinton) selon le protocole décrit par Lennette *et al.*, 1985.

Des solutions mères de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et HgCl_2 ou de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ contenant respectivement 409600 et 51200 $\mu\text{g/ml}$ ont été préparées dans de l'eau distillée, puis stérilisées par filtration sur membrane (0,2 μm). Douze solutions filles sont obtenues, pour chacun des métaux, par dilution successive au $\frac{1}{2}$ de la solution mère correspondante dans des tubes d'eau distillée stérile (10 ml). Après dilution des solutions mères métalliques, les concentrations de métaux se répartissent dans les solutions filles entre 2,5 et 5120 $\mu\text{g/ml}$ pour le HgCl_2 et entre 20 et 40960 $\mu\text{g/ml}$ pour le $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et le $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$. Les solutions des sels de métaux lourds ainsi obtenues sont ensuite diluées au 1/10 dans des bouillons Mueller-Hinton. Finalement, 200 μl de chacun des bouillons Mueller-Hinton additionnés de métaux lourds ont été transférés séparément dans les puits des microplaques

à fond rond (96 puits) puis inoculés par 10 µl d'une suspension (10^7 germes/ml = 0,5 Mac Farland) de la souche testée. Après incubation (37 °C, 18-24 H), la lecture des microplaques a été réalisée en utilisant un miroir inversé, la C.M.I. étant déterminée par l'absence de trouble au niveau de la plus faible concentration du métal.

4- Détermination de la résistance aux antibiotiques

Les profils de résistance aux antibiotiques de 208 souches, isolées des 4 sites, ont été déterminés par la méthode de diffusion de disques sur gélose Mueller Hinton (Lennette *et al.*, 1985). Les antibiotiques testés provenant de Sanofi Diagnostic (Institut Pasteur) ont été répartis comme suit : chloramphénicol (Cm, 30 µg), triméthoprim/sulphamethoxazole (Sxt 1.25/23.75 µg), amikacine (Am. 30 µg), kanamycine (Km. 30 UI), tétracycline (Te. 30 µg), oxytétracycline (Ot, 30 µg), doxycycline (Do. 30 UI), streptomycine (S. 10 µg), colistine (Co. 50 µg), furan (Ft. 300 µg), érythromycine (E, 15 UI), tobramycine (Tm. 10 µg). Les souches isolées ont été cultivées durant 18-24 H à 37°C et diluées (1/1000) dans de l'eau physiologique. La gélose Mueller Hinton a été ensemencée par la technique d'inondation et l'excès de liquide éliminé par aspiration après 30 secondes de décantation. Après séchage des boîtes de gélose dans une étuve (37 °C, 30 min), les disques d'antibiotiques ont été appliqués à la surface de la gélose au moyen d'un distributeur de disques préalablement stérilisé. Après incubation (18-24 H à 37 °C), les diamètres d'inhibition (mm) ont été mesurés et les souches classées en type sensible, intermédiaire ou résistant selon les indications de Lennette *et al.* (1985). Les souches à résistance intermédiaire ont été rangées parmi les souches résistantes. Ce test a été effectué en utilisant la souche *E. coli* ATCC 25922 comme souche témoin suivant les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standard, (1984).

5- Extraction et électrophorèse des plasmides

Un total de 73 souches d'*E. coli* provenant des 4 stations de prélèvement ont été soumis à la recherche de plasmides. Ces souches ont été scindées en 2 groupes distincts, un premier de 38 souches et le second de 35 souches. Deux marqueurs d'ADN (I et II) ont été utilisés comme marqueurs de référence de poids moléculaire pour déterminer la taille des plasmides. Le marqueur I est un mélange de 5 fragments d'ADN (56; 33; 10,5; 4; 2,96 Kb) (Laboratoire de Microbiologie pharmaceutique, Rennes I, France) et le marqueur II (0,08-8,57 Kb Roche) ont été utilisés pour référence comme marqueur de taille respectivement pour le 1^{er} et le 2^{ème} groupe de souches. L'ADN plasmidique a été extrait par la méthode de lyse alcaline modifiée (Grinsted. and Hennett. 1988; Walker ,1984) selon le protocole suivant :

5-1-Première phase :

Un volume de 6 ml de milieu infusion cœur-cerveau (BHI) a été inoculé par une colonie de la souche à tester, puis incubés au bain marie avec agitation pendant 4-5 H à 37 °C. Ensuite, une quantité de 1,5 ml de bouillon ensemencé a été versée dans un tube eppendorf (2 tubes eppendorf /souche) suivie d'une centrifugation à 4000g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, l'excès d'humidité a été retiré du culot par tamponnement du tube retourné sur du papier absorbant. Le culot a été remis en suspension par agitation au vortex dans 100 µl de tampon froid correspondant à la solution 1 (glucose 50 mM, Na₂EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8 25 mM, lysozyme 4 mg/ml), l'action du lysozyme étant de détruire la paroi. Cette suspension avec tube ouvert a été laissée au repos à température ambiante. Après 5 min de temps d'action du lysozyme, 200 µl de solution 2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) ont été ajoutés. Dès fermeture des tubes, ceux-ci ont été retournés délicatement 2 à 3 fois et ensuite incubés dans de la glace pendant 5 min. Le but de cette

action a été d'induire la lyse alcaline de la paroi avec libération du contenu intracellulaire, l'ADN ainsi libéré rendant la solution visqueuse. Après addition de 150 µl de solution 3 (acétate de K 5 M acidifié à pH 4,8 avec l'acide acétique glacial), les tubes refermés ont été retournés doucement jusqu'à apparition d'un trouble puis incubés dans de la glace pendant 5 min. Cette action de l'acétate de K a consisté à précipiter les protéines et l'ADN chromosomique. Après cette étape, les tubes ont été centrifugés à vitesse maximale (12500 g) pendant 5 min à 0 °C, le surnageant environ 900 µl pour 2 tubes eppendorf a été transvasé dans un tube eppendorf de 2 ml préalablement refroidi. Après l'ajout d'une quantité de 900 µl de mélange phénol-chloroforme (50 ml de phénol équilibré à pH 7,8, 50 ml de chloroforme, 4 ml d'alcool isoamylique), le mélange a été agité délicatement par des mouvements de retournement. Le mélange a subi une centrifugation à vitesse maximale (12500 g) pendant 6 min à 0 °C et le surnageant (environ 700 µl) a été transféré dans un nouveau tube eppendorf préalablement refroidi. Un volume de 1400-1500 µl d'éthanol 95% froid, équivalent à 2 fois le volume de surnageant, a été ajouté au surnageant. Après agitation par inversion, le stockage du tube a été effectué à -80 °C pendant 2 heures ou pendant une nuit à -20°C ; le but de cette opération étant de précipiter l'ADN.

5-2-Deuxième phase

Après ce temps de stockage, les tubes ont été centrifugés à vitesse maximale (12500 g) pendant 30 min à 0 °C avec élimination du surnageant et mise en position inversée des tubes sur du papier absorbant de manière à ce que le culot soit le plus sec possible. Une quantité de 1400 à 1500 µl d'éthanol à 70 % a été ajoutée pour remise en suspension des culots en utilisant une micropipette munie d'un embout. La suspension a ensuite été soumise à une centrifugation à vitesse maximale (12500 g) durant 30 min à 0 °C. Après retrait du surnageant, le séchage du culot a été effectué par lyophilisation, sous vide pendant 30 min ou par incubation 1 h à 37 °C. Ensuite, 10 µl de solution 4 (Tris EDTA pH

8 contenant RNase pancréatique à 50 µg/ml, Tris 10 mM et EDTA 1 mM) préalablement refroidie ont été ajoutés au culot et incubés 45 à 60 min à 37 °C et mélangés à 3,5 µl d'une solution de bromphénol.

5-3-Electrophorèse

L'analyse des extraits obtenus a été effectuée par électrophorèse (5 V/cm pendant 1-2 H) sur gel d'agarose (0,7-0.8 %) en employant comme tampon du Tris-Acétate-EDTA. Les bandes ont été visualisées après migration au 2/3 de la longueur du gel, sous UV par coloration des gels au bromure d'éthidium (5 µg/ml) préalablement rincés avec de l'eau distillée.

6- Survie

Deux souches de *E. coli* isolées de la zone industrielles ont été utilisées, l'une ayant une CMI au Pb(NO₃)₂ de 4096 µg/ml (souche résistante), l'autre une CMI de 256 µg/ml (souche sensible). La survie a été déterminée *in-vitro* en utilisant de l'eau stérile provenant du barrage Ain Zadda. Les échantillons d'eau autoclavés sont inoculés (10⁶ CFU/ml) chacun avec 1 ml de la suspension de la souche à tester. La suspension a été préparée à partir d'une culture de 16 H (37 °C) en bouillon trypticase soja (10 ml) préalablement centrifugée, lavée 2 fois et diluée au 1/10 dans de l'eau physiologique. Les cellules survivantes ont été dénombrées sur gélose nutritive après 0, 4, 8, 11, 15, 19, 23, 27, 30 d'incubation.(essai 1) et après 0, 4, 8, 11, 15, 19, 23.(essai 2) jours d'incubation La survie a été étudiée à trois températures (10, 30 et 37 °C). La coloration de Gram a été effectuée périodiquement pour vérifier une éventuelle contamination.

La constante d'élimination est calculée selon la formule :

$\log N / \log N_0 = -k t / 2.303$. N = nombre de germes (CFU/ml) au temps t, N_0 = nombre de germes (CFU/ml) au temps $t = 0$, t = le temps, k = constante d'élimination (la constante d'élimination représente la pente de la droite de régression du log nombre de cellules par rapport au temps).

Le T_{90} , temps nécessaire pour éliminer 90% de germes, est calculé selon la formule :

$$T_{90} = 2.303 / k \text{ ou } \ln 10 / k.$$

7- Etude de l'halotolérance (détermination de la CMI)

L'étude de l'halotolérance d'*E. coli* est effectuée en milieu M63 au moyen de microplaques à 96 cupules Ghoul *et al.*(1989), ces dernières étant stérilisées sous UV pendant 5 minutes et emballées stérilement dans des sacs en plastique stériles.

7-1-Préparation du milieu M63

Les essais ont été conduits sur le milieu M63 additionné d'une quantité appropriée de NaCl de manière à avoir les concentrations suivantes : 0, 0,085, 0,17, 0,5, 0,68, 0,85, et 1 M. Après ajustement du pH à 7,2, ce milieu à différentes concentrations a été stérilisé par filtration sur membrane de porosité 0,22 μ m en étant distribué dans des tubes à raison de 5 ml. Ces milieux ont été repartis dans les cupules des microplaques à raison de 200 μ l en tenant compte que les concentrations en NaCl sont distribuées par colonne et les souches par ligne (**Fig. 1**). Des cupules contenant le milieu M63 aux mêmes concentrations en sel mais nonensemencées ont servi comme témoin négatif.

7-2-Préparation de l'inoculum

Les souches de *E. coli* sélectionnées auparavant ont été cultivées en premier lieu dans du bouillon trypticase-soja et incubées au bain-marie à 37 °C. Après 16-18 heures de

culture, chaque suspension bactérienne a été centrifugée dans des tubes stériles pendant 15 min. à une vitesse maximum, puis lavée deux fois de suite avec 10 ml d'eau physiologique. Le culot récupéré a été mélangé à 5 ml d'eau physiologique stérile.

7-3-Ensemencement, incubation, et lecture

Chaque cupule d'une même ligne contenant chacune 200 µl de milieu M63 a été ensemencés par 5 µl d'une même suspension (Figure 1). Enfin, la microplaque a été incubée dans une étuve à 37 °C durant 24 heures dans une ambiance humide. La lecture a reposé sur une examination visuelle des microplaques au moyen d'un miroir à angle variable. L'existence d'un trouble dans la cupule présentant la plus forte concentration en sel indique le seuil de l'halotolérance de la souche.

8-Etude de la croissance d'*E. coli* résistante et sensible au Pb (NO₃)₂ : influence des facteurs abiotiques

8-1-Souches utilisées

Deux souches d'*E. coli* isolées à partir des eaux usées recevant des effluents provenant d'une fabrique de piles et accumulateurs ont été utilisées. L'une résistante au Pb(NO₃)₂ ayant une CMI de 4096 µg/ml (*E. coli* Pb^R), l'autre sensible au Pb (NO₃)₂ ayant CMI de 256 µg/ml (*E. coli* Pb^S).

8-2-Milieu utilisé

Le milieu trypticase-soja glucosé a été retenu du fait qu'il s'agit d'un milieu complexe riche en vitamines et en acides amines. Très usité dans les laboratoires de microbiologie, ce milieu a la particularité de permettre une croissance rapide même pour les bactéries très exigeantes.

8-3-Préparation des solutions de Pb(NO₃)₂

Des solutions mères de nitrate de plomb contenant 960 mg /100 ml, 7680 mg/100ml, et 122880 mg / 100 ml ont été préparées dans de l'eau distillée puis stérilisées par filtration sur membrane cellulosique de 0,2 µm de porosité.

8-4-Préparation de l'inoculum

Les deux souches *E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^S ont été cultivées dans du bouillon trypticase soja pendant 16 à 18 heures à 37 °C. Après centrifugation 6000 rpm pendant 10 minutes, le culot a été lavé deux fois avec de l'eau physiologique puis resuspendu à nouveau dans 5ml d'eau physiologique dans le but de servir à l'inoculation des tubes de bouillon trypticase soja.

8-5-Préparation des milieux :

Afin de préparer le milieu tryticase soja (TS) à 3 pH différents, et chaque milieu TS à un pH donné avec 5 salinités différentes et distribuer ces milieux dans des tubes à raison de 6 ml dans des tubes, le protocole suivant était nécessaire Une quantité de 194,4 g de milieu Trypticase soja glucosé nécessaire à la préparation de 6,48 litres a été solubilisée dans 6,18 l d'eau distillée. Les 6,18 l TS ainsi préparés ont été réparti en 3 lots, en fonction des 3 valeurs de pH 4,5, 7,2 et 9,0), recherchées, de 2060 ml chacun. Chaque lot étant ensuite fractionné en 5 portions, en fonction de 5 salinités recherchées 5, 10, 20, 40 et 60 g/l, de 412 ml dans des erlenmeyers. Du chlorure de sodium a été ajouté à chacune des 5 portions de manière a obtenir 5 salinités différentes de 5, 10, 20, 40 et 60 g/l en tenant compte que le milieu TS contient initialement 5g/l de NaCl. Les portions du premier lot ont été ensuite ajustées à pH 4,5 au moyen d'une solution de HCl et KOH et complétées chacune au volume de 430,56 ml avec de l'eau distillée. Quant au deuxième et troisième lot, les portions ont été ajustées respectivement à pH 7,2 et pH 9,0 et complétées ensuite comme précédemment à un volume de 430,56 ml avec de

l'eau distillée. Après répartition des milieux de TS ainsi préparés dans des tubes à raison de 5,98 ml et stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 15 min, des solutions de Pb (NO₃)₂ ont été ajoutées au moment de l'emploi. Pour la souche sensible, des concentrations de 0, 32, et 256 µg / ml de Pb (NO₃)₂ sont obtenues par l'addition aseptique dans les tubes de 20 µl respectivement d'eau distillée stérile, et de solution métalliques de Pb (NO₃)₂ de 960 mg /100 ml, et de 7680 mg/100 ml. Pour la souche résistance, des concentrations de 0, 32, et 4096 µg / ml de Pb (NO₃)₂ sont obtenues en ajoutant aseptiquement 20 µl respectivement d'eau distillée stérile, et de solution métalliques de Pb (NO₃)₂ de 960 mg /100 ml, et de 122880 mg / 100 ml. La croissance de chacune des 2 souches (sensible et résistante) a été testée pour chaque pH (4,5; 7,2, et 9), pour chaque température (10, 20, 30, et 37 °C), pour chaque salinité (5, 10, 20, 40 et 60 g NaCl/l), en absence et en présence de concentration de Pb (NO₃)₂ sub-inhibitrice (32 µg/ml) et inhibitrices (256 µg/ml et 4096 µg/ml).

8-6-Inoculation des tubes et évaluation de la croissance

Les tubes destinés à l'évaluation de la croissance des deux souches ont été inoculés chacun par 20 µl de chaque suspension et incubés à 10, 20, 30, et 37 °C. Chaque test de croissance a été conduit en duplicata. Des tubes témoins non inoculés ont été utilisés pour corriger les phénomènes de précipitation dans le milieu. La densité bactérienne des tubes inoculés a atteint 2 à 5 x 10⁶ germes /ml de milieu. L'appréciation de la croissance a été évaluée par lecture de la densité optique à 630 nm au moyen d'un spectrophotomètre avec établissement d'une courbe d'étalonnage.

9- Etude de l'accumulation du Plomb

L'accumulation du Plomb chez 2 souches (*E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^S) a été étudiée dans chacun des échantillons d'eau suivants : eau de surface (eau de barrage), eau usée urbaine.

L'accumulation a été également testée en bouillon TS.

9-1-Préparation des échantillons

Les essais ont consisté à préparer du bouillon TS à différents pH (4,5 7, 2 et 9,0) qui a été distribué dans des erlenmeyer par volume de 50 ml et d'échantillons d'eau de surface (barrage) ou d'eau usée urbaine. La préparation des échantillons d'eau (eau de surface et de l'eau usée urbaine) a nécessité d'abord une filtration pour éliminer les particules en suspension. Après filtration, les eaux sont également distribuées dans des erlenmeyer par volume de 50 ml. Après autoclavage à 121 ° C pendant 20 mn des échantillons d'eau (eau de surface et eau usée urbaine) ou du milieu TSG, une quantité de 0,1 ml d'une solution mère de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à 5 mg/ml, préalablement stérilisée par filtration sur membrane (0,2 μm), a été additionnée dans chacun des erlenmeyer.

9-2-Préparation de l'inoculum

Les cultures de 2 souches *E. coli* Pb^{R} et *E. coli* Pb^{S} obtenues après incubation de 18-24 H à 37 °C dans du bouillon TS ont été centrifugées. Les culots ont été lavés à l'eau distillée avec remise en suspension dans 100 ml d'eau distillée stérile. Les souches ont été ensuite inoculées à raison de 2 mg de biomasse bactérienne humide /ml d'échantillon (bouillon TS, eau de surface, et eau usée urbaine).

9-3-Minéralisation et analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique

Après inoculation des différents échantillons (bouillons TS, eau de surface et eau usée urbaine) à raison de 2 mg de biomasse humide par ml d'échantillon à étudier, les différents échantillons ont été incubés pendant 2 H à température ambiante (25 °C) puis ont été soumis à une centrifugation (6000 rpm, 20min). Les culots récupérés ont été séchés à 105 °C jusqu'à

poids constant. et ensuite minéralisés par digestion nitro-perchlorique (2 :1) à 120 °C jusqu'à clarification du mélange. L'analyse des échantillons a été effectuée par spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un four à graphite.

10- Microscopie électronique à transmission (M.E.T.)

Deux souches de *E. coli* Pb^R (résistante au Pb(NO₃)₂) et *E. coli* Pb^S (sensible au Pb(NO₃)₂) ont été inoculées dans le milieu trypticase soja (10 ml) additionné de Pb(NO₃)₂ à raison de 10 mg/l puis incubées 18 Heures à 37 °C. Après incubation, les cellules de ces 2 souches ont été soumises à l'examen par M.E.T. La fixation et l'enrobage des cellules destinées à l'observation au microscope électronique à transmission a demandé plusieurs étapes selon le protocole décrit par Kuo (2007).

10-1-1^{ère} fixation et lavage

Les cellules, des 2 cultures d'*E. coli* ont été récupérées séparément par centrifugation 5000 g pendant 10 min et remises en suspension dans du glutaraldéhyde 2,5 % et à pH 7,2 en tampon cacodylate de sodium 0,1 M contenant du saccharose à 2%. La fixation a été effectuée à température ambiante ou mieux à 4 °C pendant 3 à 4 heures. Le lavage s'opère dans un bain de quelques minutes en tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2 sans fixateur.

10-2-2^{ème} fixation et lavage

Ensuite, du tétroxyde d'Osmium à 1 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2 a été ajouté et le mélange laissé au repos pendant 1 heure (sous hotte). Le 2^{ème} lavage s'opère par 2 bains de 5 min dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2.

10-4-Déshydratation, imprégnation et inclusion

La déshydratation s'est effectuée dans un bain de 10 min d'éthanol de plus en plus anhydre de 70, 80, 95% puis par 2 bains de 10 min chacun dans l'éthanol absolu (100%) et se terminant par 3 bains de 15 min chacun dans de l'acétone.

L'imprégnation a lieu dans un mélange à volume égal d'acétone et d'Epon-Araldite pendant 1 heure minimum, suivie par un mélange d'Epon-Araldite et de DMP 30 durant 1 heure 30 minutes (0,3 ml de DMP 30 pour 20 ml d'Epon-Araldite).

L'inclusion a été effectuée dans un moule en plastique avec un mélange d'Epon-Araldite et de DMP 30 préparé frais, l'ensemble étant étuvé pendant 24 H à 60 °C.

10-7-Coupes et Contraste

Des coupes semi-fines puis fines, obtenues en utilisant un microtome, ont été récupérées sur des grilles de cuivre; le contraste étant obtenu par coloration avec l'acétate d'uranyl pendant 1 heure à l'obscurité suivi par 3 rinçages à l'eau distillée. Après séchage, les coupes ont été observées au microscopie électronique à transmission JEOL 100CXII.

RESULTATS

RESULTATS

1-Identification

Sur un total de 373 souches d'entérobactéries isolées, 340 souches ont été identifiées avec une prédominance d'*E. coli* et des espèces appartenant aux genres *Citrobacter* et *Klebsiella* au niveau de toutes les stations de prélèvement (**Tab. 1**).

2-Résistance aux métaux lourds:

2-1-Seuil de tolérance aux métaux

Les valeurs des CMI relativement étendues ainsi obtenues pour le plomb, le cadmium et le mercure (**Fig. 2**) s'étaient situées respectivement à 64-8192 µg/ml, 2-512 µg/ml et 0,25-128 µg/ml. Une distribution des valeurs de CMI de type bi-modale a été notée pour le cadmium et le mercure dont les taux de 8 µg/ml pour le mercure et 32 µg/ml pour le cadmium ont été proposés comme valeurs limites (critiques) pour distinguer les souches résistantes et sensibles. Par contre, une distribution de type modale a été observée pour le plomb avec une valeur critique très difficile à évaluer. Toutefois, le seuil de 4096 µg/ml a été retenu pour le plomb, en raison de la chute du pourcentage de souches au niveau de la courbe.

2-2-Profil de résistance aux métaux (phénotypes de résistance)

Les phénotypes de résistance les plus fréquents ont concernés le Hg, Pb, HgCd, et à moindre degré HgCdPb avec des variations en fonction des stations, le phénotype HgCd étant le plus répandu parmi les phénotypes de résistance testés (**Tab. 2**). La résistance au Hg a été le plus souvent associée à celle du cadmium. En tenant compte de la mono-résistance, la proportion de souches portant le phénotype de résistance Pb (19.05%) a été significativement plus élevée au niveau de la station 4 comparativement aux proportions

des souches isolées des autres stations 1 (6,32 %), 2 (6,25 %), et 3 (6,12%). De même, la proportion de phénotypes de résistance au mercure est plus marquée au niveau de la station 4 (21,43%) par rapport à la station 3 (10,2%). Dans le cas de multi-résistance, le phénotype HgCd était plus répandu au niveau de la station 1 (32,63 %) et 2 (30,21 %) par rapport à la station 4 (14,29%). De plus, une fréquence plus élevée du phénotype de résistance à HgCdPb a été rencontrée sur des souches de la station 3 (14,29%) en comparaison à celle des autres stations (1,04 à 3,16%).

2-3-Mono-résistance, multiple-résistance et résistance cumulée aux métaux lourds

Exceptés quelques cas, la multi-résistance à 2 métaux a été plus répandue que la mono ou la multi-résistance à 3 métaux (**Tab. 3**). La proportion de germes sensibles a été moins fréquente dans la station 4 versus la station 1. La mono-résistance a été plus commune pour les souches isolées de la station 4 par rapport aux autres stations. Par ailleurs, la résistance à 2 métaux a été exprimée dans une proportion élevée pour les souches de la station 2 que celles des stations 3 et 4. Autre point, la résistance à 3 métaux a été nettement plus fréquente pour les souches de la station 3. La comparaison de la fréquence cumulée des isolats bactériens résistants aux métaux entre stations contaminées ou non par des effluents à rejet métallique, n'a montré aucune différence dans le cas de Hg (42,86-47,92 %) comme l'indique le **Tab. 4** Pour la résistance au cadmium, une différence significative est observée entre la station 4 (27,38 %) et la station 2 ou 3 (42,71-44,9 %). Par contre pour la résistance au plomb, une différence très élevée est notée entre la station 3 (28,57 %) et la station 1 (11,58 %) ou entre la station 4 (33,33 %) et les stations 1 et 2 (11,58-18,75 %).

Tableau 1. Distribution des espèces d'entérobactéries isolées des différentes stations.

Espèces	pourcentage de souches (%)			
	Station1 (95)	Station 2 (96)	Station 3 (98)	Station 4 (84)
<i>Citrobacter spp</i>	22,11	17,7	9,18	13,1
<i>Escherichia coli</i>	50,53	33,3	45,9	53,57
<i>Enterobacter spp</i>	3,16	8,33	5,1	3,57
<i>Klebsiella spp</i>	13,68	27,1	26,5	19,05
<i>Serratia spp</i>	1,05	6,25	5,1	0
NI	9,47	7,29	8,16	10,71

(), nombre de souches; NI, non identifiées.

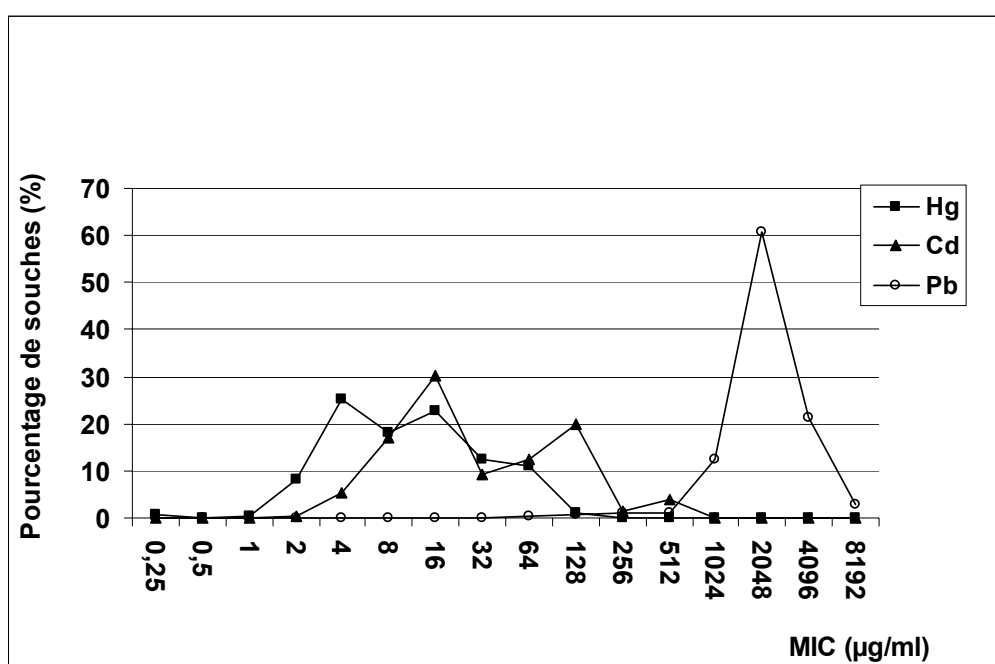


Figure 2. Distribution des CMI du mercure, du cadmium, et du plomb pour les 373 souches d'entérobactéries.

