

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun - Tiaret -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

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

Filière : "Sciences Biologiques"

Spécialité : "Microbiologie Appliquée"

Présenté et soutenu publiquement par :

- LOUZIR Slimane

- SEKKINE Ghania

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet bactéricide
de l'argile sur *Escherichia coli***

Membres du jury :

- Président : Mr HOCINE L.
- Promoteur : Mr HADJ SAID A.
- Co-Promoteur : M^{me} MOULAY M.
- Examineur : Mr BENBEGUARRA M.

Grade :

- MCA
- MCA
- MCA
- MCA

Année universitaire: 2019/2020



Remerciements

Nous tenons en premier à remercier Dieu Le Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, l'amour du savoir et surtout la patience pour pouvoir produire ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promoteur Mr HADJ Said. A pour sa sympathie, sa disponibilité, d'être toujours accueillant à notre égard et de nous avoir fait bénéficier de ses grandes compétences scientifiques et intellectuelles, ses orientations, ses conseils, ses remarques pertinents et surtout son aide pendant tout cette année et tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons remercier aussi notre Co-promotrice Mme MOULAY M. Pour son aide, ses orientations judicieuses, ses qualités d'ordre et d'efficacité et pour l'élaboration de ce travail.

On exprime nos remerciements aux honorables membres de jury :

Au président du jury : Monsieur HOUCINE L. qui nous a fait l'honneur de Présider le jury de notre mémoire.

Au Examineur : BENBEGUARRA M. Nous avoir honorées en acceptant de jurer ce modeste travail.

Au personnel de laboratoire de microbiologie appliquée, à Mme Kheira et Mme Zahra

Et a tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail,

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.



Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail

Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans le monde

Mon Père : Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études Qu'Allah Je le garde

Ma Mère : C'était magnifique si vous étiez présent à voir votre fille diplômée. Pas de basse c'est le destin. Je vous le dit qu'une personne chère ne nous quitte jamais. Elle vit au plus profond de notre cœur et pour la revoir, il est suffit de fermer les yeux; Sois toujours fier de moi où tu es

A mes chères sœurs « Dalila, Naima, Soundous, Nada rawan »

A mes chères frères « Mohammed, Ali, Nabil »

Et à toute la famille SEKKINE

A mes amies « Zahira, Chaima, Widad, Manel, Nessrin, Samia, Habiba et A ceux qui m'aiment, qui font partie de ma vie

A mon binôme « Slimane et sa famille »

Et à toute la promotion de Microbiologie appliquée

2019 -2020.

GHANIA



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A la femme que j'aime le plus au monde, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, maman que j'adore.

A mon très cher père mon soutien moral et source de joie et de bonheur, qui a été toujours là pour moi, que dieu te procure bonne santé et longue vie.

A ma très chère tante que j'aime beaucoup, qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui était toujours à mes côtés.

Aux personnes que j'adore ma deuxième maman « Zohra » mes sœurs : « Souad et Souassen », mes frères : « Mohamed, Riad et Sid Ahmed ».

A toute ma famille.

*A ma binôme **GHANIA** et toute la famille **SEKKINE**.*

Aux personnes qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis et collègues d'étude.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour

que ce projet soit possible, je vous dis merci.

LOUZIRSLIMANE

Citation

Le Prophète ﷺ a dit :

« Nul ne fait de bonnes actions aussi valeureuses que
prier, réconcilier les gens et avoir un bon
comportement. »

Authentifié par Albany

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	II
Liste des figures	III
Liste des photos	IV

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre I	Partie bibliographique
-------------------	-------------------------------

1. L'argile	2
1.1. Introduction	2
1.2. Origine de la bentonite	2
1.3. Structure et composition de la bentonite	2
1.4. Propriétés de la bentonite	3
1.5. Utilisation de la bentonite	3
2. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1. Définition	4
2.2. Habitat	4
2.3. Classification	4
2.4. Caractéristiques biochimiques et antigéniques	5
2.5. Pouvoir pathogène naturel	5

Partie expérimentale

Chapitre II	Matériel et méthodes
--------------------	-----------------------------

1. Objectif du travail	6
2. Lieu et période de travail	6
3. Matériel	6
4. Méthodes.	8
4.1. Protocole expérimental	8
4.2. Ré-identification des souches	9
4.2.1. Repiquage des souches	9
4.2.2. Tests d'identification d' <i>E.coli</i>	9
I. Etude morphologique	9
I. 1. Examens macroscopiques	9
I. 2. Examens microscopiques	9
II. Etude biochimique	11
II. 1. Recherche des enzymes respiratoires	11
II. 1.1. Test de la catalase	11
II. 1.2. Test d'oxydase	11
II. 2. Recherche de type respiratoire	12
II. 3. Galerie biochimique classique	12
II. 4. Galerie API 20E	14
4.2.3. Standardisation de la souche à l'échelle McFarland 0.5	15
4.3. Préparation de l'argile	15
4.3.1. Bentonite de Maghnia	16
4.3.2. Tamisage de la bentonite	16
4.3.3. Stérilisation de la bentonite	16

4.3.4. Taux d'humidité	16
4.3.5. Préparation de solution mère	16
4.3.6. Détermination de pH	17
4.3.7. Préparation des dilutions	17
4.4. Préparation des disques	17
4.5. Activité antibactérienne	18
4.5.1. Antibiogramme	18
4.5.2. Les étapes de la préparation des deux O2 témoins et ceux avec une quantité connue de l'argile	19
4.6. La concentration minimale inhibitrice (CMI).....	19

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Ré-identification d' <i>E.coli</i>	21
1.1. Etude morphologique	21
1.1.1. Observation macroscopique	21
1.1.2. Observation microscopique.....	21
1.2. Etude biochimique	22
1.2.1. résultats d'enzyme respiratoire	22
1.2.2. Galerie biochimique classique	22
1.2.3. Galerie API 20E	23
2. Activité antibactérienne	24
2.1. Résultats des témoins	24
2.2. Activité antibactérienne de la bentonite sur l' <i>Escherichia coli</i>	25
Conclusion	30
Références bibliographiques	31
Annexes	

Liste des abréviations

- **API** : Appareils et procédés d'identification.
- **ATB** : Antibiotique
- **CA -SFM** : Comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie
- **CEC** : Capacité d'Echange Cationique
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **COVID-19** : Corona virus disease 2019.
- ***E.coli*** : *Escherichia coli*
- **ENF** : Entreprise Nationale de Fonderie
- **EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

- **T.S.I** : Triple-Sugar- Iron
- **UFC** : Unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification d' <i>Escherichia coli</i>	4
Tableau 2. Matériel utilisé dans l'expérience	7
Tableau 3. Galerie biochimique classique d'identification d' <i>Escherichia coli</i>	12
Tableau 4. Antibiotiques utilisés pour <i>E.coli</i>	19
Tableau 5. Résultats de la galerie biochimique classique et type respiratoire sur milieu Schubert cloche	22
Tableau 6. Résultats de la Galerie API 20 E	24
Tableau 7. L'antibiogramme d' <i>E.coli</i>	25
Tableau 8. Article de Santos et <i>al.</i> , 2011.....	26
Tableau 9. Article de Yuhang et <i>al.</i> , 2004.....	28
Tableau 10. Tests microbiologiques appliquant la méthode de la concentration minimale inhibitrice	27
Tableau 11. La capacité antimicrobienne de Cu^{2+} /montmorillonite sur <i>E.coli</i>	28

Liste des figures

Figure 1. La structure d'une montmorillonite	3
Figure 2. Protocole expérimental	8
Figure 3. Les étapes de la préparation de la bentonite	15
Figure 4. Bentonite de Maghnia en poudre	16
Figure 5. Préparation des dilutions	17
Figure 6. L'antibiogramme d' <i>E.coli</i>	25
Figure 7. Résultats microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose à la bentonite brute	26
Figure 8. Tests microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose à la bentonite échangée par Ag ⁺ montrant la présence d'un effet bactéricide	26
Figure 9. Tests microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose montrant une comparaison entre les effets bactéricides.....	27
Figure 10. Valeurs de diamètres ou halos pour la bentonite échangée avec Ag ⁺ activée par l'acide et la bentonite échangée avec Ag ⁺ prétraitée montrant une comparaison entre les effets bactéricides sur l' <i>E.coli</i>	26

Liste des photos

Photo 1. Milieu Mannitol-Mobilité	12
Photo 2. Milieu Citrate de simmon	13
Photo 3. Milieu T.S.I	13
Photo 4. Aspect macroscopiques de souches d' <i>E.coli</i> sur gélose Mac Conkey	21
Photo 5. Observation microscopique d' <i>E.coli</i> après coloration de Gram	21
Photo 6. Milieu Mannitol-Mobilité après incubation	22
Photo 7. Milieu Citrate de simmon après incubation	22
Photo 8. Milieu T.S.I après incubation	22
Photo 9. Milieu Schubert avec cloche après incubation	22
Photo 10. Résultats API 20 E d' <i>E.coli</i> après incubation	23

Introduction

Dans la lutte antibactérienne, les moyens d'action sont de plus en plus limités. Les antibiotiques, qui semblaient être le remède miracle contre de nombreuses infections il y a moins d'un siècle, sont désormais obsolètes. Les bactéries communiquent et s'échangent des gènes de résistance, ce qui leur permet de lutter contre les antibactériens. La multirésistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique majeure, et de nouveaux moyens de traitements sont nécessaires.

En particulier, l'*Escherichia coli* est la bactérie la mieux étudiée et également le microorganisme expérimental de choix pour beaucoup de microbiologistes. Cette bactérie majeure du colon humain et des animaux à sang chaud est très utile pour l'analyse de la contamination fécale. Par ailleurs, C'est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales (**Bourjilat, 2009**).

A côté des antibiotiques, d'autres voies sont explorées pour combattre les infections. Utilisées depuis longtemps dans les anciens pays de l'Est, les bactériophages suscitent un regain d'intérêt en France, où ils font l'objet de recherches et bientôt d'un essai contrôlé. Aussi la recherche de nouveaux antibiotiques qui sont efficaces sur les bactéries résistantes. Et y'en a aussi la lutte biologique, précisément par utilisation de micro-organismes entomopathogènes (qui luttent les insectes) est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire. Il existe des moyens de lutte par l'utilisation des agents naturels tels que l'argile

En effet, l'argile est un outil thérapeutique très ancien. Les Égyptiens l'utilisaient dans le procédé de momification et dans le traitement des diarrhées, des abcès et des blessures. Durant la première guerre mondiale, les médecins allemands et autrichiens s'en sont également servis pour soigner la dysenterie, une maladie infectieuse du côlon.

On ne trouve pas une mais des argiles. De part une structure spécifique, ainsi que des propriétés multiples, les argiles répondent à de nombreuses indications. Elle est déformable, transformable, adhérente, coulante, glissante, et a ainsi de nombreuses capacités parmi lesquelles le transport, la capture, la libération de substances liquides, gazeuses...etc. Sa richesse minérale et en oligo-éléments en fait un outil dans la santé, le bien-être, la beauté, l'entretien du corps, de la maison, des constructions, dans l'industrie (**Adrienne, 2003**). L'argile était utilisée comme un antipoison naturel radicalement efficace. Elle possède un fort pouvoir absorbant et adsorbant qui attire les poisons, toxiques et impuretés du conduit digestif sans les relâcher. Une manière efficace de nettoyer le système digestif et de débarrasser l'intestin des toxines, germes, et bactéries pathogènes sans pour autant détruire la flore intestinale comme le feraient des antibiotiques (**Theodorou et al., 1994**).

