

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre et de l'Univers



## **Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master**

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Département : ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT**

---

**Thème :**

**Contribution à l'isolement et l'identification des bactéries  
provenant des Hammams publics  
(Cas des hammams Ben Nadji et Kharchiche – Guelma)**

---

**Présenté par : Mlle. HAOUAM Loubna**

Mlle. SERDOUK Sara

**Devant le jury composé de :**

**Président : Mr. GUEROUI Yacine MCB Université de Guelma**

**Encadreur : Mr. ROUIBI Abdelhakim MCB Université de Guelma**

**Examineur : Mr. ROUABHIA Kamel MAA Université de Guelma**

**Juin 2018**

## *Remerciements*

*Nous exprimons notre profonde gratitude avant tout à **Dieu** qui nous a aidé et qui nous a donné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.*

*Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre gratitude à la directrice de ce mémoire, **Mr. ROUIBI Abdelhakim** Maître de conférences « B » au Département des Sciences de la nature et de la vie, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Notre gratitude va également à : **Mr. ROUABHIA Kamel**, Maître assistant « A » au département de biologie et **Mr. GUEROUI Yacine** Maître de conférences « B » au Département des Sciences de la nature et de la vie, qui nous honore par sa participation de notre jury d'examinations.*

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.*

*Enfin, tous les étudiants de 2<sup>me</sup> année Master Microbiologie appliquée (2017 /2018), tous les enseignants et les enseignantes du département d'Ecologie et génie d'environnement qui ont contribué à notre formation durant les Cinq années. Et tout ceux qui de près ou de loin qui ont participé à l'élaboration directe ou indirecte de ce modeste travail.*



# Dédicaces

*Avec un très grand honneur que je dédie ce modeste  
travaille*

*à mes chères parents.*

*Pour ces deux être les plus chères de ma vie, pour leurs  
sacrifices,*

*Et leurs soutient tout au long de mes études.*

*A mes chère frères Lokman et Mohamed Cherif*

*Mes sœurs chères Hadjer, Oumaima, Amel, Kaouther,*

*La petite fille Assil.*

*A tout ma grande famille Serdouk et Nakib*

*D'ici ou d'ailleurs vous seraient toujours proche de moi.*

*A tous mes chères amies sans exception*

*A toutes mes collègues et enseignants de la promotion de  
master.*



-Sara-

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

*A mes chers parents pour leur amour inestimable, leur  
confiances, leur soutien, leur sacrifices.*

*A ma très chère sœur "Chahra Zed".*

*A mon très chère frère "IMAD".*

*A la personne le plus précieuse de mon cœur à mon fiancé  
« AMER »*

*A tout ma grande famille grande et petite*

*« Haouam & Assaslla »*

*Loulou .....*

## Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Représentation schématique de la formation et de la structure d'un biofilm au sein d'un réseau de distribution d'eau (Ortolano et Canonica, 2007).	10
02	Localisation de commun de hammam Debagh-wilaya de Guelma (cartes d'Algérie).	14
03	Localisation des deux Hammams Ben nadeji et Kherchiche (google earth 2018)	15
04	Les points de prélèvement au niveau de Hammam Ben Nadji.	19
05	Les points de prélèvement au niveau de Hammam Kharchiche	20
06	Recherche des coliformes totaux.	23
07	Recherche des streptocoques fécaux.	25
08	Dénombrement des spores des anaérobies sulfito- réducteurs(ASR).	27
09	Dénombrement de la microflore aérobie mésophile totale (germes totaux).	29
10	Recherche des Salmonelles.	31
11	Galerie API 20E.	37
12	Photo présentant les résultats d'isolement sur le milieu TGEA	40
13	Variations du nombre des germes revivifiables à 22 et à 37 °C dans les deux Hammams	41
14	Variations du nombre des coliformes totaux dans les points du prélèvement	42
15	Photo présentant les résultats du test de présomption des CT	42
16	Variations du nombre des coliformes fécaux dans les points du prélèvement	42
17	Variations du nombre des Streptocoques fécaux dans les points du prélèvement	43
18	Variations du nombre des spores des anaérobies-sulfito-réducteurs (ASR) dans les points du prélèvement	44
19	Photo présentant les résultats de recherche des ASR	44
20	Photo présentant les résultats d'isolement des <i>psudomonas</i> à partir des milieux king A et king B	44

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Maladies causées par <i>P. aeruginosa</i> et populations à risques associées.	08
02	Les principales infections liées à la présence de biofilms.	11
03	Caractéristiques physico-chimiques de la source chaude de Hammam Debagh (Yakhlef <i>et al.</i> , 2012).	16
04	Matériel utilisé pour l'étude de la qualité bactériologique.	17
05	Répartition des prélèvements par hammam et par sites.	18
06	La galerie biochimique classique utilisée.	33
07	Les caractères du test catalase.	35
08	Les caractères du test d'oxydase.	36
09	Les caractères du test Béta-galactosidase.	36
10	Evaluation du nombre de la flore mésophile totale dans les sites de prélèvements.	40
11	Résultats d'isolement sur le milieu Chapman	45
12	Résultats d'isolement sur le milieu SS	46
13	Rapport CF/SF des sites du prélèvement	47

## LISTE DES ABREVIATIONS

**BCPL** : bouillon lactose au pourpre de bromocresole.

**CF** : coliformes fécaux.

**CT** : coliformes totaux.

**D/C** : double concentration.

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**E** : Enterobactériacées.

**Fig** : figure.

**Glu** : glucose.

**IND** : indole

**NPP** : Nombre le Plus Probable.

**Oxy**: Oxydase.

**ONPG**: Ortho-nitro phényle B-D gala.

**SS**: Salmonella Schegilla

**S /C**: Simple concentration.

**SF** : Streptocoques fécaux.

**Staph** : Saphylocoques.

**TGEA** : Gélostryptone-glucose-Extrait de levure.

**TSI** : tri-sugar iron.

**T** : Température.

**UFC** : unité formant colonie.

**VF** : viande foie.

**VP** : Voges-Proskauer.

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction.....01**

## *CHAPITRE I : Synthèse bibliographique*

1.	Localisation des microorganismes dans les cabines de douches .....	03
1.1.	Le pommeau de douche .....	03
1.2.	Chauffe-eau.....	03
1.3.	Les parois de douche .....	04
1.4.	Les serviettes.....	04
1.5.	Les poignées .....	05
1.6.	Les baignoires .....	05
2.	Les microorganismes probablement trouvés dans les douches .....	05
2.1	Les bactéries indicatrices de contamination.....	05
2.1.1.	Les coliformes.....	05
2.1.1.1.	Les coliformes totaux(CT).....	05
2.1.1.2.	Les coliformes fécaux(CF) .....	05
2.1.2.	Les Streptocoques fécaux(SF) .....	06
2.2.	Les bactéries pathogènes .....	06
2.2.1.	Les Staphylocoques.....	06
2.2.1.1.	Habitat.....	06
2.2.1.2.	Pouvoir pathogène .....	06
2.2.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	07
2.2.2.1.	Ecologie.....	07
2.2.2.2.	Pathologies.....	08
2.2.3.	Legionella .....	08
2.2.3.1.	Réservoirs.....	08
2.2.3.2.	Pathologies.....	09

3.	Présence des biofilms dans les réseaux des douches .....	09
3.1.	Le problème des biofilms .....	09
3.2.	Définition des biofilms .....	09
3.3.	Formation et développement du biofilm .....	10
3.4.	Facteurs favorisant le développement des biofilms .....	10
3.5.	Importance des biofilms .....	11
4.	Mesures de prévention pour élimination des agents infectieux .....	12

## *CHAPITRE II : Matériel et méthodes*

1.	Description du site d'étude .....	14
1.1.	Localisation.....	14
1.2.	Caractéristiques .....	15
2.	Matériel et méthodes.....	17
2.1.	Matériel utilisé .....	17
2.2.	Écouvillonnages et méthodes de prélèvement .....	17
2.2.1.	Écouvillonnages des surfaces .....	17
2.2.2.	Méthodes de prélèvement .....	18
3.	Méthodes d'analyse bactériologique .....	18
3.1.	Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux .	21
3.2.	Dénombrement des streptocoques fécaux .....	24
3.3.	Dénombrement des spores des anaérobies sulfito- réducteurs(ASR) .....	26
3.4.	Dénombrement de la microflore aérobie mésophile totale (Germes Totaux) .....	28
3.5.	Recherche des Salmonelles .....	30
3.6.	Recherche des Staphylocoques .....	30
3.7.	Recherche des <i>Pseudomonas</i> .....	32
4.	Identification et tests complémentaires .....	32
4.1.	Les examens microscopiques .....	32
4.2.	Études des caractères biochimiques .....	33
4.2.1.	La galerie biochimique classique .....	33
4.2.2.	Les enzymes respiratoires .....	35
4.2.3.	Etude des caractères biochimiques par les galeries miniaturisées.	37
5.	Origine de la pollution fécale .....	38

**CHAPITRE III : Résultats et discussion**

1. Résultats de la recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiants ..	40
2. Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes .....	41
2.1. Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes totaux .....	41
2.2. Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes fécaux .....	42
3. Résultats de recherche des Streptocoques fécaux .....	43
4. Résultats de recherche et dénombrement des spores des anaérobies-sulfite-réducteurs (ASR) .....	43
5. Résultat de recherche des Pseudomonas .....	44
6. Résultat de recherche des Staphylocoques .....	45
7. Résultat de recherche des Salmonelles .....	45
8. Origine de la pollution fécale .....	46
<b>Conclusion</b> .....	48
<b>Références Bibliographiques</b> .....	49

**Résumé****Abstract**

الملخص

**Annexes**

# *Introduction*

Les eaux thermo-minérales naturelles ont une large distribution mondiale et une vaste utilisation à des fins thérapeutiques. Leurs utilisations varient selon les habitudes des populations. Certaines eaux minérales de sources thermales sont commercialisées ou bien utilisées comme bains thérapeutiques pour guérir certaines maladies.(Hakam *et al*, 2000).

Les eaux souterraines, souvent protégées géologiquement, sont exposées à des pollutions agricoles, industrielles et / ou urbaines ce qui provoque une modification de leur composition physico-chimique (Ben Moussa *et al*, 2012) et par conséquent, elle peut véhiculer des agents potentiellement dangereux, notamment des micro-organismes pathogènes (Hassoune *et al*, 2010) et être à l'origine des maladies (El Haissoufiet *al*, 2011).

Les micro-organismes sont très diversifiés peut être trouvé partout dans l'environnement sur choses vivantes et non-vivantes avec des humains inclusives Ces organismes qui peuvent être trouvés sur le peau, bouche, intestin, urine, reproduction les organes des humains et même des eaux de baignade ont été vu sur les surfaces des toilettes et salles de bains La salle de bain qui est une pièce pour l'hygiène personnelle contient généralement une baignoire ou une douche, et dans certains cas contient des toilettes.