Tableau 2. Distribution des phénotypes de résistance aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries

Phénotype	pourcentage (%) de souches			
	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
	(95)	(96)	(98)	(84)
S	43,16 ^a	34,38	35,71	27,38 ^a
Hg	14,74	12,5	10,2 ^a	21,43 ^a
Cd	1,05	4,17	6,12	3,57
Pb	6,32 ^a	6,25 ^b	6,12 ^c	19,05 ^{abc}
HgCd	29,47 ^a	30,21 ^b	19,39	14,29 ^{ab}
HgPb	1,05	4,17	3,06	4,76
CdPb	1,05 ^{ab}	7,29 ^a	5,1	7,14 ^b
HgCdPb	3,16 ^a	1,04 ^b	14,29 ^{abc}	2,38 ^c

() nombre de souche; ^{a-c} La différence est statistiquement significative (P < 0.05) entre les stations ayant le même exposant pour un phénotype donné; S, sensible

Table 3. Fréquence de mono-résistance et de multi-résistance aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries.

Nombre de facteurs de résistance	Pourcentage (%) de souches résistantes à			
	Station 1 (95)	Station 2 (96)	Station 3 (98)	Station 4 (84)
0	43,16 ^a	34,38	35,71	27,38 ^a
1	22,1 ^a	22,92 ^b	22,45 ^c	44,05 ^{abc}
2	31,58	41,67 ^{ab}	27,55 ^a	26,19 ^b
3	3,16 ^a	1,04 ^b	14,29 ^{abc}	2,38 ^c
résistance globale aux métaux	56,84 ^a	65,62	64,29	72,62 ^a

() nombre de souches; ^{a-d} La différence est statistiquement significative ($P < 0,05$) au niveau des stations ayant le même exposant pour un test donné.

Table 4. Fréquence de la résistance cumulée aux métaux lourds pour les souches d'entérobactéries.

Metal	Pourcentage (%) de souches résistantes au			
	Station 1 (95)	Station 2 (96)	Station 3 (98)	Station 4 (84)
Hg	46,31	47,92	46,94	42,86
Cd	34,74	42,71 ^a	44,9 ^b	27,38 ^{ab}
Pb	11,58 ^{ca}	18,75 ^b	28,57 ^c	33,33 ^{ab}

() nombre de souches; ^{a-d} La différence statistiquement significative ($P < 0.05$) au niveau des stations ayant le même exposant pour un métal donné.

3- Résistance aux antibiotiques

Un panel de 9 antibiotiques a été utilisé pour tester la résistance aux antibiotiques de souches isolées d'eaux usées urbaines ou des oueds contaminés soit par un effluent mixte (eaux usées urbaines et industrielles), soit pollués uniquement par des eaux usées urbaines. La résistance aux antibiotiques de 208 souches est reportée dans la table 5. Les antibiotiques de la famille des tétracyclines (14-61,11 %), l'érythromycine (45,45-68,8 %), la streptomycine (16-24 %) et le furane (8,16-24,1 %) ont conduit aux plus fortes fréquences de résistance. Toutefois, la résistance à la kanamycine (5,45-12,96 %), au triméthoprim-sulphaméthaxazole (8-14,29 %), et au chloramphénicol (2-12,24 %) a été relativement faible. Par contre aucune résistance n'a été notée pour la colistine, la tobramycine et l'amikacine. La résistance aux antibiotiques entre les différents stations a été significative ($P < 0,05$) pour les tétracyclines, le chloramphénicol, l'érythromycine et le furane.

En absence ou en présence de variable discriminative des stations, la comparaison de la résistance aux antibiotiques entre toutes les paires : eau usée et eaux douces ou entre les eaux douces elles-mêmes n'a pas permis de dégager une différence objective (**Tab. 5**). Lorsque le nombre de variables est élevé, l'analyse par les composantes principales (ACP) constitue une alternative pour comparer la résistance aux antibiotiques des souches provenant de différents sites de prélèvement. La discrimination des stations par rapport à l'origine ou à la source de l'eau (eau usée urbaine, eau douce), le niveau de pollution fécale (faible, modérée, forte), la pollution de type métallique (présence, absence de métaux), déchets d'élevage de poulets (présence ou absence de déchets) ont été pris en compte lors de l'analyse de la résistance aux antibiotiques par l'ACP.

Les données de la résistance aux antibiotiques des souches isolées de trois oueds

(Ouricia, Bousselam, El Mallah), et de l'eau usée urbaine (oued Echouk) ont été combinées et toutes les variables ont été codées. Une matrice de corrélation est générée sur la base de toutes les variables codées. Deux composantes ont été extraites, composantes 1 et 2, comptant respectivement pour 31,54 et 14,4 % de la variance de l'antibio-résistance des souches isolées des 4 stations. La première composante a été représentée par la doxycycline, la streptomycine, et l'oxytétracycline; ces antibiotiques contribuant pour environ 50 % de cet axe. La seconde composante a été représentée par l'érythromycine en contribuant pour environ 45 % de cet axe. Les scores de chacune des 208 souches ont été calculés par rapport à la 1^{ère} et la 2^{ème} composante. Les coefficients de corrélation de Spearman entre les scores de 1^{ère} et la 2^{ème} composante des différentes souches et les différentes variables (antibiotiques) ont été reportés au niveau du **Tab. 6**.

Les tests statistiques utilisés pour comparer les scores des composantes principales 1 et 2 directement en fonction de la station ou en tenant compte des caractéristiques des stations (degré de pollution fécale, origine de l'eau,) sont résumés dans le **Tab. 7**. Des différences significatives ($P < 0,05$) ont été observées entre les stations en tenant compte de la pollution fécale ou de la source de l'eau par rapport aux scores des composantes 1 et 2. De même, une différence a été observée entre les différentes stations en rapport aux scores de la composante 1. En tenant compte de la pollution fécale, la comparaison multiple des valeurs de p a révélée que des différence existent entre le niveau élevée et modéré pour les scores de la composante 1 ou entre le niveau faible et élevé modéré pour les scores de la composante 2. Aussi pour les stations, la comparaison multiple des valeurs de p a montré une différence entre les stations 3 et 2 pour les scores de la composante 1. Par contre, aucune différence n'a été observée entre les différentes stations soumises ou non à la pollution à caractère métallique et/ou due aux rejets des élevages de poulets.

Tableau 5. Incidence de la résistance aux antibiotiques pour les souches d'entérobactéries

Antibiotique	Pourcentage (%) de souches résistantes aux antibiotiques			
	Station 1 (54)	Station 2 (50)	Station 3 (55)	Station 4 (49)
A	0	0	0	0
Tm	0	0	0	0
Co	0	0	0	0
S	24,07	16	20	20,41
K	12,96	8	5,45	12,24
Te	61,11 ^a	34 ^{ab}	56,36 ^b	44,9
Ot	33,33 ^a	30 ^b	50,91 ^{ab}	40,82
Do	35,19 ^a	14 ^{abc}	41,82 ^b	32,65 ^c
Sxt	11,1	8	9,09	14,29
F	24,1 ^a	10	18,18	8,16 ^a
E	68,5 ^a	62	45,45 ^a	57,14
C	11,1	2 ^a	10,91	12,24 ^a

() number of strains; ^{a-c} différence statistiquement significative ($P < 0.05$) au niveau des stations ayant le même exposant pour un antibiotique donné ; C, chloramphénicol ; Sxt, triméthoprim/sulphaméthoxazole ; A, amikacine ; K, kanamycine ; Te, tetracycline ; Ot, oxytétracycline ; Do, doxycycline ; S, streptomycine, Co, colistine ; F, furan ; E, érythromycine ; Tm, tobramycine

Tableau 6. Coefficients de corrélation de Sperman entre les scores et les variables sur les axes des composantes principales 1 et 2.

Variable	Composante principale 1	Composante principale 2
S	0,655*	NS
K	0,411*	0,188*
Te	0,522*	-0,520*
Ot	0,787*	-0,221*
Do	0,788*	NS
Sxt	0,410*	NS
F	0,159*	0,443*
E	NS	0,797*
C	0,470*	0,165*

* $P < 0,05$

NS non significative

Table 7. Différences établies entre les scores des composantes principales 1 et 2 par rapport aux caractéristiques des stations et suivant les tests statistiques utilisés

Facteur	axes ACP	Scores des stations par ordre ¹ de grandeur	Test statistique utilisé
Degré de pollution fécale	Composante principale 1	élevée > modérée	K. W. ² p = ,0000
Origine de l'eau		eau douce > eau usée urbaine	M. W. ³ p = 0,0309
Station		3 > 2	K. W. p = ,0174
Degré de pollution fécale	Composante principale 2	faible > élevée	K. W. p=0,0343
Origine de l'eau		eau douce > eau usée urbaine	M. W. p=0,0095

¹: ordre de grandeur des scores des stations a été effectué par la comparaison multiple des valeurs de p. ²:K. W.: test de Kruskal-Wallis. ³:W.: test de Mann-Whitney

4-Analyse du profil plasmidique

4-1-Distribution des plasmides

Les pourcentages des souches porteuses de plasmides sont consignés dans le **Tab. 8** en étant établis sur la base de l'analyse des images de gels au niveau des **Fig. 3, 4 et 5** (marqueur taille 1) ou des **Fig 6, 7** (marqueur taille 2). L'analyse de ces pourcentages, par rapport au marqueur de taille 1 (≤ 56 Kb), a montré qu'il existait une différence entre la station 1 et les trois autres stations (2, 3, 4), mais cette différence n'était pas significative au seuil de 0,05. Inversement; par rapport au marqueur de taille 2 ($\leq 8,57$ Kb) une différence significative a été notée entre les pourcentages des souches isolées des stations 3 et 1 ou 4.

4-2-Corrélation entre la résistance aux métaux lourds et la présence des plasmides

Aucune corrélation n'a été établie entre la résistance aux métaux lourds et la présence de plasmides car des souches porteuses de plasmides se sont avérées sensibles aux métaux, et inversement des souches non porteuses de plasmides ont manifesté une résistance (**Tab. 9**).

Tableau 8. Frequence de la distribution des plasmides pour les souches d'*E. coli*.

Station	% d' <i>E. coli</i> avec plasmides	
	Marqueur de taille de l'ADN 1 (≤ 56 Kb)	Marqueur de taille de l'ADN 2 (≤ 8.57 Kb)
Station 1	50 (10)	30 ^a (10)
Station 2	33,33 (9)	71,43 (7)
Station 3	30 (10)	100 ^{ab} (10)
Station 4	33,33 (9)	62,5 ^b (8)

() nombre de souches testées; ^{a-b} La différence est statistiquement significative ($P < 0.05$) au niveau des stations ayant le même exposant pour un marqueur donné.

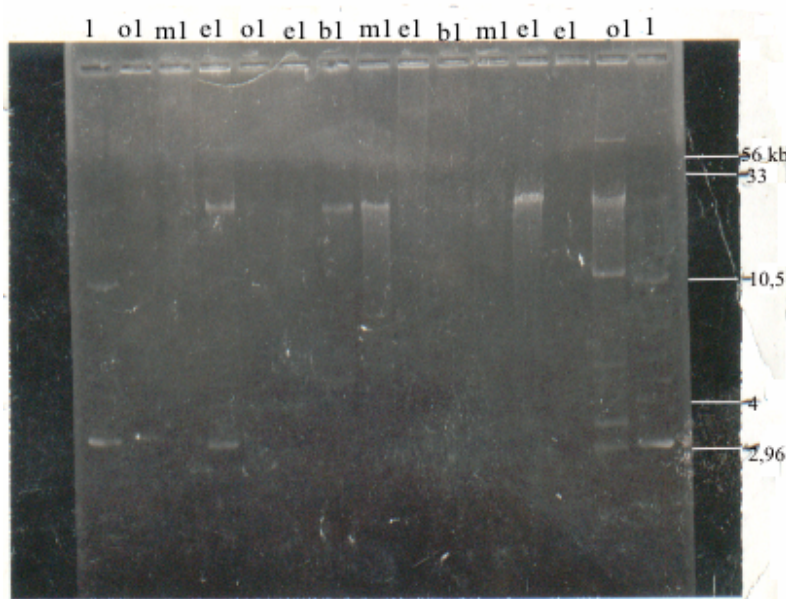


Figure 3. Profil plasmidique de différentes souches *E. coli* traitées par le marqueur de taille 1 (el:souches isolées de la station 3, ml: souches isolées de la station 4, ol:souches isolées de la station 4, bl?: souches isolées de la station 2, l : marqueur de taille 1).

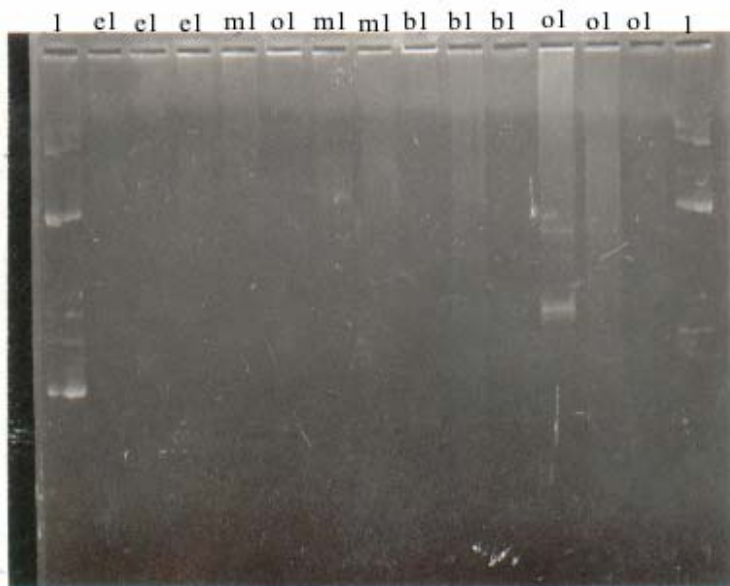


Figure 4. Profil plasmidique de différentes souches *E. coli* traitées par le marqueur de taille 1 (e1:souches isolées de la station 3, m1: souches isolées de la station 4, o1:souches isolées de la station 4, b1:? souches isolées de la station 4, 1 : marqueur de taille 1).

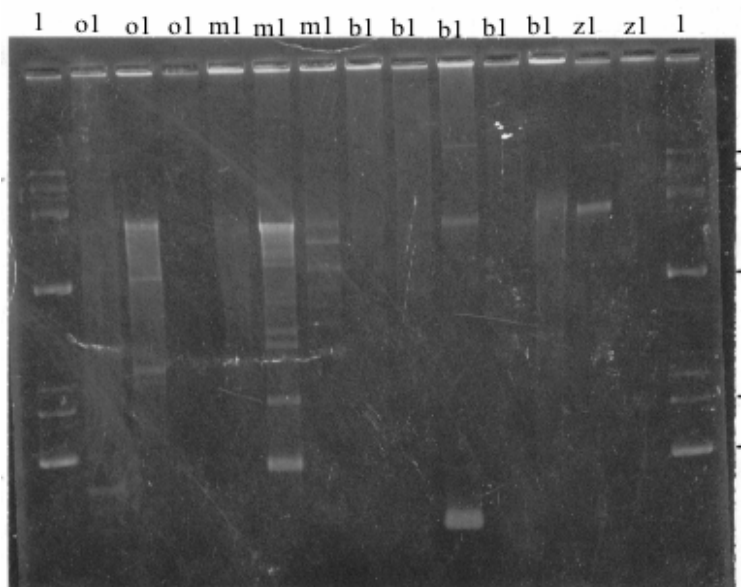


Figure 5. Profil plasmidique de différentes souches *E. coli* traitées par le marqueur de taille 1 (e1:souches isolées de la station 3, m1: souches isolées de la station 4, o1:souches isolées de la station 4, b1: souches isolées de la station 4, 1 : marqueur de taille 1)

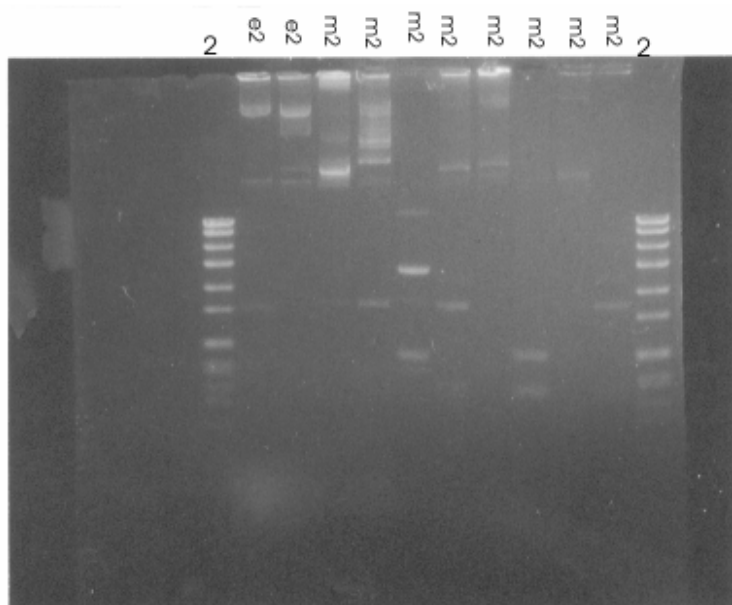


Figure 6. Profil plasmidique de différentes souches *E. coli* traitées par le marqueur de taille 2 (m2:souches isolées de la station 3, e2: souches isolées de la station3, 2 : marqueur de taille 2)

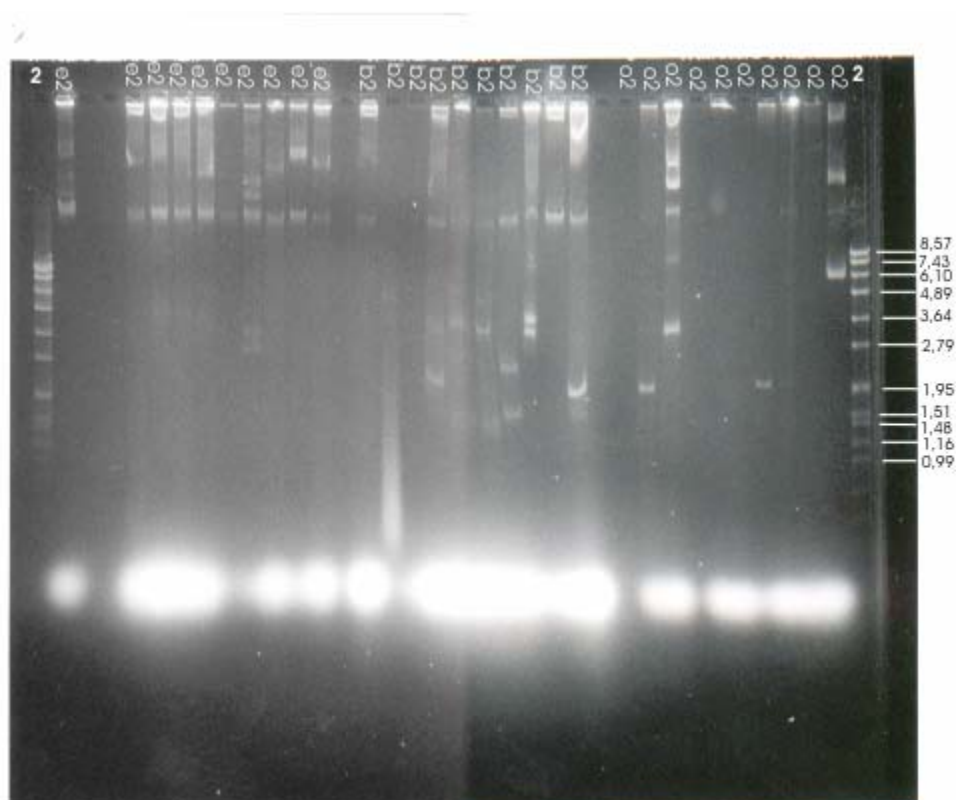


Figure7. Profil plasmidique de différentes souches *E. coli* traitées par le marqueur de taille 2 (o2 : souches isolées de la station 1, e2: souches isolées de la station 3, b2 : souches isolées de la station 2, 2 : marqueur de taille 2).

Table 9. Corrélation métaux lourds et plasmides

Nombre de <i>E. coli</i> testés	Présence ou absence de plasmides	Résistance à		
		Hg	Cd	Pb
3	-	-	-	-
1	-	+	-	-
23	-	+	+	-
2	-	-	+	+
1	-	+	-	+
7	-	+	+	+
4	+	-	+	-
2	+	+	-	-
18	+	+	+	-
1	+	+	-	+
3	+	-	+	+
5	+	+	+	+
3	+	-	-	-

5-Etude de la survie de deux souches d'*E. coli* (sensible et résistance au Pb(NO₃)₂)

L'observation du nombre de souches survivantes fonction du temps pour les deux souches : *E. coli* Pb^R (**Fig. 8**) et *E. coli* Pb^S (**Fig. 9**) a montré que ce nombre a commencé à décliner progressivement à partir du 23^{ème} et 8^{ème} jour respectivement aux températures 10 et 30 °C. A 37 °C, le déclin s'était amorcé dès le 2^{ème} et le 8^{ème} jour respectivement pour *E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^S. L'examen du pourcentage du nombre de cellules survivantes, calculé selon une période de 4 semaines a permis de fournir une indication de la survie des 2 souches en fonction du temps et de la température. En effet, il a été constaté que le nombre de souches survivantes n'était pas significativement différent ($P=0,001$) pour les deux souches de *E. coli* qu'entre la 1^{ère} et la 4^{ème} semaine, ou entre 10 et 37 °C.

Les vitesses d'élimination (**Tab. 10**) des 2 souches ont augmenté parallèlement en fonction de l'accroissement de la température et du temps d'incubation, car une constante plus négative indique une vitesse plus élevée. De même, le temps de réduction décimale (T_{90}) (**Tab. 10**) décroît quand la température augmente, celui-ci variant entre 32,9-76,8, 19,2-20,9, et 6,8-7,4 respectivement pour la température 10, 30, et 37 °C. Toutefois, la vitesse d'élimination est plus significative ($P<0,05$), seulement pour la souche sensible, entre 37°C et 10° ou 30° C, et entre la 4^{ème} et la 1^{ère}, la 2^{ème} ou la 3^{ème} semaine. L'analyse de la variance de la constante d'élimination (K) n'a pas montré de différence significative entre les 2 souches, ni en fonction du temps, ni en fonction de la température (**Fig. 10**). Ainsi, en se basant sur le T_{90} , il apparaît que le gradient de survie peut être classé de la façon suivante: 10 °C > 30 °C > 37 °C, *E. coli* Pb^S 10 °C > *E. coli* Pb^R, 10 °C et *E. coli* Pb^R, 30 °C > *E. coli* Pb^S 30 °C.

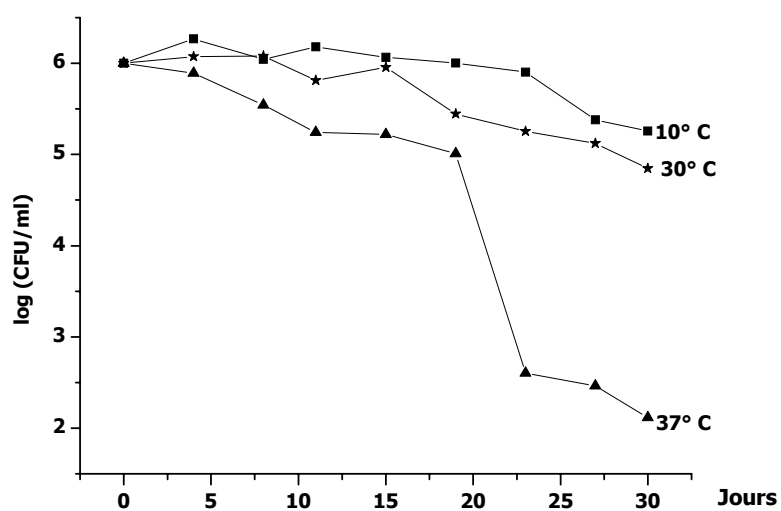


Figure 8. Evolution du nombre de germes survivants pour *E. coli* Pb^R

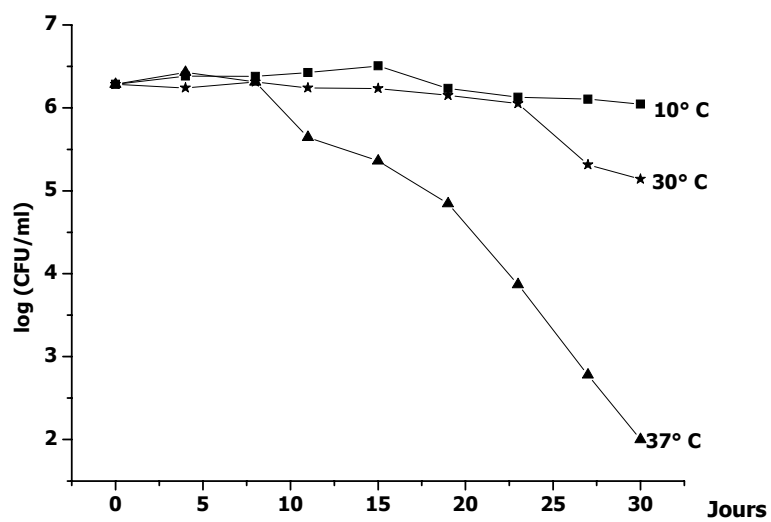


Figure 9. Evolution du nombre de germes survivants pour *E. coli* Pb^S.

Tableau 10 : Constantes d'élimination (**K**) et T_{90} des souches *E. coli* (*E. coli* Pb^S . *E. coli* Pb^R).

Paramètre	<i>E. coli</i> Pb ^S		<i>E. coli</i> Pb ^R	
	K (J ⁻¹)	T ₉₀	K (J ⁻¹)	T ₉₀
10°C	-0,03 ^a	76,8	-0,07	32,9
30°C	-0,12 ^b	11,5	-0,11	21,2
37°C	-0,34 ^{ab}	6,8	-0,31	7,5
1 ^{ère} semaine	-0,08 ^a	28,8	-0,08	28,8
2 ^{ème} semaine	-0,10 ^b	23,0	-0,07	32,9
3 ^{ème} semaine	-0,20 ^c	11,5	-0,39	5,9
4 ^{ème} semaine	-0,48 ^{abc}	4,8	-0,26	8,9

^{a-c} Différence statistiquement significative pour un paramètre au niveau de la même colonne.