D'après le grand usage de la bentonite dans différents domaines, la question qui vient à l'esprit dans ce cas-là est : si la bentonite a un effet antibactérien ?

L'objet de ce travail est de savoir si la bentonite a un effet sur la bactérie *Escherichia coli*.

Chapitre I

Partie

bibliographique

1. l'argile

1.1. Introduction

Les argiles présentent un intérêt croissant car leurs applications industrielles ne cessent de se diversifier. L'argile qui fait l'objet de ce travail est connue sous le nom de "**bentonite**", largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels. Sous sa forme pâteuse ou à l'état de poudre, ce type d'argile est employé dans la réalisation de barrières étanches pour les déchets industriels, ménagers (géomembranes bentonitiques) et radioactifs (barrières ouvragées, poudre compactées). La bentonite est utilisée également dans l'industrie agroalimentaire et dans la composition des produits cosmétiques et pharmaceutiques... (**Besq et al., 2003**).

En Algérie, les gisements de bentonite les plus importants économiquement se trouvent dans l'Oranie (ouest algérien). On relève en particulier la carrière de Maghnia (Hammam Boughrara) dont les réserves sont estimées à un million de tonnes et de celle de Mostaganem (M'zila) avec des réserves de deux millions de tonnes. (**Abderrahim et al., 2006**).

1.2. Origine de la bentonite

L'altération et la transformation hydrothermale de cendres des tufs volcaniques riches en verre entraînent la néoformation des minéraux argileux, qui font partie principalement du groupe des Smectites. Les roches argileuses ainsi formées portent le nom de bentonite, d'après le gisement situé près de Fort Benton (Wyoming, Etats-Unis). Elle contient plus de 75 % de montmorillonite ; cette dernière fut découverte pour la première fois en 1847 près de Montmorillon, dans le département de Vienne (France) (**Airoidi et Critter., 1997 ; Ferrah, 2013**).

1.3. Structure et composition de la bentonite

Certaines bentonites sont riches en sodium, d'autres en calcium, potassium ou magnésium. Les bentonites à base de sodium sont dotées de très grandes capacités d'absorption des liquides et susceptibles de se transformer en gel à partir d'une certaine concentration. En présence d'eau la bentonite gonfle de 10 à 15 fois son volume initial et absorbe 6,5 fois son poids en eau. Ayant la faculté de favoriser la pénétration des principes actifs à travers la peau, elle est incorporée aux cosmétiques naturels. Appelée également terre à Foulon, la bentonite est aussi capable d'absorber les protéines et de réduire l'activité des enzymes. Ce sont les bentonites riches en calcium qui sont utilisées au niveau de la sphère digestive. Retrouvées dans la composition de pansements gastriques, dans le traitement d'ulcère de l'estomac, constipation, diarrhée, reflux gastrique... Elles sont aussi utilisées dans les litières pour chat (**Darcel, 1982**).

La bentonite est une roche argileuse, friable, tendre et onctueuse au toucher, sa teinte dépend des composés minéraux et impuretés (matière organique et oxydes des métaux) qui lui sont étroitement associés. Elle est blanche, grise ou légèrement jaune. Elle se caractérise par une capacité élevée d'adsorption, d'échange ionique et de gonflement (**Airoidi et Critter, 1997**). Elle est constituée, principalement, par un minéral argileux appelé montmorillonite qui est représentée dans la **figure 1**.

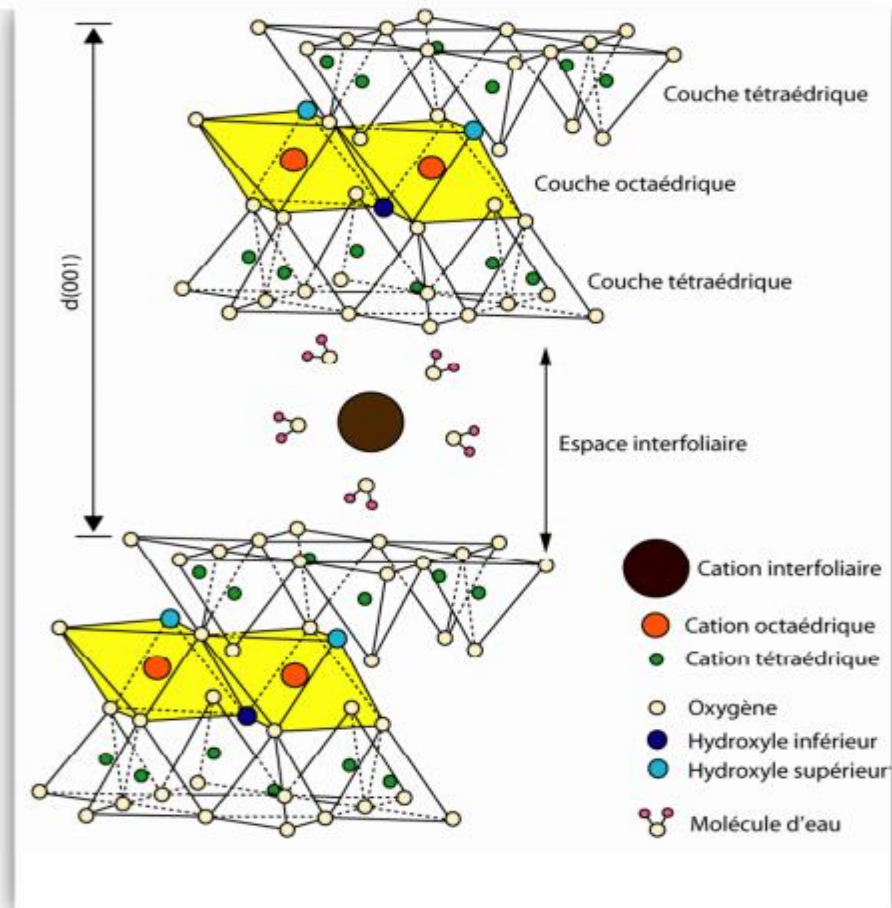


Figure 1 : La structure d'une montmorillonite (*d'après Grim, 1968*).

1.4. Propriétés de la bentonite

Les propriétés sont définies par la constitution chimique, l'épaisseur et l'écartement des feuillets de l'argile.

Les substitutions isomorphiques dans la partie cristalline de la montmorillonite sont à l'origine de la charge négative à la surface des feuillets. Cette charge négative, appelée charge permanente, permet à la montmorillonite d'échanger des cations (capacité, CEC) et d'adsorber des molécules d'eau (capacité de gonflement).

Elle a plusieurs autres caractéristiques intéressantes qui peuvent être résumées par sa grande surface spécifique, son coût modéré et son état colloïdal (**Wang et al., 2007**).

1.5. Utilisation de la bentonite :

La bentonite est l'argile industrielle la plus importante en raison de son principal composant de montmorillonite qui lui confère une capacité d'absorption et de gonflement très élevées qui sont exploités dans différents domaines dont :

- **Protection environnementale.**
- **Forage.**
- **Les céramiques.**
- **Les peintures.**

- L'agroalimentaire.
- Décoloration des huiles.
- Raffinage du pétrole.
- Additif dans la fabrication du papier.
- Génie civil (additif dans le ciment).
- Traitement des eaux usées.
- La pharmacie et la cosmétique.

Les bentonites sont largement utilisées dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique en tant qu'excipient, ingrédients actifs et transporteur et libérateurs d'ingrédients actifs (Lopezgalind et Viseras, 2004 ; Guenoun et Gada, 2017)

2. *Escherichia coli*

2.1. Définition

Escherichia coli est une bactérie naturellement présente dans la flore intestinale. La plupart des souches de cette bactérie sont sans danger pour la santé, certaines sont à l'origine d'infections intestinales plus ou moins graves.

2.2. Habitat

E. coli est l'espèce prédominante de la flore aéro-anaérobie facultative du tube digestif chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales (Mariani-Kurkdjian et Bingen., 2012). La bactérie *E. coli* est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations supérieures à 10^6 UFC/g de contenu intestinal (Lefebvre et al., 1988). Elle demeure très souvent dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif (Smati et al., 2015).

2.3. Classification

E. coli est une espèce bactérienne du genre *Escherichia*, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, ordre des Enterobactériales, phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria (Bergy's manuel, 2004 ; Diassana, 2018). La classification est présentée dans le **tableau 1**

Tableau 1 : classification d'*Escherichia coli*

Règne	Procaryotae
Domaine	Bactéria
Phylum	Protéobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Escherichia
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

2.4. Caractéristiques biochimique et antigénique

Ce sont des bacilles à gram négatif, chimio-organotrophes, parfois capsulés, ils possèdent une ciliature péritriche pour les espèces mobiles. Ces bacilles fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz), ils sont aéro-anaérobies facultatifs et possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif (**Loukiadis, 2007 ; King et al., 2014**)

2.5. Pouvoir pathogène naturel

E.coli est responsable d'infections extra-intestinales, infections urinaires, infections abdominales et septicémies avec choc septique dû à l'endotoxine O et d'infections intestinales : l'existence des diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotype particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies (**Abhijit et al., 2013**).

Partie

expérimentale

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail

Notre étude a pour objectif de savoir si l'argile de type Bentonite a un effet sur la croissance de la bactérie *Escherichia coli*.

2. Lieu et période de l'étude

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie n°01 de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ibn Khaldoun de Tiaret, durant le mois de mars 2020.

3. Matériel

3.1. Matériel biologique

❖ Souches bactériennes

Cette étude a été réalisée sur 02 souches d'*Escherichia coli* :

- *Escherichia coli* (ATCC 25922) : Souche référenciée ;
- *Escherichia coli* : de laboratoire prélevé à partir des urines d'un patient ;

3.2. Matériel naturel

❖ Argile

C'est l'argile de Maghnia qui a été mise à notre disposition par l'ENF.

3.3. Appareillages et produits utilisés

Nous avons utilisé des instruments et produits chimiques qui sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Matériel et produits utilisé dans l'expérimentation.