Les surfaces telles que les murs, les éviers, les portes, les fenêtres, poignées affleurâtes et sièges de toilette dans la salle de bain peuvent être des sites de contamination microbienne.

Les microbes qui sont susceptibles d'être trouvés dans les salles de bains peut être divisé en trois groupes; micro-organismes qui vivent sur la peau humaine, ceux de l'extérieur qui sont portés avec des chaussures et des bactéries qui vivent à l'intérieur des humains qui sont transmis dans urine ou fèces. [1]

C'est la pièce censée être la plus propre, et pourtant, elle cache des milliers de bactéries dans chaque recoin. En cause, l'humidité et de chaleur dans ces endroits de la douche, qui aident les microbes à se multiplier vecteurs de maladies (par exemple les bactéries, les virus, et les champignons), à cause de ça, les maladies se propagent facilement d'un homme à l'autre.

Les maladies infectieuses liées à l'usage des douches collectives constituent donc un sérieuse problème de la santé et selon les médecins, les personnes à risque sont : les femmes enceintes, les personnes âgées, les individus dont le système immunitaire est faible. [2]

L'objectif général de notre thème de recherche " Contribution à l'isolement et l'identification des bactéries provenant des hammams publiques (cas des hammams Ben Nadji et Kharchiche–Guelma)" sont :

- Isolement des microorganismes indicateurs de contamination fécale à partir de plusieurs endroits des douches.
- Identification des souches isolées en étudiant le maximum des caractères biochimiques.
- Vérification du niveau d'hygiène au niveau du site d'étude« hammam Debagh » qui considéré comme source de traitement naturelle.

A cet égard, le mémoire présente deux chapitres :

Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique avec des généralités sur la localisation des microorganismes probablement trouvé dans les douches, les maladies d'origine bactérienne et les mesures de prévention au niveau de ces endroits

Le deuxième chapitre expose notre travail expérimental qui présente une description du site d'étude et rassemble les méthodes d'isolements et identification les microorganismes dans les cabines des douches, après on savoir les résultats obtenus et leurs discussions, et termine par une conclusion générale.

*Synthèse  
bibliographique*

# *Chapitre I*

## **1. Localisation des microorganismes dans les cabines de douches**

Une cabine de douche est un lieu où l'on prend une douche qui est généralement pratiqué pour des raisons d'hygiène.

La douche se prend en général dans une cabine de douche, cabine spécialement conçue à cet effet et pouvant aussi servir à soigner par son action massant et éventuellement aromathérapique ; mais l'on peut aussi se doucher dans une baignoire, ou directement sur le sol, lequel doit être en pente convergente vers une bonde, avec ou sans enfoncement spécialement aménagé. Une douche peut être aménagée par un rideau de douche. Des douches publiques collectives existent également, notamment dans les campings, les salles de sport, partout où l'on peut pratiquer la baignade, ainsi que dans les prisons. [3]

La douche compte parmi les endroits où l'on retrouve le plus de germes qui se développent parfaitement dans les conditions de température et l'humidité élevée et qui nécessitent des besoins nutritionnels (source d'énergie, azote, carbone, présence/absence d'oxygène libre dans leurs environnements) ces derniers peuvent devenir un réservoir potentiel ou idéal à la survie des bactéries et se multiplier rapidement.

### **1.1. Pommeau de douche**

Les pommeaux de douche offrent un milieu de développement idéal à une bactérie responsable de problèmes respiratoires ou 100 fois plus de bactéries à l'origine d'infections pulmonaires dans un pommeau de douche que dans un simple robinet. Bien que les types de microbes qui y vivent diffèrent selon la source d'eau et d'autres facteurs externes, certains de ces microbes peuvent être des agents pathogènes opportunistes qui ont le potentiel de nuire aux personnes immunodéprimées.

Les personnes les plus exposées sont les asthmatiques, les fumeurs, les diabétiques non équilibrés, les personnes âgées et les petits enfants. [4]

### **1.2. Chauffe-eau**

En matière de prévention des risques liés à l'eau chaude sortant du robinet, on doit se préoccuper tout autant des dangers de brûlures que de la contamination par les bactéries. Réduire la température du chauffe-eau s'avère d'autant plus risqué que des études réalisées au Québec ont permis de noter la présence de la bactérie *Legionella* dans près de 25 % des

chauffe-eau électriques, même quand le thermostat était réglé à 60 °C (140 °F), toutefois, à cette température, les risques sont plutôt faibles. Cette situation est d'autant plus préoccupante qu'au-delà de 90 % des résidences privées du Québec sont dotées d'un chauffe-eau électrique.

Les chauffe-eaux électriques semblent plus sujets à la contamination que les appareils fonctionnant au gaz ou à l'huile. La température de l'eau dans la partie inférieure du réservoir y est souvent trop basse pour empêcher la multiplication de la bactérie *Legionella*, ces bactéries sont responsables d'une forme de pneumonie. La transmission se fait essentiellement par l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminées provenant, par exemple, de bains-tourbillons, de douches et de systèmes de climatisation de grands immeubles., Chaque année au Québec près de 100 personnes sont hospitalisées pour une pneumonie attribuable à la contamination des chauffe-eaux résidentiels. [5]

### 1.3. Parois de douche

Les parois des douces chaleurs associées à un taux élevé d'humidité constitue le milieu idéal pour le développement des moisissures. Les moisissures sont des champignons microscopiques aux couleurs multiples (vert, gris, noir) et à l'odeur caractéristique, qui se reproduisent en émettant des spores. Ces spores se dispersent dans l'air. Inhalées par les personnes sensibles, ces spores peuvent provoquer des irritations des muqueuses des voies respiratoires supérieures et entraîner des symptômes d'allergie : rhinite, bronchite, asthme. [6]

### 1.4. Serviettes

L'espèce *Staphylococcus aureus* résiste à la pénicilline et les staphylocoques peuvent survivre de sept jours à sept mois sur des surfaces molles. La chaleur et l'humidité entraînent une croissance plus rapide des micro-organismes en l'absence de tout traitement antimicrobien. suspendre les serviettes pour qu'elles sèchent après chaque utilisation prolongera le temps entre les lavages. Bien sûr, si quelqu'un est malade, une fréquence accrue de lavage et de nettoyage aidera à prévenir la propagation des maladies." Il faut laver les serviettes avec de l'eau chaude et de l'eau de Javel ou un désinfectant pour le linge. [7]

### 1.5. Poignées

La désinfection portée de main pour tuer les germes sur les interrupteurs, les poignées de porte, les armoires, les robinets afin d'empêcher le transfert des germes d'une personne à l'autre. [8]

### 1.6. Baignoires

Une grande variété de baignoires peut être utilisée pour les bains thermaux : aérobain, hydrobain (douche à pression, en immersion), Ces baignoires sont souvent équipées d'hydrojets et de buses qui doivent être démontables et nettoyés et désinfectés après usage, afin de limiter les contaminations comme pour les autres dispositifs, il est conseillé de limiter les stagnations d'eau dans les circuits et d'entretenir régulièrement les dispositifs d'arrivée et d'évacuation de l'eau. Pour réduire le risque de contamination par *legionella*, la hauteur des jets d'eau dans la baignoire doit être adaptée pour éviter la production d'aérosols. [9]

## 2. Microorganismes probablement trouvé dans les douches

### 2.1. Bactéries indicatrices de contamination fécales

#### 2.1.1. Coliformes

##### 2.1.1.1. Coliformes totaux (CT)

Ce sont des Bacilles Gram négatifs, non sporogones, aéro-anaérobies facultatifs avec une oxydase négative. Les coliformes les plus communs sont : *Escherichia*, *Entérobactérie*, *Citrobactérie*, *Serratia*, et *Klebsiella*, avec *Escherichia coli* étant les plus abondants dans l'intestin des humains et d'autres animaux à sang chaud. Elles sont identifiables par leur capacité de fermenter le lactose avec la production d'acides et de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C (Leclerc, 1996).

##### 2.1.1.2. Coliformes fécaux (CF)

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermos tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température 44,5°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsilla*.

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermos tolérants font partie des coliformes totaux et sont représentés principalement par : *Escherichia coli*, *Entérobactérie* et *Klebsiella*. Ils

habitent les intestins des animaux à sang chaud puisqu'ils peuvent cultiver et fermenter le lactose à une température relativement élevée (45°C) d'où elles également appelé "Coliformes thermo tolérantes".(Leclerc, 1996). Le nombre élevé des coliformes fécaux dans l'eau est considéré comme indice de contamination fécale. (Chigbu et Sobolev, 2007).

### **2.1.2. Streptocoques fécaux (SF)**

Ces bactéries appartiennent à la famille de *Streptococcaceae*, au genre *Streptococcus* et au groupe sérologique D de lance Field. Ils sont définis comme étant des cocci sphériques légèrement ovales Gram positifs ils se disposent le plus souvent en diplocoques ou en chainettes, se développent le mieux à 37°C. et peuvent vivre également plus longtemps dans l'eau que les coliformes fécaux. ils possèdent le caractère homofermentaire avec production de l'acide lactique sans gaz. Il y a 5 espèces reconnues parmi les SF : *S.bovis*, *S.equinus*, *S.avium*, *S.faecalis* et *S.faecum*(Chigbu et Sobolev, 2007).

## **2.2. Bactéries pathogènes**

### **2.2.1. Staphylocoques**

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. L'espèce *S.aureus* sera prise comme type de description.

#### **2.2.1.1. Habitat**

*S.aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement [13].

#### **2.2.1.2. Pouvoir pathogène**

L'espèce la plus pathogène de la famille des staphylocoques est *Staphylococcus aureus*. En effet, il peut être responsable de plusieurs infections. Cependant certaines espèces commensales sont dites pathogènes opportunistes, elles peuvent entraîner des infections dans des conditions particulières :

-L'espèce *Staphylococcus epidermidis* peut être responsable d'infections de la peau, nasales et aussi d'endocardites et d'infections localisées chez les patients immunodéprimés.

-L'espèce *Staphylococcus saprophyticus* peut être responsable d'infections urinaires [14].

- L'espèce *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie de la famille de *Micrococcaceae* de forme sphérique (coque). Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, a sporulée et aérobie facultatif possédant une catalase. Les staphylocoques sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires ou il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites. Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanées qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastro-intestinales [15].

### 2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) se présente sous forme de bâtonnets droits, de 1 à 3 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. C'est un bacille à Gram négatif, non sporulé et rendu mobile, surtout en aérobiose, par une ciliature polaire. *P. aeruginosa* est une bactérie avec un métabolisme strictement respiratoire. Cette espèce produit de façon habituelle deux pigments : la pyocyanine (caractère spécifique de l'espèce) et la pyoverdine (caractère spécifique du groupe génomique fluorescent). On peut noter également la production d'un voile fragile visqueux et peu épais à la surface des milieux liquides avec une odeur aromatique caractéristique. (Jacques, 2008).