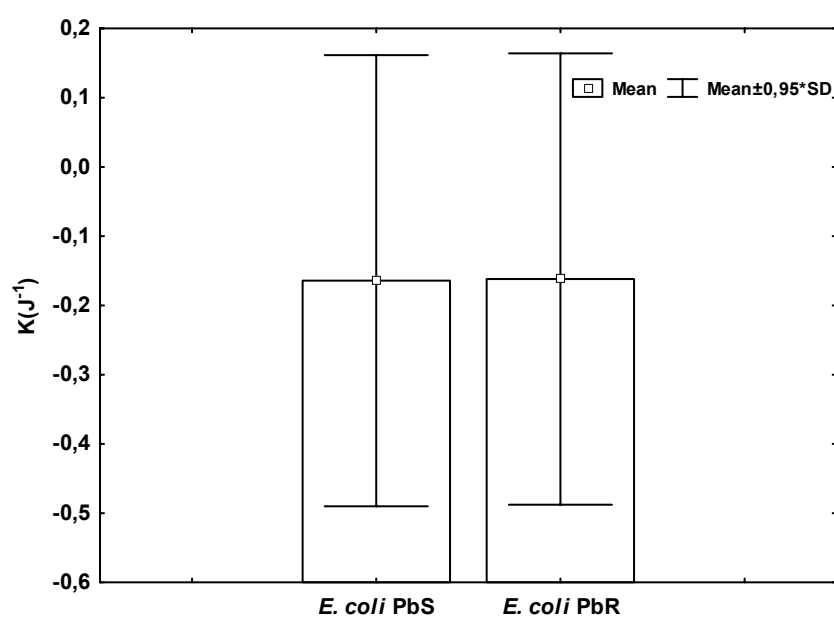


Figure 10. Constante d'élimination (**K**) moyenne de *E. coli* Pb^S et *E. coli* Pb^R.

6-Seuil d'halotolérance

Les essais d'halotolérance (**Fig. 11**) sur des souches de *E coli* isolées de différentes stations ont montré une gamme relativement large de réponses. La majorité des souches (63 à 81%) ont montré un seuil d'halotolérance de 0,5 M NaCl. En ce qui concerne les autres salinités (0,17, 0,68 et 0,85 M NaCl), le pourcentage de souches tolérantes a varié en fonction de la salinité et de la station de prélèvement. Pour une salinité extrême de 0,85 M, il a été constaté un pourcentage 1,9 à 3,4 fois plus élevé de souches halotolérantes au niveau de la station 4 en comparaison aux stations. Cependant l'analyse de variance (**Fig. 12**) n'a pas montré de différence significative ($P=0,05$) entre les différentes stations. De même aucune différence significative ($P=0,05$) n'a été remarquée lors des comparaisons multiples, entre les différentes stations, pour chacun des seuils testé d'halotolérance.

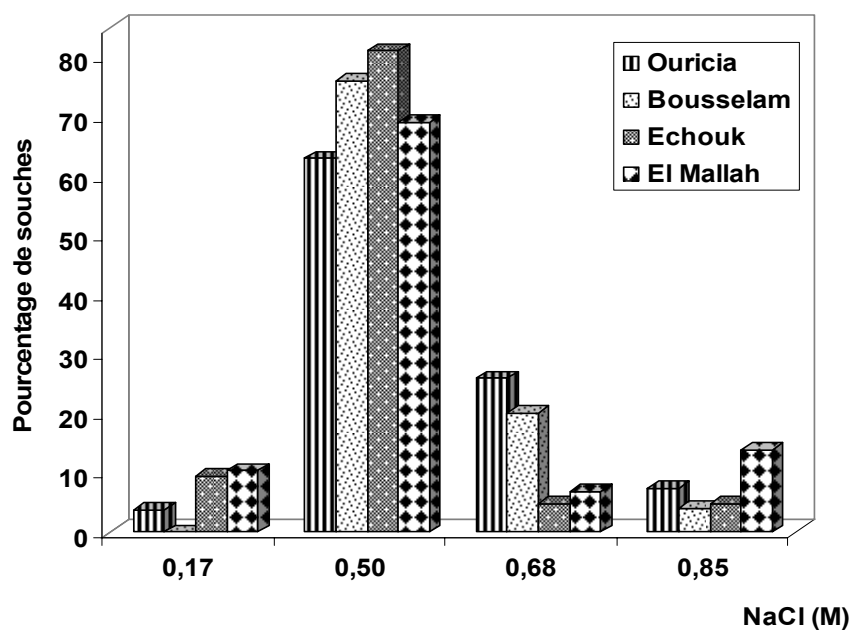


Figure 11. Distribution des seuils d'halotolérance des souches de *E. coli* au niveau des différentes stations

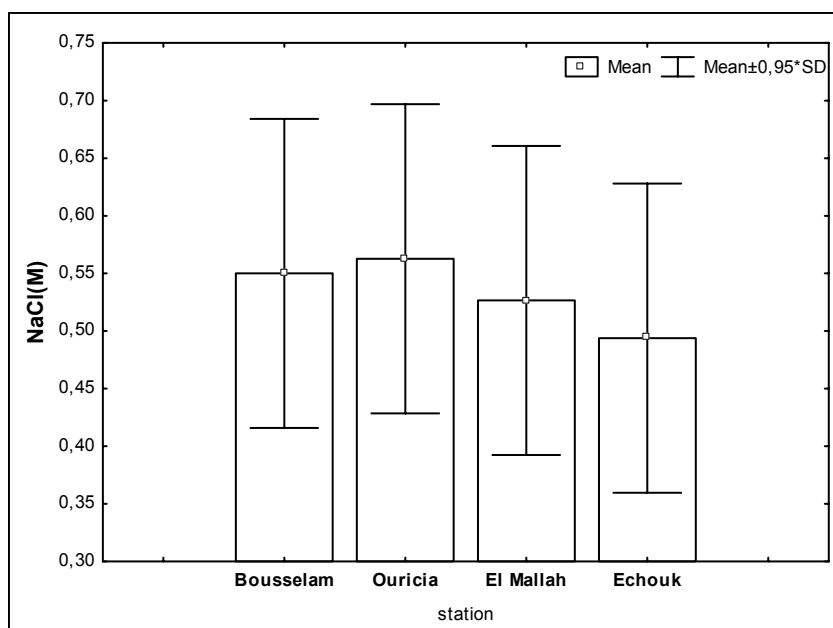


Figure 12. Seuil d'halotolérance moyen des souches d'*E. coli* au niveau des différentes stations.

7- Etude de la croissance

L'effet de la salinité, du pH, et de la température sur la croissance de *E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^R en employant le milieu trypticase soja glucosé a été évaluée en absence et en présence de concentration sub-inhibitrice et inhibitrice de Pb(NO₃)₂. Après addition du plomb dans le bouillon trypticase soja, une précipitation a été remarquée et a été corrigée par des blancs. Les densités optiques sont converties en pourcentage en prenant comme référence pour *E. coli* Pb^R (Do=2,39 obtenue à 37° C, pH 7,2, 5 g/l NaCl, 0 µg/ml Pb²⁺) et *E. coli* Pb^S (Do=2,49 obtenue à 37° C, pH 7,2, 5 g/l NaCl, 0 µg/ml Pb²⁺). Les interactions entre facteurs ont été traitées globalement par l'analyse de la variance à deux facteurs (Pb*pH), (Pb*T°), et (Pb*NaCl), cette analyse ayant révélé que seule l'interaction (Pb*T°) était significative (P<0,05).

Pour la souche *E. coli* Pb^R, en absence ou en présence de concentration sub-inhibitrice de plomb (32 µg/ml), une réduction graduelle de la croissance a été notée parallèlement à l'augmentation de la salinité, la croissance passant de 60 % à 5 g/l de NaCl à moins de 20 % à 60 g/l de NaCl (**Fig. 13**). La concentration inhibitrice de plomb (4096 µg/ml) s'était révélée toxique quelque soit la salinité, car dans les meilleurs des cas, aucune croissance n'avait dépassé les 20 %. La différence de croissance de *E. coli* Pb^R entre 0 ou 32 µg/ml et 4096 µg/ml de Pb²⁺ a été significative (P<0,05) pour toutes les salinités à l'exception de celle à 60 g/l.

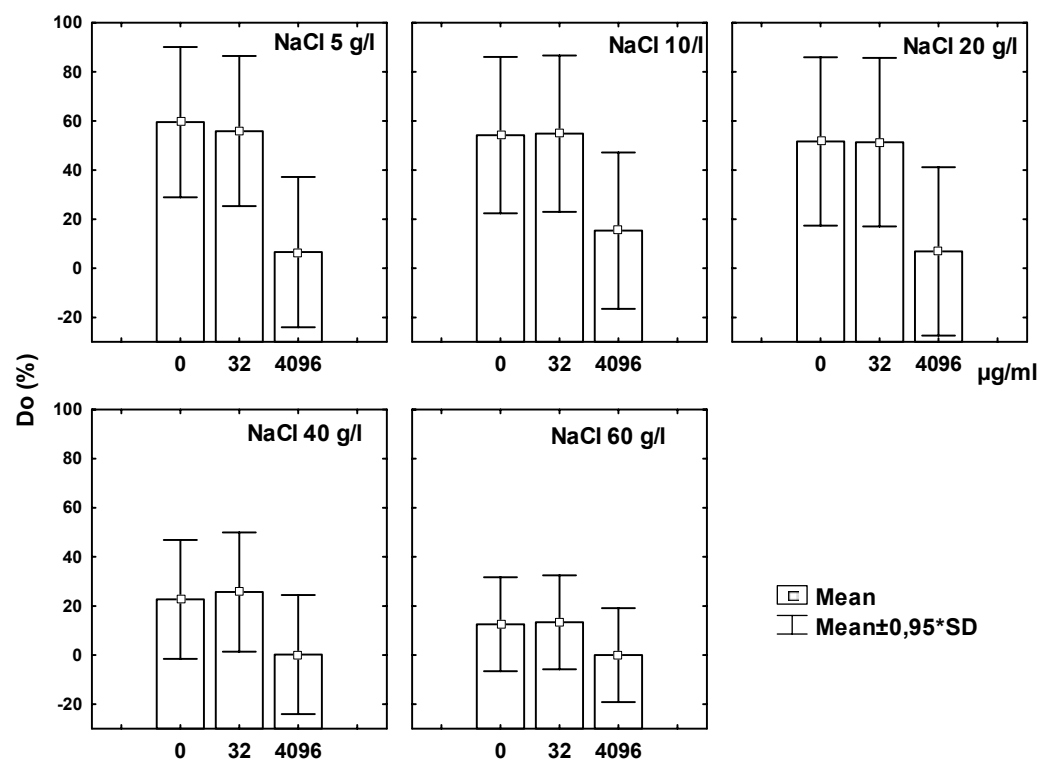


Figure 13. Effet de la concentration en $Pb(NO_3)_2$ sur la croissance de *E. coli* Pb^R en fonction de la salinité

Les niveaux de croissance de *E. coli* Pb^R à pH 4,5 ou à pH 9,0 ont été comparables (**Fig. 14**), la concentration inhibitrice du Pb²⁺ restant toxique même à pH alcalin. La meilleure croissance a été remarquée à pH 7,2 pour des concentrations de 0 ou 32 µg/ml de Pb²⁺, se situant à environ 60% et représentant 2 ou 3 fois les niveaux enregistrés à pH 4,5 ou 9,0. La différence de croissance de *E. coli* Pb^R entre 0 ou 32 µg/ml et 4096 µg/ml de Pb²⁺ est significative (P<0,05) pour toutes les valeurs de pH.

A 10 °C, les niveaux de croissance de *E. coli* Pb^R à 0, 32 et 4096 µg/ml ont été identiques (**Fig. 15**), Les taux de croissance en absence ou en présence de 32 µg/ml de Pb²⁺ ont été du même ordre en augmentant parallèlement avec la température avec des niveaux d'environ 5 % à 10 °C à plus de 60 % à 37 °C. La concentration inhibitrice n'était pas affectée par la température. Un léger effet stimulant sur la croissance a été observé pour 32 µg/ml de Pb²⁺ à 37 °C. La différence de croissance de *E. coli* Pb^R entre 0 et 32 µg/ml et 4096 µg/ml de Pb²⁺ était significative (P<0,05) pour toutes les températures à l'exception de celle à 10 °C.

En comparaison à *E. coli* Pb^R, la croissance de *E. coli* Pb^S n'était pas affectée généralement par la concentration inhibitrice du plomb (256 µg/ml) (**Fig. 16**), En absence ou en présence de concentration sub-inhibitrice de plomb (32 µg/ml) et inhibitrice du plomb (256 µg/ml), une réduction graduelle de la croissance a été notée parallèlement à l'augmentation de la salinité, la croissance passant d'environ 60 % à 5 g/l de NaCl à près de 10 % à 60 g/l de NaCl. La différence de croissance de *E. coli* Pb^S entre 0, 32, et 256 µg/ml de Pb²⁺ n'était pas significative (P>0,05) pour toutes les salinités.

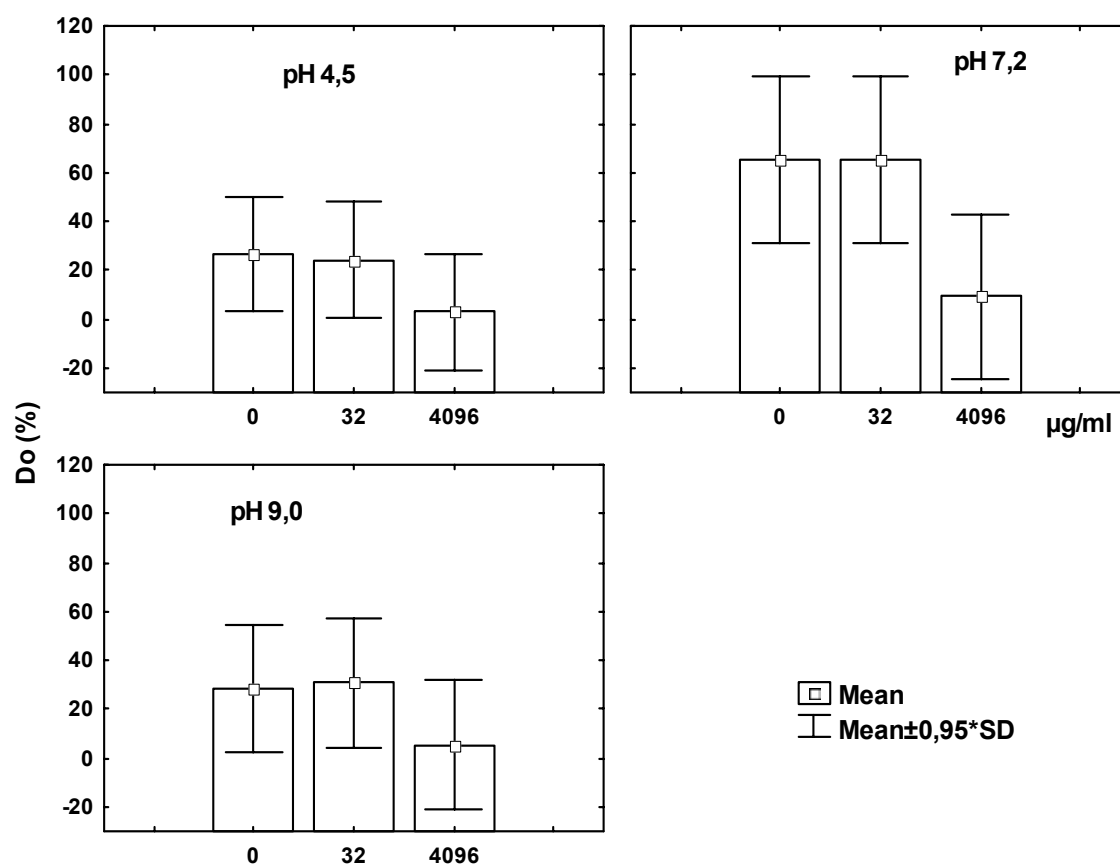


Figure 14. Effet de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur la croissance de *E. coli* Pb^R en fonction du pH.

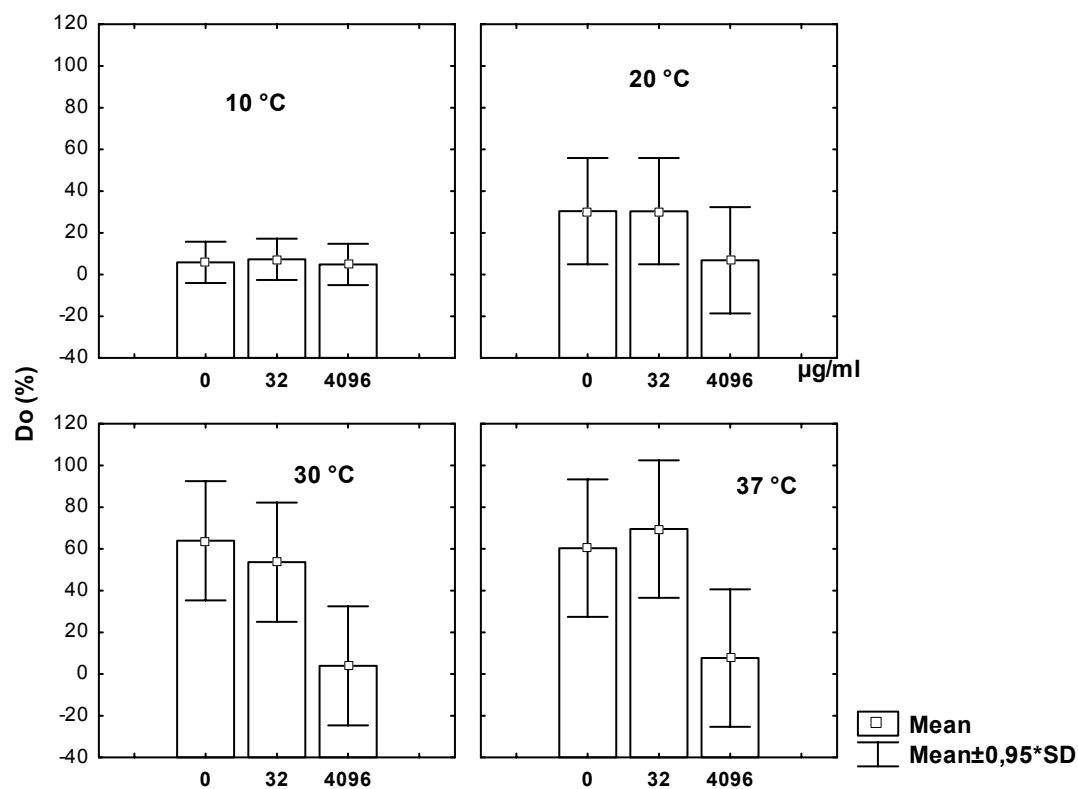


Figure 15 : Effet de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur la croissance de *E. coli* Pb^R en fonction de la température.

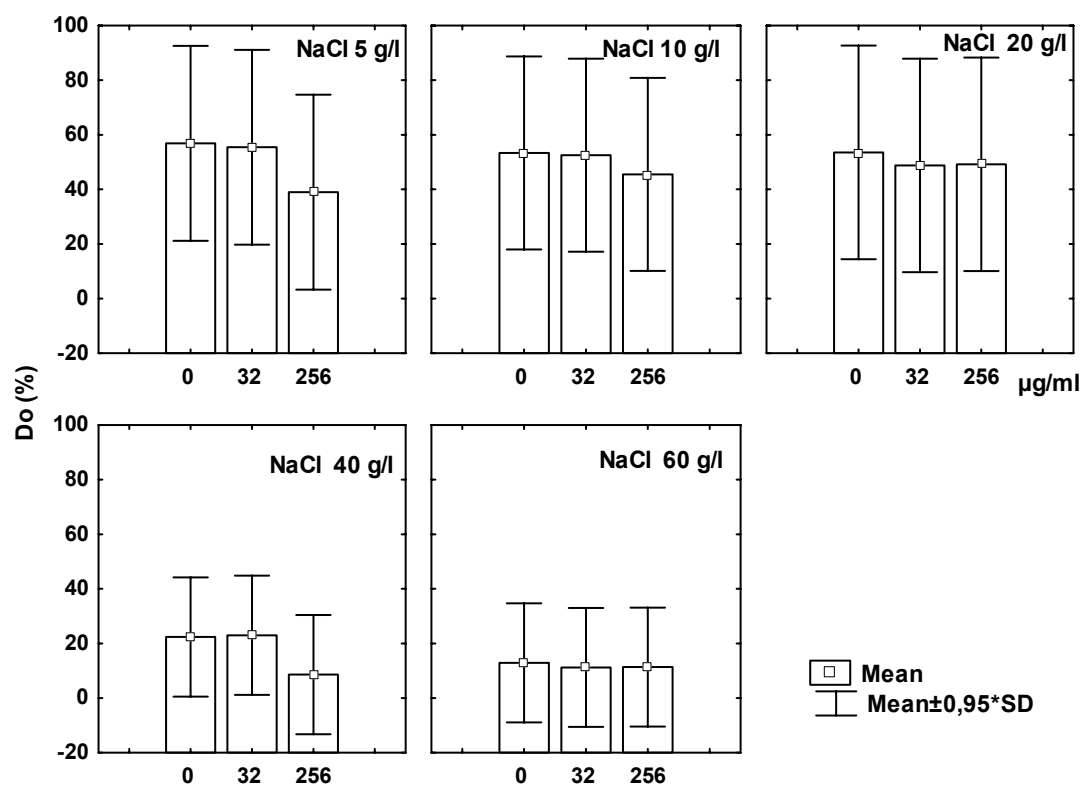


Figure 16. Effet de la concentration en $Pb(NO_3)_2$ sur la croissance d'*E. coli* Pb^S en fonction de la salinité.

Les taux de croissance de *E. coli* Pb^S à pH 9,0 ont été relativement plus élevés que ceux observés à pH 4,5 (**Fig. 17**), les meilleurs niveaux de croissances étant constatés à pH 7,2. la concentration inhibitrice du Pb²⁺ a été toxique à pH acide et alcalin avec moins d'effet sur la croissance à pH 7,2. La différence de croissance de *E. coli* Pb^S entre 0 et 32 µg/ml et 256 µg/ml de Pb²⁺ n'était pas significative ($P>0,05$) pour toutes les valeurs de pH.

De la même manière que pour *E. coli* Pb^R, à 10°C, les niveaux de croissance de *E. coli* Pb^S à 0, 32 et 256 µg/ml de Pb²⁺ ont été identiques (**Fig. 18**). Les niveaux de croissance en absence et en présence de 32 ou 256 µg/ml ont été du même ordre et ont augmenté parallèlement avec la température, ces niveaux passant d'environ 5 % à 10 °C à plus de 60 % à 37 °C. La concentration inhibitrice n'a pas été affectée par la température. Tout comme précédemment, un léger effet inhibiteur sur la croissance a été constaté avec 256 µg/ml de Pb²⁺ à 30 et 37 °C par comparaison aux niveaux observés avec 0 ou 32 µg/ml. La différence de croissance de *E. coli* Pb^S entre 0 et 32 µg/ml et 256 µg/ml de Pb²⁺ n'était pas significative ($P>0,05$) pour toutes les températures.

8-Accumulation du plomb

Les résultats de l'accumulation du plomb pour les deux souches de *E. coli* (Pb^R et Pb^S) sont résumés dans le **Tab. 11**. En tenant compte des concentrations de Pb²⁺ accumulées en fonction du pH du bouillon trypticase soja, le gradient d'accumulation a différé selon la souche : pH 9 > pH 4,5 > pH 7 (*E. coli* Pb^R), pH 4,5 > pH 9 = pH 7 (*E. coli* Pb^S). De plus, une différence de l'accumulation du Pb²⁺ dans le milieu trypticase soja a été constaté entre les 2 souches. Il ressort de ces résultats que la souche sensible a accumulé plus de plomb que la souche résistante particulièrement pour les pH 4,5 et 7,0.

Cependant, l'analyse de variance n'a démontré aucune différence significative,

concernant l'accumulation, que ce soit entre les 2 souches (**Fig. 19**) ou entre le milieu d'incubation. Les cultures de la souche sensible en bouillon trypticase soja ont fait apparaître en présence de plomb dans la plupart des cas un précipité noir intracellulaire.

L'examen par microscopie à transmission des souches a montré que *E. coli* Pb^S (**Fig. 20a**) était plus opaque que *E. coli* Pb^R (**Fig. 21a**). En tenant compte que la souche sensible, à l'inverse de la souche résistante, a été examinée au microscope à transmission sans addition de produit de contraste, en l'occurrence le plomb ou l'uranium, il est évident que la souche sensible a accumulé plus de plomb que la souche résistante. En effet, l'analyse d'image par le logiciel image J (**Fig. 20b**, *E. coli* Pb^S; **Fig. 21b**, *E. coli* Pb^R) a montré que le nombre de pixels correspondant aux zones noires (pixels :0-26), c'est-à-dire les zones chargées de métaux donc opaques aux électrons, était supérieur pour la souche sensible mais n'était pas significatif ($P = 0,0562$) au seuil $\alpha=0,05$.

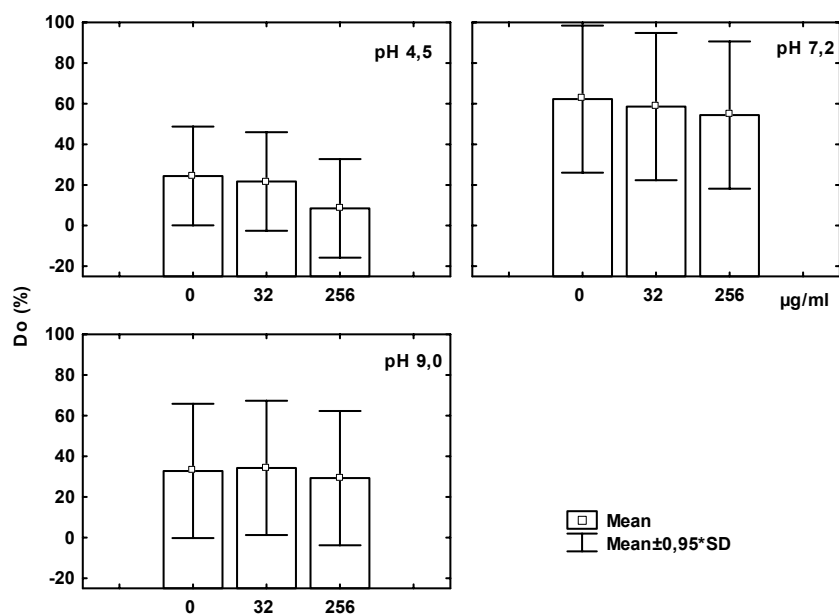


Figure 17. Effet de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur la croissance d'*E. coli* Pb^S en fonction du pH.