Appareillages	Verreries	Autres matériels
<ul style="list-style-type: none"> • Microscope (Optika) • Incubateur (Mettler) • Agitateur magnétique (Stuart) • Balance électrique (Sartorius) • Réfrigérateur (IRIS) • Bec bunsen 	<ul style="list-style-type: none"> • Béchers • Éprouvettes graduées • Lames • Lamelles • Pipettes pasteur • Flacons • Tubes à essai • Verre de montre • Cloche de durham 	<ul style="list-style-type: none"> • Pince métallique • Pince en bois • Anse de platine • Portoirs • Pissette • Micropipette • Boîtes de petri • Papier Wathman n°3 • Seringues • Papier aluminium • Papier hygiénique
Produits	Réactifs	Milieux de culture (Annexe 1)
<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • Huile d'immersion • Galerie API 20 E • Disque d'oxydase • Eau oxygénée (H₂O₂)99.8% • Violet de Gentiane • Lugol • Fuchsine • Alcool 	<ul style="list-style-type: none"> • Réactif TDA (tryptophane désaminase) • Réactif VP1 et VP2 (Voges Proskauer) • Réactif Ehrlich Kovacs • Réactif NIT1 et NIT2 	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose Mac Konkey • Gélose Muller Hinton (MH) • Bouillon nutritif (BN) • Milieu Mannitol Mobilité • Milieu TSI • Milieu citrate de simmon • Milieu Schubert

4. Méthodes

4.1. Protocole expérimental

Les étapes de l'expérimentation sont résumées dans la **figure 2**

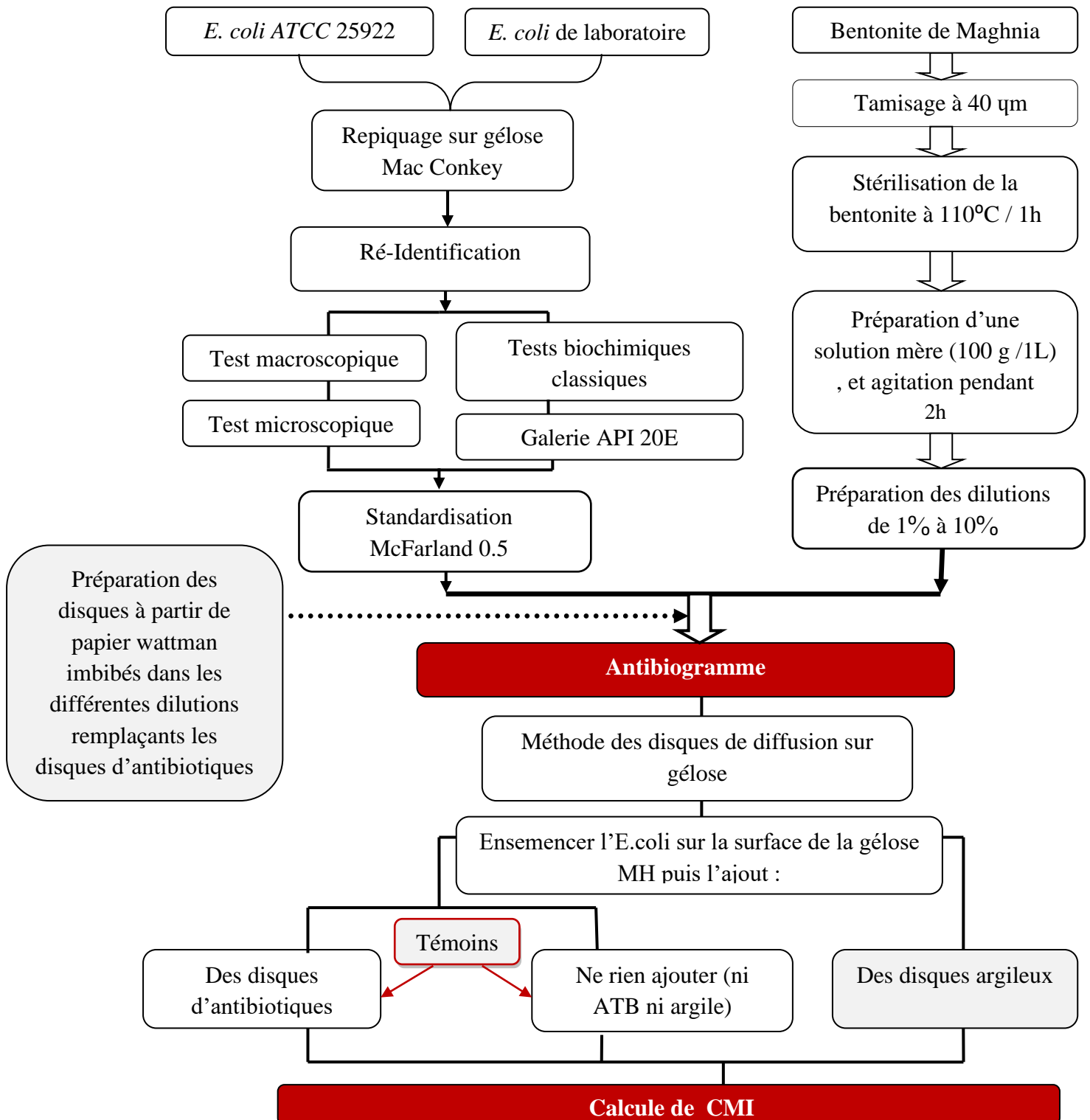


Figure 2 : Protocole expérimental

4.2. Ré-identification des souches

4.2.1. Repiquage des souches d'*Escherichia coli*

Cette opération consiste d'abord à prélever quelques colonies d'*E.coli* à partir de ses milieux et à procéder ensuite à l'ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu de culture Mac Conkey :

- Refroidir et maintenir à 44-47 °C
- Couler en boîtes de Pétri stériles
- Laisser solidifier sur une surface froide
- Ensemencer l'*E.coli* à la surface des boîtes afin d'obtenir des colonies isolées par la méthode des stries serrées. Enfin, les boîtes sont incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 24h.

- Les colonies lactose-positif présentent une coloration rouge et sont entourées d'un halo de sels biliaires précipités. Les colonies lactose-négatif sont incolores (Faure, 2010). (Annexe 1).

4.2.2. Tests d'identification d'*Escherichia coli*

I. Etude morphologique

I. 1. Examen macroscopique

Cet examen permet de déterminer la forme, la taille, pigmentation, contour, aspect et viscosité des colonies sur boîte de Pétri par une observation visuelle (Mami, 2013) ; L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation.

I. 2. Examen microscopique

I. 2.1. Examen à l'état frais

- Principe

Cet examen nous permet d'apprécier la forme, la mobilité, le mode de regroupement, et l'abondance de notre bactérie.

- Mise en œuvre

- Déposer aseptiquement sur une lame porte objet, quelques gouttes d'eau physiologique.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une à deux colonies à partir du milieu contenant de la gélose nutritive.
- Emulsionner dans la goutte d'eau physiologique.
- Recouvrir d'une lamelle tout en évitant la formation des bulles d'air.
- Observer sous microscope optique grossissement (×40).

- Lecture

A l'issu de cet examen microscopique, on peut observer la forme, le mode de regroupement et la mobilité des souches (**Labioud, 2016**).

I. 2.2. Coloration de Gram**- Principe**

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram+) ou la fuchsine (Gram-). Cette opération se déroule en sept étapes.

-Mise en œuvre

Réaliser un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne, agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.

- Etaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre.
- Procéder à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec bunsen.
- Plonger La lame pendant une minute dans le violet de gentiane, puis rincée à l'eau déminéralisée.
- Etaler le Lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau. Cette étape à pour but de stabiliser la coloration violette.
- Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la coloration (15 à 30 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer avec de l'eau.

- Si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries donc sont de type Gram-, si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

- Réaliser une contre coloration avec de la fuchsine : laisser agir 30 secondes à une minute, laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard.

Enfin, observer à l'objectif à immersion ($\times 100$) après dépôt d'une goutte de l'huile de cèdre.

- Lecture :

Les bactéries Gram+ apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram- sont colorées en rose (**Labioud, 2016**).

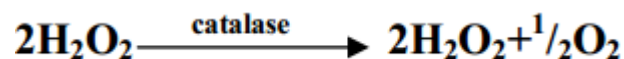
II. Etude biochimique

II. 1. Recherche des enzymes respiratoires

II. 1.1. Test de la catalase

-Principe

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante : (Labioud, 2016).



- Mise en œuvre

- Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée.
- Prélever à l'aide de l'effilure de pipette pasteur un fragment de colonies et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

- Lecture

La présence d'une catalase se traduit en quelque seconde par la formation de bulles d'oxygène (Labioud, 2016).

II. 1.2. Test d'Oxydase

-Principe

Ce test permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase ou cytochrome oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Le réactif utilisé est un dérivé N-méthylé du paraphénylène diamine (composé réduit incolore) qui, en présence de l'enzyme, est oxydé et libère un composé rose violacé (forme oxydée semi-quinone), noircissant à l'air. La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif en particulier pour *Escherichia coli* (Hennia, 2016).

-Mise en œuvre

Une goutte de suspension bactérienne à étudier a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur un disque pré- imprègne du N-diméthylparaphénylène diamine

-lecture

Si le papier demeure incolore au bout de quelques secondes la bactérie est alors oxydase négative par contre si le papier devient violet la bactérie est considérée comme oxydase positive (Essodolom, 2016).

II. 2. Recherche de type respiratoire

C'est le test de confirmation d'*E.coli*, par la production ou non du gaz. Ce test est réalisé par le repiquage de la bactérie dans le milieu Schubert munie d'une cloche de Durham qui permet de recueillir les gaz produits après 24 à 48 h à 44°C (Boumedjou et Fekih, 2014).

II. 2.1 milieu Schubert avec cloche de Durham


II. 3. Galerie biochimique classique



Elle permet l'étude de plusieurs caractères biochimiques dont :

- Fermentation des sucres et production de gaz et d'H₂S
- Etude de type fermentaire
- Utilisation du mannitol et détermination de la mobilité
- Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....etc.

Le principe, les techniques et les règles d'interprétation des tests effectués sont résumés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Galerie biochimique classique d'identification d'*Escherichia coli* (Hennia, 2016).

Milieu / principe	Aspect de milieu avant l'ensemencement	Mode d'ensemencement	Caractère recherché	Lecture
<p>Mannitol-Mobilité</p> <p>-Principe :</p> <p>Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, il permet aussi la mise en évidence de la mobilité bactérienne</p>	 <p>Laboratoire de microbiologie 1 2020</p>	<p>Le milieu mannitol est ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur chargée de la culture bactérienne en milieu semi-solide. Incuber à 37°C pendant 24h.</p>	<p>-Fermentation de mannitol. -La mobilité.</p>	<p>Mannitol</p> <p>. Mannitol (+) : apparition d'une coloration jaune. Mannitol (-) : milieu reste rouge.</p> <p>Mobilité</p> <p>Mobilité (+) : Diffusion de la culture à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu Mobilité (-) : pas de diffusion</p>

<p style="text-align: center;">Citrate de Simmons</p> <p>-Principe : C'est un milieu gélosé utilisé pour l'identification des entérobactéries par l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.</p>	 <p style="text-align: center;">Laboratoire de microbiologie 1 2020</p>	<p>Ce milieu peut être utilisé aussi bien en tube gélosé incliné qu'en boîte de Pétri. Dans les deux cas, ensemercer légèrement la surface du milieu par stries et pour les tubes en pente jusque dans le culot, puis incubation</p>	<p>- Utilisation de Citrate.</p>	<p>Citrate (+) : Virage de milieu au bleu et une culture de colonie sur la pente.</p>
<p style="text-align: center;">TSI</p> <p>-Principe : Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de l'H₂S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.</p>	 <p style="text-align: center;">Laboratoire de microbiologie 1 2020</p>	<p>Ensemencement de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par piqûre centrale et l'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. -Le bouchon de milieu ne doit pas être trop vissé.</p>	<p>- Lactose. - Glucose. - saccharose. - Gaz. - Production d'H₂S.</p>	<p>Lactose (+) : virage de la pente au jaune (la pente du milieu) Saccharose (+) : Virage au jaune au milieu de tube (la pente du milieu). Glucose (+) : Virage de culot au jaune et bactérie aéro-anaérobie. Gaz (+) : apparition des bulles ou des poches gazeuses qui décalent la gélose de fond de tube. Production d'H₂S : Noircissement du milieu.</p>

II. 4. Galerie API 20 E

Après une identification des souches par la galerie biochimique classique nous avons procédé à une autre identification Par la galerie API 20 E pour la confirmation des résultats.