#### 2.2.2.1. **Ecologie**

*P. aeruginosa* est un germe ubiquitaire très répandu dans l'environnement qui vit habituellement à l'état de saprophyte dans l'eau, les sols humides ou à la surface des végétaux. Le bacille pyocyanique peut également survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, sur tout type de support et de matériel humide (Avril *et al.* 1988).

### 2.2.2.2. Pathologies

C'est un germe habituellement inclus dans la liste des bactéries pathogènes. Peu virulent chez l'individu sain, il est convenu de le définir comme un agent pathogène opportuniste. C'est un agent infectieux redoutable chez les sujets dont les défenses immunitaires sont faibles (sujets atteints d'affections graves). C'est le germe type des infections nosocomiales.

*Pseudomonas aeruginosa* est une des principales bactéries responsables des infections nosocomiales. A ce titre, elle est visée par la réglementation sanitaire relative aux eaux minérales embouteillées mais aussi par les normes régissant les établissements hospitaliers et les établissements thermaux (Hardalo, 1997).

Selon les infections causées par la bactérie, il existe des populations plus à risques comme précisé dans le tableau suivante (**Tab.1**)

**Tableau 01.** Maladies causées par *P. aeruginosa* et populations à risques associées.

Pathologies	Population à risqué
-Endocardites	-Utilisateurs d'intraveineuses
-Infections respiratoires	-Personnes à affections respiratoires ou du système immunitaire, cancéreux
-Septicémies	-Immunodéprimés, diabétiques, sidéens, brûlés sévères
-Infections du système nerveux central	-Personnes ayant un trauma crânien, ayant subi un acte chirurgical invasif
-Infections auditives	-Fréquentation de piscine
-Infections oculaires	-Néonatal, opérations ophtalmologiques
-Infections osseuses et des articulations	-Utilisateurs d'intraveineuses, chirurgie du pied.

### 2.2.3. Legionella

Est un bacille intracellulaire à Gram négatif, cultivable sur milieu spécifique, Le genre comprend plus de 53 espèces et 70 sérogroupes. *L. pneumophila* est le plus fréquemment retrouvé en pathologie humaine (environ 90 % des cas)

#### 2.2.3.1. Réservoirs

Les légionelles colonisent de façon ubiquitaire de très nombreux milieux : eaux douces de surface (lacs et rivières), eaux de forages, eaux thermales, sols humides, etc. A partir du

milieu naturel, la bactérie peut coloniser des sites hydriques artificiels lorsque les conditions de son développement sont réunies et peut ainsi proliférer dans différentes installations à risque du fait de la production potentielle d'aérosols telles que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires.

#### **2.2.3.2. Pathologies**

- a. Voie aérienne par inhalation : c'est la seule voie de contamination démontrée à ce jour. Les *légielles* infestent les macrophages alvéolaires. La douche est souvent incriminée en raison de la vapeur d'eau produite.
- b. Pas de contamination interhumaine.
- c. Pas de transmission manu-portée.
- d. Aucun isolement septique ne doit être prescrit pour un patient atteint. [16].

### **3. Présence des biofilms dans les réseaux des douches**

#### **3.1. Problème des biofilms**

L'adhésion des microorganismes aux matériaux est un phénomène conduisant, lorsque les conditions environnementales le permettent, à leur multiplication et à la formation d'une masse de composition chimique et biologique hétérogène généralement appelée "biofilm". Les incidences économiques et sanitaires sont nombreuses : biocorrosion des surfaces métalliques immergées et des canalisations, colmatage des systèmes de filtration, opacités des verres optiques, présence des flores pathogènes et/ou d'altération sur les aliments, dégradation de la qualité de l'eau, diminution d'efficacité des échangeurs de chaleur (Characklis, 1990).

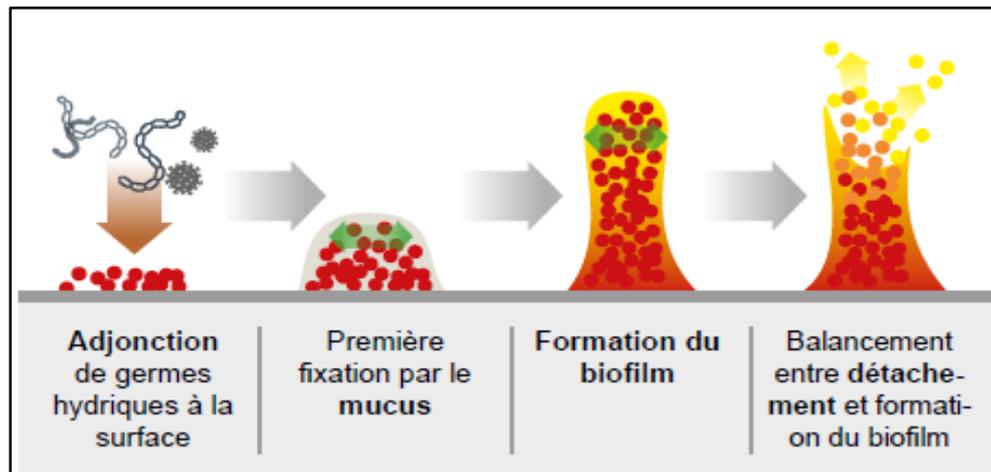
#### **3.2. Définition des biofilms**

Un biofilm est une communauté microbienne adhérant à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires (Characklis, 1990). La formation de biofilms est un processus de fixation irréversible des micro-organismes sur une surface donnée, impliquant la création de polymères extracellulaires qui facilitent l'adhérence. Les cellules microbiennes sont entourées de cette matrice formée de biopolymères, généralement polysaccharidiques et protéiques, excrétés par certains de ces micro-organismes à certains moments de leur cycle cellulaire additionnée de composés minéraux et de produits de corrosion. Cette matrice extracellulaire fortement hydratée, appelée aussi

couche muqueuse, permet la survie des micro-organismes, favorise leur nutrition et leur développement (Oliveira, 1992).

### 3.3. Formation et développement du biofilm

La prolifération bactérienne sous forme de biomasse fixée dans les réseaux de distribution d'eau est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique. Le biofilm ne représente pas un simple assemblage de cellules déposées sur une surface, mais un système dynamique et structuré. Le cycle de mise en place d'un biofilm (fig.1) est représenté par 3 étapes majeures : l'adhésion des cellules au support, la maturation du biofilm qui correspond à la croissance cellulaire et la mise en place d'une architecture particulière avec production de la matrice d'exopolymères, puis une phase de détachement cellulaire permettant la colonisation de nouvelles surfaces.



**Figure 01** : Représentation schématique de la formation et de la structure d'un biofilm au sein d'un réseau de distribution d'eau (Ortolano et Canonica, 2007).

### 3.4. Facteurs favorisant le développement des biofilms

Plusieurs facteurs sont susceptibles de favoriser l'implantation des biofilms sur les canalisations au contact de l'eau destinée à la consommation humaine. Les plus influents sont :

- le régime hydraulique du système et ses variations (temps de séjour de l'eau, absence de variation du débit), l'accélération de la vitesse d'écoulement augmente la croissance des biofilms aussi bien dans les tubes en cuivre qu'en matériaux plastique entraînant une augmentation immédiate du nombre de bactéries et de la concentration en cuivre dans les tubes en cuivre, du fait du détachement des sédiments des canalisations.
- La température de l'eau et la composition physico-chimique de l'eau.

- La nature et la concentration des éléments nutritifs (matières organiques, carbone inorganique, fer, phosphates) et la présence d'un résiduel en chlore.
- La compétition et l'avantage donné à certaines espèces du fait de leurs exigences nutritionnelles.
- La nature des matériaux utilisés en distribution d'eau. Ils sont tous largement colonisés par des micro-organismes mais les matériaux supports jouent un rôle considérable dans la sélection de la biomasse et son organisation. En effet, ils conditionnent l'efficacité d'adhésion des « pionniers » et peuvent être une source de nutriments ou de facteurs de croissance. Leur composition et les adjuvants nécessaires à leur stabilisation sont des facteurs de prolifération (Lehtola *et al.* 2006)

### 3.5. Importance des biofilms

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. En effet, 65% des infections recensées dans les pays développés sont dues à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Costerton *et al.* 2004). Les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales, on parle donc d'infections nosocomiales. Les infections à biofilms sont résistantes aux traitements antibiotiques, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique. Certaines maladies peuvent même favoriser la formation de biofilms, comme nous le verrons avec l'exemple de la mucoviscidose.

Le tableau 2, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilms (Lewis, 2008) :

**Tableau 02** : Les principales infections liées à la présence de biofilms.

Infections ou maladies	Infections nosocomiales
Caries dentaires Gingivites, Péritonite, Mucoviscidose, Otite moyenne (notamment chez l'enfant), Ostéomyélites Prostatites	Sonde urinaire Lentilles de contact, Cathéter veineux central, Sonde endotrachéale Sonde de gastrotomie, Valve cardiaque artificielle, Prothèse orthopédique, Broches (ostéomyélite)

Les catégories d'individus présentant le plus de risques de développer des infections dues à la présence de biofilms sont les individus immunodéprimés ou porteurs de prothèses médicales. Les agents bactériens les plus fréquemment rencontrés font partie de la flore commensale de l'organisme et sont organisés en biofilms (Costerton, 1999). Certaines maladies favorisent l'invasion des bactéries et la formation de biofilms. C'est le cas, entre autres, de la mucoviscidose, qui est une affection héréditaire de l'appareil respiratoire profond caractérisée par la présence dans les poumons d'un mucus très visqueux (Clutterbucket *et al.* 2007).

L'attachement à des surfaces recouvertes de mucus visqueux est plus rapide et plus massif et donne lieu à des agrégats bactériens plus importants que sur du verre ou sur des filaments d'actine. Un déséquilibre de charges ioniques favorise l'attachement de bactéries à une surface naïve. La plupart des composants extracellulaires des bactéries sont des molécules chargées négativement. Un excès de charges positives au niveau d'une surface va donc favoriser, par l'attraction exercée, l'attachement des bactéries au niveau de cette surface. Dans la mucoviscidose, un excès d'ions calcium  $Ca^{2+}$  dans le surfactant permet à *Pseudomonas aeruginosa* de se fixer et d'être à l'origine d'une infection (Clutterbucket *et al.* 2007).

#### **4. Mesures de prévention pour élimination des agents infectieux**

La prévention de la transmission des maladies infectieuses s'effectue d'abord par la mise en place des mesures d'hygiène qui visent tous les individus, sans exception, puisque toute personne peut transmettre une maladie infectieuse. Le nettoyage et la désinfection de l'environnement jouent un rôle dans la transmission des infections. Le nettoyage a pour but d'enlever les saletés, la poussière et les autres substances qui peuvent héberger des microorganismes ou permettre leur multiplication. La désinfection détruit ou empêche la multiplication des microorganismes [17].

Les douches sont des endroits naturellement humides. Avec le temps, l'humidité et les produits que vous utilisez pour vous laver forment une croûte et des dépôts solides. Il va vous falloir seulement un petit peu de temps et de produits nettoyants pour nettoyer votre cabine de douche et la garder propre.