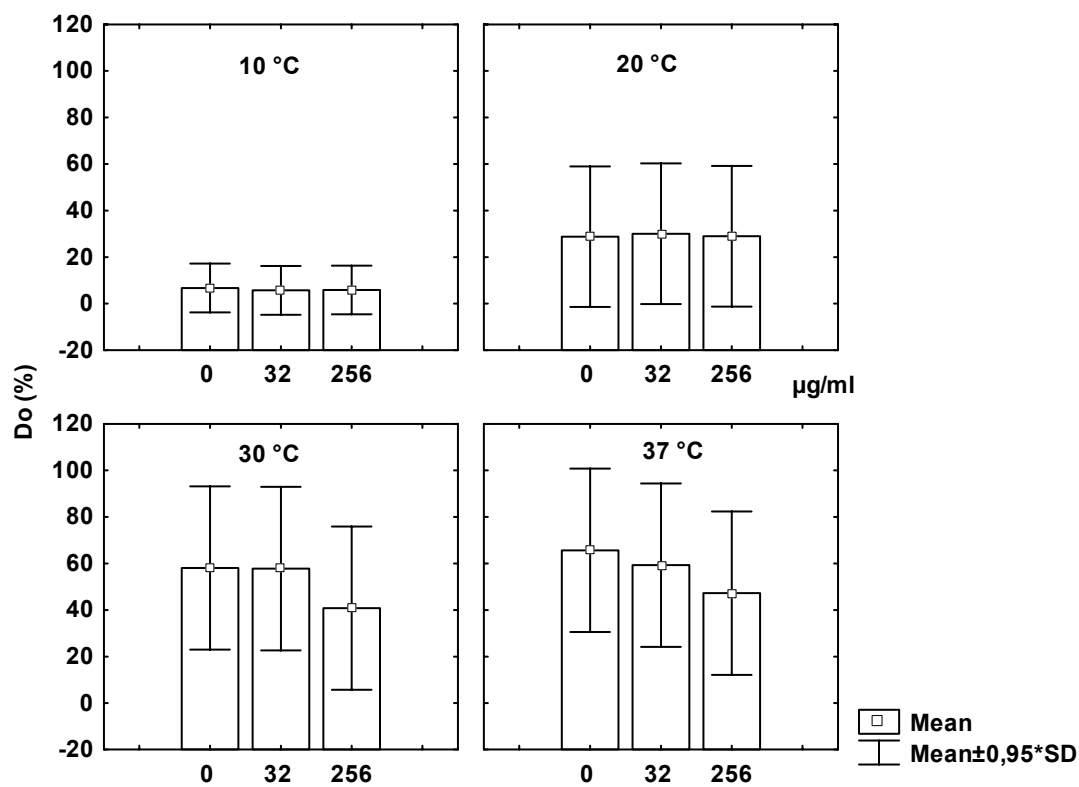


Figure 18. Effet de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur la croissance d'*E. coli* Pb^S en fonction de la température.

Tableau 11 : Teneurs en plomb accumulées par *E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^S.

N° Echantillon	Milieu d'incubation	Milieu	Pb (ng/mg MS.)	
			<i>E. coli</i> Pb ^R	<i>E. coli</i> Pb ^S
1	Milieu	BTS, pH 7	91	635
2	Milieu	BTS, pH 9,0	886	692,6
3	Milieu	BTS, pH 4.5	537,6	2773
4	Eau	Eau usée urbaine	2393,65	1849,80
6	Eau	Eau douce	1213,80	1305,50

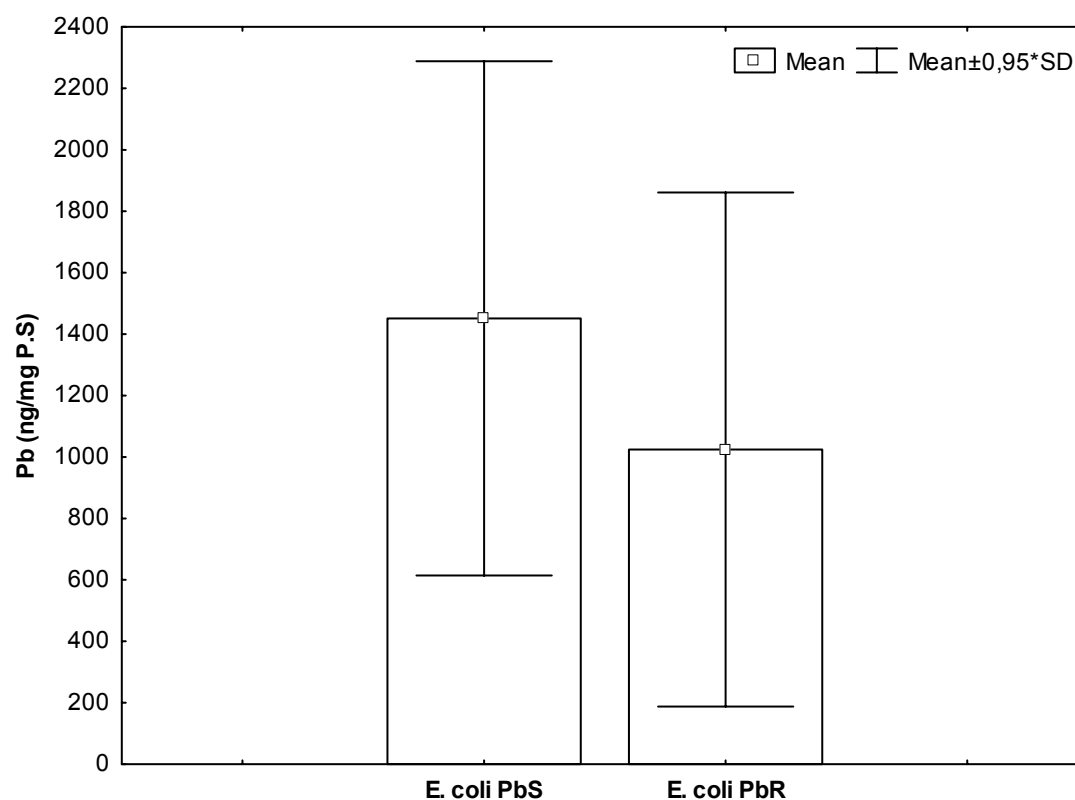


Figure 19. Accumulation du plomb au niveau de *E. coli* Pb^R et *E. coli* Pb^S

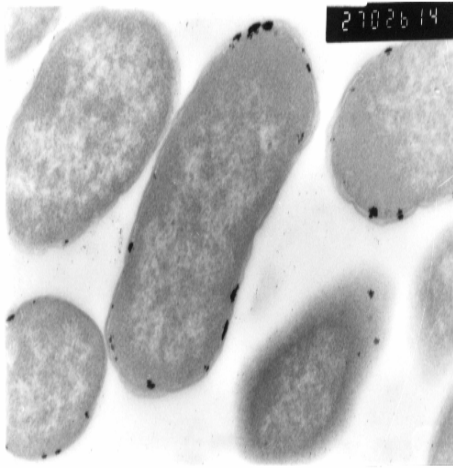


Figure 20a : Micrographie (x 27000) au MET de cellules *E. coli* Pb^S incubée en présence de 10 mg/l de Pb(NO₃)₂, non colorées.

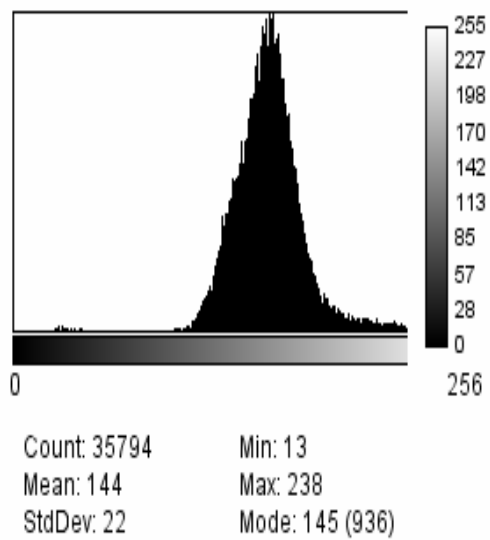


Figure 20 b :Histogramme de distribution des pixels chez *E. coli* Pb^S.

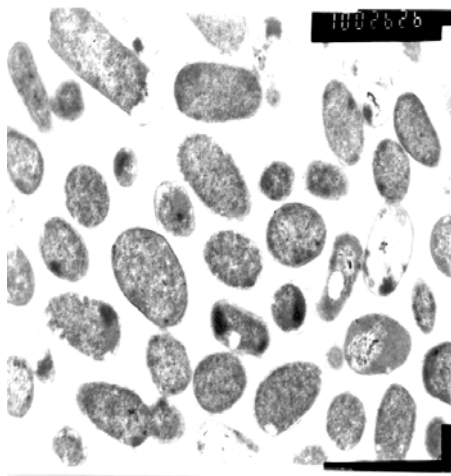


Figure 21a : Micrographie (x 10000)
au MET de La souche *E. coli* Pb^R incubée
en présence de 10 mg/l de Pb(NO₃)₂,
colorée à l'acétate d'uranyl

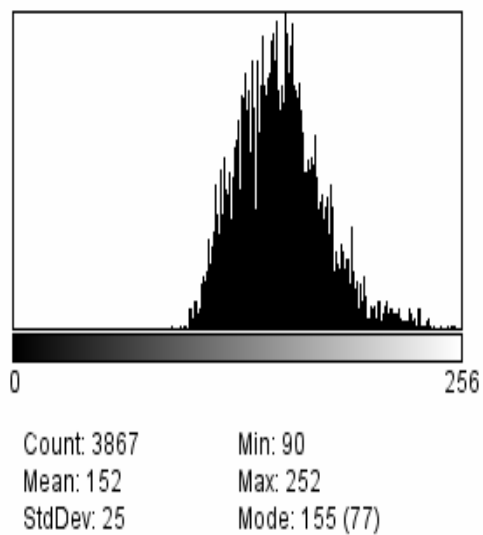


Figure 21b :Histogramme de distribution
des pixels chez *E. coli* Pb^R

DISCUSSION

DISCUSSION

Les concentrations de HgCl_2 , de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de CdCl_2 , déterminées d'après les courbes de CMI et permettant de différencier les souches sensibles des souches résistantes, sont concordants avec les études de Groves *et al.* 1975, de Antai, 1987, et de Grewal *et al.* 1990. En revanche, les valeurs obtenues diffèrent de celles d'autres auteurs (Jones *et al.*, 1986; Niemi *et al.*, 1983). Cette différence dans la détermination de la concentration critique peut avoir plusieurs explications : i) la méthode de détermination de la CMI (en milieu liquide, en milieu solide en utilisant des disques ou par incorporation), ii) type de milieu (milieu riche ou pauvre), iii) nature du sel métallique utilisé, iv) type de bactéries utilisées, car tous ces facteurs peuvent avoir une grande influence sur la toxicité des métaux et par conséquent sur les valeurs des CMI.

Au niveau des stations 1 et 2, la fréquence élevée du phénotype de résistance au HgCd est probablement liée : i) à la composition des genres et des espèces bactériennes de ces stations, ii) aux conditions spécifiques de ces stations favorisant la prolifération de ce phénotype, iii) à l'origine non humaine des souches isolées au niveau de ces stations, iv) aux conditions régnantes au niveau des stations 3, 4 et qui peuvent avoir un effet répressif sur l'apparition de ce phénotype. La surveillance des phénotypes de résistance aux métaux lourds ou la détermination des CMI des métaux lourds chez des souches bactériennes, isolées sur des milieux non additionnés de métaux puis sélectionnées aléatoirement, constitue une méthode de choix pour détecter une pollution par les métaux lourds ou pour discriminer entre les cours d'eau pollués ou non par les métaux lourds.

Ainsi, le pourcentage élevé de souches porteuses du phénotype de résistance au Pb observé à la station 4 (El Mallah) pourrait expliquer la pollution de type métallique (Pb)

induite par les effluents de la manufacture de batteries à base de plomb. Des études antérieures avaient notées que les fréquences élevées de germes résistants aux métaux rencontrés dans un site donné sont liées aux pressions sélectives exercées par les métaux lourds au sein de ce site (Al-Jebouri, 1985; Zelibor *et al.*, 1987b; Diaz-Ravina *et al.*, 1994). Cependant, la fréquence élevée du phénotype de résistance au Hg observée chez les souches isolées de la station 4 reste incompréhensible car non en rapport avec le phénomène de pollution ou de pression sélective étant donné qu'il n'existe pas de source identifiable ou d'une ancienne pollution par le mercure. L'explication réside peut être dans la distance parcourue de près de 20 km par les eaux usées de la station 3 et leur déversement dans l'oued El Mallah (station 4). Cette situation pourrait favoriser une telle fréquence en raison du temps alloué aux processus de transfert de plasmides de résistance aux métaux lourds entre les souches (Ünaldi Coral *et al.*, 2005; Dionisio *et al.*, 2002 ; Ghosh *et al.*, 2000).

Le faible pourcentage de phénotype de résistance au Cd constaté sur des souches de la station 4 en comparaison à la station 3, pourrait être en rapport avec la salinité des sols, et interfère probablement avec le mécanisme d'efflux du cadmium (Silver and Walderhaug, 1992). La résistance globale aux métaux n'est pas influencée par le degré de pollution fécale. Dans cette étude, il ressort que les eaux des stations 1, 2 et 3 non exposées à des rejets de type métallique ont comporté des bactéries résistantes aux métaux lourds ce qui suggère l'existence d'autres facteurs que la sélection directe (pression sélective des métaux lourds), pour promouvoir ce type de résistance. Ce présent travail a également démontré que la différence de résistance à certains antibiotiques constatée sur des souches d'entérobactéries isolées de différentes stations de prélèvement n'était pas reliée au degré de pollution fécale. Miranda et Castillo (1998) ont abouti à des résultats

similaires en testant la sensibilité à certains antibiotiques de souches de *Aeromonas* provenant de diverses sources aquatiques présentant des degrés différents de pollution fécale.

Les valeurs obtenues pour la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif ont été aussi comparées à d'autres études en tenant compte de l'origine des souches (eau douce, eau usée urbaine et/ou industrielle) et des groupes bactériens étudiés. Des travaux sur la résistance aux antibiotiques de souches d'entérobactéries provenant des eaux douces ont été rapportés par Goni-Urriza *et al.* (2000), Antai (1987), Obi *et al.* (2004), et Al-Jebouri (1985). Les pourcentages de résistance obtenus de ces études ont oscillé entre 9,1-70 %, 0-17 %, 1,8-17,8 %, 1,8-80 %, 50-80% respectivement pour la tétracycline, la kanamycine, le chloramphénicol, la streptomycine et l'érythromycine. Ces résultats sont relativement concordants au travail de cette thèse. En ce qui concerne la résistance des souches isolées des eaux usées urbaines de la région de Sétif, les valeurs obtenues restent comparables aux pourcentages de souches d'entérobactéries résistantes rapportés par Al-Jebouri (1985), Jones *et al.* (1986), Silva *et al.* (2006), Olayemi et Opaleye (1990). Dans ce cas, les résultats de la résistance ont donné pour la streptomycine : 1-55 %, la tétracycline : 5-75 %, l'érythromycine : 30-60 % et la kanamycine : 5.6-25 %. Par contre, les fréquences de souches résistantes au chloramphénicol et à la kanamycine parmi les souches isolées des eaux usées urbaines sont très faibles que celles démontrées dans des études similaires (Silva *et al.* 2006, Olayemi and Opaleye 1990). Par contre, la fréquence de la résistance à la tétracycline est très élevée comparée à celles d'autres travaux (Jones *et al.*, 1986; Niemi *et al.*, 1983; Al-Jebouri, 1985, Watkinson *et al.*, 2007).

L'analyse de la résistance aux antibiotiques par les composantes principales (ACP),

n'a pas permis de dégager une différence significative par rapport au degré de pollution fécale. De même, aucune différence significative n'a été perceptible entre les souches isolées des oueds contaminés ou non par les effluents à pollution métallique et/ou par les effluents d'élevage de poulets. Ces résultats mitigés de l'antibiorésistance doivent probablement être liés à un échantillonnage insuffisant. En effet, Miranda and Castillo (1998) ont constaté que les souches isolées des eaux polluées modérément ont montré une multi-résistance aux antibiotiques faible et une sensibilité aux métaux par rapport aux eaux non polluées et hautement polluées. De la même façon Tuckfield and McArthur (2008) ont remarqué que lorsque la concentration des métaux lourds augmente, la prédominance de la résistance antibiotique diminue.

La différence de la résistance aux antibiotiques entre eau douce et eau usée urbaine pourrait avoir plusieurs explications: composition générique et des espèces, la distance entre le station d'échantillonnage et la contamination avec les eaux usées urbaines, le transfert de résistance antibiotique. En fait, plusieurs auteurs (Boon and Cattanaach, 1999; Goni-Urriza *et al.*, 2000; McArthur et Tuckfield, 2000) ont montré que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques augmente en aval du point de contamination par les eaux usées. De la même façon le transfert de la résistance aux antibiotiques entre les souches (Silva *et al.*, 2006) dans les cours d'eau pourrait être favorisé par la distance entre le site d'échantillonnage et le point de contamination par les eaux usées urbaines. De plus, la composition des espèces des échantillons d'eaux pourrait affecter le profil de résistance aux antibiotiques des souches (Niemi *et al.*, 1983).

De nombreuses études ont examiné le lien entre la fréquence du plasmide et la présence de contaminants environnementaux au niveau d'un site donné. Généralement, les plus hautes fréquences des plasmides ont été observée dans les sites pollués (Baya *et al.*,

1986; Bell *et al.*, 1983; Burton *et al.*, 1982; Hada et Sizemore, 1981; Avilés *et al.*, 1992).

Cependant, lorsque la fréquence des plasmides est examinée entre différents sites selon leur degré de pollution du fécale, aucun consensus n'est observé.

Une différence significative de la fréquence des plasmides a été notée entre sites, à faible et à forte pollution fécale, pour des souches apparentées au genre *Pseudomonas* (Burton *et al.*, 1982) ou appartenant au groupe *Aeromonas/Vibrio* (Avilés *et al.*, 1992). Toutefois, aucune différence n'a été détectée avec les souches non apparentées au genre *Pseudomonas* (Burton *et al.*, 1982) ou d'autres groupes bactériens (Avilés *et al.*, 1992).

Les données obtenues dans ce travail de thèse ont indiqué une différence entre les eaux usées urbaines et les eaux douces à faible pollution fécale lorsque la fréquence des plasmides de faible taille a été considérée pour les entérobactéries. La prépondérance relative des plasmides de faible taille trouvée dans cette étude contrastent avec les résultats rapportés par Glassman et McNicol, (1981). La fréquence élevée de souches d'entérobactéries porteuses de ces plasmides de faible taille est reliée probablement à l'origine humaine de ces souches et concorde avec les résultats de Al-Bahry (2000) qui rapporte que la plupart des souches humaines contiennent relativement beaucoup plus de plasmides de faible taille.

Les résultats concernant le gradient de survie, ainsi que l'absence de différence de survie entre souche résistante et sensible s'accordent avec ceux de Flint (1987). Une augmentation de la constante d'élimination en fonction de la température constatée au cours de cette étude a été également rapportée par les travaux de Craig *et al.*, (2002), Flint (1987) et Rhodes and Kator (1988). De même, Wang et Doyle (1998), Ozkanca and Flint (1997 et Medema *et al.*, 1997 ont démontré que la survie de *E. coli* ensemencé dans des eaux filtrées et autoclavées était meilleure à basse température. L'absence de différence de survie entre souche sensible et résistante observée au cours de ce travail de thèse est en

désaccord avec les travaux de Pettibone *et al.* (1987) qui constatèrent une meilleure survie de la souche *E. coli* résistante aux antibiotiques par rapport à la souche sensible. Ce désaccord témoigne probablement de l'absence de facteur de sélection, en l'occurrence le plomb, au niveau des eaux du barrage Ain Zadda à des concentrations qui pourraient favoriser la survie de la souche résistante. L'augmentation de l'élimination de *E. coli* en fonction de la température et du temps d'incubation est en rapport avec l'activité métabolique et le niveau nutritionnel du milieu (Lessard and Sieburth, 1983). L'accroissement du T_{90} en fonction de la réduction de la température a été également rapporté par Chedad and Assobhei (2007) au cours d'une étude de survie des coliformes fécaux.

Il est souvent très difficile de comparer les données sur la toxicité d'un métal ou le niveau de croissance d'une souche en présence d'un métal donné par rapport à d'autres travaux, car les conditions expérimentales tels que le milieu de culture, la température, le pH, le métal testé peuvent avoir une grande influence sur la toxicité (Hassen et al, 1998, Hussein *et al.*, 2004, Kondo *et al.*, 1974, Bachich and Stotzsky, 1979) et sur la croissance bactérienne. Ainsi, les résultats de différents auteurs se sont révélés parfois contradictoires dans le cas de l'effet de la salinité. Parallèlement à l'absence ou à la faible croissance de la souche *E. coli* Pb^R remarquée avec une concentration inhibitrice de plomb (4096 $\mu\text{g/ml}$), il a été également noté une réduction graduelle de la croissance en absence et en présence de 32 $\mu\text{g/ml}$ de Pb^{2+} . Il pourrait s'agir de la pression osmotique exercée par le NaCl qui joue un rôle inhibiteur sur la croissance. Il ressort que lorsque la concentration en NaCl devient critique soit proche du seuil de tolérance de la souche en l'occurrence 40 à 60 g/l, le milieu devient fortement inhibiteur ou toxique. Ceci est nettement visible avec les niveaux de croissance atteints en présence de ces concentrations en sel par rapport au témoin.

Cet effet inhibiteur de NaCl remarqué chez *E. coli* Pb^R est en accord avec les constations de Gupta *et al.* (1998) qui ont observé contrairement à la souche sensible, que la croissance d'*E. coli* résistante à AgNO₃ était beaucoup plus affectée par 40, 50 ou 60 g/l de NaCl même en absence de Ag⁺.

L'effet toxique de la concentration inhibitrice en plomb pour *E. coli* Pb^R est clairement visible, quelque soit la concentration en sel, ce qui est en contradiction avec les travaux de Babich et Stotzky (1978) qui constatèrent l'absence de toxicité de 10 mM de zinc pour *Pseudomonas aeruginosa* dans l'intervalle de salinité (0-1 M) et un effet toxique de 10 mM de zinc pour *E. coli* en présence de 1 M de NaCl. Ces auteurs expliquent l'augmentation de la toxicité du zinc en présence de NaCl ne résulte pas de l'effet synergique entre le zinc et l'augmentation de la pression osmotique, mais probablement de l'effet synergique entre le zinc et les ions Cl⁻, dont les composés résultants, en l'occurrence les chloro-complexes peuvent avoir une toxicité plus importante que le métal à l'état libre.

Le faible taux de croissance de *E. coli* Pb^R observé à pH 4,5 et 9,0 en absence ou en présence de concentration sub-inhibitrice de plomb (32 µg/ml), de même l'augmentation de la croissance à pH 7,2 en absence et en présence de concentration sub-inhibitrice de plomb (32 µg/ml) de Pb²⁺ est en relation avec les caractéristiques de la souche *E. coli* qui croit mieux à pH neutre (Brenner *et al.*, 2005). L'inhibition de la croissance constatée en présence de 4096 µg/ml de Pb²⁺ même à pH 9,0 est conforme avec les constations de Babich and Stotzky (1977a) que l'inhibition de la croissance de certaines bactéries dépend de la concentration du métal et du pH du milieu et qu'à une certaine concentration, le métal devient toxique quelque soit le pH du milieu. Toutefois, les résultats de ce travail sont en désaccord avec celles de Babich and Stotzky (1979) qui ont noté une réduction de la toxicité de 1000 et 2000 µg/ml de Pb²⁺ respectivement pour *Trichoderma viridae* et

Aspergillus niger quand le pH augmente de 5 à 8 ou à 9. Les résultats obtenus désavouent aussi celles de Onishi *et al.* (1984) dont les observations montrent une réduction de la toxicité du cadmium pour *Pseudomonas* sp quand la concentration en NaCl augmente de 1 à 3 M. Dans cette même étude, la toxicité a été notée à haute concentration en plomb à pH alcalin, malgré le phénomène de précipitation ce qui est probablement en rapport avec la formation de complexes métalliques mixtes toxiques à base d'ions Cl^- et OH^- .

En absence et en présence de concentration sub-inhibitrice, la souche *E. coli* Pb^R a réagi normalement à la température, autrement dit à mesure que la température s'était approchée de la température optimum, la croissance a augmenté graduellement. Aussi, l'influence de la basse température (10 °C) a été nettement visible aussi bien en absence qu'en présence de concentrations sub-inhibitrices et inhibitrices de plomb. L'effet stimulant constaté à 37 °C en présence de 32 µg/ml de plomb est en rapport avec la loi d'Arrhenius étant donné que la température accroît l'agitation et la mobilité des ions rendant la probabilité d'interaction entre les cellules microbiennes et les ions métalliques plus élevée. Il pourrait se produire aussi l'effet d'Arndt-Schultz (Harithsa et al., 2002) où l'accumulation de concentration non létale d'un toxique à la surface des cellules, induit parmi d'autres changements, une altération de la perméabilité qui permet une libre circulation des nutriments à travers la membrane et donc une stimulation de l'activité métabolique.

La forte concentration en plomb testée dépasse la capacité de complexation par les composés du milieu, et la concentration des ions Pb^{2+} à l'état libre ou les chlorocomplexes formés exercent un effet toxique quelque soit la salinité, le pH ou la température. Contrairement à l'inhibition constatée chez *E. coli* Pb^R en présence d'une concentration inhibitrice de Pb^{2+} (CMI 4096 µg/ml), le niveau de croissance atteint par *E. coli* Pb^S à

certaines salinités (5, 10, 20 g/l NaCl), à certains pH (7,2 et 9,0) et à certaines températures (20, 30 et 37 °C) en présence d'une concentration inhibitrice de Pb^{2+} (CMI 256 µg/ml) pourrait être dû à ce que le plomb ait été partiellement ou totalement complexé par les constituants du milieu trypticase soja. Par conséquent, ceci rendrait la concentration en ions libres très faible et le métal ainsi complexé deviendrait inaccessible pour la bactérie et donc absence d'inhibition. Les mêmes remarques ont été formulées par El-Deeb (2009), Konopka and Zakhorova (1999), Hassen *et al.* (1998), Nieto *et al.* (1989), Nieto *et al.* (1987). Ces observations prouvent que l'utilisation de milieux très riches en nutriments ou en composés complexants est inadapté ou discutable pour la détermination des concentrations inhibitrices des métaux lourds, surtout lorsque le niveau de résistance de la souche est très bas.

L'accumulation du plomb étudiée au cours de ce travail aussi bien au niveau de la souche sensible que de la souche résistante est en accord avec les tests de El-Deeb (2009) qui n'a remarqué aucune différence d'accumulation du Pb^{2+} pour *Enterobacter* sp entre la souche sauvage résistante au Pb^{2+} et la souche mutante sensible au Pb^{2+} (dépourvue de plasmide). Différents mécanismes ont été rapportés pour expliquer l'accumulation du plomb : rétention extracellulaire par un exopolymère pour *Pseudomonas marginalis*, rétention intracellulaire sous forme de granules opaques pour *Bacillus megaterium* (Roane, 1999); ou encore précipitation sous forme phosphate de plomb (Mire *et al.*, 2004 ;Levinson *et al.*, 1996; Aickin *et al.*, 1979;). Dans une autre étude, Levinson and Mahler (1998) ont remarqué que pour *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus*, la résistance au plomb n'était pas liée à l'activité de la phosphatase. Concernant les essais réalisés durant cette thèse, l'absence de différence significative entre souche sensible et résistante au sel métallique pourrait être liée au faible nombre d'échantillons soumis à l'analyse de la variance. Par ailleurs, il est probable que l'opacité des cellules de *E. coli* Pb^S et l'apparition

de précipité noir intracytoplasmique constaté en présence de sel de plomb indiquerait que cette souche réagirait au plomb par un mécanisme différent de celui de *E. coli* Pb^R.