-Principe d'API 20 E

La galerie API 20E est un système pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests biochimiques miniaturisés, prêt à l'emploi et standardisé. En effet, cette galerie comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique (milieu "Suspension Medium"). Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Bouchaala, 2017**).

- Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

- Galerie API 20 E permet d'effectuer les tests 20 tests biochimiques (**Annexe 3**)

- La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le Microtubule "GLU" (**Bouchaala, 2017**).

- Mode opératoire :

L'opération s'effectuée selon les étapes suivantes :

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".
- A l'aide d'une micro-pipette remplir les micro-tubes de la galerie. Au sein des micro-tubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule (**Annexe 3**).
- Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37°C durant 24 h (**Bouchaala, 2017**).

-lecture :

- Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Noter les résultats sur la fiche de lecture.

- Indiquer le profil numérique (Bouchaala, 2017)

4.2.3. Standardisation McFarland 0.5

Selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM / EUCAST, 2020). La standardisation McFarland 0.5 est :

A partir d'une culture visible, réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml pour *Escherichia coli*.

La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 McFarland. Un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits et inversement.

Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum. Cet appareil doit être calibré contre un étalon de la gamme de McFarland selon les recommandations du fabricant.

On peut également comparer à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. Dans ce cas agiter vigoureusement l'étalon de turbidité sur un Vortex avant usage. Pour faciliter la comparaison des deux échantillons, se placer face à un fond blanc avec des lignes noires.

Pour ajuster la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland, ajouter soit la solution salée soit les bactéries (Annexe 5).

4.3. Préparation de l'argile

Les étapes de préparation de l'argile sont résumées dans la **figure 3** :

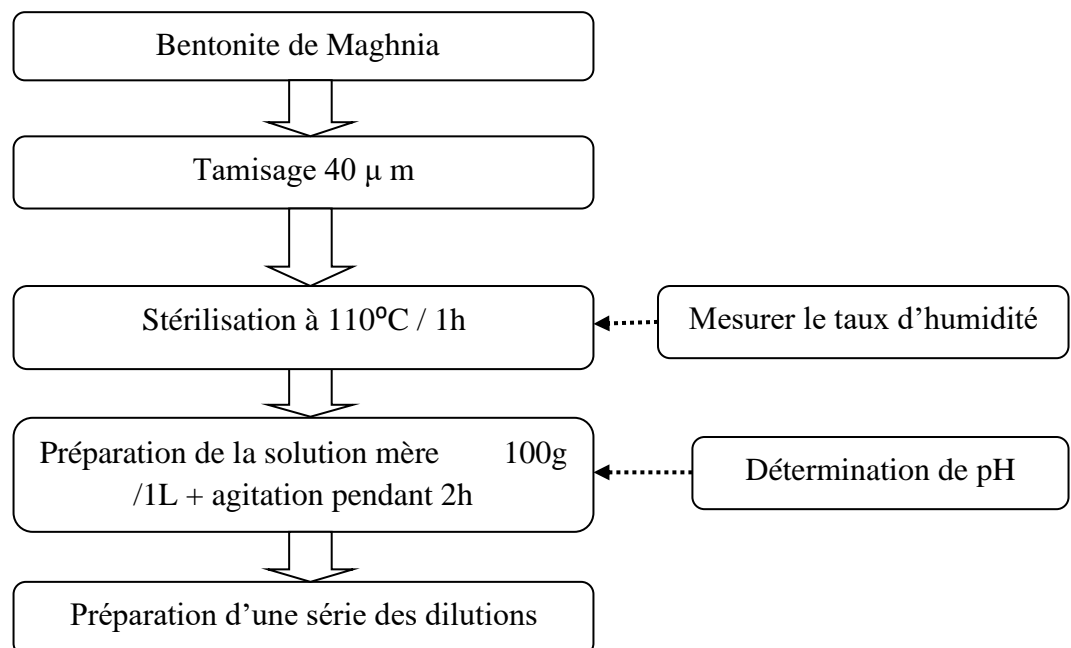


Figure 3 : les étapes de la préparation de la bentonite

4.3.1 Bentonite de Maghnia

L'argile utilisée au cours de notre étude est une argile de type bentonite provient de gisement de Roussel, Hammam Boughrara à 15 Km à l'Est de la ville de Maghnia, Wilaya de Tlemcen. Situé à l'ouest d'Algérie.



Figure 4 : Bentonite de Maghnia en poudre

4.3.2. Tamisage de l'argile

La bentonite qui fait l'objet de ce travail a été tamisée à travers un tamis dont la dimension des mailles est de 40 μm .

4.3.3. Stérilisation de la bentonite

Cette étape est effectuée dans une étuve à 110° C dans le but d'éliminer les contaminants microbiens de notre argile (Amari, 2019).

4.3.4. Taux d'humidité

La mesure du taux d'humidité consiste à déterminer la masse d'eau éliminée par le séchage d'un matériau humide jusqu'à l'obtention d'une masse constante à une température de 105 ± 5 °C pendant 24 heures, La masse du matériau après l'étuvage est considérée comme la masse des particules solides (m_s). La détermination du taux d'humidité a été calculée à partir du rapport de la masse de l'eau évaporée (m_{eau}) sur la masse des particules solides (m_s), (Qlihaa et al., 2016).

$$H (\%) = (m_{\text{eau}}/m_s) * 100 = (m_t - m_s/m_s) * 100 \dots\dots (1)$$

m_{eau} : masse d'eau (g)

m_s : masse de l'échantillon sec (g)

m_t : masse de l'échantillon humide (g)

4.3.5. Préparation de la solution mère

Pour réaliser l'expérience, On doit préparer une solution mère par dissolution de 100 g de la poudre de bentonite dans un volume précis de 1 L d'eau distillée avec une agitation pendant 2h à une température ambiante.

4.3.6. Détermination du pH

La solution d'argile obtenue est homogénéisée par un agitateur magnétique et la lecture est faite directement avec un pH-mètre.

4.3.7. Préparation des dilutions

Pour préparer des solutions de concentrations désirées, la solution mère est diluée dans Des volumes connus d'eau distillée par la méthode suivante :

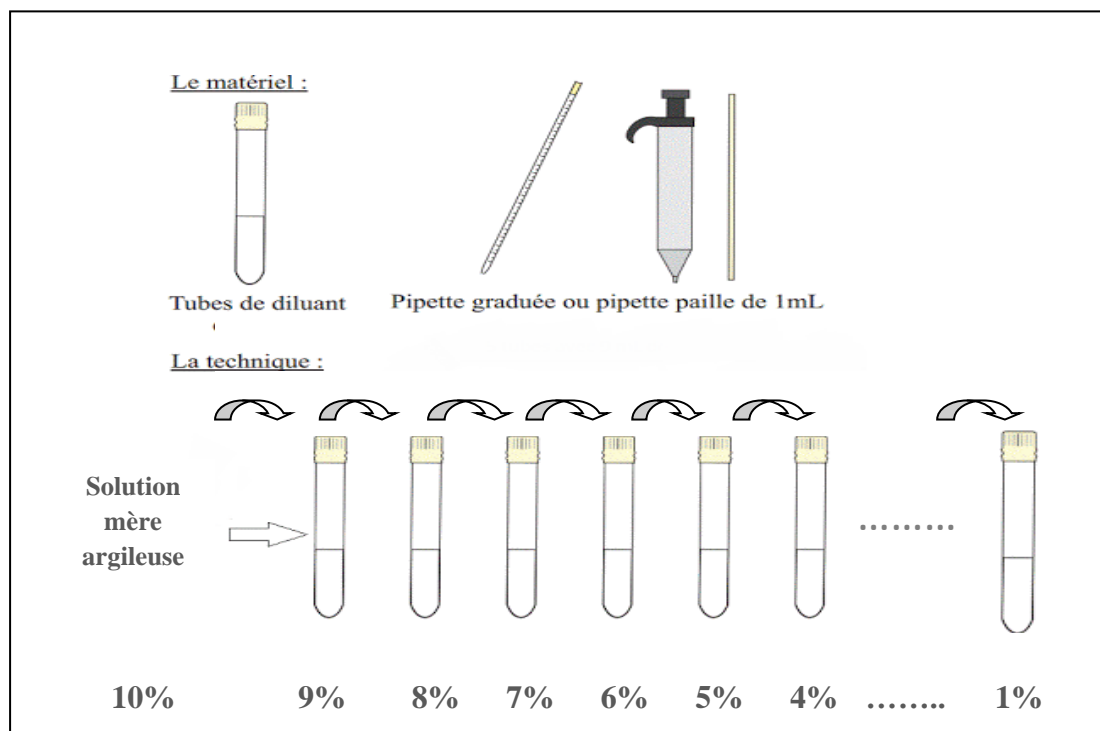


Figure 05 : préparation des dilutions.

4.4. Préparation des disques

Les disques sont confectionnés à partir de papier filtre (Wattman n° 3), à raison de 5mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation, les disques sont mis dans un tube en verre stérile et stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un four pasteur (Ait chabane, 2018).

4.5. L'activité antibactérienne de l'argile

4.5.1. Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une Bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des antibiotiques et à Observer les conséquences sur le développement et la survie de celle -ci.

Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

La réalisation de l'antibiogramme se fait par étapes : (Hnich, 2017).

- La préparation de l'inoculum bactérien ;
- Ajustement de la turbidité (densité) de l'inoculum ;
- Ensemencement et séchage des boîtes ;
- Disposition des disques ATB ;
- Incubation ;
- Lecture et interprétation des antibiogrammes

4.5.2. Les étapes de préparation des deux 02 témoins et ceux avec une quantité connue de l'argile

Pour réaliser ce test il est nécessaire d'utiliser le milieu Muller Hinton agar pour la culture de la souche bactérienne examinée. Le milieu est coulé dans des boîtes de pétri (9 cm de diamètre) avec une épaisseur de 4 mm, puis les boîtes sont séchées à 37°C pendant 30 min avant l'utilisation.

A partir d'une culture jeune et pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement bouillon nutritif on prépare une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) de façon à obtenir un inoculum d'une opacité équivalente à une DO de 0.08 à 0.1, lue à 625 nm, ce qui correspond à une charge de 1.5×10^8 ufc /ml à l'échelle de McFarland (Labioud, 2016).

Des dilutions sont faites en eau physiologiques stériles ($10^{-1}, 10^{-2}$), 5 ml de la dilution 10^{-2} est versée sur le milieu solidifié et l'excès est éliminé après 2 à 3 min par méthode d'inondation

Après chaque manipulation les boîtes vont subir une incubation pendant 24 h d'incubation à 37° C les zones d'inhibitions sont mesurées en millimètre par règle, compas ou pied à coulisse (Belkhiri, 2009).

I. Préparation des témoins

I. 1. ensemencement de la bactérie (T1)

Après coulage des boîtes on ensemence la bactérie sur toute la surface de la gélose de Muller Hinton et met la boîte à l'étuve pour l'incubation.

I. 2. Antibiogramme par des disques de diffusion (T2)

Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose avec une pince métallique stérile, une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

Tableau 4 : Antibiotiques utilisés pour *Escherichia coli* (Hennia, 2016).

Antibiotique	Signe	La charge du disque
Pipéracilline	PIP	75 µg
Céfazoline	CZ	30 µg
Amikacine	AN	30 µg
Doxycycline	DO	30 µg
Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10 µg
Pénicilline	P	6 µg

II. Application des suspensions d'argile

A l'aide d'une pince stérile 1 ou 3 disques de diffusions sont placés à la surface des boîtes inoculées et chacun est injecté par 10 µl de la suspension argileuse de différentes dilutions testées (Gulluce et al., 2003).