Il est nécessaire de respecter de nombreuses dispositions légales en matière d'hygiène et de sécurité par :

- Enlevez tous les saletés grossières.

- Appliquez un désinfectant pour baignoire et sur les murs et les sols d'une cabine de douche carrelée.
- Quand c'est possible ouvrez une fenêtre pour aérer et pièce et enlever l'humidité pendant et après la douche car la vapeur d'eau non seulement favorise le développement des bactéries, mais empêche les serviettes de sécher et abîme les revêtements muraux.
- Nettoyer régulièrement la cabine (pomme, les parois, baignoire) avec une solution eau et vinaigre. Et répéter cette opération au moins une fois par moins.
- La vinaigre est un de plus redoutables ennemis des bactéries, avec une rate de destruction de 85-92 %.
- Toujours l'hygiène c'est la base la plus important de prévention contre les maladies infectieuses [18].

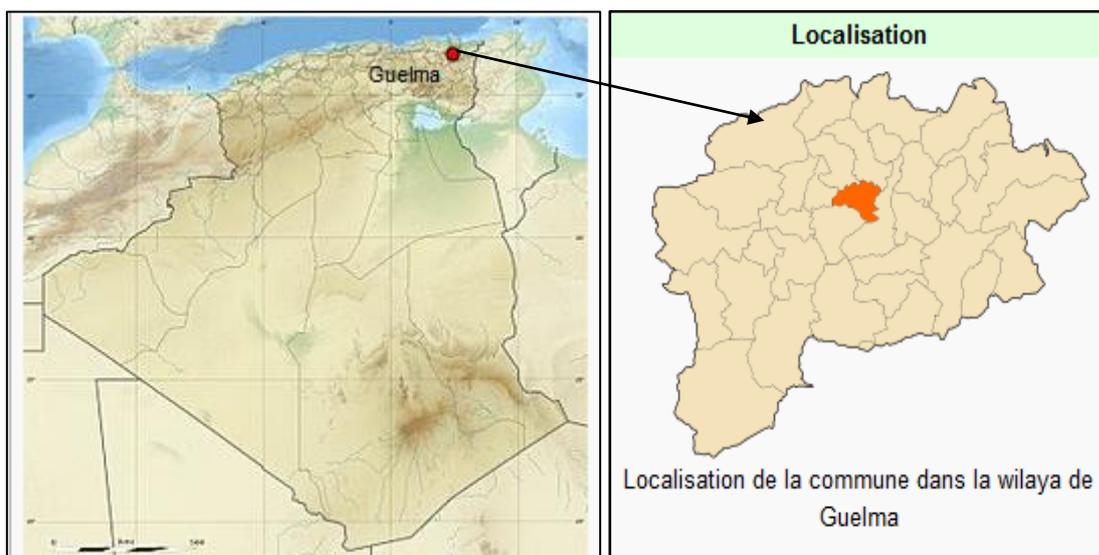
# *Matériel et méthodes*

## 1. Description du site d'étude

### 1.1. Localisation

La station thermale du Hammam Meskhoutine appartient aux eaux hyperthermales, les plus chaudes du monde après les Geysers de l'Islande. Elle est située à 19 km à l'Est de la ville de Guelma (fig.2) et à 4 km sur le côté droit de la route Nationale Guelma – Constantine. Ce Hammam a été construit par les turcs.

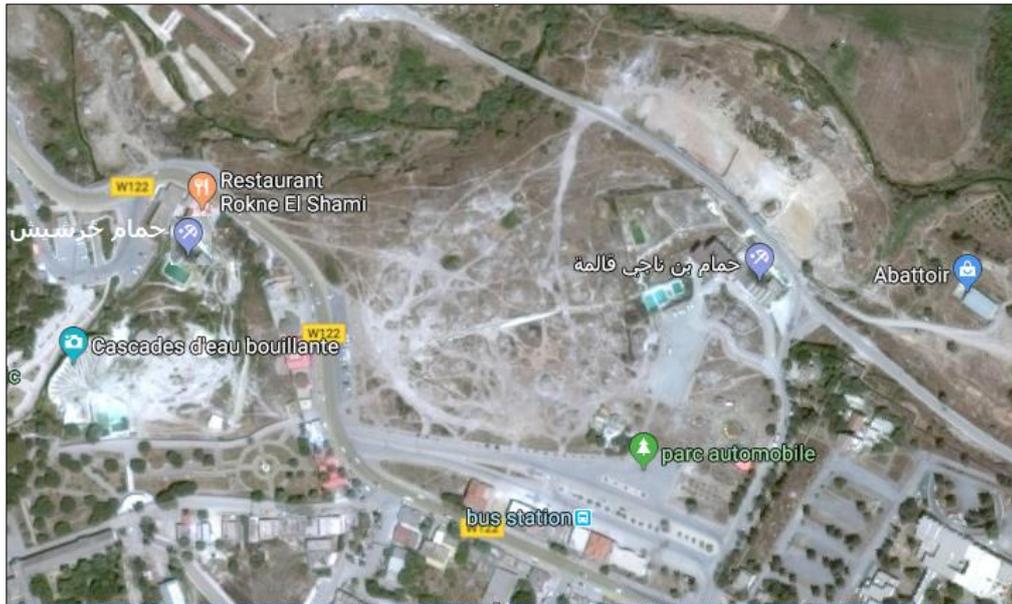
Cette station comprend plusieurs griffons hyperthermaux, et nous tiendrons compte surtout la description de l'émergence de cascade (**Boughalali, 2003**).



**Figure 02 :** Localisation de la commune de hammam Debagh-wilaya de Guelma (cartes d'Algérie).

Les échantillons ont été prélevés à partir de deux cabines de douche de la source thermale Hammam Debagh (ou Hammam Meskhoutine, en arabe: حمام المسك و الطين) située dans la Wilaya de Guelma (Nord-Est Algérien) et sont : hammam "Ben nadji" et hammam "Kharchiche"(Fig. 03).

Le site d'étude se localise à l'Est Constantinois, à 20 Km du chef-lieu de la Wilaya de Guelma, il se retrouve à 320 mètres d'altitude surprenant des collines et montagnes boisées. La source de Hammam Debagh est la plus florissante de l'Algérie et ses eaux sont les plus chaudes. Elle contient neuf sources hyperthermales d'origine volcanique dont la température de l'eau thermale varie entre 90 et 98°C. (**Ouali, 2008**).



**Figure 03 :** Localisation des deux Hammams Ben nadeji et Kherchiche(googleearth 2018)

## 1.2. Caractéristique

Les eaux sont d'une nature saline, incolore, avec une odeur sulfureuse comme l'odeur des œufs pourris. Leur faciès chimique est bicarbonaté calciques, chloruré sodique, radioactives, avec dégagement d'hydrogène sulfuré( $H_2S$ ) (**Bekkouche, 2016**).

Les eaux thermales sont le résultat au lent voyage de l'eau de pluie qui traverse les parois rocheuses des montagnes (jusqu'à une profondeur pouvant parfois atteindre mille mètres) avant de rejaillir du sol. Pendant ce long processus, elle se charge de minéraux et de gaz carbonique. L'eau thermique est donc une eau minérale souterraine qui a des propriétés curatives. Naturellement pure et riche en sels minéraux(**Tab.03**), en gaz et en oligo-éléments, on reconnaît à l'eau thermique de nombreuses propriétés thérapeutiques, particulièrement en ce qui concerne la peau.

Les eaux thermales de la wilaya de Guelma se caractérisent par des propriétés curatives « exceptionnelles », affirment des spécialistes qui plaident pour une exploitation optimale de cette richesse unique et à même de constituer un « argument » touristique.

Ces eaux sont réputées pour leurs vertus curatives, grâce à leur composition physico-chimique, les eaux de Guelma ont la particularité d'être « très bicarbonatées avec des composantes mixtes aux vertus thérapeutiques avérées pour les pathologies rhumatismales et dermatologiques ». Elles sont aussi « très indiquées pour la prise en charge des séquelles des traumatismes et des maladies neurologiques »

Lorsque l'on sait que 60 à 65% de la clientèle qui fréquente le complexe de Hammam Debagh souffre de maladies rhumatismales, on comprend l'intérêt de ces thermes pour ces malades, observe-t-il, estimant qu'il n'existe pas une grande différence entre la qualité de ces eaux et celles d'autres régions de la wilaya où les eaux prennent les composantes qui caractérisent les couches des sols.

**Tableau 03:** Caractéristiques physico-chimiques de la source chaude de Hammam Debagh (Yakhlef *et al.* 2012).

Location	36°27'N/07°16'E
T(°C)	95°
pH	7.3
Débit (L/s)	1650
Ca	130 mg/l
Mg <sup>2+</sup>	37.4 mg/l
K <sup>+</sup>	46 mg/l
Na <sup>2+</sup>	40 mg/l
Cl <sup>-</sup>	370 mg/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	385 mg/l
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	183 mg/l
H <sub>2</sub> S	6.80 mg/l
As	0.45 mg/l

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel utilisé

Pour l'étude de la qualité bactériologique, nous avons utilisé l'appareillage, les milieux de cultures et les produits suivants : (Tab.04)

**Tableau 04.** Matériel utilisé pour l'étude de la qualité bactériologique.

Appareillages	Les milieux de culture	Les réactifs et les colorons utilisées	Autres matériel
-Autoclave.	-Gélose TGEA.	-L'alcool.	-Anse de platine.
-Etuve.	-Gélose Chapman.	-Fuchsine.	-Bec bunsen.
-Réfrigérateur.	-Gélose SS.	-Violet de Gentiane.	-Boite de pétri stérile.
-Microscope optique de marque OPTIKA à objectif à immersion (×100) et (×40)	BCPL (D/C, S/C) avec cloche Durham	-Lugol.	-Ecouillons.
- Appareil photo-numérique	-King A King B.	-Huile de cèdre.	-Etiquette.
- Bain marie	-Milieu Viand de foi (VF).	-Réactifs de kovacs.	-Micro pipette.
	-Roth (D/C et S/C)	-Réactif de TDA.	-Système Api 20 E.
	-Mannitol mobilité.	- Réactifs Voges-Proskauer (VP1, VP2).	-Système Api staph.
	-Urée indole.	-Additif alun de fer	-Lames et lamelles.
	-Eau oxygénée.	-Sulfite de sodium.	-Pipettes Pasteur.
	-Citrate de Simmons.	- Eau physiologie stérile et eau distillée stérile	- Pipettes graduées
	-Milieu TSI.		- Tubes à essai stériles.
	-Milieu SFB (S /C).		- Glacière.