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce travail portant sur plusieurs aspects de l'impact de la pollution métallique sur la flore bactérienne aquatique a permis de dégager les points suivants :

- La résistance aux métaux a été observée aussi bien pour des souches isolées de l'oued El Mallah soumis à une pollution métallique (Pb) que pour les souches provenant d'eaux usées ou de cours d'eau non pollués.
- L'analyse et la comparaison des phénotypes de résistance aux métaux lourds sur des souches isolées des différents cours d'eau et des eaux usées a permis de mettre en évidence une pollution provoquée par le déversement de métaux (Pb) provenant de l'unité de fabrication de batteries (ENPEC) au niveau de l'oued El Mallah.
- La résistance aux antibiotiques des souches isolées de l'oued El Mallah n'est pas influencée par la pollution due au plomb.
- La survie *in vitro* d'*E. coli* sensible au plomb n'est pas affectée par les teneurs en plomb présentes dans l'eau du barrage Ain Zadda .
- L'halotérance moyenne des souches isolées de l'oued El Mallah est comparable à celle des autres souches isolées des eaux usées ou des autres oueds.
- A l'inverse d'*E. coli* sensible au plomb, la croissance d'*E. coli* résistante au plomb est beaucoup plus diminuée par une concentration inhibitrice en plomb quelque soit le facteur qui entre en jeu (salinité, pH, température).

- *E. coli* sensible au plomb possédant un potentiel non négligeable de biosorption du plomb pourrait constituer un moyen biologique de traitement des effluents chargés de plomb.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- Aickin R. M., and A. C. R. Dean. 1979.** Lead Accumulation by *Pseudomonas fluorescens* and by *Citrobacter* sp. *Microbios Letters* **9**:55-56.
- Aickin R. M, A. C. R Dean, A. K. Cheetham, and A. J. Skarnulis. 1979.** Electron Microscope Studies on Uptake of Lead by a *Citrobacter* Species. *Microbios Lett.* **9**: 7-15.
- Al-Bahry, S. N., 2000.** Plasmid profiling of antibiotic resistant *Salmonella* species isolated in Muscat, Oman. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* **3**:215-218.
- Al-Jebouri M. M., 1985.** A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage-polluted River Tigris in Mosul, Iraq. *J. Appl.Bacteriol.*, **58**: 401-405.
- Allen D. A., B. Austin, and R. R. Colwell. 1977.** Antibiotic Resistance Patterns of Metal-Tolerant Bacteria Isolated from an Estuary. *Antimicrob.Ag.Chemother.*, **12**:545-547.
- Alvarez, A. J, G. M. Yumet, C. L. Santiago, T. C. Hazen, R. Chaudhry and G. A. Toranzos. 1996.** In Situ Survival of Genetically Engineered Microorganisms in a Tropical Aquatic Environment. *Environ.l Toxic.Wat Qual.: An Intern.J.* **11**: 21-25.
- Anderson K. L., J. E. Whitlock, and V. J. Harwood, 2005.** Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3041–3048.
- Anonyme. 1999.** Antimicrobial Resistance: An Ecological Perspective. Report based on an American Academy of Microbiology colloquium held July 16-18, 1999, in San Juan, Puerto Rico. www.mindfully.org/Health/Antimicrobial-Resistance.htm.
- Arana I., J. I. Justo, A. Muela, M. Pocino, J. Iriberry, and I. Barcina. 1997.** Influence of a Survival Process in a Freshwater System upon Plasmid Transfer Between *E. coli*. *Microb. Ecol.* **33**:41-49.
- Barer M. R. 1997.** Editorial. Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and misnomer. *J. Med. Microbiol.* **46**:629-631.
- Antai, S. P. 1987.** Incidence of *Staphylococcus aureus*, coliforms and antibiotic strains of *Escherichia coli* in rural water supplies in Port Harcourt. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**:371-375.
- Attrassi B., M. saghi. 1992.** Bacterial resistance to heavy metal in isolated strains from the mussels of the atlantic Moroccan coast. *Hydroécol. Appl.*, **2**:1-7.
- Avilés M., J. C. Codina, F. M. Cazorla, P. Romero, and A. de vicente. 1992.** Distribution of bacterial plasmids in marine environments. Condensés des travaux présentés lors du XXXIIIe congrès-assemblée plénière. Trieste (Italie) par la Commission internationale pour l'exploration scientifique de la mer Méditerranée. Monaco. **33**: p193.
- Babich H., and G. Stotzky, 1977a.** Sensitivity of Various Bacteria, Including *Actinomycetes*, and Fungi to Cadmium and the Influence of pH on Sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**:681-695.

Babich H., and G. Stotzky , 1977b. Effect of Cadmium on Fungi and on Interactions Between Fungi and Bacteria in Soil: Influence of Clay Minerals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**:1059-1066.

Babich H., and G. Stotzky 1978. Toxicity of Zinc to Fungi, Bacteria, and Coliphages: Influence of Chloride Ions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**:906-914.

Babich H., and G. Stotzky 1979. Abiotic Factors Affecting the Toxicity of Lead to Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**:506-513.

Baker-Austin C., M. S. Wright, R. Stepanauskas, and J. V. McArthur. 2006. Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trends in Microbiol.* **14**:176-182.

Barcina I., P. Lebaron, and J. Vives-Rego. 1997. MiniReview: Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **23**:1-9.

Baya A. M., P. R. Brayton, V. L. Brown, D. J. Grimes, E. Russek-Cohen and R. Colwell R. 1986. Coincident Plasmids and Antimicrobial Resistance in Marine Bacteria Isolated From Polluted and Unpolluted Atlantic Ocean Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**:1285-1292.

Bell J. B., G. E. Elliott and D. W. Smith, 1983. Influence of Sewage Treatment and Urbanization on Selection of Multiple Resistance in Fecal Coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**:227-232.

Bogosian G., L. E. Sammons, P. J. L. Morris, J. P. O'Neil, M. A. Heitkamp, and D. B. Weber, 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 Strain W3110 in Soil and Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4114-4120.

Boivin M-E. Y., B. Massieux, A. M. Breure, F. P. van den Ende, G. D. Greve, M. Rutgers and W. Admiraal. 2005. Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aqua. Toxicol.* **71**:345-356.

Boon P.I. and M. Cattanaach, 1999. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:164-168.

Brenner D. J. and J. J. Farmer. 1980. *Enterobacteriaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd Ed.), vol. 2. *The Proteobacteria*. Part B. *The Gammaproteobacteria*. Brenner Don J, Noel R. Krieg, James T., Staley editors

Brenner D. J., N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, snd edition, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), Springer-Verlag, New York.

Brocklehurst K. R and A. P. Morby. 2000. Metal-Ion Tolerance in *Escherichia coli*: Analysis of Transcriptional Profiles by Gene-Array Technology. *Microb..* **146**: 2277-2282.

Bruins M. R., S. Kapil, and F. W. Oehme, 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol and Environ Safety*, **45**:198-207.

Brynhildsen L, B.V. Lundgren, B. Allard, and T. Rosswall.1988. Effects of Glucose Concentrations on Cadmium, Copper, Mercury, and Zinc Toxicity to a *Klebsiella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:1689-1693.

Burton N. F., M. J. Day and A. L. Bull, 1982. Distribution of Bacterial Plasmids in Clean and Polluted Sites in South Wales River. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**:1026-1029.

Calomiris J. J., J. L. Armstrong, and R. J. Seidler. 1984. Association of Metal Tolerance with Multiple Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**:1238-1242.

Chedad K.and O. Assobhei, 2007. Etude de la Survie des Bactéries de Contamination Fécale (Coliformes Fécaux) dans les Eaux de la Zone Ostréicole de la Lagune de Oualidia.(Maroc). *Bulletin de l’Institut Scientifique.*, Rabat, section Sciences de la Vie N°**29** :71-79.

Clement R.L. , Flatau G.N., Mahdoun F. , and Gautier M.J. 1989. Influence de certains paramètres environnementaux sur la résistance au cadmium chez *Vibrio parahaemolyticus*. *Environ. Techn. Letters*. **10**:669-674.

Courvalin P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* **38**:1447-1451.

Courvalin P. 2008. La Résistance des Bactéries aux Antibiotiques:Combinaisons de Mécanismes Biochimiques et Génétiques. *Bull. Acad. Vét. France* **161**:7-12.

Craig D., H. Fallowfield, and N. Cromar. 2002. Comparison of decay rates of fecal indicator organisms in recreational coastal water and sediment. *Water Sci. Technol.* **2**:131–138.

Croteau M. N., S. N. Luoma, and A. R. Stewart, 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.*, **50**:1511–1519.

Davies C. M. and L. M. Evison, 1991. Sunlight and the Survival of Enteric Bacteria in Natural Waters. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:265-274.

DeForest D. K., K. V. Brix and W. J. Adams, 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*, **84** : 236–246.

De-Toni A., A. Touron-Bodili and F. Walleti. 2009. Effet des Changement Climatiques sur les Microorganismes Aquatiques Pathogènes: Quelques Exemples. *Environnement, Risques&Santé*. **8**:20.

Díaz-Raviña M., E. Bååth, and A. Frostegård. 1994. Multiple Heavy Metal Tolerance of Soil Bacterial Communities and Its Measurement by a Thymidine Incorporation Technique *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2238-2247.

Dionisio F., I. Matic, M. Radman, O. R. Rodrigues, and F. Taddei. 2002. Plasmids Spread Very Fast in Heterogeneous Bacterial Communities. *Genetics* **162**: 1525–1532.

Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. 2006. The Prokaryotes, 3rd edition vol. 6 (*Proteobacteria: Gamma Subclass*), Springer-Verlag, New York.

Ehrlich H. L. 2001. Geomicrobiology of Mercury In: *Geomicrobiology*. 4ed. Marcel Dekker, Inc. New York • Basel. Pp 328-329.

El-Deeb B. 2009. Plasmid Mediated Tolerance and Removal of Heavy Metals by *Enterobacter* sp. *Americ. J. Biochem. Biotech.* **5**: 47-53.

Endo G., M. Narita, C-C. Huang and S. Silver. 2002. Microbial Heavy Metal Resistance Transposons and Plasmids: Potential Use for Environ. Biotech.. *J. of Environ.l Biotech.* **2**:71-82.

Elmerich C. 1990. A Brief Survey of the Plasmid World. *Res. Microbiol.* **141**:617-619.

Faria C., I. Vaz-Moreira , E. Serapicos, O. C. Nunes ,and C. M. Manaia. 2009. Antibiotic resistance in coagulase negative *staphylococci* isolated from wastewater and drinking water. *Sc. Tot. Environ.* **407**:3876–3882.

Farrel R. E., J. J Germida,, and P. M Huang,. 1993. Effects of chemical speciation in growth media on the toxicity of mercury (II). *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:1507–1514.

Flint K. P. 1987. The Long-Term Survival of *Escherichia coli* in River Water. *J. Appl. Bacteriol.* **63**:261-270.

Foster T. J. 1983. Plasmid-Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**:361-409.

Gadd, G. M. 1992. “Metals and microorganisms: A problem definition”. *FEMS Microb. Lett.* **100**:197-204.

Garcia-Lara J., J. Martinez, M. Vilamu and Vives-Rego. 1993. Effect of Previous Growth Conditions on the Starvation-Survival of *Escherichia coli* in Seawater. *J. General Microb.* **139**:1425-1431.

Georgopapadakou N. H. 2008. Antibiotic Resistance in Enterobacteria in: *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. editors, R. G. Wax , K. L. Abigail, A. Salyers, H. Taber 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group.

Gikas P., S. S. Sengör, T. Ginn, J. Moberly, and B. Peyton, 2009. The Effects of Heavy Metals and Temperature on Microbial Growth and Lag. *Global NEST J.* **11**:325-332.

Ghosh A., A. Singh, P. W. Ramteke and V. P. Singh, 2000. Characterization of Large Plasmids Encoding Resistance to Toxic Heavy Metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **272**:6-11.

Ghoul M., M. Pommepuy, A. Moillo-Batt, and M. Cormier. 1989. Effect of Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine on *Escherichia coli* Halotolerance. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 1040-1043.

Giller K. E., E. Witter and S. P. McGrath, 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem., **30**:1389–1414.

Glassman D. L. and L. A. McNicol, 1981. Plasmid frequency in natural population estuarine microorganisms. Plasmid, **5**:231.

Goni-Urriza M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette and C. Quentin. 2000. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp.. Appl. Environ. Microbiol., **66**:125- 132.

Grewal J. S. and R. P. Tiwari, 1990. Resistance to metal ions and antibiotics in *Escherichia coli* from foodstuffs. J. Med. Microbiol., **32**:223-226.

Grinsted. J., and P.M. Bennett. 1988. Plasmid Technology. 2nd Edn.. Academic Press. USA.

Groves D. J. and F. E. Young, 1975. Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance Patterns in Staphylococci Isolated from Population Not Known to be Exposed to Heavy Metals. Antimicrob. Agents Chemother. **7**:614-621.

Gupta A, M. Maynes, and S. Silver, 1998. Effects of Halides on Plasmid-Mediated Silver Resistance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 5042–5045.

Hada H. S. and K. Sizemore, 1981. Incidence of Plasmids Marine *Vibrio* spp. Isolated from Oil Field in the Northwestern Gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. **41**:199-202.

Haichour N. 1992. Effet du Sel sur la Sélection de la Flore Bactérienne Totale et les Coliformes des Eaux de Rivières de la Région de Sétif. Thèse de Magister. Université Ferhat Abbas Sétif.

Hallas L. E., J. S. Thayer, and J. J. Cooney, 1982. Factors Affecting the Toxic Effect of Tin on Estuarine Microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **44**:193-197.

Harnett N. M and C. L. Gyles. 1984. Resistance to Drugs and Heavy Metals, Colicin Production, and Biochemical Characteristics of Selected Bovine and Porcine *Escherichia coli* Strains. Appl. Environ. Microbiol **48**:930-935.

Hassen A., N. Saidi, M. Cherif, and A. Boudabous. 1998. Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. Biores. Techn. **64**: 7-15.

Harithsa S., S. Kerkar, P.A. Loka Bharathi. 2002. Mercury and Lead Tolerance in Hypersaline Sulfate-Reducing Bacteria. Mar. Pol. Bull. **44** :726–732.

Hart B. A., and B. D. Scaife, 1977. Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. Environ. Res. **14**: 401-413.

Hobman J. L., K. Yamamoto, T. Oshima. 2007. Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. In: Molecular Microbiology of Heavy Metals. D.H. Nies, S. Silver:Editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore.

Hossain S. M., M. Das, N. Anantharaman, 2006. Studies on Bacterial Growth and Lead Biosorption using *Escherichia Coli*. IE(I) Journal-CH. **87**:9-15.

Hrenovic J.,and T. Ivankovic. 2009. Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. EurAsia J BioSci **3**:144-151.

Hussein H., H. Moawad, and S. Farag. 2004. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* Resistant to Heavy Metals Contaminants. Arab J. Biotech.,. **7**:13-22.

Jeanthon C.and D.Prieur.1990. Susceptibility to Heavy Metals and Characterization of Heterotrophic Bacteria Isolated from Two Hydrothermal Vent Polychaete Annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudate*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:3308-3314.

Jolivet-Gougeon A., Z. Tamanai-Shacoori, M. Pommepuy. and M. Cormier. 2000. Étude de la capacité de toxicogénèse de la souche d'*Escherichia coli* H10407 introduite en eau de mer synthétique. Oceanol. Acta **23**:221-228.

Jones J. G., S. Gardener, B. M. Simon and R. W. Pickup, 1986. Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District. J. Appl. Bacteriol. **60**:443-453.

Karbasizadeh V., N. Badami and G. Emtiazi, 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. Af. J.of Biotechn. **2**:379-383.

Kondo I., T. Ishikawa, and H. Nakahara, 1974. Mercury and Cadmium Resistances Mediated by the penicillinase Plasmid in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **117**:1-7.

Konopka A., and T. Zakhorova. 1999. Quantification of Bacterial Lead Resistance via Activity Assays. J. Microb. Met. **37**:17-22.

Kozdrój J. and J. D. van Elsas, 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods, **43**:197-212.

Kuo J. 2007. Electron Microscopy: Methods and Protocols. 2nd Ed. Humana Press Inc.

Larsen P. I., L. K. Sydney, B. Landfald and A. R. Strøm. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organics osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. Arch. Microbiol. **132**:1-7.

Lennette E. H., A. Balows, W. J. Hausler and H. J. Shadomy, 1985. Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition: American Society for Microbiology. Washington, D. ZC., pp. 967-983.

Lessard E. J., and J. McN. Sieburth, 1983. Survival of Natural Sewage populations of Enteric Bacteria in Diffusion and Batch Chambers in the Marine Environment. Appl. Environ. Microbiol. **45**:950–959.

Levinson H. S., I. Mahler, P. Blackwelder, and T. Hood. 1996. Lead Resistance and Sensitivity in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microb. Lett. **145**:421-425.

Levinson H. S., and I. Mahler. 1998. Phosphatase Activity and Lead Resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters **161**:135-138.

Lewis K., 2000. Programmed Death in Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 503–514.

Lin J. and P. T. Biyela. 2005. Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the *Enterobacteriaceae* isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). Water SA **31**:257-260.

Logan N. A. 1994. Bacterial systematics. 1994. Blackwell Scientific Publications.

Lösch L. S., J. M. Alonso and L. A. Merino, 2008. Occurrence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in water from different sources in a subtropical region of Argentina. Revista Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science **3**:28-36.

Mariano-da-Silva S., S. L. de Olivera, C. A. O. Leite, R. S. do Prado, F. P. de Faria, R. Olivera C. N., F. M. de S. Mariano-da-Silva, 2009. Effect of pH, dextrose and yeast extract on cadmium toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas **29**:295-299.

Martinez J. L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ. Pollut. **157** :2893–2902.

McArthur J. V., and R. C. Tuckfield, 2000. Spatial Patterns in Antibiotic Resistance among Stream Bacteria: Effects of Industrial Pollution. Appl. Environ. Microbiol., **66**:3722-3726.

Medema G. J., M. Bahar and F. M. Schets. 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, *Faecal enterococci* and *Clostridium perfringens* in River Water: Influence of Temperature and Autochthonous Microorganisms. Wat. Sci. Tech. **35**:249-252.

Mills, A. L. and R. R. Colwell, 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay and sediments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **18**:99-103.

Miranda C. D. and G. Castillo, 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. The Science of the Total Environment. **224**:167-176.

Mire C. E., J. A. Tourjee, W. F. O'Brien, K. V. Ramanujachary, and Gregory B. Hecht. 2004. Lead Precipitation by *Vibrio harveyi*: Evidence for Novel Quorum-Sensing Interactions. Appl. Environ. Microbiol. **70**:855–864.

Morozzi G., G. Cienci and G. Caldini, 1982. The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **176**:189: 55-62.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved standard M2–A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Nedwell D. B. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**: 101-111.

Niemela S. I. and P. Vaatanen, 1982. Survival in Lake Water of *Klebsiella pneumoniae* Discharged by a Paper Mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:264-269.

Niemi M., M. Sibakov and S. Niemela, 1983. Antibiotic Resistance Among Different Species of Fecal Coliforms Isolated from Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**:79-83.

Nies D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **51**:730-750.

Nieto J. J, A. Ventosa, and F. Ruiz-Berraquero. 1987. Susceptibility of Halobacteria to Heavy Metal. *J. Appl. Microbiol.* **53**:1199-1202.

Nieto J. J, R. Fernandez-Castillo, M. C. Marquez, A. Ventosa, E. Quesada and F. Ruiz-Berraquero. 1989. Susceptibility of Halobacteria to Heavy Metal. *J. Appl. Microbiol.* **55**:2385-2390.

Nweke C. O., C. S. Alisi, J. C. Okolo and C. E. Nwanyanwu, 2007. Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. *Appl. Environ. Res.* **5**:23-132.

Obi C. L., P. O. Bessong, M. N. B. Momba, N. Potgieter, A. Samie and E. O. Igumbor, 2004. Profiles of antibiotic susceptibilities of bacterial isolates and physico-chemical quality of water supply in rural Venda communities, South Africa. *Water SA* **30**:515-519.

Olayemi, A. B. and F. I. Opaleye, 1990. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from hospital and urban wastewaters. *W. J. Microbiol. Biotech.*, **6**:285-288.

Onishi H., T. Kobayashi, N. Morita, and M. Baba. 1984. Effect of salt concentration on the cadmium tolerant *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **48**:2441-2448.

Ozkanca R. and K. P. Flint, 1997. Relationship between Respiratory Enzymes and Survival of *Escherichia coli* under Starvation Stress in Lake Water. *J. Appl. Microbiol.* **82**:301-309.

Pennanen T., Å. Frostegård, H. Fritze, and E. Bååth. 1996. Phospholipid fatty acid Composition and Heavy Metal Tolerance of Soil Microbial Communities Along Two Heavy-Metal-Polluted Gradients in Coniferous Forests. *Appl. Environ. Microb.*, **62**:420-428.

Petala M., V. Tsiridis, P. Samaras, A. Kungolos, and G. P. Sakellaropoulos. 2005. Evaluation of Toxic Response of Heavy Metals and Organic Pollutants Using Microtox Acute Toxicity Test. *Proceeding of International Conference on Environmental Science and Technology.* Rhodes island, 1-3 September 2005. A-1200-1205

Pettibone G. W., S. A. Sullivan, and M. P. Sharis. 1987. Comparative Survival of Antibiotic-Resistant and Sensitive Fecal Indicator Bacteria in Estuarine Water. *Appl. Environ. Microb.* **53**:1241-1245.

Piotrowska-Seget Z., J. Cycoń and J.Kozdró. 2005. Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil. *Appl. Soil Ecol.* **28**:237–246.

Podbielski A., G. Haase, R. Berndt 1989. An Improved Broth-Microdilution Procedure for Testing Ion Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Zbl. Hyg.*, **189**:147-150.

Poirier I., N. Jean, J.C. Guary, and M. Bertrand. 2008. Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals: Physiological and biochemical aspects. *Sc . Tot. E nviron.* **406**:76-87.

Rathnayake V. N., M. Megharaj, N. Bolan, and R. Naidu. 2009. Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *W. Acad. Sc., Engin. Techn.* **53**:1185-1189.

Rhodes M. W., and H. Kator. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. In Estuarine Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2902-2907.

Roane T. M. 1999. Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microb. Ecol.* **37**:218-224.

Roszak D. B., D. J. Grimes and R. R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteridis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30**:334-338.

Roszak D. B., R. R. Colwell. 1987. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiol. Rev.* **51**:365-379.

Rouch D. A., Lee, B. T. D., and Morby, A. P. 1995. Understanding cellular Responses to Toxic Agents: A Model for Mechanism Choice in Bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.* **14**:32-141.

Sandaa R. A. , Ø. Enger and V. Torsvik, 1999. Abundance and Diversity of Archaea in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3293–3297.

Sani R. K, B. M. Peyton, and L. T. Brown. 2001. Copper-Induced Inhibition of Growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: Assessment of Its Toxicity and Correlation with Those of Zinc and Lead. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:4765–4772.

Sasseville J. L. 1980. La problématique des substances toxiques dans l’environnement, tome 1 : L’agression toxique. Bureau sur les substances toxiques, Ministère de l’Environnement, Gouvernement du Québec, p 46.

Satchanska G., E. N. Pentcheva, R. Atanasova., V. Groudeva, R Trifonova, and E. Golovinsky, 2005. Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. *Biotechnol.&Biotechnol.Eq.*,**19**:61-67.

Schwarz. S, C. Kehrenberg , T.R. Walsh, 2001. Review : Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production.*Intern. J. Antimicrob. Ag.***17**: 431–437.

Servais P.,and J. Passerat. 2009 .Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* **408**:365–372.

Sharma A, S. K.Singh, and D. Bajpai. 2010. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. with reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. *Microb Res.* **165**: 33-42.

Sharma P. K., D. L. Balkwill, A. Frenkel, and M. A. Vairavamurthy, 2000. A New *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3083–3087.

Shotyk W. and G. Le Roux. 2005. Biogeochemistry and Cycling of Lead. In *Metal Ions in Biological Systems* v.43. Edited by A. Sigel, H. Sigel and R. K.O. Sigel. Francis & Taylor Group. Pp. 247-249.

Sigee D. C., 2005. *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment.* John Wiley & Sons Ltd, England.

Silva J., G. Castillo, L. Callejas, H. Lopez and J. Olmos, 2006. Frequency of Transferable Multiple Antibiotic Resistance amongst Coliform Bacteria Isolated from Treated Sewage Effluent in Antofagasta, Chile. *Elect. J. Biotechn.* **9**:533-540.

Silver S., 1996. Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions - a review. *Gene* **179**:9-19.

Silver S, M. Walderhaug. 1992. Gene Regulation of Plasmid and Chromosome-Determined Inorganic Ion Transport in Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:195–238.

Speer B. S., N. D. Shoemaker, and A. Salyers.1992. Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanism, Transfer and Clinical Significance. *Clin.Microb. Rev.* **5**:387-399.

Sugumar, G. and S. Mariappan, 2003. Survival of *Salmonella* sp. in Freshwater and Seawater Microcosms Under Starvation. *As. Fish. Sci.* **16**:247-255.

Tappeser B., Jagger M. and C. Eckelkamp.1998. Survival, Persistence, Transfer – An Update on Current Knowledge on GMOs and the Fate of their recombinant DNA. Available in: [http://online.sfsu.edu/~rone/GEessays/Survival%20Persistence Transfer.htm](http://online.sfsu.edu/~rone/GEessays/Survival%20Persistence%20Transfer.htm).

Terzieva S. I., and G. A. McFeters. 1991 Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Can. J. Microb.*, **37**: 785-790.

Todar K., 2008. Bacterial Resistance to Antibiotics. In *Todar's online textbook of bacteriology*. <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>.

Tuckfield, R. C., and J. V. McArthur, 2008. Spatial analysis of antibiotic resistance along metal contaminated streams. *Microb. Ecol.* **55**:595-607.

Ünaldi Coral, M. N., H. Kormaz, B. Arıkan and G. Coral, 2005. Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu Landfill, in Adana, Turkey. *An. Microbiol.* **55**:175-179.

Vernozy-Rozand C., M. P. Montet and S. Ray-Gueniot. 2002. Présence d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau un problème en santé publique. *Revue Méd. Vét.* **153**:235-242.

Walker H. I. 1984. Methods in Molecular Biology.. Vol. 2, Nucleic Acids, Humana Press. Clifton New Jersey, ISBN 0-89603-064-4. pp 191-195.

Wang G., and M. P. Doyle 1998. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Water. J. Food Prot. **61**:662-667.

Watkinson A. J., G. B. Micalizzi, G. M. Graham, J. B. Bates and S. D. Costanzo, 2007. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Wastewaters, Surface Waters, and Oysters from Urban Riverine System. Appl. Environ. Microbiol. **73**:5667-5670.

Wcislo R. and R. J. Chróst. 2000. Survival of *Escherichia coli* in Freshwater. Pol. J. Environ. St. **9**:215-222.

Wixson B. G., and B. E. Davies. 1993. Lead in soil: Recommended guidelines. Science Reviews, Society for Environmental Geochemistry and Health, Northwood, Middlesex, England.

Wright D. A., and P. Welbourn. 2002. Environmental toxicology. Cambridge University Press. pp.274-280.