4.6. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme la plus faible concentration du produit inhibant totalement en 18 ou 24 heures à une température de 37°C la multiplication des micro-organismes (Audrey, 2004). La mesure de la CMI permet de déterminer si une souche est sensible ou résistante à l'antibiotique testé. La lecture est réalisée en plaçant les boîtes de différentes concentrations sur une surface sombre, pour y observer la présence (ou l'absence) de colonies, par rapport à la boîte témoin. Mesurer la zone d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle. Se rapporter aux tableaux d'interprétation des zones d'inhibition fournis par les fabricants de disques d'antibiotiques pour établir les corrélations entre la zone d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est alors relevée Labiod, (2016) et Bouarroudj, (2017).

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Ré-identification d'*E. coli*

1.1. Etude morphologique

1.1.1. Observation macroscopique

Les résultats obtenus après 24h d'incubation à 37°C sur le milieu Mac Conkey ont montré que les souches d'*Escherichia coli* apparaissent en colonies :

- Rouges, Ronds, semi bombés, lisses, Crémeuses, opaques.

Ce résultat est identique à celui trouvé par (Diassana, 2018).

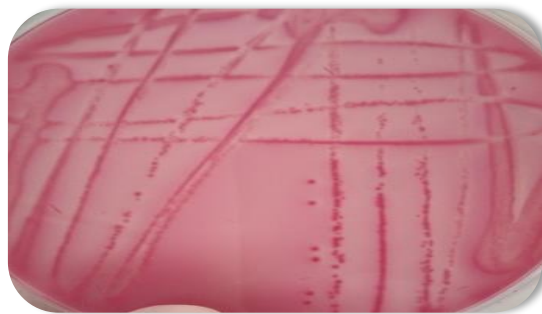


Photo 5 : Aspect macroscopique des souches d'*Escherichia coli* sur gélose Mac Conkey.

1.1.2. Observation microscopique

L'observation microscopique d'*E.coli* entre lame et lamelle nous a permis d'observer des coccobacilles, mobiles, et après la réalisation de la coloration de Gram, on trouve de coccobacille coloré en rose regroupé en amas ou isolé ou bien en petite chênnettes. Ce dernier a montré que la bactérie est à Gram négatif.

Nos résultats concordent à ceux trouvés par **Lamouri et Messelem (2018) ; Merniez (2018)**

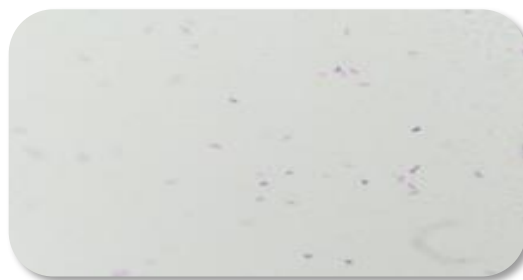


Photo 6 : Observation microscopique d'*Escherichia coli* après coloration de Gram (×100)

1.2. Etude biochimique

1.2.1. Recherche d'enzyme respiratoire

1.2.1.1. Catalase

D'après les résultats trouvés, nous observons la présence des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie d'*E.coli*, cela confirme que la souche est de catalase positive, et ces résultats sont identiques aux résultats trouvés par **avril et al (2000)** ; **benaisa et benamara (2016)**.





1.2.1.2. Oxydase

La bactérie *d'E. Coli* ne possède pas une cytochrome-oxydase qui normalement se traduit après un contact à N-diméthyl-1,4-phénylénédiamedichlorure en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement en violet très foncé. Cet isolat obtenu est donc oxydase négative. ces résultats conformes aux résultats trouvés par **avril et al (2000)** ; **benaisa et benamara (2016)**.

1.2.2. Galerie biochimique classique et type respiratoire

Les résultats des tests biochimiques classiques après un temps d'incubation 24 h sont présentés dans le **tableau 05**.

Tableau 5 : Résultats de la galerie biochimiques classique et type respiratoire sur milieu Schubert.

Galerie biochimique classique				Type respiratoire
Test	Mannitol-mobilité	Citrate de simmon	T.S.I	Milieu Schubert +cloche
Observation				

Résultats	Manitole	+	Citrate	-	Glucose +	Gaz	+
	Mobilité	+		Saccharose	+		
				Lactose	+		
				H₂S	-		
				Gaz	-		

Les résultats obtenus sont identiques aux résultats trouvés par **Hennia, (2016)** ; **Lamouri et Messelem, (2018)**.

1.2.3. Galerie API 20E



Photo 11 : API 20E d'*E.coli* après incubation 24h à 37°C.

- Après incubation et selon le **bio Mérieux SA, 2010**
 - Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - **Test TDA** : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - **Test IND** : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - **Test VP** : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

Les résultats sont indiqués dans le **tableau 6** :

Tableau 6 : résultats de la Galerie API 20 E.

Tests positifs(+)											
ONPG	ADH	LDC	ODC	IND	VP	GLU	MAN	SOR	RHA	MEL	ARA

Tests négatifs(-)							
CIT	H ₂ S	URE	TDA	GEL	INO	SAC	AMY

- Confirmation de la présence de la souche *E.coli* avec la galerie API 20 E (tableau d'identification (**Annexe 4**)).

2. Activité antibactérienne

2.1 Les témoins

2.1.1. Ensemencement de la bactérie (T1)

On observe une multiplication bactérienne qui est indiqué par la présence des colonies dans la boîte de pétri.

Le résultat obtenu est concorde avec les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie et European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**CA-SFM / EUCAST, 2020**).

A cause de la richesse du milieu Muller Hinton en composés favorables à la croissance d'*E.coli* autant qu'une bactérie non exigeante.

2.1.2. Antibiogramme des disques de diffusion(T2).

Les résultats trouvés Selon le test de l'antibiogramme effectué par **Hennia (2016)**, de 05 types d'antibiotique sur l'*E.coli* montrent que cette souche est sensible aux trois antibiotiques : Amoxicilline +acide clavulanique (AMC) (20/10 µg), Amikacine (AN) (30 µg) et Céfazoline (CZ) (30 µg) mais présente une sensibilité intermédiaire à la pénicilline (P) (6 µg) et la Doxycycline (DO) (30 µg). Les résultats sont représentés dans le **tableau 7**.

Tableau 07 : l'antibiogramme d'*E.coli*.

Antibiotiques	Diamètre de zone d'inhibition en (mm)	Résultats
AMC	20	S
AN	24	S

CZ	20	S
P	8	I
DO	7	I



Figure 06 : l'antibiogramme d'*E.coli*.

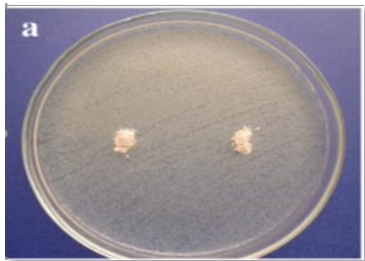
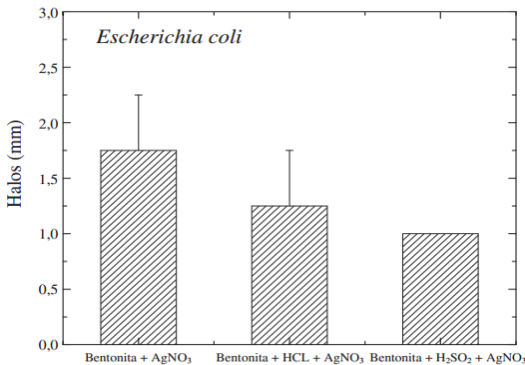
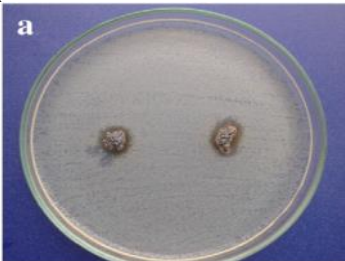
Les résultats présentés dans le **tableau 7** montrent que l'*Escherichia coli* est résistante à tous les antibiotiques de la famille des β -lactamines sauf Amoxicilline (AMC) et Céfazoline (CZ) et moins résistante au pénicilline (P) et Doxycycline (DO).

On explique la résistance aux bêta-lactamines par la production de bêta-lactamases qui inactive les bêta-lactamines par hydrolyse du noyau bêta-lactame, une diminution de la perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques hydrophiles par modification des porines chez les bacilles à Gram négatif, ainsi que des phénomènes d'efflux **Filali et al (2000)**.

2.2. L'activité antibactérienne de la bentonite sur l'*Escherichia coli*

A cause de la pandémie du Covid-19, on n'a pas pu continuer notre travail au sein du laboratoire. Pour compléter notre travail, on a synthétisé dans **les tableaux 8 et 9**, 02 articles scientifiques différents, qui ont des thématiques proches de la nôtre.

Tableau 8. Représente l'article de Santos *et al.*, 2011

Résultats	Discussion
<p>➤ Dans La figure 7 il se trouve les résultats microbiologiques de la diffusion sur gélose pour les 2 g de bentonite brute qui n'a pas été soumise à un échange ionique avec la bactérie <i>E. coli</i>. Les résultats montrent une absence d'effet bactéricide et l'effet bactériostatique pour les bactéries testées, mis en évidence par l'absence d'halo d'inhibition bactérienne.</p>  <p>Figure 7 : Résultats microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose à la bentonite brute.</p>	<p>- Les résultats indiquent que le prétraitement dans un environnement d'HCL confère à la bentonite de meilleures propriétés microbiologiques que le prétraitement H2SO4</p> <p>- L'effet le plus important de la bentonite traitée au HCL peut être une indication que le traitement avec de l'acide chlorhydrique améliore le processus d'échange ionique entre Ag+ et les échantillons ioniques présents dans la bentonite.</p>  <p>Figure 10 : Valeurs de diamètre des halos pour la bentonite échangée avec Ag + activée par l'acide et la bentonite échangée avec Ag + prétraitée montrant une comparaison entre les effets bactéricides sur E.coli.</p>
<p>➤ Dans La figure 8 il se trouve les résultats microbiologiques pour la masse de 2 g de bentonite après le processus d'échange ionique avec la bactérie <i>E. coli</i>. Il existe d'un halo d'inhibition bactérienne, indiquant un effet bactéricide de la bentonite par incorporation d'argent ionique.</p>  <p>Figure 8 : Tests microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose à la bentonite échangée par Ag + montrant la présence d'un effet bactéricide.</p> <p>➤ Dans La figure 9 (a et c) : (a) montre les résultats pour la bentonite traitée dans une solution de HCl puis</p>	<p>- Tableau 10 présente des tests microbiologiques utilisant la méthodologie CMI, comparant les effets bactéricides de la bentonite brute avec de la bentonite prétraitée avec HCL et H2SO4. Les résultats de la CMI montrent que la bentonite brute ne présente pas de propriétés bactéricides, tandis que la bentonite soumise à un échange ionique dans des environnements contenant de l'argent présente de tels effets. Les résultats indiquent une plus grande capacité bactéricide pour les environnements contenant d'acide chlorhydrique. Pour la concentration inhibitrice minimale était de 0,012 g pour la bentonite activée par HCL et de 0,038 g pour l'échantillon prétraité avec H2SO4. Cependant, cet effet n'est observé que pour la bentonite prétraitée au HCL. Il est à noter que ces résultats sont conformes aux résultats présentés par les tests de diffusion d'agar. Les résultats microbiologiques montrent que le traitement de la bentonite avec de l'acide est une étape importante pour obtenir la bentonite bactéricide.</p> <p>Tableau 10 : Tests microbiologiques appliquant la</p>

soumis à un processus d'échange ionique. (c) montre les résultats pour la bentonite traitée dans une solution de H₂SO₄, puis soumis à un processus d'échange ionique. Les résultats montrent la présence d'un halo d'inhibition bactérienne, indiquant l'action bactéricide pour les deux bentonites avec la bactérie, bien que celles traitées au HCl présentent un effet bactéricide plus important que la bentonite traitée avec acide sulfurique.