### 2.2.Écouvillonnages et méthodes de prélèvement

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie de l'Université 08 Mai 1945 de Guelma. Deux hammams publics ont fait l'objet de notre étude à savoir Hammam Ben Nadji et Hammam Kharchiche situés dans la commune de hammam Debagh wilaya de Guelma

#### 2.2.1. Écouvillonnages des surfaces

Huit prélèvements de surfaces ont été effectués au mois d'avril 2018 au niveau des deux hammams dans la wilaya de Guelma à savoir 04 prélèvements au niveau de Hammam Ben Nadjiet également 04 prélèvements au niveau de Hammam Kharchiche. La répartition des prélèvements par sites pour chaque Hammam est résumée dans le tableau 04.

**Tableau 05** : Répartition des prélèvements par hammam et par sites.

Hamam	Lieu	Numéro de prélèvement	Site de prélèvement	Nombre de prélèvement
Ben Nadji	Chambre de bain	P 01	Poignée de porte	04
		P 02	Robinet	
		P 03	Sol	
		P 04	Mur	
Kharchiche	Chambre de bain	P05	Poignée de porte	04
		P06	Robinet	
		P07	Sol	
		P08	Mur	

### 2.2.2. Méthodes de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués par la méthode d'écouvillonnage. Des écouvillons stériles sont préalablement humidifiés avec du bouillon nutritif puis frottés sur les surfaces désignées en stries parallèles et rapprochées. L'écouvillon est immédiatement introduit dans le bouillon nutritif, transporté au laboratoire.

### 3. Méthodes d'analyse bactériologique

L'objectif de l'analyse bactériologique des surfaces n'est pas d'effectuer un inventaire de toutes les espèces présentes, mais de rechercher soit celles qui sont susceptibles d'être pathogènes, soit celles qui sont indicatrices de contamination fécales.

Après effectués les différentes prélèvements les écouvillons sont induits dans des tubes d'eau physiologie (chaque tube contient 20 ml) .les tubes ensuite acheminés dans une glacière à 4°C au laboratoire dans un délai qui n'a pas dépassé trois heures pour commencer les autres étapes d'analyse.

A partir des échantillons nous avons ensemencé plusieurs milieux de culture gélosés afin d'isoler le maximum des microorganismes présents sur les surfaces à analyser.



**Hammam Ben Nadji**



P1

P2

P3

P4

**Figure 04** : Les points de prélèvement au niveau de Hammam Ben Nadji.



**Hammam Kharchiche**



P5

P6

P7

P8

**Figure 05:** Les points de prélèvement au niveau de Hammam Kharchiche

### .3.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux

- **Principe**

La colimétrie est l'ensemble des méthodes permettant la recherche et le dénombrement des coliformes, qui indique une contamination fécale.

Les coliformes ont la particularité de fermenter le lactose avec dégagement de gaz. Le développement des coliformes totaux acidifie le milieu qui se traduit par un virage de l'indicateur coloré. En outre, une production de gaz apparaît dans les cloches renversées

- **Mode opératoire**

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes fécaux est réalisé selon la méthode liquide par la technique du Nombre le Plus Probable(NPP),qui est basée sur deux étapes à savoir:(**fig.06**)

- **Le test présomptif**

Le test présomptif réservé à la recherche des coliformes dans le milieu BCPL (Bouillon Lactose au Pourpre de Bromocrésol).

On a travaillé avec 3 séries de 3 tubes :

- . 3 tubes de BCPL D/C+ cloche de Durham,ensemencé avec 1 ml d'échantillon.
- . 3 tubes de BCPL S/C+ cloche de Durham,ensemencé avec 1 ml d'échantillon.
- . 3 tubes de BCPL S/C+ cloche de Durham,ensemencé avec 1 ml d'échantillon.
- . On change à chaque fois la pipette graduée (**Bourgeois et Leveau, 1980**).
- . Les tubes inoculés sont homogénéisés par agitation douce pour ne pas faire pénétrer d'air dans la cloche (Camille, 2010).
- . La lecture se fait après 48 heures d'incubation dans une étuve à 37 °C (**Labres, 2002**).
- . Tous les tubes présentant une couleur jaune et de gaz dans la cloche sont considérés comme positifs.
- . On note le nombre de tube positifs dans chaque série et on reporte à la table du NPP (Table de Mac Grady) (**Annexes 1**) le nombre de coliformes totaux dans 100 ml d'échantillon à analyser.

- **Teste confirmatif**

Le test confirmatif réservé à la recherche des coliformes thermotolérants et *d'Escherichia coli* dans le milieu Schubert ou l'eau peptone exempte d'indole (**Labres et Mouffok ,2008**).

A partir de chaque tube de BCPL positif, on ensemence avec 4 à 5 gouttes le milieu Schubert (ou l'eau peptonée exempte d'indole) muni avec la cloche de Durham. Après incubation à 44°C pendant 24 heures, les tubes ayant apparaitre un l'anneau rouge après l'ajout de réactifs Kovacs, avec production de gaz, sont considérées positifs (Indole positif) [10].

En déterminé le nombre des coliformes fécaux (coliformes thermo-tolérants) à partir de tables de NPP par CF /100 ml.

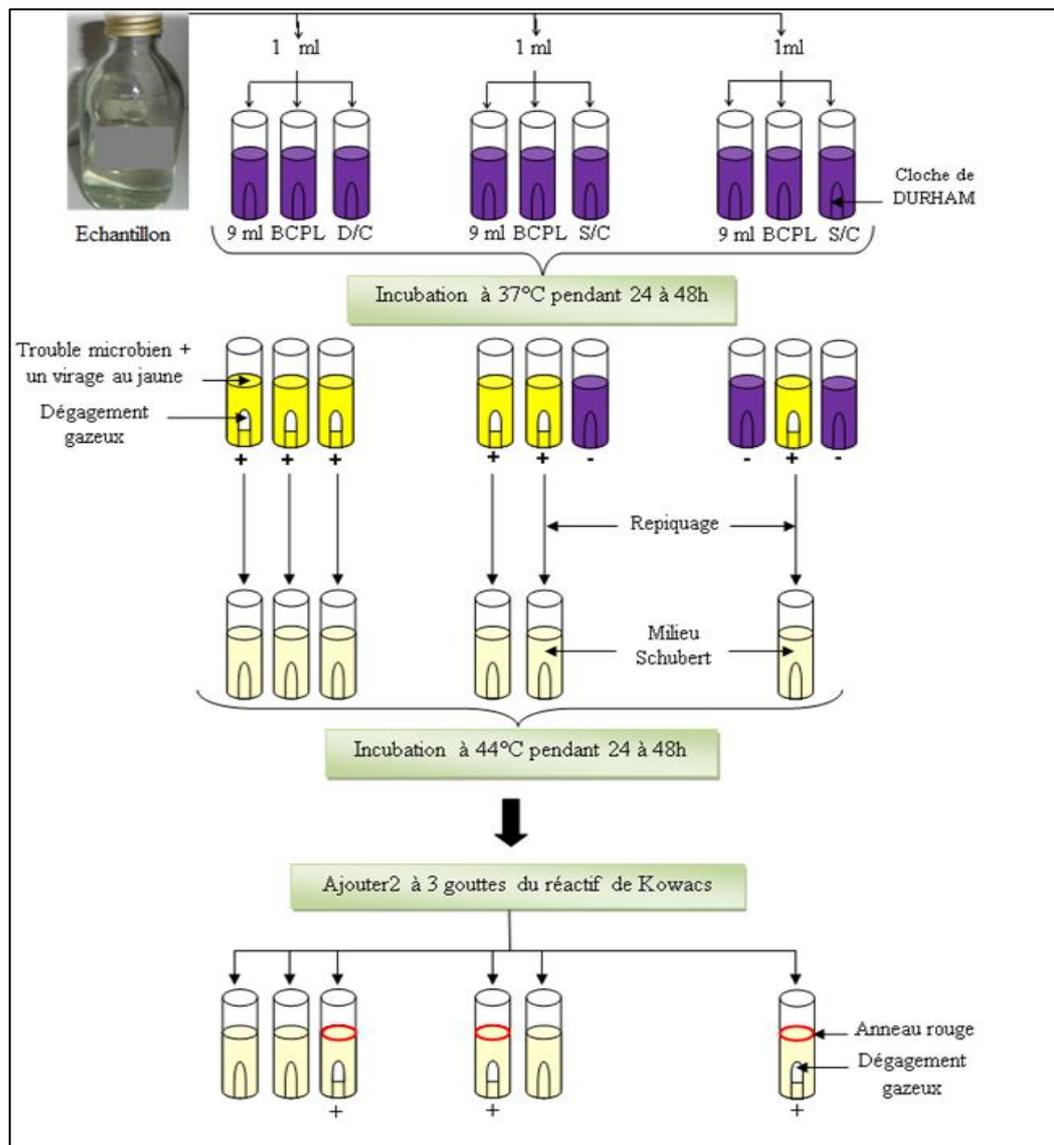


Figure 06 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux.

### 3.2. Recherche et Dénombrement des streptocoques fécaux

La recherche et dénombrement des streptocoques fécaux est réalisé par deux étapes : test de présomption sur un milieu Roth et test de confirmation sur milieu Eva-Listky(Chaouch, 2007), suivant le même procédé décrits pour les CT(fig.07).

- **Teste de présomption**

Sur milieu de Rothe : Bouillon de Rothe à simple et à double concentration

#### Ensemencer

- . 3 tubes de boillon de Rothe à double concentration avec 1 ml d'échantillon.
- . 3 tubes de boillon de Rothe à simple concentration avec 1 ml d'échantillon.
- . 3 tubes de boillon de Rothe à simple concentration avec 1 ml de chacune des dilutions.
- . Incuber à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures.

#### Lecture

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

Les tubes présentant un trouble bactérien sont considérés comme pouvant contenir des *streptocoques* du groupe « D ».

- **Teste de confirmation**

- . Première possibilité : sur milieu d'Eva Litsky ou bouillon de Litsky
- . Agiter les tubes de boillon de Rothe présentant un trouble, présumés positifs.
- . Repiquer une anse du contenu de chacun de ces tubes dans un tube de bouillon d'Eva Litsky.
- . Incuber à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures. Les tubes présentant un trouble homogène et/ou une pastille violette au fond contiennent au moins un *streptocoque* du groupe « D » (fig.07).

#### Lecture

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes (Roux, 2003).

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (Labres 2006). (Annexes1).