Xu H. S., N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwel, D. J. Grimes and R. R. Colwell. 1982. Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. **8**:313-323.

Zelibor J. L., M. Tamplin and R. R. Colwell, 1987a. A Method of Measuring Bacterial Resistance to Metals Employing Epifluorescent Microscopy. J. Microbiol. Met. **7**:143-155.

Zelibor J. L., M. W. Doughten, D. J. Grimes and R. R. Colwell, 1987b. Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by direct viable counting method. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2929-2934.

ANNEXES

Annexe 1: CMI des métaux lourds vis à vis des souches isolées des 4 stations.

Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
1	1	16	512	2048
2	1	64	128	2048
3	1	2	32	2048
4	1	16	64	2048
5	1	32	128	2048
6	1	32	128	2048
7	1	128	64	2048
8	1	32	128	2048
9	1	16	128	2048
10	1	32	64	2048
11	1	16	256	4096
12	1	4	16	2048
13	1	4	128	1024
14	1	16	64	2048
15	1	64	64	2048
16	1	32	64	1024
17	1	32	128	1024
18	1	32	64	1024
19	1	16	64	2048
20	1	32	128	1024
21	1	16	8	2048
22	1	16	4	4096
23	1	16	128	4096
24	1	16	64	2048
25	1	16	128	1024
26	1	16	64	2048
27	1	16	8	2048
28	1	128	64	2048
29	1	16	32	1024
30	1	16	32	1024
31	1	16	32	1024
32	1	16	64	2048

Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
33	1	32	128	2048
34	1	32	128	2048
35	1	16	128	2048
36	1	16	64	1024
37	1	32	512	4096
38	1	32	256	4096
39	1	16	128	2048
40	1	16	128	1024
41	1	8	16	4096
42	1	4	16	2048
43	1	4	16	2048
44	1	2	16	4096
45	1	2	32	2048
46	1	4	16	2048
47	1	2	32	2048
48	1	4	16	1024
49	1	0,25	4	512
50	1	32	8	2048
51	1	2	16	2048
52	1	32	16	2048
53	1	8	8	2048
54	1	4	8	2048
55	1	32	8	4096
56	1	16	8	2048
57	1	4	16	1024
58	1	4	8	2048
59	1	2	16	4096
60	1	8	16	2048
61	1	4	16	2048
62	1	16	16	2048
63	1	8	16	2048
64	1	8	16	2048
65	1	64	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
66	1	2	16	2048

67	1	64	16	2048
68	1	8	16	2048
69	1	8	16	1024
70	1	8	8	4096
71	1	8	16	1024
72	1	4	16	2048
73	1	8	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)	Souche	station
74	1	8	16	2048
75	1	16	16	2048
76	1	8	32	2048
77	1	2	16	2048
78	1	8	8	2048
79	1	8	16	512
80	1	8	16	2048
81	1	8	16	4096
82	1	8	16	2048
83	1	64	16	2048
84	1	8	8	2048
85	1	8	16	2048
86	1	8	8	2048
87	1	4	8	2048
88	1	8	16	2048
89	1	8	16	4096
90	1	4	16	2048
91	1	8	4	2048
92	1	4	4	128
93	1	8	16	2048
94	1	8	16	256
95	1	2	16	4096
96	2	16	64	2048
97	2	16	64	2048
98	2	4	64	4096
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
99	2	16	512	2048
100	2	32	64	4096
101	2	4	128	4096

102	2	64	64	2048
103	2	4	128	4096
104	2	32	128	2048
105	2	16	32	256
106	2	16	128	2048
107	2	64	4	4096
108	2	32	64	2048
109	2	8	512	2048
110	2	32	64	2048
111	2	8	128	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)	Souche	station
112	2	8	128	4096
113	2	32	64	2048
114	2	16	512	2048
115	2	32	128	2048
116	2	4	128	2048
117	2	16	64	2048
118	2	16	64	1024
119	2	32	128	1024
120	2	4	4	2048
121	2	16	64	2048
122	2	16	256	2048
123	2	16	128	2048
124	2	64	16	2048
125	2	4	128	4096
126	2	16	128	2048
127	2	16	64	1024
128	2	4	128	4096
129	2	4	128	4096
130	2	16	128	2048
131	2	64	128	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
132	2	16	128	1024
133	2	16	64	2048
134	2	16	128	2048
135	2	32	128	2048
136	2	8	64	2048

137	2	16	128	2048
138	2	16	128	2048
139	2	16	64	2048
140	2	32	64	1024
141	2	4	8	2048
142	2	8	16	2048
143	2	64	16	2048
144	2	8	16	2048
145	2	64	16	2048
146	2	4	8	1024
147	2	8	16	2048
148	2	4	16	1024
149	2	4	8	4096
Souche	station	CMI (µg/ml)	Souche	station
150	2	2	16	256
151	2	2	16	2048
152	2	8	2	2048
153	2	2	8	2048
154	2	8	16	2048
155	2	2	16	4096
156	2	4	8	2048
157	2	64	16	2048
158	2	8	16	2048
159	2	64	16	2048
160	2	64	4	2048
161	2	8	16	2048
162	2	4	8	2048
163	2	16	32	4096
164	2	4	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
165	2	4	4	2048
166	2	32	16	2048
167	2	8	16	1024
168	2	64	16	1024
169	2	64	16	2048
170	2	64	8	4096
171	2	4	16	2048

172	2	2	32	2048
173	2	8	16	1024
174	2	2	32	2048
175	2	2	32	2048
176	2	32	16	1024
177	2	64	16	2048
178	2	4	8	4096
179	2	8	8	4096
180	2	64	8	2048
181	2	16	8	4096
182	2	4	8	2048
183	2	4	16	2048
184	2	2	16	2048
185	2	4	8	8196
186	2	8	16	1024
187	2	4	8	1024
Souche	station	CMI (µg/ml)	Souche	station
188	2	4	16	4096
189	2	2	32	2048
190	2	8	16	4096
191	2	4	8	8196
192	3	4	64	2048
193	3	128	128	4096
194	3	32	256	4096
195	3	8	16	2048
196	3	64	16	2048
197	3	8	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
198	3	4	128	1024
199	3	16	128	1024
200	3	16	64	2048
201	3	64	512	2048
202	3	16	128	4096
203	3	32	32	4096
204	3	32	128	4096
205	3	16	64	2048
206	3	32	128	1024

207	3	16	64	2048
208	3	32	64	1024
209	3	32	64	2048
210	3	32	64	4096
211	3	32	512	4096
212	3	64	128	2048
213	3	16	128	2048
214	3	4	128	4096
215	3	4	128	2048
216	3	16	128	2048
217	3	16	32	2048
218	3	16	128	2048
219	3	16	64	2048
220	3	16	64	2048
221	3	4	128	2048
222	3	4	128	2048
223	3	16	64	1024
224	3	4	128	2048
225	3	64	64	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)	Souche	station
226	3	4	128	4096
227	3	64	128	2048
228	3	4	128	4096
229	3	64	64	2048
230	3	64	512	4096
231	3	4	64	8192
232	3	64	512	4096
233	3	64	512	4096
234	3	32	512	4096
235	3	32	512	4096
236	3	4	64	4096
237	3	32	128	4096
238	3	64	512	4096
239	3	32	128	2048
240	3	32	512	4096
241	3	0,25	8	1024
242	3	8	8	256
243	3	8	8	2048

244	3	16	32	4096
245	3	2	8	2048
246	3	8	16	2048
247	3	64	16	2048
248	3	64	16	2048
249	3	8	16	2048
250	3	4	8	2048
251	3	4	8	2048
252	3	8	8	2048
253	3	4	8	2048
254	3	4	8	2048
255	3	32	8	2048
256	3	16	16	64
257	3	4	16	4096
258	3	8	8	2048
259	3	4	8	4096
260	3	2	16	2048
261	3	4	8	2048
262	3	4	16	2048
263	3	2	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
264	3	16	32	2048
265	3	8	16	1024
266	3	16	8	8192
267	3	8	16	1024
268	3	4	32	2048
269	3	8	16	1024
270	3	4	16	512
271	3	16	16	4096
272	3	8	32	2048
273	3	64	16	2048
274	3	2	8	1024
275	3	16	32	2048
276	3	16	16	2048
277	3	2	8	1024
278	3	4	4	2048
279	3	4	8	2048

280	3	8	16	4096
281	3	2	16	2048
282	3	16	32	2048
283	3	4	8	2048
284	3	8	32	2048
285	3	4	8	2048
286	3	8	16	4096
287	3	4	4	4096
288	3	8	4	1024
289	3	8	16	2048
290	4	4	64	4096
291	4	4	32	4096
292	4	16	32	128
293	4	4	32	4096
294	4	4	32	4096
295	4	4	32	4096
296	4	32	4	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
297	4	16	64	512
298	4	16	128	2048
299	4	32	128	2048
300	4	4	4	4096
301	4	64	128	2048
302	4	16	256	2048
303	4	16	128	2048
304	4	16	32	2048
305	4	8	128	2048
306	4	16	128	2048
307	4	16.0	128	1024
308	4	16	128	1024
309	4	16	128	4096
310	4	128	16	2048
311	4	32	64	2048
312	4	4	128	2048
313	4	4	128	4096
314	4	4	32	4096
315	4	4	128	4096

316	4	4	128	2048
317	4	16	128	2048
318	4	32	4	2048
319	4	16	128	1024
320	4	16	64	4096
321	4	16	32	2048
322	4	4	128	4096
323	4	4	128	4096
324	4	4	128	4096
325	4	8	4	2048
326	4	2	32	2048
327	4	64	16	2048
328	4	16	16	2048
329	4	2	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
330	4	4	8	2048
331	4	16	16	1024
332	4	4	32	2048
333	4	64	16	2048
334	4	16	16	2048
335	4	8	8	4096
336	4	8	8	4096
337	4	4	4	2048
338	4	2	32	2048
339	4	4	4	4096
340	4	4	8	2048
341	4	2	8	8192
342	4	16	16	2048
343	4	4	4	4096
344	4	4	16	2048
345	4	4	16	4096
346	4	64	8	4096
347	4	1	32	2048
348	4	8	8	8192
349	4	4	16	2048
350	4	64	16	2048
351	4	32	4	2048

352	4	8	8	8192
353	4	4	8	2048
354	4	4	8	2048
355	4	4	16	2048
356	4	64	16	8192
357	4	4	8	1024
358	4	2	8	2048
359	4	32	4	2048
360	4	4	8	2048
361	4	2	16	2048
362	4	2	16	2048
Souche	station	CMI (µg/ml)		
		Hg	Cd	Pb
363	4	8	16	2048
364	4	4	32	2048
365	4	4	16	4096
366	4	32	8	1024
367	4	8	8	4096
368	4	64	16	2048
369	4	64	16	2048
370	4	16	8	8192
371	4	8	16	2048
372	4	8	16	2048
373	4	64	8	8192

Annexe 2 a: Antibiotigramme des différentes souches isolées de la station 1
(0 : sensible, 1: résistante)

Souche	Station	S	K	Tm	Am	Te	Ot	Do	Sxt	Co	F	E	C
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
6	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
7	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
9	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
13	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
17	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
18	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
20	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
21	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
22	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
23	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
28	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
29	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
32	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
33	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
36	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
37	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
38	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
39	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
40	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
41	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0

32	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
36	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
38	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
39	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
40	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
42	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
43	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
44	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
45	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
47	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
48	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
49	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
50	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 2 c: Antibiotigramme des différentes souches isolées de la station 3
(0 : sensible, 1 : résistante)

Souche	Station	S	K	Tm	Am	Te	Ot	Do	Sxt	Co	F	E	C
1	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
4	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
5	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
6	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
7	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
8	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
9	3	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
12	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
13	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
14	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
16	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
18	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
20	3	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
21	3	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
22	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
24	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0

26	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
28	3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
29	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
30	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
32	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
34	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
35	3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
36	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
38	3	1	0	0	0	0	1		0	0	0	1	0
39	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
40	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
41	3	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
42	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
43	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
44	3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
45	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
46	3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
47	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
48	3	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
49	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
50	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
51	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
52	3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
53	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
55	3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0

Annexe 2 d: Antibiotigramme des différentes souches isolées de la station 4
(0 : sensible, 1 : résistante)

Souche	Station	S	K	Tm	Am	Te	Ot	Do	Sxt	Co	F	E	C
1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	4	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
4	4	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
8	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	4	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
10	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
11	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
13	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	4	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0

[illegible]

Annexe 3a : Sensibilité ou résistance aux métaux lourds chez les souches d'*E. coli* hébergeant ou non des plasmides (1 ou 2) au niveau de la station 1.

Station	Type de marqueur utilisé	Présence ou absence de plasmide	Hg	Cd	Pb
1	1	1	R	R	S
1	1	0	R	R	S
1	1	1	R	R	R
1	1	0	R	R	S
1	1	1	R	R	S
1	1	0	R	R	S
1	1	0	R	R	S
1	1	1	R	R	S
1	1	1	R	R	S
1	1	0	R	R	S
1	2	1	R	R	S
1	2	0	R	R	S
1	2	0	R	R	S
1	2	1	R	R	S
1	2	0	R	S	S
1	2	0	R	R	S
1	2	0	R	R	S
1	2	1	R	R	S
1	2	1	R	S	S
1	2	0	R	R	S

Annexe 3b : Sensibilité ou résistance aux métaux lourds chez les souches d'*E. coli* hébergeant ou non des plasmides (1 ou 2) au niveau de la station 2.

[illegible]

Annexe 3c : Sensibilité ou résistance aux métaux lourds chez les souches d'*E. coli* hébergeant ou non des plasmides (1 ou 2) Au niveau de la station 3.

Station	Type de marqueur utilisé	Présence ou absence de plasmide	Hg	Cd	Pb
3	1	0	R	R	S
3	1	0	R	R	R
3	1	1	S	R	R
3	1	0	R	R	R
3	1	0	R	R	R
3	1	0	R	R	S
3	1	0	R	R	R
3	1	1	R	R	S
3	1	0	R	R	R
3	2	1	R	R	R
3	2	1	R	R	S
3	2	1	S	R	S
3	2	1	S	R	S
3	2	0	S	R	R
3	2	1	S	R	S
3	2	1	R	R	S
3	2	1	R	S	S
3	2	1	S	S	S
3	2	1	R	S	R

Annexe 3c : Sensibilité ou résistance aux métaux lourds chez les souches d'*E. coli* hébergeant ou non des plasmides (1 ou 2) au niveau de la station 4.

Station	Type de marqueur utilisé	Présence ou absence de plasmide	Hg	Cd	Pb
4	1	1	R	R	S
4	1	0	R	R	S
4	1	0	R	R	R
4	1	0	R	S	R
4	1	0	S	R	R
4	1	0	R	R	S
4	1	1	S	R	S
4	1	1	R	R	R
4	2	1	R	R	S
4	2	1	R	R	S
4	2	1	R	R	S
4	2	1	S	S	S
4	2	1	S	S	S
4	2	1	R	R	R
4	2	1	S	S	S
4	2	1	S	S	S

Annexe 4 : Seuil de tolérance au NaCl des souches d'*E. coli* isolées des différentes stations

Station	Seuil de tolérance au NaCl (M)
1	0,50
1	0,50
1	0,68
1	0,85
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,85
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,68
1	0,68
1	0,68
1	0,17
1	0,50
1	0,50
1	0,68
1	0,68
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,50
1	0,68
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50

2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,50
2	0,68
2	0,50
2	0,68
2	0,68
2	0,50
2	0,85
2	0,68
2	0,68
2	0,50
2	0,68
2	0,50
3	0,17
3	0,50
3	0,50
3	0,68
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,17
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50
3	0,50

Station	Seuil de tolérance au NaCl (M)
3	0,50
3	0,50
3	0,85
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,85
4	0,50
4	0,50
4	0,85
4	0,50
4	0,50
4	0,85
4	0,50
4	0,85
4	0,17
4	0,85
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,50
4	0,17
4	0,68
4	0,50
4	0,50
4	0,68
4	0,50
4	0,50
4	0,17

Annexe 5a : Nombre de germe survivants d'*E. coli*
Pb^R en fonction du temps et de
La température d'incubation (essai 1)

Temps	R_10° C	R_30° C	R_37° C
1	1000000	1000000	1000000
2	1850000	1180000	780000
3	1100000	1200000	350000
4	1510000	650000	175000
5	1160000	900000	166000
6	1010000	278000	102000
7	800000	179000	400
8	240000	132000	290
9	180000	70000	130

Annexe 5b : Nombre de germe survivants d'*E. coli*
Pb^S en fonction du temps et de la
température d'incubation (essai 1)

Temps	S_10° C	S_30° C	S_37° C
1	1920000	1920000	1920000
2	2410000	1740000	2690000
3	2400000	2050000	2050000
4	2670000	1740000	440000
5	3200000	1710000	230000
6	1720000	1420000	70000
7	1350000	1130000	7400
8	1270000	206000	600
9	1110000	138500	100

Annexe 5c : Nombre de germe survivants d' *E. coli*
Pb^R en fonction du temps et de la
température d'incubation (essai 2)

Temps	R_10° C	R_30° C	R_37° C
1	4800000	4800000	4800000
2	8100000	6600000	6600000
3	1920000	6400000	5300000
4	3420000	2110000	2110000
5	3620000	1180000	1730000
6	2130000	380000	380000
7	610000	165000	160000

Annexe 5d : Nombre de germe survivants d'*E. coli*
Pb^S sensible en fonction du temps et de la
température d'incubation (essai 2)

Temps	S_10° C	S_30° C	S_37° C
1	7200000	7200000	7200000
2	3000000	4900000	4900000
3	1860000	8550000	8550000
4	1440000	1164000	1160000
5	1030000	1760000	1310000
6	1130000	250000	250000
7	1130000	130000	130000

Annexe 6 a: Densités optiques des 2 essais de croissance d'*E. coli* Pbr en fonction des paramètres étudiés

Souche	Température	pH	NaCl	Pb(NO ₃) ₂	Do (630 nm)	
					Essai 1	
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	1	1	0,07	0,09
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	1	1	1,00	1,04
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	1	1	0,17	0,16
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	1	1	0,43	0,44
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	1	1	2,02	2,00
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	1	1	1,58	1,55
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	1	1	1,44	1,48
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	1	1	3,04	3,26
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	1	1	2,35	2,06
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	1	1	1,13	1,09
<i>E. coli</i> Pbr	4	2	1	1	2,41	2,38
<i>E. coli</i> Pbr	4	3	1	1	1,54	1,43
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	1	2	0,11	0,14
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	1	2	1,05	1,02
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	1	2	0,23	0,25
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	1	2	0,20	0,21
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	1	2	1,97	1,81
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	1	2	1,78	1,61
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	1	2	1,00	1,02
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	1	2	1,95	2,14
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	1	2	1,69	1,64
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	1	2	1,01	1,13
<i>E. coli</i> Pbr	4	2	1	2	3,39	3,29
<i>E. coli</i> Pbr	4	3	1	2	1,73	1,68
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	1	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	1	3	0,57	0,61
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	1	3	0,27	0,09
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	1	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	1	3	0,48	0,53
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	1	3	0,65	0,33
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	1	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	1	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	1	3	0,04	0,02
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	1	3	0,00	0,00

<i>E. coli Pbr</i>	4	2	1	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	1	3	0,10	0,09
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	2	1	0,03	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	2	1	0,32	0,36
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	2	1	0,01	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	2	1	0,36	0,37
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	2	1	1,74	1,72
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	2	1	1,44	1,45
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	2	1	1,84	1,80
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	2	1	2,35	2,21
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	2	1	1,71	1,56
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	2	1	1,53	1,50
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	2	1	2,88	2,82
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	2	1	1,59	1,49
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	2	2	0,00	0,02
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	2	2	0,46	0,46
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	2	2	0,00	0,82
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	2	2	0,22	0,13
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	2	2	2,15	1,70
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	2	2	1,48	1,63
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	2	2	1,32	1,15
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	2	2	2,26	2,29
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	2	2	1,04	1,14
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	2	2	1,49	1,52
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	2	2	3,91	3,15
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	2	2	1,56	1,60
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	2	3	0,39	0,42
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	2	3	0,44	0,41
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	2	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	2	3	0,00	0,02
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	2	3	0,60	0,54
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	2	3	0,57	0,50
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	2	3	0,00	0,04
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	2	3	0,50	0,40
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	2	3	0,45	0,55
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	2	3	0,50	0,44
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	2	3	0,97	1,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	2	3	0,05	0,09
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	3	1	0,00	0,04
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	3	1	0,25	0,29

<i>E. coli</i> Pbr	1	3	3	1	0,00	0,01
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	3	1	0,24	0,21
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	3	1	1,64	1,70
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	3	1	0,03	0,01
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	3	1	1,97	1,59
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	3	1	2,89	2,75
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	3	1	1,45	1,66
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	3	1	2,21	2,15
<i>E. coli</i> Pbr	4	2	3	1	2,63	2,68
<i>E. coli</i> Pbr	4	3	3	1	1,68	1,64
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	3	2	0,00	0,01
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	3	2	0,10	0,14
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	3	2	0,08	0,08
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	3	2	0,05	0,14
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	3	2	1,65	1,55
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	3	2	0,21	0,24
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	3	2	1,57	1,58
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	3	2	2,30	2,36
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	3	2	2,03	1,63
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	3	2	2,14	2,12
<i>E. coli</i> Pbr	4	2	3	2	2,34	2,88
<i>E. coli</i> Pbr	4	3	3	2	2,22	2,06
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	3	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	3	3	0,16	0,10
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	3	3	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	3	3	0,18	0,07
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	3	3	0,19	0,12
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	3	3	0,06	0,06
<i>E. coli</i> Pbr	3	1	3	3	0,10	0,07
<i>E. coli</i> Pbr	3	2	3	3	0,10	0,13
<i>E. coli</i> Pbr	3	3	3	3	0,22	0,24
<i>E. coli</i> Pbr	4	1	3	3	0,26	0,32
<i>E. coli</i> Pbr	4	2	3	3	0,47	0,56
<i>E. coli</i> Pbr	4	3	3	3	0,27	0,24
<i>E. coli</i> Pbr	1	1	4	1	0,00	0,00
<i>E. coli</i> Pbr	1	2	4	1	0,08	0,08
<i>E. coli</i> Pbr	1	3	4	1	0,02	0,05
<i>E. coli</i> Pbr	2	1	4	1	0,06	0,08
<i>E. coli</i> Pbr	2	2	4	1	1,16	1,16
<i>E. coli</i> Pbr	2	3	4	1	0,03	0,03

<i>E. coli Pbr</i>	3	1	4	1	0,77	0,70
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	4	1	1,52	2,17
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	4	1	0,00	0,02
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	4	1	0,78	0,88
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	4	1	1,67	1,73
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	4	1	0,02	0,01
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	4	2	0,03	0,01
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	4	2	0,06	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	4	2	0,01	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	4	2	0,10	0,13
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	4	2	0,96	0,90
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	4	2	0,01	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	4	2	0,71	0,85
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	4	2	1,68	1,78
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	4	2	0,01	0,01
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	4	2	1,50	1,55
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	4	2	2,03	2,29
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	4	2	0,01	0,02
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	4	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	4	3	0,05	0,07
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	5	1	0,01	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	5	1	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	5	1	0,06	0,07
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	5	1	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	5	1	0,08	0,15
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	5	1	0,06	0,06
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	5	1	0,04	0,04
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	5	1	1,44	1,65
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	5	1	0,05	0,06
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	5	1	0,08	0,05

<i>E. coli Pbr</i>	4	2	5	1	1,65	1,58
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	5	1	0,04	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	5	2	0,01	0,02
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	5	2	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	5	2	0,08	0,07
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	5	2	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	5	2	0,12	0,11
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	5	2	0,35	0,34
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	5	2	0,02	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	5	2	1,68	1,43
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	5	2	0,09	0,08
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	5	2	0,03	0,03
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	5	2	1,58	1,48
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	5	2	0,05	0,06
<i>E. coli Pbr</i>	1	1	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	2	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	1	3	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	1	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	2	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	2	3	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	1	5	3	0,01	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	2	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	3	3	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	1	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	2	5	3	0,00	0,00
<i>E. coli Pbr</i>	4	3	5	3	0,00	0,00

Annexe 6 b: Densités optiques des 2 essais de croissance de *E. coli* Pbs en fonction des paramètres étudiés

Souche	Température	pH	NaCl	Pb(NO ₃) ₂	Do (630 nm)	
					Essai 1	Essai 2
<i>E. coli</i> Pbs	1	1	1	1	0,09	0,10
<i>E. coli</i> Pbs	1	2	1	1	1,09	1,07
<i>E. coli</i> Pbs	1	3	1	1	0,59	0,49
<i>E. coli</i> Pbs	2	1	1	1	0,55	0,51
<i>E. coli</i> Pbs	2	2	1	1	1,97	2,05
<i>E. coli</i> Pbs	2	3	1	1	1,60	1,63
<i>E. coli</i> Pbs	3	1	1	1	0,93	0,94
<i>E. coli</i> Pbs	3	2	1	1	2,89	3,05
<i>E. coli</i> Pbs	3	3	1	1	2,39	2,23
<i>E. coli</i> Pbs	4	1	1	1	0,95	0,88
<i>E. coli</i> Pbs	4	2	1	1	2,47	2,57
<i>E. coli</i> Pbs	4	3	1	1	2,12	1,92
<i>E. coli</i> Pbs	1	1	1	2	0,16	0,15
<i>E. coli</i> Pbs	1	2	1	2	0,83	0,84
<i>E. coli</i> Pbs	1	3	1	2	0,46	0,44
<i>E. coli</i> Pbs	2	1	1	2	0,24	0,23
<i>E. coli</i> Pbs	2	2	1	2	1,68	1,98
<i>E. coli</i> Pbs	2	3	1	2	1,99	1,93
<i>E. coli</i> Pbs	3	1	1	2	1,03	1,04
<i>E. coli</i> Pbs	3	2	1	2	2,67	2,70
<i>E. coli</i> Pbs	3	3	1	2	2,05	2,19
<i>E. coli</i> Pbs	4	1	1	2	1,05	1,28
<i>E. coli</i> Pbs	4	2	1	2	2,48	2,62
<i>E. coli</i> Pbs	4	3	1	2	2,19	2,21
<i>E. coli</i> Pbs	1	1	1	3	0,56	0,57
<i>E. coli</i> Pbs	1	2	1	3	0,60	0,44
<i>E. coli</i> Pbs	1	3	1	3	0,43	0,43
<i>E. coli</i> Pbs	2	1	1	3	0,52	0,60
<i>E. coli</i> Pbs	2	2	1	3	2,20	2,04
<i>E. coli</i> Pbs	2	3	1	3	1,70	2,08
<i>E. coli</i> Pbs	3	1	1	3	0,77	0,80
<i>E. coli</i> Pbs	3	2	1	3	2,64	2,45
<i>E. coli</i> Pbs	3	3	1	3	2,03	1,94
<i>E. coli</i> Pbs	4	1	1	3	0,99	1,00
<i>E. coli</i> Pbs	4	2	1	3	2,68	2,40