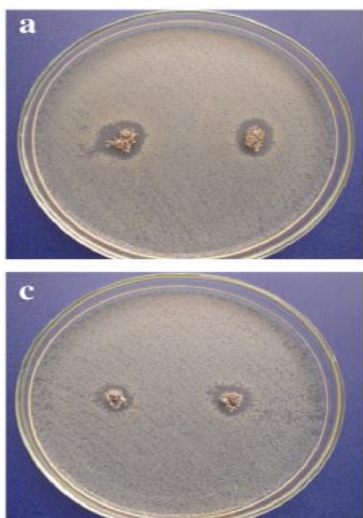


Figure 9 : Tests microbiologiques appliquant la méthode de diffusion sur gélose montrant une comparaison entre les effets bactéricides.

- (a) Bentonite activée par HCL après échange d'ions avec AgNO₃.
- (c) Bentonite traitée en milieu H₂SO₄ après un processus d'échange d'ions avec AgNO₃.

- dans La figure 10 il se trouve une comparaison entre les diamètres moyens des halos d'inhibition bactérienne pour la bentonite soumise à un échange ionique et sans et avec traitement d'acide avant échange ionique.

méthode de la concentration minimale inhibitrice.

Etat de la bentonite	Effet de la bentonite sur <i>E.coli</i>						
	0.012g	0.022g	0.038g	0.066g	0.115g	0.200g	0.346g
Brute	-	-	-	-	-	-	-
Traitée par HCL	-	+	+	+	+	+	+
Traitée par H ₂ SO ₄	-	-	-	+	+	+	+

- + Inhibition
- Pas d'inhibition

Des études avec l'acide sulfurique ont montré que, pendant le processus d'activation, la surface de la bentonite augmente jusqu'à 200–400 m²/g. cette augmentation est habituellement à 80% ou plus de la surface disponible correspond à des pores avec des diamètres allant de 2,0 à 6,0 nm, (Francisco et al., 2001).

La décomposition des structures de smectites de la bentonite, permettant ainsi l'échange de cations avec les échantillons présents dans la structure naturelle de bentonite et les ions H⁺ présents dans la solution acide et favorisant l'augmentation de la surface spécifique. Ces transformations entraînent des changements importants dans la capacité d'échange cationique (CEC) et dans les caractéristiques chimiques et minéralogiques de la bentonite (Francisco et al., 2001 et Demirbas et al., 2006). Ainsi, le processus de traitement acide favorise l'incorporation de plus grandes quantités d'espèces ioniques d'argent dans la bentonite. Après immersion de la bentonite dans l'acide chlorhydrique, le processus d'échange ionique avec l'argent ionique et les propriétés bactéricides résultantes sont améliorés.

Tableau 09. Représente l'article de Yuhang et al., 2004

Résultats		Discussion																																																	
<p>• Effet du Cu²⁺ sur <i>E.coli</i></p> <p>Tableau 11: la capacité antimicrobienne de Cu²⁺/montmorillonite sur <i>E.coli</i> (cel/ml).</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Temps d'incubation (h)</th> <th colspan="6">Cu²⁺/montmorillonite (mg/l)</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>10</th> <th>25</th> <th>50</th> <th>100</th> <th>200</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> <td>(8.35±0.40) × 10⁴</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>(8.50±0.26) × 10⁴</td> <td>(5.20±0.36) × 10⁴</td> <td>(3.00±0.31) × 10⁴</td> <td>(1.50±0.12) × 10⁴</td> <td>(6.40±0.30) × 10³</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>(8.65±0.31) × 10⁴</td> <td>(1.60±0.18) × 10⁴</td> <td>(8.90±0.40) × 10³</td> <td>(7.00±0.37) × 10¹</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>(8.20±0.18) × 10⁴</td> <td>(7.30±0.27) × 10²</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>(8.35±0.35) × 10⁴</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Temps d'incubation (h)	Cu ²⁺ /montmorillonite (mg/l)						0	10	25	50	100	200	0	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	2	(8.50±0.26) × 10 ⁴	(5.20±0.36) × 10 ⁴	(3.00±0.31) × 10 ⁴	(1.50±0.12) × 10 ⁴	(6.40±0.30) × 10 ³	0	4	(8.65±0.31) × 10 ⁴	(1.60±0.18) × 10 ⁴	(8.90±0.40) × 10 ³	(7.00±0.37) × 10 ¹	0	0	6	(8.20±0.18) × 10 ⁴	(7.30±0.27) × 10 ²	0	0	0	0	24	(8.35±0.35) × 10 ⁴	0	0	0	0	0	<p>- Le tableau 11 montre la quantité des cellules viables d'<i>E.coli</i> en suspension dans 100 ml d'eau après leur mise en contact avec différentes quantités de Cu²⁺/montmorillonite. La teneur en cellules viables testé diminuait avec l'augmentation du temps de contact. Lorsque 100 ml de milieu de culture contenaient 1 mg de Cu²⁺/montmorillonite (égale à une teneur en Cu²⁺ de 10 ppm), la bactérie mourait en 24 h. Lorsque la teneur en Cu²⁺/montmorillonite a été augmentée à 5 mg (50 ppm), <i>E. coli</i> a été tuée en 6h. Lorsque <i>E.coli</i> a été en contact avec 20 mg de Cu²⁺/montmorillonite en suspension dans l'eau distillée, toutes les cellules sont mortes en moins de 2 h.</p> <p>- Les résultats démontrent que la capacité antimicrobienne de la Cu²⁺/montmorillonite était très efficace sur <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>- Les parois cellulaires des bactéries viables étaient généralement chargées négativement en raison de groupes fonctionnels tels que les carboxylates présents dans les lipoprotéines à la surface (Breen et al., 1995). Le Cu²⁺/montmorillonite attire les bactéries par des forces électrostatiques et les immobilise à la surface. Cu²⁺ pourrait également se dissocier et exercer directement son effet antimicrobien sur les bactéries de la dispersion. En raison de la densité des ions Cu²⁺ sur la surface minérale qui est beaucoup supérieure à celle du milieu, la capacité antimicrobienne des particules de Cu²⁺/montmorillonite pourrait dominer sur les cations Cu²⁺ libérés dans le milieu.</p>	
Temps d'incubation (h)	Cu ²⁺ /montmorillonite (mg/l)																																																		
	0	10	25	50	100	200																																													
0	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴	(8.35±0.40) × 10 ⁴																																													
2	(8.50±0.26) × 10 ⁴	(5.20±0.36) × 10 ⁴	(3.00±0.31) × 10 ⁴	(1.50±0.12) × 10 ⁴	(6.40±0.30) × 10 ³	0																																													
4	(8.65±0.31) × 10 ⁴	(1.60±0.18) × 10 ⁴	(8.90±0.40) × 10 ³	(7.00±0.37) × 10 ¹	0	0																																													
6	(8.20±0.18) × 10 ⁴	(7.30±0.27) × 10 ²	0	0	0	0																																													
24	(8.35±0.35) × 10 ⁴	0	0	0	0	0																																													

Conclusion

L'argile est liée à la vie. Elle a toujours fait partie du quotidien. Elle représente surtout une alternative aux thérapeutiques classiques dans les domaines du soin des plaies, la cicatrisation, l'antalgie, l'inflammation... etc.

Cette étude vise à étudier l'effet bactéricide de l'argile de type « **Bentonite** » sur la bactérie *Escherichia coli*.

La première partie de la méthodologie expérimentale consistait à faire une réidentification de la bactérie par des tests microbiologiques et biochimiques.

La deuxième partie de la méthodologie expérimentale consistait à faire un tamisage et stérilisation de l'argile afin de l'utiliser dans l'étape de l'antibiogramme et vérifier son effet bactéricide mais malheureusement à cause des conditions de la pandémie du COVID-19, on n'a pas pu continuer notre travail, mais on a jugé utile de faire des synthèses bibliographiques sur des articles scientifiques abordant la même thématique que la nôtre.

Nous avons trouvé comme résultats que la bactérie est à : **Gram négatif**, **catalase +**, **oxydase-**, **mobile**, fermente le Glucose, Lactose, Saccharose et Mannitol, sans production de H₂S, aérobic et n'utilise pas le citrate comme seul source de carbone.

Les principaux résultats obtenus dans l'article de recherche de **Santos et al., 2011**, sur les tests microbiologiques de diffusion de la gélose et de la concentration minimale inhibitrice, ont montré que la présence d'effets bactéricides significatifs pour la bentonite soumise à un échange d'ions dans les mélanges de nitrate d'argent. La bentonite activée par HCl a montré de meilleures propriétés bactéricides que la bentonite activée par H₂SO₄. Les procédures pour conférer des propriétés bactéricides à la bentonite se sont avérées efficaces et le potentiel d'incorporation de propriétés microbiologiques dans la structure de la bentonite a été vérifié.

Quant au deuxième article de **Yuhang et al., 2004**, le Cu²⁺ a montré un effet bactéricide qui devient plus efficace avec l'augmentation du couple temps de contact et concentration du complexe Cu²⁺ / montmorillonite.

Enfin, cette étude se voulait une source importante d'informations sur la « **Bentonite** » plusieurs données sur son effet antibactérien mais ce travail pourrait être approfondi et complété.

Références

bibliographiques

.A.

- **Abderrahim O., Didi M.A., Moreau B., Villemain D., (2006).** « A new sorbent for selective separation of metal polyethylenimine methylene phosphonicacid», *Solv, Extr Ion, Exch* 24: 943–955.
- **Abhijit A., Nighute S., Khatoon M., (2013).** Study of urinary isolates with reference to extended spectrum beta lactamases detection and antibiogram. Vol 2, Issue 9: p1052.
- **Adrianne P., (2003).** L'argile, médecine ancestrale de la tradition aux preuves scientifiques, éditions Amirys SPRL, dépôt légal : 4^e trimestre
- **Aioldi C., Critter S. A. M., (1997).** « Thermodynamic study involving Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Ca and Na', *Clays and clay Minerals* » 45 (2): P125.
- **Ait chabane O., (2018).** Etude des effets antimicrobiens des extraits bruts, phénoliques et à base d'huiles essentielles du Miswak (*Salvadora persica*) sur les microorganismes responsables des infections buccales (caries dentaires, gingivite, parodontite, candidoses...etc). Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition. Mostaganem. P 52.
- **Amari H., (2019).** Etude De l'adsorption et teste d'élimination de phényle parabène sur une argile naturelle. Mémoire de Master. Université Dr. Moulay Tahar : Faculté des sciences. Saida : P 67.
- **Audrey A., (2004).** environnement des bactéries et sensibilité aux biocides - Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens-. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires : Ecole Doctorale Agriculture Biologie et Santé. France. P 18
- **Avril, J.L., Debarnat H., Denis F., Monteil H., (2000).** Bactériologie clinique. 2ed .Ellipses, Paris. pp. 171-177.