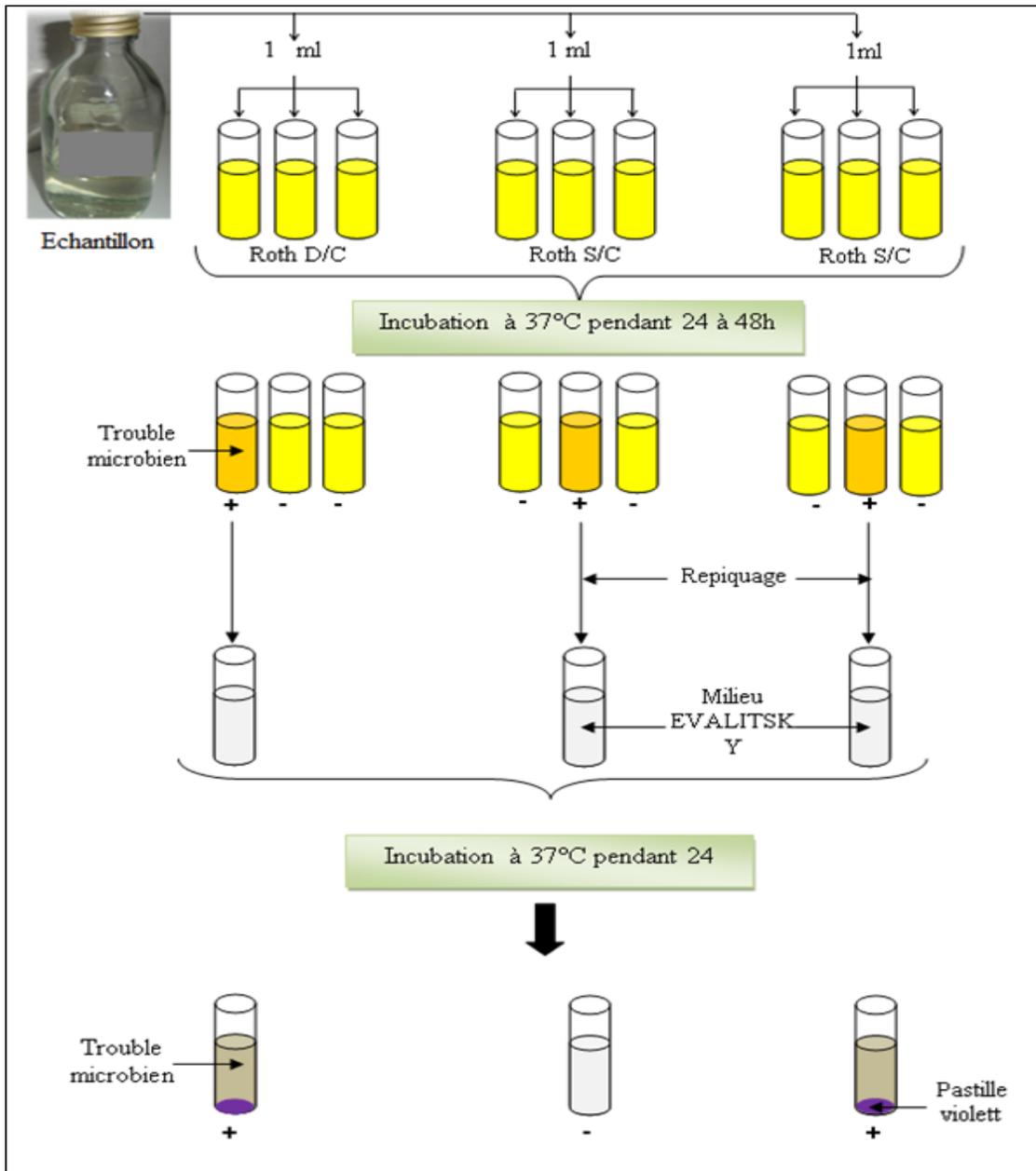


Figure07 : Recherche et dénomremet des streptocoques fécaux.

### 3.3. Dénombrement des spores des anaérobies sulfito- réducteurs (ASR)

Cette méthode est utilisée pour la recherche des microorganismes bacilles à Gram positif anaérobies stricts caractérisées par la résistance de leurs spores et par un équipement enzymatique réduise les sulfites en sulfures. Ces spores peuvent survivre dans l'eau et dans l'environnement pendant plusieurs mois. (Rodier et al.2008).

- **Mode opératoire**

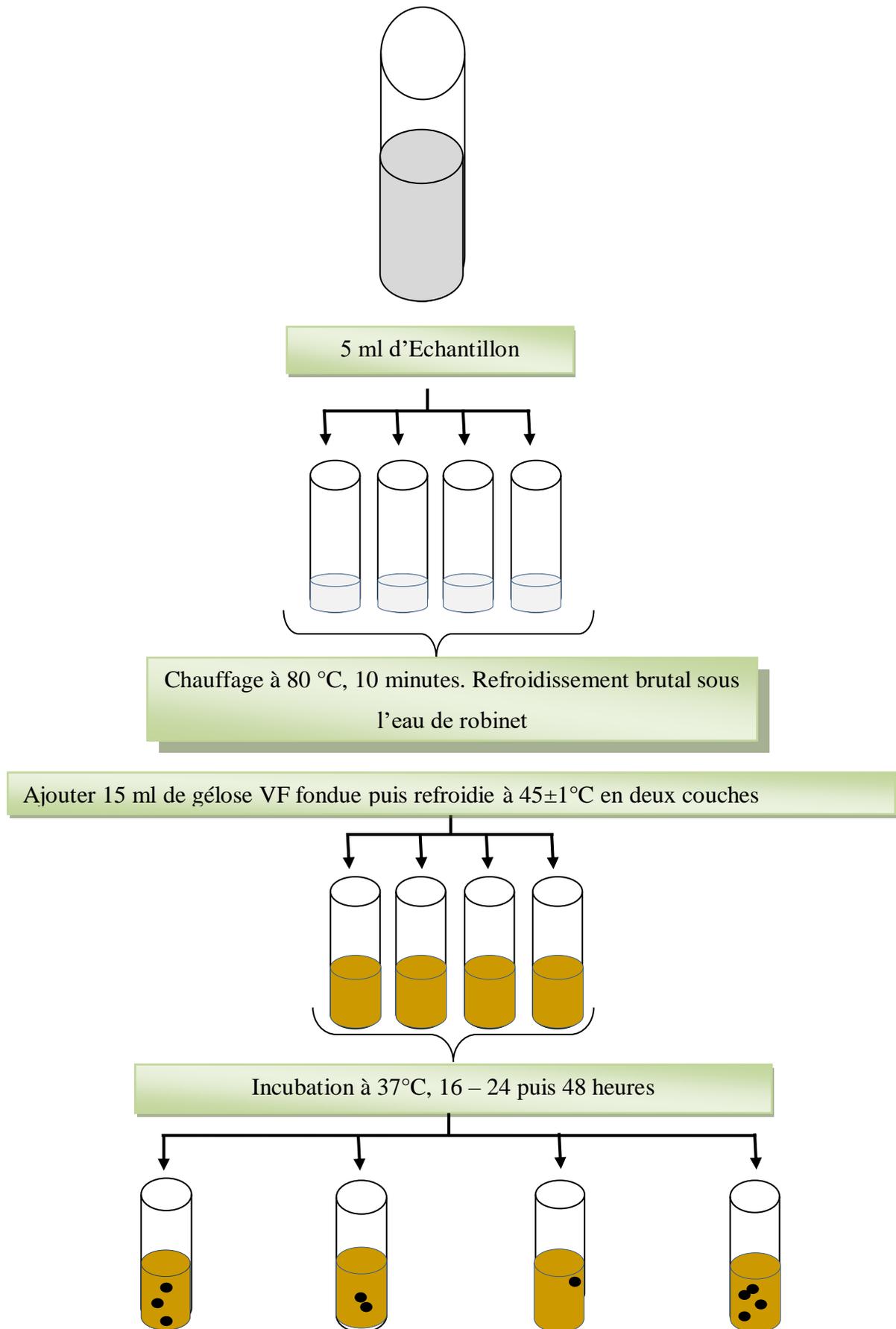
Le mode opératoire de recherche et dénombrement des spores sulfito-réducteurs est schématisé dans la **figure 08**.

A partir de l'échantillon à analyser :

- . Transférer environ 5 ml dans 4 tubes différents et stérile, qui sera par la suite soumis à un bain marin de l'ordre de 80°C pendant 10 min, dans le but de détruire toutes les formes végétatives des bactéries anaérobies sulfito-réductrices éventuellement présentes.
- . Après chauffage, refroidir immédiatement les tubes destinés à l'analyse, sous l'eau de robinet.
- . Ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie, fondue puis refroidie à 45°C, additionnée de leurs additifs spécifiques (0.5 ml d'alun de fer et 4 gouttes de sulfite de sodium).
- . Mélanger doucement le milieu et l'inoculum en évitant d'introduire des bulles d'air.
- . Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 min environ, puis incuber à 37°C pendant 24h. (**Labres et al, 2008**).

- **Résultat**

Après l'incubation on considère comme résultant d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir indique la présence des spores (**Rodier, 2009**).



**Figure 08:** Recherche et dénombrement des spores des anaérobies sulfite- réducteurs(ASR).

### 3.4. Recherche et dénombrement de la microflore aérobique mésophile totale (Germes Totaux)

Le dénombrement des germes révivifiables est utilisé comme indicateur de pollution

Le principe consiste à mettre en évidence les bactéries

- Qui se développent à 22°C favorisant ainsi les germes spécifiques de l'eau ou de l'environnement.
- Et celles qui se développent à 37°C favorisant ainsi les germes issus de l'homme et des animaux à sang chaud (**fig.09**).