<i>E. coli Pbs</i>	4	3	1	3	1,44	1,40
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	2	1	0,03	0,01
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	2	1	0,47	0,43
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	2	1	0,06	0,07
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	2	1	0,42	0,43
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	2	1	1,77	1,56
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	2	1	1,24	1,38
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	2	1	1,74	1,61
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	2	1	2,34	1,96
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	2	1	1,51	1,49
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	2	1	2,24	2,07
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	2	1	2,74	2,90
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	2	1	1,90	1,94
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	2	2	0,04	0,10
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	2	2	0,57	0,57
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	2	2	0,15	0,12
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	2	2	0,23	0,30
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	2	2	1,69	1,73
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	2	2	1,74	1,76
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	2	2	1,70	1,73
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	2	2	2,85	2,69
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	2	2	2,22	2,08
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	2	2	2,08	2,27
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	2	2	2,51	2,60
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	2	2	1,21	1,42
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	2	3	0,49	0,49
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	2	3	1,15	1,06
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	2	3	0,47	0,44
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	2	3	0,73	0,81
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	2	3	2,01	2,35
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	2	3	2,16	1,66
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	2	3	1,17	1,18
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	2	3	2,26	2,94
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	2	3	1,37	1,43
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	2	3	1,34	1,43
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	2	3	2,82	3,07
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	2	3	2,35	2,13
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	3	1	0,07	0,08
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	3	1	0,24	0,26
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	3	1	0,03	0,05
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	3	1	0,22	0,23

<i>E. coli Pbs</i>	2	2	3	1	1,67	1,72
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	3	1	0,07	0,08
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	3	1	1,76	2,32
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	3	1	2,80	2,98
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	3	1	2,24	1,80
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	3	1	2,36	2,32
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	3	1	2,90	3,23
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	3	1	2,21	2,04
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	3	2	0,04	0,05
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	3	2	0,23	0,22
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	3	2	0,03	0,04
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	3	2	0,18	0,12
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	3	2	1,66	1,49
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	3	2	1,71	1,49
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	3	2	1,54	1,71
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	3	2	2,02	2,36
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	3	2	1,71	1,50
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	3	2	1,51	1,46
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	3	2	2,81	2,10
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	3	2	1,79	2,20
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	3	3	0,60	0,59
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	3	3	0,93	1,02
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	3	3	0,40	0,39
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	3	3	0,70	0,63
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	3	3	1,91	2,16
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	3	3	1,56	1,64
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	3	3	0,94	0,92
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	3	3	2,71	2,51
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	3	3	2,32	2,32
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	3	3	1,34	1,35
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	3	3	3,20	3,12
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	3	3	2,55	2,73
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	4	1	0,02	0,01
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	4	1	0,26	0,25
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	4	1	0,05	0,05
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	4	1	0,34	0,34
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	4	1	1,17	1,19
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	4	1	0,06	0,07
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	4	1	0,81	0,87
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	4	1	1,63	1,79
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	4	1	0,04	0,03

<i>E. coli Pbs</i>	4	1	4	1	0,85	1,19
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	4	1	1,92	1,19
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	4	1	0,04	1,81
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	4	2	0,03	0,02
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	4	2	0,11	0,10
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	4	2	0,03	0,05
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	4	2	0,06	0,07
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	4	2	1,06	1,19
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	4	2	0,07	0,06
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	4	2	1,01	0,94
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	4	2	1,56	1,77
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	4	2	0,06	0,03
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	4	2	1,08	1,15
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	4	2	1,90	1,70
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	4	2	0,61	0,07
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	4	3	0,42	0,42
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	4	3	0,84	0,97
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	4	3	0,35	0,27
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	4	3	0,43	0,42
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	4	3	0,59	0,57
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	4	3	0,32	0,33
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	4	3	0,40	0,42
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	4	3	1,10	1,14
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	4	3	0,40	0,38
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	4	3	0,46	0,44
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	4	3	1,16	1,19
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	4	3	0,30	0,30
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	5	1	0,04	0,02
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	5	1	0,03	0,05
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	5	1	0,06	0,06
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	5	1	0,03	0,04
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	5	1	0,16	0,26
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	5	1	0,09	0,08
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	5	1	0,08	0,06
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	5	1	1,50	1,62
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	5	1	0,78	0,10
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	5	1	0,12	0,12
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	5	1	1,62	1,63
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	5	1	0,11	0,09
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	5	2	0,08	0,09
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	5	2	0,05	0,05

Plasmid Incidence, Antibiotic and Metal Resistance among Enterobacteriaceae Isolated from Algerian Streams

S. Habi and H. Daba

Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de Biologie,
Faculté des Sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif (19000), Algérie

Abstract: Enterobacteriaceae isolates from surface water were examined to assess impact of faecal and/or metal pollution on heavy metal, antibiotics resistance and plasmid incidence. A bi-modal CMI distribution was noted for cadmium and mercury. On the other hand, modal distribution was observed for Pb. Critical metal concentration were >8 , >32 , $\geq 4096 \mu\text{g mL}^{-1}$ for mercury, cadmium and lead, respectively. High resistance to Pb and low resistance to Cd were remarked in stream water polluted with heavy metal. Resistance to antibiotics was most frequent to erythromycin (45.45-68.8%), tetracyclin family (14-61.11%), streptomycin (16-24%) and furan (8.16-24.1%). Bacterial resistance to some antibiotics (kanamycin, tetracyclin, doxycyclin, furan and chloramphenicol) was significantly different ($p < 0.05$) between streams water. Analysis of antibiotic resistance by principal component analysis showed a clear difference between fresh water and urban waste water for two principal components (1, 2) and the difference between principal component scores of antibiotic could not be related to the faecal pollution level. No difference was found between stream water subjected or not to contamination from metallic or poultry waste. The frequency of strains carrying plasmids was higher in urban waste water than metal and/or low faecal polluted stream water. No correlation was observed between plasmid and metal resistance.

Key words: Plasmid, antibiotic, heavy metal, enterobacteria, water

INTRODUCTION

Currently, sustainable development has gained a great importance in political development. Therefore, it is incompatible with an environment highly polluted by toxic compounds as heavy metals.

Heavy metals are stable and persistent environmental contaminants; they can be accumulated and transferred to higher organisms of food web (DeForest *et al.*, 2007; Croteau *et al.*, 2005) leading serious ecological and health problem.

Some metals were toxic often at low concentration (Mills and Colwell, 1977) and microorganisms were the first trophic web organism influenced by this toxicity (Giller *et al.*, 1998). These compounds may have deleterious effects on microorganisms as increasing lag-phases (Morozzi *et al.*, 1982), inhibition enzymatic activities (Nweke *et al.*, 2007) damage the structure of DNA (Bruins *et al.*, 2000) modifying composition and genetic structure of microbial populations (Kozdrój and van Elsas, 2001; Satchanska *et al.*, 2005) and reducing microbial diversity (Anne *et al.*, 1999). Since, bacteria play a key role in the environment, thus factors that concern

their diversity and activities threat fertility of ecosystems and consequently their sustainability.

To face heavy metals profusion in the environment, bacteria have evolved several resistance mechanisms that lead to persist or/ and to grow are in several cases plasmid-borne (Silver, 1996). These plasmid mediated resistance to heavy metals can also carry genes coding for antimicrobial resistance (Karbasizaed *et al.*, 2003). As these resistance traits are generally associated with transmissible plasmids (Karbasizaed *et al.*, 2003; Ünalı Coral *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2000), their dissemination requires a survey. Spreading of heavy metal resistance represented an ecological advantage for bacteria especially in heavy metals polluted environments. Proliferation of antibiotic resistant bacteria, by direct (antibiotic usage) or indirect (heavy metal pollution) selection, present a potential health hazard because its represent therapeutic failure sources.

Impact of dilution fluid (fresh water or urban waste water) on toxicity of metallic effluent was few explored. In Setif (Algeria), batteries manufacture plant discharge effluent from lime neutralized process into sewer. No information about waste environmental risk is available.

Moreover, level of faecal pollution or origin of water on bacterial heavy metal and antibiotic resistance has received little importance.

This study has as objectives:

- To determine the critical metal concentration that permit to differentiate sensitive and resistant bacteria
- To compare antibiotic and heavy metal resistance of bacteria isolated from urban waste water, metal and/or faecal polluted fresh water
- To determine the distribution of plasmid in various streams water, urban waste water and relationship between metal resistance and plasmid

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites and samples collection: Streams of setif region are characterized globally by flood in winter and a partial or total drought in summer. Four sampling sites, localized on 4 streams have been chosen (Fig. 1).

Level of faecal pollution, pollution type (organic, metallic) and origin of water (fresh or used) were criteria which governed sites selection. Site 1 (4°24.82"N latitude, 5°25'34.26"E longitude) was on the Ouricia stream. It was polluted by urban used water of the city Ouricia. Site 2 (36°12'50.03"N latitude, 5°22'58.50"E longitude), located 3 km downstream the begining of Bousselam stream which

was the main stream bordering Setif city. It was contaminated by brut urban effluent coming from Ouricia, Fermatou towns and neighboring localities, as well as sewage mill. Site 3 (36°9'48.66"N latitude and 5°25'34.26"E) was located on Echouk stream. This stream in an open sewer and have received urban effluent from North-East and South of Setif, as well as industrial sewages: mineral, metallic (Pb) and organic. Water was sampled 25 m downstream from the metallic effluent discharge point after input of industrial effluent. Site 4 was on El-Malah stream at 36°3'42.59" N latitude and 5°25'34.26"E longitude; It was located approximately 100 m from the confluence of Bousselam and El-Malah streams. The last stream was resulted from several streams that browsed salty soils and received urban used water from Guellal and Ouled Gassem localities, as well as industrial effluent coming from Echouk stream. Bousselam and El-Malah streams constitute the main water suppliers for barrage Ain Zada. Sites sampling are classified as following:

- **Site 1 (Ouricia stream):** Low faecal polluted water
- **Site 2 (Bousselam stream):** Moderate faecal polluted water
- **Site 3 (Echouk stream):** High faecal and industrial polluted water
- **Site 4 (El Mallah stream):** Low faecal and metal (Pb) polluted water

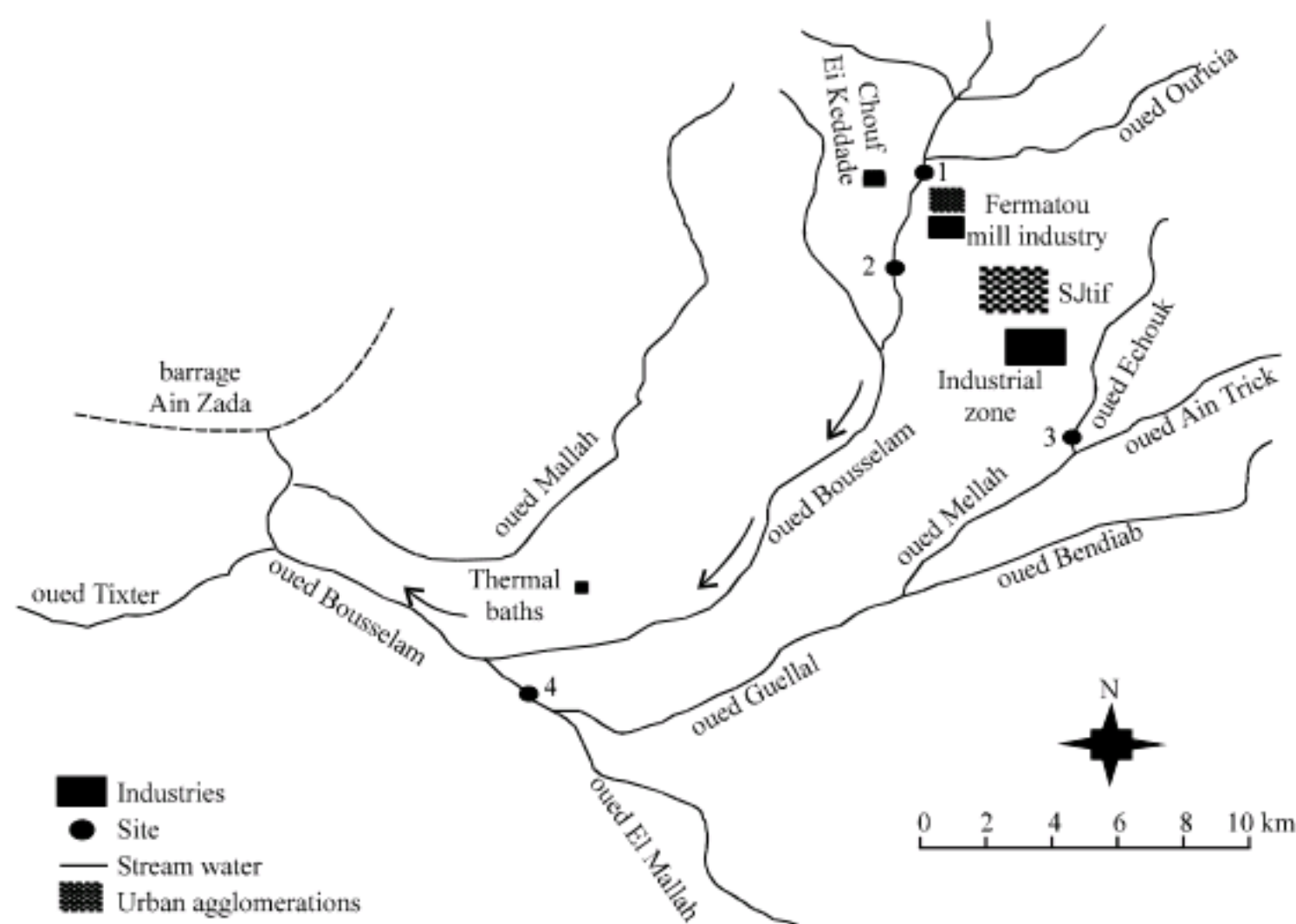


Fig. 1: Map of study area and site locations

Ouricia stream and El Mallah streams have browsed some poultry farming zones. Water samples were collected under the stream surface in sterilized glass bottles and stored on ice for up to 6 h from the time of collection for transport and subsequent analysis in the laboratory. For Echouk stream, water was sampled at 30 m after metallic effluent input. A total 10 samples by site have been harvested between January 1998 and May 2002.

Isolation and identification of enterobacteria: Samples of raw water and/or its dilutions were plated on Mac Conckey agar media. After incubation (18-24 h, 37°C), 10 to 12 lactose positive colonies, by sample of water, were purified on nutrient agar. Preliminary identification of strains obtained in pure culture was based on general characteristics of *Enterobacteriaceae* family in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). After confirmation of negative Gram reaction, negative oxidase test, facultative aero-anaerobic respiratory type and respiratory-fermentative type of metabolism, isolates were identified by API bacterial identification system (API 20E, Bio-Merieux). After identification, isolates were placed in a -70°C freezer.

Determination of resistance to heavy metals: The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of metals has been tested by two-fold serial dilution in Mueller-Hinton broth according to protocols described by Lennette *et al.* (1985). Three stocks solutions (10x) of heavy metals salts (HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$) were prepared in distilled water and sterilized by membrane filtration (0.2 μm). A set of metallic solutions (12) has been prepared, for each selected heavy metals salts, by two-fold serial dilution of the stock solutions, in sterile distilled water (10 mL). The range of concentration of metallic salts solutions was between 2.5 and 5120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HgCl_2 , 20 and 40960 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ or $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$. The metallic solutions were then diluted at 1/10 in Mueller-Hinton broth. Finally 200 μL of each Mueller Hinton broth supplemented with metallic solution were transferred separately in a 96-well microtiter plate rounded format and then inoculated with 10 μL of a bacterial suspension (10^7 cells mL^{-1}). After incubation (37°, 18-24 h) without shaking and observation of microtiter plate, using a reversed mirror, MICs were recorded in the lowest metallic concentration which prevented visible turbidity.

Determination of resistance to antibiotics: The antimicrobial resistance patterns of 208 strains, isolated from four sites, were tested by single disc diffusion

method using Muller-Hinton agar against the following antibiotics (Sanofi Diagnostics Pasteur): chloramphenicol (Cm, 30 μg), trimethoprim-sulphamethoxazole (Sxt 1.25/23.75 μg), amikacin (Ak, 30 μg), kanamycin (Km, 30 UI), tetracycline (Te, 30 μg), oxytetracyclin (Ot, 30 μg), doxycyclin (Do, 30 UI), streptomycin (S, 10 μg), colistin (Co, 50 μg), furan (Ft, 300 μg), erythromycin (E, 15 UI), tobramycin (Tm, 10 μg). Overnight broth cultures were diluted on saline solutions (9 mL). Bacterial saline suspensions (1:1000) were spread over Mueller-Hinton agar plates and plates were dried at 37°C for 30 min. Antibiotic discs were placed using disk distributor. The plates were incubated for 24 h at 37°C and organisms were classified as sensitive, or resistant. Intermediate susceptibility organism was scored as resistant. The tests were performed following National Committee for Clinical Laboratory Standards (1984) recommendations, including *Escherichia coli* ATCC 25922 as a control strain.

Detection of plasmids: Seventy three randomly *E. coli* strains isolated from the four sampling sites have been submitted to plasmid search. These strains have been divided in 2 distinct groups (first with 38 and second with 35). Two DNA markers (I and II) were kept as reference molecular weight marker to determine plasmid size. First marker was taken as standard for one group and second for other group. Marker I is a mixture of 5 DNA fragments (56, 33, 10.5, 4, 2.96 kb, Laboratoire de Microbiologie pharmaceutique, Rennes I, France) and Marker II (VII, 0.08-8.57 kb, Roche). Plasmids DNA was extracted from each strain after overnight growth at 37°C in Trypticase soja broth and prepared by alkaline lysis method modified by the addition of lysozyme (Walker, 1984; Grinsted and Bennett, 1988). Agarose gel 0.8% (w/v) was prepared and 12 μL of DNA preparation was loaded into each well. Electrophoresis was conducted for 2-3 h at 75-100 V and gel was stained with 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide (Grinsted and Bennett, 1988). Plasmid DNA band was observed with UV transilluminator and photographed with a Polaroid MP4 camera equipped with red filter and type 667 Polaroid film (Grinsted and Bennett, 1988).

Statistical analysis: Data derived from antibiotic and heavy metal susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* isolates were converted to binary code. Statistical analysis of metal tolerance data were performed by a comparison of proportions by the Z-test, with confidence levels of 5% being considered significant. All pairwise comparison of proportions of antibiotic resistance, plasmid and factor scores were made by Mann-Whitney test and multiple comparisons of principal

component scores procedure were analyzed by Kruskal-Wallis test with confidence levels of 5% being considered significant. Statistica software was used to analyze all data.

RESULTS

Identification: On a total of 373 isolated enterobacteria strains, 340 were identified. The strains were distributed according to following species: *E. coli*, *C. sp.*, *En. sp.*, *K. sp.*, *S. sp.*, NI (Table 1). The most frequent genera isolated from 1, 2, 4 sites were *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. At site 3, only two genera *Escherichia*, *Klebsiella* were dominant.

Heavy metal resistance

Metal resistance level: Distribution CMI's value to lead, cadmium and mercury (Fig. 2) showed large range and varied between 64-8192, 2-512 and 0.25-168 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. A bi-modal CMI's distribution was noted for cadmium and mercury. On the other hand modal distribution was observed for Pb. Otherwise 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of mercury and 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of cadmium were proposed as critical values to distinguish resistant and sensitive strains. While for Pb, it was difficult to establish critical value. However, 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$ could be proposed,

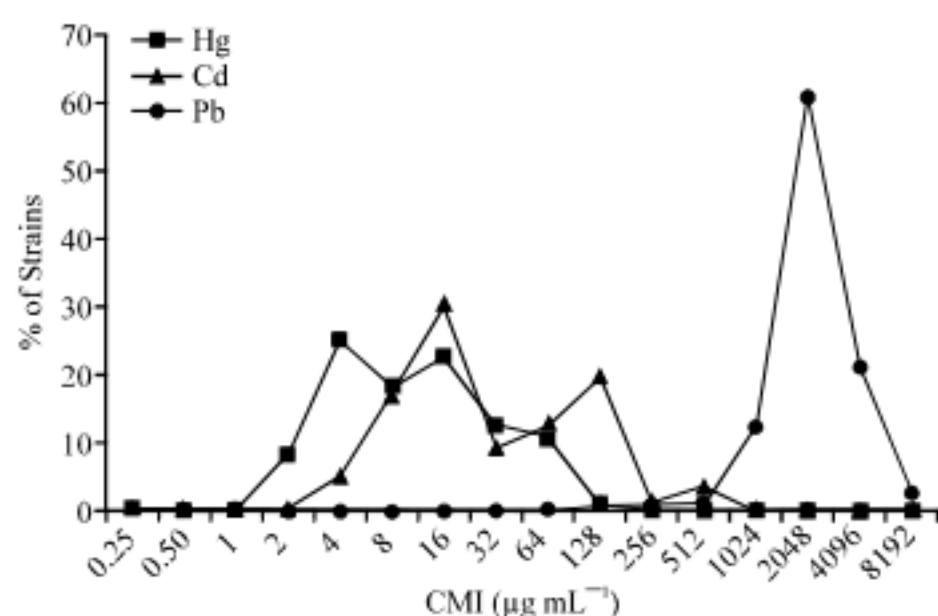


Fig. 2: The minimal inhibitory concentration (MIC) distribution of resistance to mercury, cadmium and lead among 373 enterobacteria strains.

Table 1: Distribution of the enterobacteria species found in different sites

Species	Percentage of strains			
	Ouricia (95)	Bousselam (96)	Echouk (98)	El-Malah (84)
<i>Citrobacter sp.</i>	22.11	17.70	9.18	13.10
<i>Escherichia coli</i>	50.53	33.30	45.90	53.57
<i>Enterobacter sp.</i>	3.16	8.33	5.10	3.57
<i>Klebsiella sp.</i>	13.68	27.10	26.50	19.05
<i>Serratia sp.</i>	1.05	6.25	5.10	0.00
Ni ^a	9.47	7.29	8.16	10.71

a : unidentified

because of curve decrease of strains percentage at this value. According to CMI's values, metal toxicity gradient was found in the following order: Hg>Cd>Pb.

Metal resistance pattern: Globally the most frequent phenotypes, summarized in Table 2, were represented by Hg, Pb, HgCd and HgCdPb and varied between sites. Resistance to mercury was almost always associated to cadmium resistance. For resistance to single metal, percentage of strains with Pb phenotype (19.05%) were significantly higher in site 4 compared to strains isolated from site 1 or 2 (6.12-6.32%). Also, marked frequency to Hg phenotype was shown in site 4 (21.43%) than in site 3 (10.2%). HgCd phenotype was more frequent among strains isolated from site 1 or 2 (30.21-32.63%) than those from site 4 (14.29%). Whereas HgCdPb phenotype, higher frequency predominate among strains isolated from site 3 (14.29%) than strains of other sites (1.04- 3.16%).

Mono, multiple and cumulative resistance to metals:

Except values found in some streams, globally resistance to 2 metals, as shown in Table 3, was more frequent than resistance to one or 3 metals. Proportion of sensitive strains was less frequent in site 4 than in site 1. Resistance to one metal was more common among strains isolated from site 4 than those other sites. Resistance to 2 metals was expressed by significantly greater proportions of

Table 2: Distribution of heavy metal resistance pattern of enterobacteria strains at different

Resistance pattern	Percentage of resistant strains			
	Ouricia (95)	Bousselam (96)	Echouk (98)	El-Malah (84)
S	43.16 ^a	34.38	35.71	27.38 ^a
Hg	14.74	12.50	10.20 ^a	21.43 ^a
Cd	1.05	4.17	6.12	3.57
Pb	6.32 ^a	6.25 ^b	6.12 ^c	19.05 ^{abc}
HgCd	29.47 ^a	30.21 ^b	19.39	14.29 ^{ab}
HgPb	1.05	4.17	3.06	4.76
CdPb	1.05 ^{ab}	7.29 ^a	5.10	7.14 ^b
HgCdPb	3.16 ^a	1.04 ^b	14.29 ^{abc}	2.38 ^c

() No. of strains. ^{a-c}Difference is statistically significant ($p < 0.05$) in sites having same letter in the same line

Table 3: Frequency of mono and multi-resistance to heavy metals among enterobacteria strains isolated from different sites

No. of resistance pattern	Percentage of resistant strains			
	Ouricia (95)	Bousselam (96)	Echouk (98)	El-Malah (84)
0	43.16 ^a	34.38	35.71	27.38 ^a
1	22.10 ^a	22.92 ^b	22.45 ^c	44.05 ^{abc}
2	31.58	41.67 ^{ab}	27.55 ^a	26.19 ^b
3	3.16 ^a	1.04 ^b	14.29 ^{abc}	2.38 ^c
Global resistance to metals	56.84 ^a	65.62	64.29	72.62 ^a

() No. of strains. ^{a-d}Difference is statistically significant ($p < 0.05$) in sites having same letter in the same line

site 2 isolates than site 3 or 4 isolates. Resistance to three metals was prevalent amongst site 3 isolates. A higher incidence of global resistance to metals was found among site 4 isolates than those in site 1 isolates. When cumulative metal resistance frequency, summarized in Table 4, was compared between sites subjected or not to heavy metal pollution, no marked difference was observed for mercury (42.86-47.92%). For cadmium, significant difference was found between site 4 (27.38%) and site 2 or 3 (42.71-44.9%). Whereas for lead higher difference was noted between site 3 (28.57%) and 1 (11.58%) or between site 4 (33.33%) and 1 or 2 (11.58-18.75%).

Antibiotic resistance: A panel of nine antibiotics was used to test antibiotic resistance of strains isolated from stream polluted with the mixed effluent (urban and industrial), faecal polluted stream or urban used water. The antibiotic resistances of 208 enterobacteria strains are shown in Table 5. The most frequent resistance was found for tetracyclin family (14-61.11%), erythromycin (45.45-68.8%), streptomycin (16-24%) and furan (8.16-24.1%). Resistance to kanamycin (5.45-12.96%), trimethoprim-sulphamethoxazole (8-14.29%) and chloramphenicol (2-12.24%) was relatively low. Resistance to colistin, tobramycin and amikacin was absent. The difference between sites was significant ($p < 0.05$) for family tetracyclin, chloramphenicol, erythromycin and furan. Without introducing discrimination variable of site, all pairwise comparison of antibiotic resistance between freshwater streams and/or used water has not given a clear difference (Table 5). Principal Component Analysis (PCA) could be another method to make an approach of antibiotic resistance between stream water when variable was high. Discrimination of site against source of water, faecal pollution level, metal pollution, or poultry farming waste input was taken into account when antibiotic resistance was analyzed by PCA. Antibiotic resistance data of strains isolated from three streams and used water were combined and all variables were coded. Correlation matrix was generated, based on all coded variable. Two components were extracted; component 1 and 2 accounts for 31.54, 14.4 % respectively of the variance of antibiotic

Table 4: Frequency of cumulative resistance to heavy metals among enterobacteria strains isolated from different sites

Metal	Percentage of resistant strains			
	Ouricia (95)	Bousselam (96)	Echouk (98)	El-Malah (84)
Hg	46.31	47.92	46.94	42.86
Cd	34.74	42.71 ^a	44.90 ^b	27.38 ^{ab}
Pb	11.58 ^{ca}	18.75 ^b	28.57 ^c	33.33 ^{ab}

() No. of strains. ^{ac} Difference is statistically significant ($p < 0.05$) in sites having same letter in the same line

resistance of strains isolated from four sites. First component was represented by doxycycline, streptomycin and oxytetracycline; these antibiotics contributed to about 50% of this axis. The second component was represented by erythromycin and contributes to about of 45% of this axis. Spearman correlation coefficients between principal component 1, 2 scores and variable were shown in Table 6. Significant difference (Table 7) of factor 1 and 2 were found with faecal pollution and origin of water or with factor 1 and site. With faecal level, multiple comparison of p-values have shown that significant difference occur between high and moderate level for principal component 1 or between low and high level for principal component 2. Otherwise for site, multiple comparisons of p-values have shown that significant difference occur between 3 and 2. No significant difference was seen between streams water subjected or not to metal pollution and/or to poultry waste.