.B.

- **Bahlouli S., et Idiri N., (2015).** Criblage de souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmes au niveau des laboratoires d'analyses médicales de la wilaya de Béjaia. Mémoire de Master. Université A. MIRA. Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie. Béjaia. (Annexe)
- **Bergy's manual of systematic bacteriology (2004).** The Proteobacteria. Volume 2: procaryotic Domains. Pp21-26 krieg , Noel R. Editors: Garriy, George (Ed)
- **Besq A., Malfoy C., Pantet A., Monnet P., and Righi D., (2003).** “Physicochemical characterization and flow properties of some bentonite muds,” *Appl. Clay Sci.* 23, 275–286.
- **Breen P.J., Compadre C.M., Fifer, E.K., Salari, H., Serbus, D.D., Lattin, D.L., (1995).** Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella typhimurium* to poultry tissues. *J. Food Sci.* 60 : 1191–1196.
- **Belkhiri F., (2009).** Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *tamus communis L. et Carthamus caeruleus L.* Mémoire de Master. Université Ferhat Abbas : Faculté des sciences .Sétif .p 60.

- **Bouarroudj T., (2017).** Contribution à la connaissance de l'effet bactéricide et la cytotoxicité des oxydes nanocristallins. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar : Faculté des sciences. Annaba. P 75.
- **Bouchaala L., (2017).** Contribution à l'étude de la qualité physico-chimique et microbiologique de l'eau des écosystèmes aquatiques de Guerbes-Sanhadja (Skikda) et utilisation de l'espace par le Canard Siffleur *Anas penelope*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques. Tizi-Ouzou. P (68-69-70).
- **Boumedjou F. Z., et Fekih M., (2014).** Etude de la qualité de l'eau « Exquise» destinée à l'irrigation des terres d'El Fehoul. Mémoire de Master. Université Abo Bekr Belkaid : Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers. Tlemcen. P (96-70).
- **Bourjila T M. (2009).** Etude prospective de la résistance chez *E. coli* dans l'hôpital de Meknès. Maroc. Eline. Microbial. Rev. 22, p 120-123.
- **Bouzeraa A., Berrihil H., (2018).** Bactériologie des Entérobactéries isolées au niveau du Service de Réanimation de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC). Mémoire de Master. Université Frères Mentouri Constantine 1 : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Constantine.

.C.

- **Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Recommandations Avril 2020. V.1.1

.D.

- **Darcel C. L. (1982).** A "liver" antigen associated with a vianery throbblastosis: binding by bentonite and precipitation with sodium dodecylsulphate. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46(1), page 97.
- **Debabza M., (2005).** Analyse microbiologique des eaux des plages de la ville de Annaba « Evaluation de la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes ». Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar : Faculté des sciences. Annaba(Annexe).
- **Debbi S., et Saadi M., (2019).** Isolement, identification et étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans différents service de l'hôpital de Lakhdaria. Mémoire de Master. Université Akli Mohand Oulhadj : Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre. Bouira (Annexe).
- **Demirbas A., Sari A., Isildak O., (2006).** Adsorption thermodynamics of stearic acid onto bentonite. *J. Hazard. Mater.* 31 (135(1-3)) : 226-231.
- **Diassana A., (2018).** Identification des souches d'*Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition à dioro. Thèse de doctorat. Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako : Faculté de pharmacie. Mali. P 25.

.E.

- **Essodolom T., (2016).** Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Thèse unique Pour obtenir le grade de Docteur. Université ouaga I pr joseph ki-zerbo : École Doctorale Sciences et Technologie. Burkina Faso. P 66.
- **Euzéby J.P., (2008).** Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. <http://www.bacteriologie.net>. Consultation le 10/03/202015.

.F.

- **Faure M., (2010).** Purification de l'air ambiant par l'action bactéricide de la photocatalyse. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré : Ecole doctorale RP2E, Ressources Procédés Produits et Environnement. Nancy. P 69.
- **Ferrah N., (2013).** « Fonctionnalisation de Matrices Polymériques et leurs Applications dans la Rétention de Cd (II), Cu (II), U(VI) et Eu (III) », Thèse de doctorat d'Université de Tlemcen.
- **Filali B. k., Toufik J., Zeroual Y.F.A.Z., Dzairi F.Z., Talbi M & Blaghen M. (2000).** Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current microbiology* .41(3), 151-156.
- **Francisco R., Valenzuela D., Persio D.E.S., (2001).** Studies on the aid activation of Brazilian smectitic clays. *Quim. Nova* 24 (3) : 345–353.

.G.

- **Guenoun N., Gada S., (2017).** Activation de la Bentonite de Maghnia pour usage pharmaceutique. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri : Faculté des sciences. Tizi-Ouzou.
- **Gulluce M., Sokman M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sokmen A., Shin F., (2003).** Invitro antibacterial, Antifungal, and Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 51: 3958-3965.

.H.

- **Hennia A., (2016).** Extraction et étude de l'activité biologique des huiles essentielles du Myrte (*Myrtus communis* L). Thèse de doctorat. Université Abdelhamid ibn Badis : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Mostaganem. p (104-105-106-110-111).
- **Hnich H., (2017).** La résistance bactérienne: mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah : Faculté de médecine et de pharmacie. Royaume du Maroc. P 62.

- <https://www.sensetsante.fr/bonnes-raisons-cure-d-argile/>
- <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/biologie-argile-staphylocoque-dore-46562/>
- <https://journals.openedition.org/vertigo/4091>
- <https://sante.lefigaro.fr/actualite/2014/10/07/22876-antibiotiques-solutions-alternatives-prometteuses>.
- <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>

.K.

- **King L.A ., Loukiadis E ., Mariani-kurkdjian P., Haeghebaert S., Weill F.X., Baliere C., Ganet S., Gouali M., Vaillant V., Pihier N., Callon H., Novo R., Gaillot O., Thevenot-sergentet D., Bingen E., Chaud P., De valk H. (2014).** Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: [H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:1136–1144.

.L.

- **Labiod R., (2016).** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar. Faculté des sciences. Annaba. P (40-41-42-45).
- **Lamouri N.S., et Messelem M.B., (2018).** Anitibiorésistance des souches *Escherichia coli* d'origine aviaire. Mémoire de Master. Centre Universitaire Belhadj Bouchaib : Faculté des sciences de la nature et de la vie. Ain-Temouchent. P (26-27-28).
- **Lefebvre P., Rigo J-M., Leprince P., Rogister B., Delrée P., Hans P., Born J-D., Moonen G. (1988).** **Agressologie** : revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression. 0002-114829 [Internet]. [consulté 27 Mars 2018]; Disponible sur: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE2014104070>
- **Lopez-galindo A., Viseras C., (2004).** Pharmaceutical and cosmetic application of clays, In. *Clay Surfaces, Fundamentals and Applications*, Elsevier; Amsterdam, 267.
- **Loukiadis E. (2007).** Facteur de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). Thèse de doctorat Université de Toulouse, France.

.M.

- **Mariani-Kurkdjian P., Bingen É. (2012).** Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (Shiga-toxin producing by *Escherichia coli*: pathophysiology and virulence). SRLF ET Springer-Verlag France. V 21: p 268-279.
- **Mami A., (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections

alimentaires en Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran : Faculté des sciences. Oran. P 61.

- **Merniez M., et Merniez S., (2018).** Etude de la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées du lait de vache commercialisée dans la région d'Ain m'lila et Ain fakroun. Mémoire de master. Université larbi ben m'hidi : Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie. Oum el Bouaghi. P 26.

.Q.

- **Qlihaa A., Dhimni S., Melrhaka F., Hajjaji N., Srhiri A., (2011).** Caractérisation physico-chimique d'une argile Marocaine [Physico-chemical characterization of a morrocan clay]. J. Mater. Environ. Sci. 7 (5), 1741-1750.

.S.

- **Santosa M.F., Oliveira C.M., Tachinski C.T., Fernandes M.P., Pich C.T., Angioletto E., Riella H.G., Fiori M.A., (2011).** Bactericidal properties of bentonite treated with Ag+ and acid. International Journal of Mineral Processing, 100, 51–53.
- **Smati M., Clermont O., Bleibtreu A., Fourreau F., David Anthony., Daubie AS.. (2015).** Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. Microbiol Open. 4(4):604-15.
- **Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux,** bio Mérieux SA. Français – 1.2010.

.T.

- **Theodorou V., Chrestian B., Fioramonti J., Droy-Lefaix M.T., Bueno M.T., (1994).** Protective action of diosmectite treatment on digestive disturbances induced by intestinal anaphylaxis in the guineapig, Alimentary Pharmacology and Therapeutics 8, , pages 295-299.

.W.

- **Wang X.S., Huanga J., Hu H.Q., Wang J., Qin Y. (2007).** «Determination of kinetic and equilibrium parameters of the batch adsorption of Ni (II) from aqueous solutions by Namordenite», Journal of Hazardous Materials 142, 468–476.

.Y.

- **Yuhang Z., Meisheng X., Ying Y., Caihong H., (2004).** Antimicrobial ability of Cu²⁺-montmorillonite. Applied Clay Science, 27, 215–218

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture et solutions

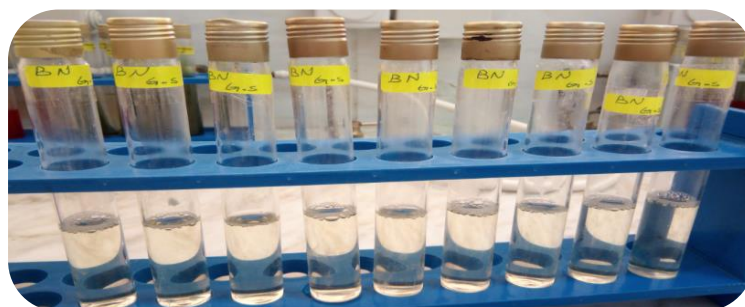
1- Gélose Mac Conkey (Bahlouli et Idiri, 2015).

Peptone de caséine	17g
Peptone de viande	3g
Sels biliaires	1.5g
Cristal violet	0,001g
Lactose	10g
Rouge neuter	0,03g
Chlorure de sodium	5g
Agar	13,5g
ZnSO4	0,07g
pH : 7,1 ± 0,2, Autoclavage à 120°C /20 min.	



2- bouillon nutritif : (Mami, 2013).

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
pH : 7.4 autoclavage à 120°C/ 20 min.	



3- Eau physiologique

Chlorure de sodium	8.5g
Peptone	0.5g
Eau distillée	1000 ml
pH : 7 , Autoclavage à 120°C / 20 min.	

3- Milieu de Schubert (milieu indole-mannitol) : (Debabza, 2005).