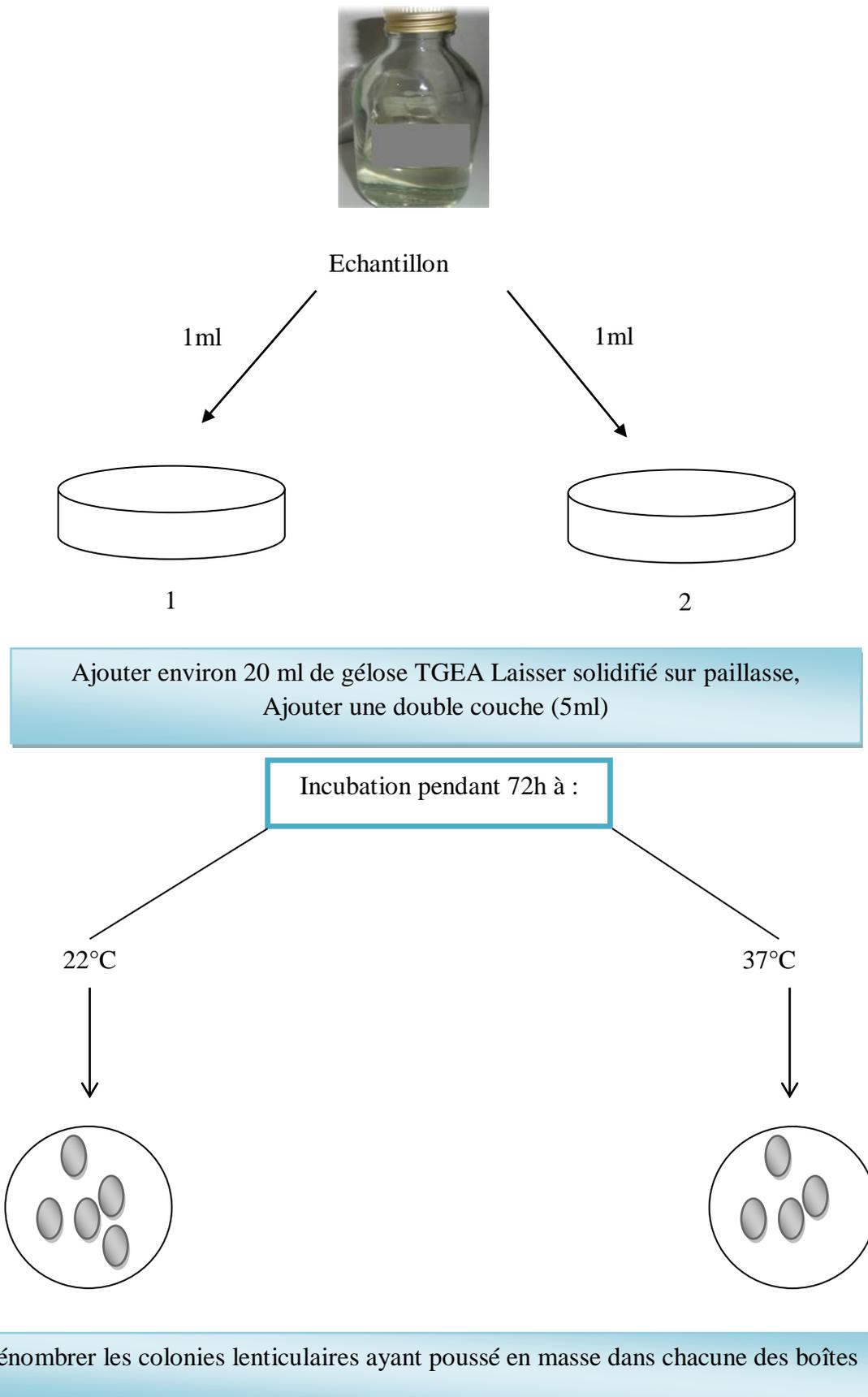
- **Mode opératoire**

A partir de l'échantillon à analyser :

- . Porter aseptiquement 1 ml en double dans deux boîtes de pétri vides, numérotées et préparées à cet usage.
- . Compléter ensuite avec environ 19 ml de gélose TGEA fondue puis refroidie à 45°C.
- . Faire ensuite de mouvement circulaire et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose, sur une surface fraîche et horizontale.
- . Les boîtes seront partagées en deux séries distinctes :
  - La première série sera incubée à 22°C pendant 72h.
  - La seconde série sera incubée à 37°C pendant 48h. (**Lebres et al ,2006**).

- **Lecture**

Les colonies de microorganismes révivifiables apparaissent en masse sous formes lenticulaires et bien distinctes. Retenir les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.



**Figure 09 :** Recherche et dénombrement de la microflore aérobie mésophile totale (germes totaux).

### 3.5. Recherche des Salmonelles

#### Principe

La méthode de recherche de cette bactérie, découle de deux données :

- D'une part leur présence en nombre relativement faible dans les douches, ainsi que leur difficulté d'y survivre.
- D'autre part, l'existence habituelle d'un nombre important de germes d'accompagnement d'origine fécale ou no fécale.

Ces constatations entraînent l'obligation d'utiliser des milieux d'enrichissement sélectifs dans le but d'inhiber le développement des autres bactéries (Rodier *et al*, 1996).

- **Mode opératoire (fig.10)**

- **Enrichissement**

Introduire 1 ml de l'échantillon dans 10 ml de SFB (D/C). Incuber à 37° pendant 24h (Ait hamlet ,1998).

- **Isolement**

À partir du bouillon d'enrichissement, effectuer des isolements sur le milieu Salmonella-Schigella(SS). Incuber à 37°C pendant 24h à 48h (Rodier *et al*, 1996).

- **Identification**

Après l'incubation les colonies qui sont lactose négatif sur milieu SS vont subir une observation macroscopique, une coloration de Gram et enfin une identification biochimique (API 20 E).

### 3.6. Recherche des Staphylocoques (*Staphylococcus aureus*)

- **Mode opératoire**

- **Isolement**

Le milieu Chapman permet l'isolement sélectif de *Staphylococcus* sur la base d'une tolérance à une forte teneur en Na Cl, et la différenciation de l'espèce *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de la dégradation de mannitol et l'élaboration fréquente d'un pigment (Marchal *et al*.1982). Ensemencer une boîte de milieu Chapman Incuber à 37°C pendant 24h.

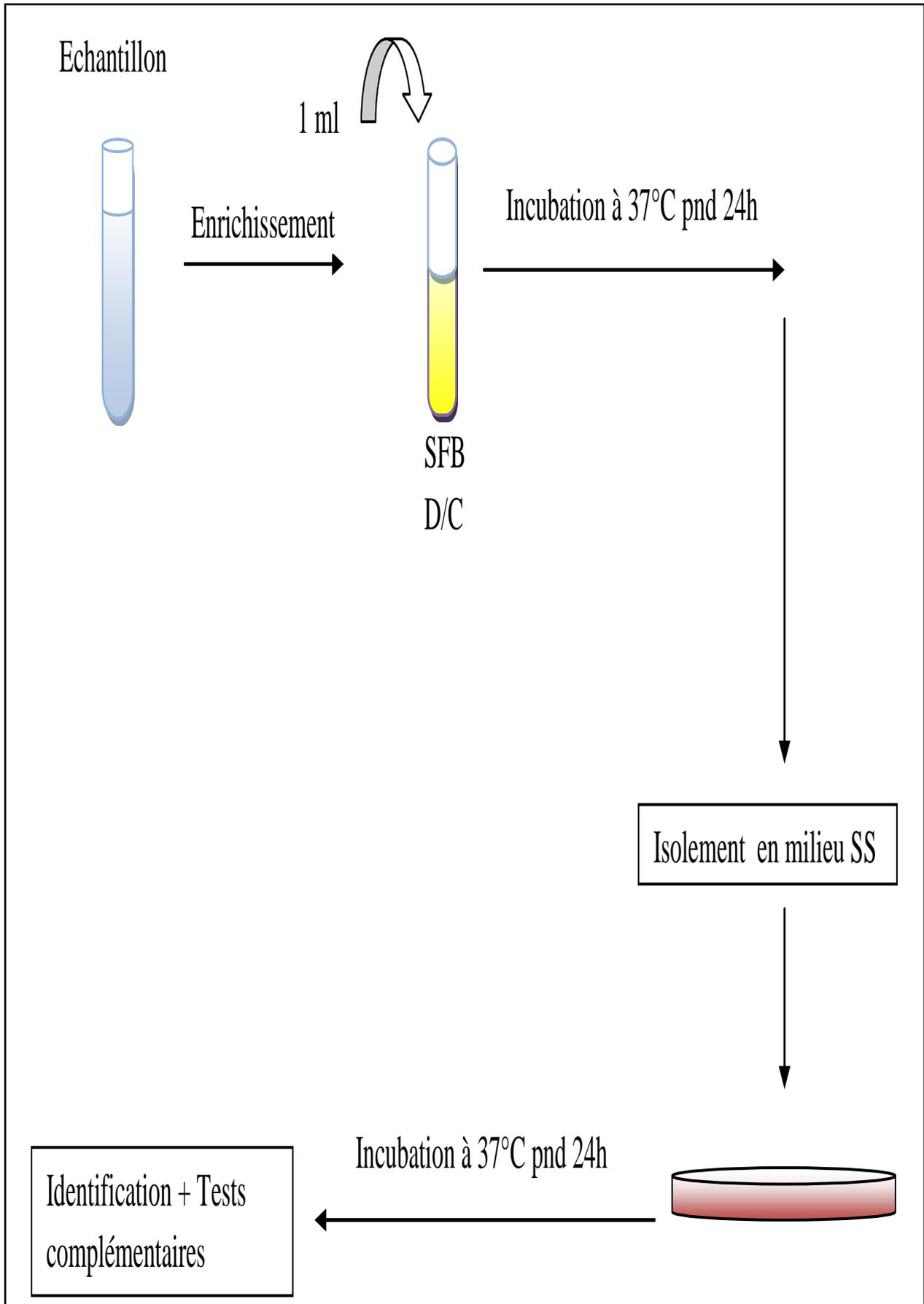


Figure 10 : Recherche des Salmonelles.

### 3.7. Recherche des *Pseudomonas*

- **Mode opératoire**

A l'aide d'une anse de platine en semence la surface d'un milieu de culture king A ensuite un milieu de culture king B et on incube les milieux à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

Deux examens microscopiques sont effectués : l'examen direct entre lame et lamelle (il permet d'observer la mobilité des germes) et la coloration de Gram.

- a. **Recherche de la pyocyanine** : pigment bleu caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue des milieux de culture : sa production est favorisée sur milieu de king A.
- b. **Recherche de la pyoverdine** : présente une teinte vert fluorescent (*P. fluorescent*) est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de king B.

### 4. Identification et tests complémentaires

#### 4.1. Les examens microscopiques

➤ **Coloration de Gram**

Cette technique traditionnelle a pour but de déterminer l'aspect microscopique de la bactérie et la nature de sa paroi (Gram+ et Gram-), on peut observer la disposition des germes et leur morphologie (cocci, bacille, coccobacille).

- **Préparation d'un frottis** A partir de la culture à étudier préparer un frottis.
  - . Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile.
  - . Prélever à l'aide de l'anse de platine une colonie bactérienne.
  - . Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.
  - . Réaliser le frottis en partant du centre de la lame en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires se façon à obtenir un étalement.
  - . Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec bunsen.
- **La coloration**
  - . Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laissé agir pendant 1 min, rincer à l'eau.
  - . Ajouter le lugol et laisser agir pendant 1min.
  - . Rincer à l'eau courante.
  - . Laver à l'eau puis à l'alcool à 95° ; rincer à l'eau.

- . Recolorer avec la fuchsine, laissé agir pendant 30 secondes.
- . Rincer à l'eau courante égouttée puis sécher au-dessus de la flamme de bec bunsen.
- . Observer au microscope à immersion après avoir déposé une goutte de l'huile de cèdre au centre de la lame(x100) (**Guillaume, 2004**).

➤ **Examen direct à l'état frais**

Le but d'examen : permet de connaître la forme, la taille, la mobilité et l'abondance des bactéries ainsi que leur mode de groupement.

• **La méthode**

- . Déposer aseptiquement sur une lame porte-objet (propre) une goutte d'eau physiologique.
- . Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une colonie à partir du milieu gélosé, l'émulsionner dans la goutte, puis recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.
- . Lecture : faire l'observation microscopique à l'objectif (x40) (**Guillaume, 2004**).

## 4.2. Études des caractères biochimiques

### 4.2.1. La galerie biochimique classique

Nous avons utilisé la galerie biochimique présentée dans le tableau 05 :

**Tableau 06:** La galerie biochimique classique utilisée.

Milieu	L'ensemencement	Caractères recherches	Résultat attendu
<b>TSI (tri-sugar_iron)</b>	-Ensemencer abondamment la surface par des stries serrées, puis le culot par simple piquêre. -Mettre à l'étuve 24h à 37°C.	-Utilisation du glucose. -Utilisation du saccharose. -Utilisation du lactose. -Production H <sub>2</sub> S. -Production du gaz. <b>(Jesene,1998).</b>	-Virage de la couleur vers le jaune : glucose, lactose et saccharose positif (+). -Formation de tache noire. (H <sub>2</sub> S+) -Bulles de gaz dans le culot, parfois même une surélévation de la gélose : Gaz (+).