Plasmids analysis

Plasmid distribution: When taking DNA size marker I (≤ 56 kb) (Table 8), frequency of strains carrying plasmids between sites was not significant. On the other hand with the DNA size marker 2 (≤ 8.57 kb), significant difference ($p < 0.05$) was noted between strains isolated from site 3 and sites 1, 4.

Table 5: Incidence of antibiotic resistance among enterobacteria strains isolated from different sites

Antibiotic	Percentage of strains resistant to antibiotic			
	Ouricia (95)	Bousselam (96)	Echouk (98)	El-Malah (84)
Metal	(95)	(96)	(98)	(84)
S	24.07	16	20.00	20.41
K	12.96	8	5.45	12.24
Te	61.11 ^a	34 ^{ab}	56.36 ^b	44.90
Ot	33.33 ^a	30 ^b	50.91 ^{ab}	40.82
Do	35.19 ^a	14 ^{abc}	41.82 ^b	32.65 ^c
Sxt	11.10	8	9.09	14.29
F	24.10 ^a	10	18.18	8.16 ^a
E	68.50 ^a	62	45.45 ^a	57.14
C	11.10	2 ^a	10.91	12.24 ^a

() No. of strains. ^{ac} Difference is statistically significant ($p < 0.05$) in sites having same letter in the same line

Table 6: Spearman correlation coefficients between scores and variable on principal component axes 1 and 2

Variables	Principal component 1	Principal component 2
S	0.655*	NS
K	0.411*	0.188*
Te	0.522*	-0.520*
Ot	0.787*	-0.221*
Do	0.788*	NS
Sxt	0.410*	NS
F	0.159*	0.443*
E	NS	0.797*
C	0.470*	0.165*

NS: Not significant. * $p < 0.05$

Table 7: Statistical test difference for principal component 1, 2 scores and variable

Variables	PCA axes	Rank ¹ of site characteristic	Test
Faecal pollution level	Principal component 1	High > moderate	K.W. ²
Origin of water		Fresh water > Urban used water	P = 0.0000
Site		3>2	M.W. ³
Faecal pollution level	Principal component 2	Low>high	P = 0.0309
Origin of water		Fresh water> Urban used water	K.W.
			P = 0.0174
			K.W.
			P = 0.0343
			M.W.
			P = 0.0095

¹:Ranking of site characteristic was conducted with multiple comparisons of p-values. ²:K. W.: Kruskal-Wallis test. ³: M. W.: Mann-Whitney test

Table 8: Frequency of plasmid distribution among enterobacteria strains by DNA size marker and sampling site

Site	Percentage of strains with plasmid	
	DNA size marker 1 (≤56 kb)	DNA size marker 2 (≤8.57 kb)
Ouricia	50.00 (10)	30 ^a (10)
Bousselam	33.33 (9)	71.43 (7)
Echouk	30.00 (10)	100 ^{ab} (10)
El-Mallah	33.33 (9)	62.5 ^b (8)

() No. of strains. ^{ab}Difference is statistically significant (p<0.05) in sites having same letter in the same column

Table 9: Plasmid heavy metal correlation

No. of <i>E. coli</i> tested	Presence or absence of plasmids	Resistance to		
		Hg	Cd	Pb
3	-	-	-	-
1	-	+	-	-
23	-	+	+	-
2	-	-	+	+
1	-	+	-	+
7	-	+	+	+
4	+	-	+	-
2	+	+	-	-
18	+	+	+	-
1	+	+	-	+
3	+	-	+	+
5	+	+	+	+
3	+	-	-	-

Plasmid and metal resistance correlation: No correlation was found between plasmid and heavy metal resistance (Table 9).

DISCUSSION

HgCl₂, of Pb(NO₃)₂ and CdCl₂ concentrations determined according to the CMI curves and allowing to differentiate sensitive from resistance strains was in agreement with the studies of Grewal and Tiwari (1990), Antai, (1987) and Groves and Young (1975). On the other hand these proposed values differ from those others authors (Jones *et al.*, 1986; Niemi *et al.*, 1983). The difference in the determination of the critical concentrations can have several explanations: (1) method

used, (2) type of medium, (3) nature of metal salt used, (4) type of bacteria tested have greater influence on metal toxicity. At sites 1 and 2, higher frequency of HgCd phenotype was probably linked to: (1) generic and species composition of sites, (2) specific conditions in these sites that favors proliferation of this phenotype, (3) no human strains origin, (4) conditions presents in sites 3 and 4 repress this phenotype. Survey or testing metal CMI from randomly isolated strains is an excellent method for detecting heavy metal pollution or discriminating between sites with or without heavy metal pollution. High percentage of Pb phenotype or Pb resistant strains observed in site 4 (El Mallah) could explane the metallic pollution (Pb) induced by the battery manufacture effluent. Earlier studies have noted that higher number of metal resistance bacteria in given site was attributed to selective pressure by heavy metal (Al-Jebouri, 1985; Zelibor *et al.*, 1987; Diaz-Ravina *et al.*, 1994). But, we are unable to explain the high percentage of Hg phenotype observed in strains isolated from site 4, since identifiable or characterized mercury pollution source do not exist. Low percentage of cadmium resistant strains observed in site 4 could probably be related to higher salinity of soil and probably interfering with Cd efflux mechanism. Global resistance to metals was not influenced by faecal pollution level. In this study, streams water (sites 1, 2 for Pb, Cd, Hg and 3 for Hg) without direct or historical metal pollution contain heavy metal resistant bacteria suggesting the existence of other factors, than direct selection, for promoting heavy metal resistance.

The present study has displayed that significant difference to some antibiotics of *Enterobacteriaceae* strains isolated from different sites were not related to faecal pollution level. Miranda and Castillo (1998) were found similar results when testing sensitivity to some antibiotics of *Aeromonas* isolates from different sources with varied level of faecal pollution. Comparison of antibiotic resistance with similar studies can be made while taking into account origin of the strains and the studied bacterial groups. Antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* strains for fresh water has reported by Goni-Urriza *et al.* (2000), Antai (1987), Obi *et al.* (2004) and Al-Jebouri (1985). The values of these studies range from 9.1-70%, 0-17%, 1.8-17.8%, 1.8-80%, 50-80% for tetracycline, kanamycin, chloramphenicol, streptomycin and erythromycin, respectively. Present results correspond fairly well to the results from these studies. Whereas for strains isolated from sewage effluent, values found in this study was comparable for resistance to streptomycin (1-55%), tetracycline (5-75%), erythromycin (30-60%), kanamycin (5.6-25%) reported by Al-Jebouri (1985), Jones *et al.* (1986), Silva *et al.* (2006) and Olayemi

and Opaleye (1990). Otherwise observed frequency to chloramphenicol and kanamycin resistance among sewage strains was markedly lower than those demonstrated in similar studies (Silva *et al.*, 2006; Olayemi and Opaleye, 1990). On the contrary the rate of resistance to tetracyclin was higher compared to others findings (Jones *et al.*, 1986; Niemi *et al.*, 1983; Al-Jebouri, 1985; Watkinson *et al.*, 2007). With principal component analysis no clear difference was seen with faecal pollution level. In the same way no significant difference were seen with sample water subjected or not to metal pollution and/or to poultry waste, but marked difference was noted between fresh and urban used water. These mitigated findings of antibiotic resistance were probably linked to insufficiency sampling. Indeed Miranda and Castillo (1998) have shown that moderately polluted waters showed lower antibiotic multiresistance and metal susceptibility than unpolluted and highly polluted ones. In the same way Tuckfield and McArthur (2008) have found when heavy metal concentration increase, the prevalence of antibiotic resistance decrease. Difference in antibiotic resistance between fresh water and urban used water could have several explanations: generic and species composition, distance between sampling site and contamination with urban used water, transfer of antibiotic resistance. In fact several authors (Boon and Cattanach, 1999; Goni-Urriza *et al.*, 2000; McArthur and Tuckfield, 2000) have shown that the antibiotic resistance increase downstream from the polluted discharge. In the same way transfer of antibiotic resistance between strains (Silva *et al.*, 2006) in stream water could be favoured by distance between sampling site and input of the contamination by urban used water. Also, species composition of water sample could affect antibiotic resistance pattern (Niemi *et al.*, 1983).

Numerous studies have examined the relationship between plasmid incidence and the presence of environmental contaminants at a given site. Generally higher plasmid incidence was observed in polluted sites (Baya *et al.*, 1986; Bell *et al.*, 1983; Burton *et al.*, 1982; Hada and Sizemore, 1981). However, with regard to level of faecal pollution, consensus was not observed when a plasmid frequency between sites was examined. Significance difference in frequency of plasmid was noted between sites with low and high faecal pollution when examining *Pseudomonas*-like isolates (Burton *et al.*, 1982) or *Aeromans/Vibrio* group. But no difference was noted with non *Pseudomonas*-like isolates (Burton *et al.*, 1982) or other bacterial group. Our data indicate difference between urban used water and low faecal polluted streams when examined relatively low size plasmid frequency among enterobacteria. The relatively

preponderance of small plasmids showing in this study contrast with the results reported by Glassman and McNicol (1981). Higher incidence of enterobacteria strains harbouring these smaller plasmids probably have human origin and agree the findings of Al-Bahry (2000) which report that most human strains have relatively much smaller plasmids. Absence of correlation between presence of plasmid and resistance to mercury, cadmium and lead was in general agreement with that reported by Fredrickson *et al.* (1988) and Karbasizaed *et al.* (2003), suggesting that these resistance characters were chromosomally coded. In fact antibiotic and metal resistance can be governed by genes carried by the chromosome (Silver, 1996; Witte *et al.*, 1986) or by transposons (Lett *et al.*, 1985).

REFERENCES

- Al-Bahry, S.N., 2000. Plasmid profiling of antibiotic resistant *Salmonella* species isolated in Muscat, Oman. Pak. J. Biol. Sci., 3: 215-218.
- Al-Jebouri, M.M., 1985. A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage polluted River Tigris in Mosul, Iraq. Applied Bacteriol., 50: 401-405.
- Anne, S.R., O. Enger and V. Torsvik, 1999. Abundance and diversity of archaea in heavy metal contaminated soils. J. Applied Environ. Microbiol., 65: 3293-3297.
- Antai, S.P., 1987. Incidence of *Staphylococcus aureus*, coliforms and antibiotic strains of *Escherichia coli* in rural water supplies in Port Harcourt. J. Applied Bacteriol., 62: 371-375.
- Baya, A.M., P.R. Brayton, V.L. Brown, D.J. Grimes, E. Russek-Cohen and R.R. Colwell, 1986. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. Applied Environ. Microbiol., 51: 1285-1292.
- Bell, J.B., G.E. Elliott and D.W. Smith, 1983. Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. Applied Environ. Microbiol., 46: 227-232.
- Boon, P.I. and M. Cattanach, 1999. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, South-Eastern Australia. Lett. Applied Microbiol., 28: 164-168.
- Bruins, M.R., S. Kapil and F.W. Oehme, 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol. Environ. Safety, 45: 198-207.

- Burton, N.F., J.D. Marin and A.T. Bull, 1982. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *Applied Environ. Microbiol.*, 44: 1026-1029.
- Croteau, M.N., S.N. Luoma and A.R. Stewart, 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.*, 50: 1511-1519.
- De Forest, D.K., K.V. Brix and W.J. Adams, 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat. Toxicol.*, 84: 236-246.
- Diaz-Ravina M., E. Baath and A. Frostegard, 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied Environ. Microbiol.*, 60: 2238-2247.
- Fredrickson, J.K., R.J. Hicks, S.W. Li and F.J. Brockman, 1988. Plasmid incidence in bacteria from deep surface sediments. *Applied Environ. Microbiol.*, 54: 2916-2923.
- Ghosh, A., A. Singh, P.W. Ramteke and V.P. Singh, 2000. Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272: 6-11.
- Giller, K.E., E. Witter and S.P. McGrath, 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1389-1414.
- Glassman, D.L. and L.A. McNicol, 1981. Plasmid frequency in natural population estuarine microorganisms. *Plasmid*, 5: 231-232.
- Goni-Urriza, M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette and C. Quentin, 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas*. *Applied Environ. Microbiol.*, 66: 125-132.
- Grewal, J.S. and R.P. Tiwari, 1990. Resistance to metal ions and antibiotics in *Escherichia coli* from foodstuffs. *J. Med. Microbiol.*, 32: 223-226.
- Grinsted, J. and P.M. Bennett, 1988. *Plasmid Technology*. 2nd Edn., Academic Press. USA., ISBN: 0-12-303970-3, pp: 129-142.
- Groves, D.J. and F.E. Young, 1975. Epidemiology of antibiotic and heavy metal resistance in Bacteria: Resistance patterns in Staphylococci isolated from population not known to be exposed to heavy metals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 614-621.
- Hada, H.S. and K. Sizemore, 1981. Incidence of plasmids Marine *Vibrio* sp. Isolated from oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Applied Environ. Microbiol.*, 1981: 198-202.
- Holt, J.G., N.R. Krig, J.T. Staley and S.T. Williams, 1994. Gram Positive Cocci. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edn., Baltimore, Maryland USA., pp: 528-540.
- Jones, J.G., S. Gardener, B.M. Simon and R.W. Pickup, 1986. Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland towns in the English Lake District. *J. Applied Bacteriol.*, 60: 443-453.
- Karbasizadeh, V., N. Badami and G. Emati, 2003. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Afr. J. Biotechnol.*, 2: 379-383.
- Kozdrój, J. and J.D. van Elsas, 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Methods*, 43: 197-212.
- Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler and H.J. Shadomy, 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th Edn., American Society for Microbiology, Washington, DC., USA., ISBN: 0-914826-69-7, pp: 967-983.
- Lett, M.C., P.M. Bennett and D.J.M. Vidon, 1985. Characterization of Tn3926, a new mercury-resistance transposon from *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 40: 79-91.
- McArthur, J.V. and R.C. Tuckfield, 2000. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: Effects of industrial pollution. *Applied Environ. Microbiol.*, 66: 3722-3726.
- Mills, A.L. and R.R. Colwell, 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay and sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 99-103.
- Miranda, C.D. and G. Castillo, 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *The Science Total Environ.*, 224: 167-176.
- Morozzi, G., G. Cienci and G. Caldini, 1982. The tolerance of an environmental strain of *Escherichia coli* to some heavy metals. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*, 189: 55-62.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

- Niemi, M., M. Sibakov and S. Niemela, 1983. Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. *Applied Environ. Microbiol.*, 45: 79-83.
- Nweke, C.O., C.S. Alisi, J.C. Okolo and C.E. Nwanyanwu, 2007. Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment. *Applied Environ. Res.*, 5: 123-132.
- Obi, C.L., P.O. Bessong, M.N.B. Momba, N. Potgieter, A. Samie and E.O. Igumbor, 2004. Profiles of antibiotic susceptibilities of bacterial isolates and physico-chemical quality of water supply in rural Venda communities, South Africa. *Water SA.*, 30: 515-519.
- Olayemi, A.B. and F.I. Opaleye, 1990. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from hospital and urban wastewater. *W. J. Microbiol. Biotech.*, 6: 285-288.
- Satchanska, G., E.N. Pentcheva, R. Atanasova, V. Groudeva, R. Trifonova and E. Golovinsky, 2005. Microbial diversity in heavy-metal polluted waters. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 19: 61-67.
- Silva, J., G. Castillo, L. Callejas, H. Lopez and J. Olmos, 2006. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from treated sewage effluent in Antofagasta, Antofagasta, Chile. *Electronic J. Biotechnol.*, 9: 533-550.
- Silver, S., 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions a review. *Gene*, 179: 9-19.
- Tuckfield, R.C. and J.V. McArthur, 2007. Spatial analysis of antibiotic resistance along metal contaminated streams. *Microb. Ecol.*, 55: 595-607.
- Unaldi Coral, M.N., H. Kormaz, B. Arikian and G. Coral, 2005. Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* sp. isolated from Sofulu Landfill, in Adana, Turkey. *Ann. Microbiol.*, 55: 175-179.
- Walker, J.M., 1984. *Methods in Molecular Biology. Vol. 2, Nucleic Acids.* Humana Press. Clifton, New Jersey, ISBN: 0-89603-064-4, pp: 191-195.
- Watkinson, A.J., G.B. Micalizzi, G.M. Graham, J.B. Bates and S.D. Costanzo, 2007. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters and oysters from Urban Riverine system. *Applied Environ. Microbiol.*, 73: 5667-5670.
- Witte, W., L. Green, T.K. Misra and S. Silver, 1986. Resistance to mercury and to cadmium in chromosomally resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29: 663-669.
- Zelabor, J.L., M.W. Doughten, D.J. Grimes and R.R. Colwell, 1987. Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by direct viable counting method. *Applied Environ. Microbiol.*, 53: 2929-2934.

<i>E. coli Pbs</i>	1	3	5	2	0,12	0,10
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	5	2	0,07	0,07
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	5	2	0,17	0,17
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	5	2	0,38	0,38
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	5	2	0,10	0,10
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	5	2	1,73	1,49
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	5	2	0,12	0,12
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	5	2	0,11	0,11
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	5	2	1,64	1,53
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	5	2	0,09	0,09
<i>E. coli Pbs</i>	1	1	5	3	0,27	0,28
<i>E. coli Pbs</i>	1	2	5	3	0,34	0,35
<i>E. coli Pbs</i>	1	3	5	3	0,59	0,57
<i>E. coli Pbs</i>	2	1	5	3	0,40	0,40
<i>E. coli Pbs</i>	2	2	5	3	0,36	0,35
<i>E. coli Pbs</i>	2	3	5	3	0,41	0,42
<i>E. coli Pbs</i>	3	1	5	3	0,33	0,33
<i>E. coli Pbs</i>	3	2	5	3	1,62	1,56
<i>E. coli Pbs</i>	3	3	5	3	0,52	0,50
<i>E. coli Pbs</i>	4	1	5	3	0,43	0,42
<i>E. coli Pbs</i>	4	2	5	3	1,79	1,70
<i>E. coli Pbs</i>	4	3	5	3	0,55	0,54

عزلات من بكتريا القولون عزلت من المياه السطحية ومياه الصرف الصحي الحضري، وتم اختبار قابليتها على البقاء، والنمو، والتراكم، وكذلك تأثير التلوث البرازي و أو التلوث المعدني على مقاومة المضادات الحيوية، والمعادن الثقيلة، وتردد البلازميدات التراكيذ الحرجة للمعادن الثقيلة التي سمحت بالتفريق بين العزلات المقاومة عن الحساسية هي: $8 < 32 \leq 4096$ مكغ مل-1 لمعدن الزئبق، والكاديوم، والرصاص على الترتيب . وأظهر تحليل أنماط مقاومة المعادن الثقيلة أن النمط الظاهري للرصاص هو أعلى معنويا بثلاث مرات في الواد المالح الذي يستقبل النفايات السائلة التي يكون مصدرها برازي و معدني. اذ هناك قدر من التلوث البرازي متساوي. كما يتضمن وادي المالح ميكروبات حساسة قليلة، و كثير من الميكروبات المقاومة للمعادن، و كثير من الميكروبات أيضا أحادية المقاومة للمعادن، مع ارتفاع تردد عالي للميكروبات المقاومة للرصاص. إن مقاومة الزئبق والكاديوم معروفة كثيرا عند البكتريا المعوية المعزولة من الوديان المختلفة ومياه الصرف الصحي الحضري. إن العزلات كانت على الأغلب مقاومة للارثرومسين (70-%) (45)، وكذلك التترسكلين (14-61%)، والسربتومسين (16-24 %) والفيران (8-24 %). لوحظ فرق معنوي لمقاومة كانمسين، و تترسكلين، ودوكسيسكلين، والفيران، والكلرامفينيكول حيث سجل بين العزلات المعزولة من مختلف الوديان ومياه الصرف الصحي الحضري. وتبين أن المقاومة للأمينوسيد أو الكولستين كانت معدومة. إن معالجة المعطيات لمقاومة المضادات الحيوية بواسطة تحليل المركبات الرئيسية (ACP) أظهر أن مقاومة المضادات الحيوية ليس لها أي ارتباط بدرجة التلوث البرازي. وفي نفس الوقت اتضح أن مقاومة المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من مختلف الوديان لم تكن مختلفة بدرجة معنوية، سواء تعرضت هذه الوديان أو لم تتعرض إلى تلوث معدني أو فلاح (تربية المواشي والدواجن). إن عتبة تحمل الملوحة لبكتريا *E.coli* المعزولة من مختلف المياه السطحية ومياه الصرف الصحي الحضري جاءت متماثلة مع عتبة التحمل المتوسطة لمالح الطعام (0,5 M NaCl). وكان تردد البلازميدات أكثر ظهورا وتواجدا ضمن العزلات المعزولة من مياه الصرف الصحي الحضري. ما لم يلاحظ أي علاقة ارتباط بين وجود البلازميدات والمقاومة للمعادن الثقيلة. كان تواجدا *E.coli* المقاومة والحساسية للرصاص مخبريا في الماء المعقم لسد عين زادة متماثل عند 10،30 أو 37م°، كلا العزلتان لل *E.coli* تتلاشيان وتنتهيان بنفس السرعة. يتضرر نمو *E.coli* المقاومة للرصاص كثيرا بالتركيز المثبط للرصاص مهما يكن تأثير العامل الفيزيائي أو الكيميائي معتبرا (الأس الهيدروجيني أو الملوحة). كما أظهرت *E.coli* الحساسية إلى الرصاص قابلية فائقة على تراكم الرصاص.

الكلمات المفتاحية: المقاومة، المعادن الثقيلة، المضادات الحيوية، البلازميدات، التواجد، تحمل الملوحة، النمو، البكتريا المعوية، الماء.

Abstract

Survival, growth, and heavy metal accumulation, as well as the impact of a faecal and/or metallic pollution on antibiotics or heavy metals resistance and plasmids frequency were examined among enterobacteria strain of fresh and urban used water. To distinguish Hg, Cd and Pb resistant from sensitive strains, following critical concentration were proposed $> 8 > 32$, ≥ 4096 mg ml⁻¹ respectively. Analysis of Heavy metals resistance patterns showed that Pb phenotype was significantly 3 times higher in faecal and metal polluted streams (El Mallah). At equal faecal pollution level, El Mallah stream has less susceptible organisms, most of metal-resistant bacteria, more mono-metal resistant germs and high cumulative frequency lead resistant strains. Mercury and cadmium resistance is very common among Enterobacteriaceae strains isolated from different stream and urban used water. Enterobacteriaceae strains were more resistant to erythromycin (45-70%), tetracyclines (14-61%), streptomycin (16-24%), and furan (8-24%). A significant difference for kanamycin, tetracycline, doxycycline, furan, and chloramphenicol resistance was noted between isolated strains from different stream and urban used water. Resistance to aminoglycosides or colistin was absent. Data processing of antibiotic resistance by the principal components analysis (PCA) showed that antibiotic resistance is not linked to faecal pollution level. Also it revealed that bacterial resistance to antibiotic was not significantly different between metal or agricultural (poultry farm).impacted or not streams water. The halo-tolerance thresholds of *E. coli* strains isolated from different streams or urban used water were comparable and average threshold to NaCl was 0.5 M. Plasmids were more common among urban waste water isolated *E. coli* strains. No correlation was observed between plasmids and heavy metals resistance. In autoclaved lake (Ain Zada) water, survival of lead resistant and sensitive *E. coli* was similar. At 10, 30 or 37 ° C, both *E. coli* strains have the same decline rates. The growth of lead resistant *E. coli* was more affected by lead, inhibitory concentration, whatever physical or chemical factors (pH, temperature or salinity) influence. Lead was accumulated higher in lead sensitive *E. coli*.

Keywords : resistance, heavy metal, antibiotic, plasmid, survival, halo-tolérance, growth, *Enterobacteriaceae*, water

RESUMÉ

La survie, la croissance, l'accumulation, ainsi que l'impact d'une pollution fécale et/ou métallique sur la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et sur la fréquence des plasmides ont été examinées chez des souches d'entérobactéries isolées des eaux de surface et des eaux usées urbaines. Les concentrations critiques des métaux lourds permettant de distinguer les souches résistantes des souches sensibles sont > 8 , >32 , $\geq 4096 \mu\text{g ml}^{-1}$ pour le mercure, le cadmium, et le plomb respectivement. L'analyse des profils de résistance aux métaux lourds a montré que le phénotype Pb est significativement 3 fois plus élevé dans l'oued El Mallah qui reçoit des effluents d'origine fécale et métallique. A un degré de pollution fécale égale, l'oued El Mallah contient moins de germes sensibles, plus de germes métallo-résistants, ou mono-résistants aux métaux et une fréquence cumulée élevée de germes résistants au plomb. La résistance au mercure et au cadmium est très commune chez les entérobactéries isolées des différents oueds et des eaux usées urbaines. Les souches d'entérobactéries sont beaucoup plus résistantes à l'érythromycine (45-70 %), aux tétracyclines (14-61 %), à la streptomycine (16-24 %), et au furane (8-24 %). Chez les souches isolées des oueds et des eaux usées urbaines, la résistance à la kanamycine, à la tétracycline, à la doxycycline, au furane, et au chloramphénicol est significativement différente. La résistance aux aminosides ou à la colistine est absente. Le traitement des données de la résistance aux antibiotiques par l'analyse des composantes principales (ACP) a montré que la résistance aux antibiotiques n'est pas reliée au degré de pollution fécale. De même elle a révélée que la résistance aux antibiotiques chez les souches bactériennes isolées des différents oueds n'est pas significativement différente, que ces oueds soient soumis ou non à une pollution métallique ou agricole (élevage de poulets). Les seuils d'halo-tolérance d'*E. coli* isolée des différents cours d'eau ou l'eau usée urbaine sont comparables et le seuil de tolérance moyen au NaCl est de 0,5 M. La fréquence des plasmides est beaucoup plus élevée parmi les souches isolées de l'eau usée urbaine. Aucune corrélation n'a été observée entre la présence des plasmides et la résistance aux métaux lourds. La survie *in vitro* des deux souches d'*E. coli*, résistante et sensible au plomb, dans l'eau stérile du barrage Ain Zada, est similaire. A 10, 30 ou 37 °C, les deux souches d'*E. coli* s'éliminent avec les mêmes vitesses. La croissance d'*E. coli* résistante au plomb est plus affectée par une concentration inhibitrice du plomb, quelque soit l'influence du facteur physico-chimique (pH, température ou salinité). L'accumulation du plomb est plus importante chez *E. coli* sensible au plomb.

Mots-clés : résistance, métaux lourds, antibiotiques, plasmide, survie, halo-tolérance, croissance, entérobactéries, eau.