Tryptophane	0,2g
Acide glutamique	0,2g
Sulfate de magnésium	0,7g
Citrate de sodium	0,5g
Sulfate d'ammonium	0,4g
Chlorure de sodium	2g
Peptone	10g
Mannitol	7,5g
Phosphate disodique	4g
Phosphate monopotassique	0,6g
Eau distillée	1000ml
pH: 7,6 autoclavage 10 min à 115°C	



4- Milieu citrate de Simmons

Citrate de sodium	1g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium	0, 2g
Monohydrogénophosphate de potassium	1g
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	13g
Eau distillée	1000ml
pH: 6,8±0,2 autoclavage 20 min à 120°C	

5- Milieu mannitol-mobilité :

Peptone trypsique de viande	20g
Mannitol	2g
Rouge de phénol à 1%	4g
Agar	4g
Eau distillée	1000ml
pH: 7,6±0,2 autoclavage 30 min à 110°C	

6- Milieu trois-sucres-fer : triple sugar iron –agar (T.S.I)

Extrait de bœuf	3g
Extrait de levure	3g
Peptone	15g
Protéose peptone	5g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Glucose	1g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de fer II (FeSO ₄)	0,2g
Thiosulfate de sodium	0,3g
Rouge de phénol	0,024g
Agar	12g
Eau distillée	1000ml
pH: 7,4±0,2 autoclavage 15 min à 120°C	

7- Milieu de Mueller-Hinton (M.H)

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml
pH: 7,3±0,1 Autoclavage 15 min à 121°C	

Annexe 2 : Réactifs et colorants utilisés.

1- Violet de Gentiane (Debbi et Saadi, 2019).

Violet de Gentiane	10 g
Phénol	20 g
Éthanol (90 °GL)	100 ml
Eau distillée	1L

2 - Logul

Iodure de potassium	2 g
Iode métalloïde I	2 1 g
Eau q.s. ad	100 g
q.s. ad 100 g signifie "quantité suffisante pour obtenir 100 g de solution"	

3- Fuchsine

Fuchsine basique	10 g
Phénol	50 g
Éthanol	100 mL
Eau distillée	1 L

Annexe 3 : API 20 E.



1- comment remplir les tubules :

A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les micro-tubes de la galerie. Au sein des micro-tubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.

- ❖ Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.
- ❖ Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H2S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- ❖ Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.

2 – Lecture de la galerie API 20 E (Bouzeraa et Berrihil, 2018).

Test	Composants actifs	QTE	Réactions-enzymatique	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.223	B-galactosidase	Incolore	Jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Jaune	Rouge-orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DéCarboxylase	Jaune	Rouge-orangé (2)
<u>ODC</u>	L-omithine	1.9	Omithine DéCarboxylase	Jaune	rouge
CIT	Trisodium citrate	0.756	utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	bleu-vert – bleu (3)
H2S	Sodium thiosulfate	0.075	production d'H2S	Incolore-grisâtre	dépôt noir – fin liseré
URE	Urée	0.75	UREase	jaune	rouge – orangé (2)
TDA	L-trypphophane	0.38	Tryptophane DésAminas	TDA-immédiate	
				Jaune	marron - rougeâtre
IND	L-trypphophane	0.19	production d'indole	JAMES-immédiate	
				Incolore	Rose
VP	Sodium pyruvate	1.9	production d'acétoine	VP1+VP2/10min	
				Incolore-rose pale	Rose-rouge(5)
GEL	Gélatine	0.6	Gélatinase	non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1.9	fermentation – oxydation (GLUcose) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation – oxydation (MANnitol) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
INO	Inositol	1.9	fermentation – oxydation (INOsitol) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation – oxydation (SORbitol) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation – oxydation (RHAmnose) (4)	Bleu/bleu-vert	Jaune

SAC	D-saccharose	1.9	fermentation – oxydation (SACharose) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation – oxydation (MELibiose) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	0.57	fermentation – oxydation (AMYgdaline) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation – oxydation (ARABinose) (4)	Bleu/bleu-vert	jaune

(1): Une très légère couleur jaune également positive, **(2):** Une couleur orange apparaissant après 36-48H d'incubation doit être considérée négative, **(3):** Lecture dans la cupule (zone aérobie), **(4):** La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule, **(5):** Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Annexe 4 : Tableau d'identification d'API 20E (Bio Mérieux SA, 2010).

- % de la réaction positive après 18 – 24 / 48 h à 36 °C ± 2

API 20 E	V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
<i>Butyrivibrio agrestis</i>		100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100	0	
<i>Cedecea davisae</i>		99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1	0	
<i>Cedecea lapagei</i>		99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1	0	
<i>Citrobacter brasiliensis</i>		50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99	0	
<i>Citrobacter freundii</i>		90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99	0	
<i>Citrobacter koseri/amatonicus</i>		99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	
<i>Citrobacter koseri/fermeri</i>		99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99	0	
<i>Citrobacter youngae</i>		100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100	0	
<i>Edwardsiella hoshinae</i>		0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1	0	
<i>Edwardsiella tarda</i>		0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		99	0	99	98	82	0	1	0	0	85	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>		99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99	0	
<i>Enterobacter amnigenus 2</i>		99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99	0	
<i>Enterobacter asburiae</i>		100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100	0	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100	0	
<i>Enterobacter cloacae</i>		98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	96	90	99	99	0	
<i>Enterobacter gergoviae</i>		99	0	32	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100	0	
<i>Enterobacter intermedius</i>		99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99	0	
<i>Enterobacter sakazakii</i>		100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99	0	
<i>Escherichia coli 1</i>		90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	36	75	3	99	0	
<i>Escherichia coli 2</i>		26	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	30	3	3	1	70	0	
<i>Escherichia fergusonii</i>		96	1	99	100	1	0	0	0	99	0	0	100	99	1	0	87	0	1	99	99	0	
<i>Escherichia hermannii</i>		100	0	1	100	1	0	0	0	99	0	0	100	100	0	0	99	25	0	99	99	0	
<i>Escherichia vulneris</i>		100	30	50	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	95	95	99	0	
<i>Ewingella americana</i>		98	0	0	0	75	0	0	0	0	95	1	99	99	0	0	1	0	1	50	1	0	
<i>Hafnia alvei 1</i>		75	0	99	98	50	0	10	0	0	50	0	99	99	0	1	99	0	0	25	99	0	
<i>Hafnia alvei 2</i>		50	0	99	99	1	0	1	0	0	10	0	99	98	0	1	1	1	0	0	1	0	
<i>Klebsiella oxytoca</i>		99	0	80	0	89	0	78	0	99	80	0	100	100	99	100	99	99	100	100	100	0	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>		94	18	25	1	18	0	1	0	0	1	0	99	96	57	66	58	20	80	97	85	0	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>		99	0	73	0	86	0	75	0	0	90	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	0	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis</i>		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	90	90	75	75	1	99	10	0	
<i>Kluyvera spp</i>		95	0	25	99	60	0	0	0	80	0	0	100	99	0	25	93	89	99	99	99	0	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>		99	0	0	0	0	0	1	0	99	0	1	100	99	0	2	100	66	99	99	100	0	
<i>Mobacterella wisconsinensis</i>		97	0	0	0	40	0	0	0	15	1	0	100	1	0	0	0	100	99	0	0	0	
<i>Morganella morganii</i>		1	0	10	98	1	1	99	93	99	0	0	99	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Pantoea spp 1</i>		85	1	0	0	13	0	1	0	1	9	1	100	99	1	26	1	98	26	59	61	0	
<i>Pantoea spp 2</i>		99	1	0	0	99	0	1	0	53	62	4	100	99	36	82	90	98	81	99	99	0	
<i>Pantoea spp 3</i>		99	1	0	0	21	0	1	0	1	86	15	100	99	34	1	97	93	23	65	97	0	
<i>Pantoea spp 4</i>		86	1	0	0	29	0	1	0	59	1	1	99	100	10	32	99	72	89	99	99	0	
<i>Proteus mirabilis</i>		1	0	0	99	50	75	99	98	1	1	82	98	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Proteus penneri</i>		1	0	0	0	1	20	100	99	0	0	50	99	0	0	0	0	100	0	1	0	0	
<i>Proteus vulgaris group</i>		1	0	0	0	12	83	99	99	92	0	74	99	1	1	0	1	89	0	66	1	0	
<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>		0	0	0	0	80	0	0	100	99	0	0	99	1	1	0	0	1	0	0	1	0	
<i>Providencia rettgeri</i>		1	1	0	0	74	0	99	99	90	0	0	98	82	78	1	50	25	0	40	1	0	
<i>Providencia stuartii</i>		1	0	0	0	85	0	30	98	95	0	0	98	3	80	0	0	15	0	0	0	0	
<i>Rahnella aquatilis</i>		100	0	0	0	50	0	0	1	0	99	0	100	100	0	0	98	99	100	97	100	98	0
<i>Racoultella ornithinolytica</i>		100	0	99	99	99	0	85	0	100	65	0	100	100	99	100	100	100	100	100	100	0	
<i>Racoultella tenigena</i>		100	0	99	6	52	0	0	0	0	75	0	99	99	99	99	99	100	100	100	99	0	
<i>Salmonella choleraesuis ssp arizonae</i>		98	75	97	98	75	99	0	0	1	0	0	100	99	0	99	99	1	78	0	99	0	
<i>Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis</i>		0	15	99	99	6	64	0	0	0	0	0	100	99	0	98	99	0	20	0	0	0	
<i>Salmonella ser. Gallinarum</i>		0	1	100	1	0	25	0	0	0	0	0	100	100	0	0	1	0	0	0	100	0	

Annexe 5 : standardisation McFarland 0.5

- réparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5(CA-SFM / EUCAST, 2019).

- 1- Ajouter 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl₂ (1,175% p/v BaCl₂·2H₂O) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de H₂SO₄ (1% v/v) et agiter vigoureusement.
- 2- Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'Un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
- 3- Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
- 4- Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- 5- Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex.
- 6- Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
- 7- Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.

Résumé

Nous avons réalisé une étude sur l'argile de type de Bentonite de Maghnia pour voir son effet antibactérien sur la bactérie *Escherichia coli*. En premiers lieu on a fait une étape de ré-identification de la souche par des tests microbiologique et biochimique, ces tests avaient donné des résultats positifs, et la deuxième partie consiste l'argile : tamisage, stérilisation et dilution enfin pour faire l'antibiogramme.

L'étude de l'effet synergique des acides et la bentonite ont indiqué la présence d'effets bactéricides significatifs. Et aussi les résultats démontrent que la capacité antimicrobienne de la Cu^{2+} /montmorillonite était très efficace sur *Escherichia coli*.

Abstract

We conducted a study on Maghnia's Bentonite-clay to see its antibacterial effect onto the bacteria *Escherichia coli*. The first step was to re-identify the strain by microbiological and biochemical tests, these tests had given positive results, and the second part is about the clay: sieving, sterilization and finally dilution to do the antibiogram.

The study of the synergistic effect of acids and bentonite indicated the presence of signify antibactericidal effects. And also the results demonstrate that the antimicrobial capacity of Cu^{2+} /montmorillonite was very effective on *Escherichia coli*.

ملخص

أجرينا دراسة على طين مغنية نوع البنتونيت لمعرفة تأثيره المضاد للبكتيريا على بكتيريا الإشريكية القولونية. كانت الخطوة الأولى هي إعادة تحديد السلالة عن طريق الاختبارات الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية، وقد أعطت هذه الاختبارات نتائج إيجابية، والجزء الثاني يتمحور حول تحضير الطين : التعقيم والتخفيف الغزيلة لعمل المضاد الحيوي

أشارت دراسة التأثير التآزري للأحماض مع البنتونيت إلى وجود تأثيرات على الجراثيم. وأظهرت النتائج أيضاً أن القدرة المضادة للميكروبات من الثنائي مونت موريلونيت/ثنائي النحاس كانت فعالة جداً على الإشريكية القولونية.