Tableau 07 : Suite

<b>Citrate de Simmons</b>	-L'ensemencement de la pente se fait par une strie longitudinale, au fil droit, à partir d'une suspension bactérienne. -- Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux. Incuber pendant 24 heures voire 3à4 jours, à 37°C. <b>(Singleton, 1999).</b>	-Utilisation du citrate comme unique source de carbone est une utilisation aérobie et se traduira par une alcalinisation du milieu.	- Virage de l'indicateur de pH au bleu.
<b>Mannitol mobilité</b>	-Ensemencer par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. -Incuber pendant 24h à température optimal. <b>(Singleton, 1999).</b>	-mannitol  -mobilité. [11]	<b>-Caractère mannitol :</b> Apparition de couleur jaune. <b>-La mobilité :</b> les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle ; (formation d'un voile autour de la piqure). <b>(Singleton, 1999).</b>
<b>Urée indole</b>	-Ensemencer largement, Incuber 24h à 37°C. Test d'indole - Après incubation on ajoute à la culture le réactif à l'indole de Kowacks.	-l'urée, enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation. -Formation d'indole : la tryptophanase, après addition du réactif de Kowacks. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kowacks réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge. <b>(Prescott, 1999).</b>	<b>-Apparition de</b> couleur rose : Uréase (+). <b>-Test positif :</b> Apparition d'un anneau rouge à la surface : indole (+). <b>(Prescott, 1999).</b>

#### 4.2.2. Les enzymes respiratoires

##### ▪ Test catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène libre qui se dégage sous forme gazeuse selon la réaction suivante :

$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (Dryden, 1994). Le tableau suivant (Tab.6) explique le test de catalase :

**Tableau 08** : Les caractères du test catalase.

Technique	Caractères recherchés	Résultats
<p>Sur une lame propre et sèche déposer une goutte oxygénée à 10 volumes.</p> <p>-A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum.</p> <p>-Observer immédiatement (Joffin et Leryol, 2001).</p>	<p>La catalase : Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram+ (Délarras, 2008).</p>	<p>Apparition de bulles.</p> <p>-dégagement gazeuse de dioxygène : catalase positive (+)</p> <p>-Pas de bulles : catalase négative (-).</p>

##### ▪ Test Oxydase

L'oxydase : enzyme intervenant dans divers couples d'oxydo-réduction. La recherche de la phénylène-diamine-oxydase qui agissant sur un substrat incolore, entraîne la formation d'une semiquinone rouge. Cette dernière très instable, s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre.

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram (-) et permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthylparaphénylène diamine suivant (Harold, 1992).

**Tableau 09** : Les caractères du test d'oxydase.

Technique	Caractères recherchés	Résultats
Sur une lame propre et stérile dépose un disque d'oxydase ensuite prépare une suspension bactérienne à partir de la colonie voulue et déposer une goutte de la suspension sur le disque.	La phénylène diamine oxydase	Si la colonie prend une teinte rose, violette. Le germe possède une oxydase : le test est positif. Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase : le test est négatif ( <b>Lesene, 1998</b> ).

➤ **Recherche de la Béta-galactosidase (ONPG)**

La recherche de B-galactosidase ou test ONPG (Ortho-nitro phényle B-D galactosidase) permet de détecter l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose positive, des bactéries lactose négatives. Ce test est pratiqué uniquement pour toute bactérie lactose(-), en 24 h sur milieu solide.

Le tableau 08 explique le test de l'ONPG :

**Tableau10** : Les caractères du test Béta-galactosidase.

Techniques	Caractères recherchés	Résultats
-On utilise l'ONPG ou -Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside -A partir : de Milieu lactosée -Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. -Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG. -Incuber 30 min à 37°C. la majorité des réactions positives sont observées entre 15 et 30 mn.	-Une $\beta$ -galactoside-perméase membranaire. -Une $\beta$ -galactosidase.	-Milieu jaune : ONPG positif(+) -Milieu sans couleur: ONPGnégatif(-).[12]

### 4.2.3. Etude des caractères biochimiques par les galeries miniaturisées

#### ❖ La galerie API 20E

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés. Ainsi qu'une base de données (Murray *et al.*1999).

#### • Principe

La galerie API 20 E (fig. 11) comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produit pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Moustardier, 1972).



Figure 11 : Galerie API 20E.

#### • Mode opératoire

- . L'opération s'effectuée selon les étapes suivantes
- . Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- . Remplir tubes et cupules des tests : |CIT |, |VP |, |GEL|, avec la suspension bactérienne.
- . Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- . Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- . Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures (Murray et Baron *et al.*1999).

#### • Lecture

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positif : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kowacks. Un anneau rouge obtenu en 2minutes indique une réaction positive.
- La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E (**Castillo et Bruckner, 1984**).

#### ❖ La galerie API Staph

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée en API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est réalisée

-A l'aide du Catalogue Analytique : Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

-A l'aide du logiciel d'identification : Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres. [13]

## 5. Origine de la pollution fécale

Les coliformes fécaux sont très sensibles à l'environnement, Les streptocoques fécaux (Entérocoques D) : plutôt d'origine animale, Coques à Gram positif, plus résistants qu'*E.coli*. Peuvent également être utilisés comme indicateurs d'efficacité de traitement et donc de pollution ancienne.

L'origine de la pollution fécale est reliée au rapport quantitatif des coliformes fécaux sur les streptocoques fécaux (CF/SF). Lorsque ce rapport CF/SF est supérieur à 4, la pollution est essentiellement humaine (rejet des eaux usées) (**Borrego et Romero, 1982**).

Lorsqu'il est inférieur à 0.7, l'origine est animale, notamment le bétail et en particulier les moutons, semble jouer un rôle prédominant dans la contamination de l'eau (**Geldreich, 1976**).

Donc la détermination pratique de l'origine de la pollution fécale est indiquée par le rapport CF/SF :

- Si le rapport CF/SF est inférieur ou égal à 0,7 ( $CF/SF \leq 0,7$ ), la contamination est principalement ou entièrement d'origine animale, la source probable est les déchets de bétail ou de basse-cour.
- Si le rapport CF/SF est compris entre 0,7 et 1 ( $0,7 < CF/SF < 1$ ), la contamination est mixte à prédominance animale.
- Si le rapport CF/SF est compris entre 1 et 2 ( $1 < CF/SF < 2$ ), origine incertaine de contamination.
- Si le rapport CF/SF est compris entre 2 et 4 ( $2 < CF/SF < 4$ ), la contamination est mixte à prédominance humaine.
- Si le rapport CF/SF est supérieur ou égal à 4 ( $CF/SF \geq 4$ ), la contamination est exclusivement humaine, la source probable de contamination est les déchets humains  
**(Borrego et Romero, 1982)**

# *Résultats et discussion*

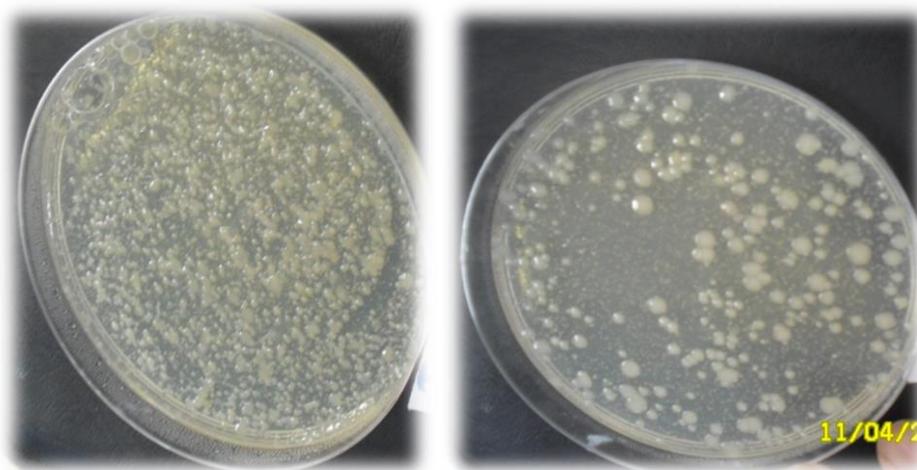
## Résultats et discussion

### 1. Résultats de la recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables

La présence d'humidité et la variation de la température entre période de douche et l'eau stagnant et /ou accumulé dans la chambre permis la croissance des différents germes. Nous constatons un nombre de microorganismes sur le milieu TGEA (fig.12) qui dépassent généralement les 300 UFC/ml et cela à 22°C et 37°C (Tab.10).

**Tableau 11** : Evaluation du nombre de la flore mésophile totale dans les sites de prélèvements.

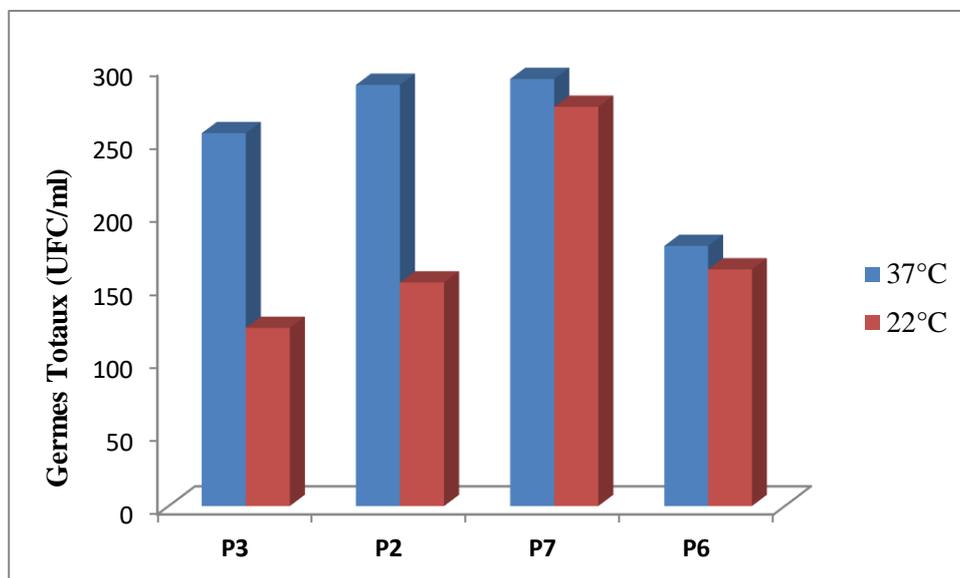
Température	Les points analysés	Nombre de germes totaux	
		Chambre 01	Chambre 02
22°C	Porte	Indénombrable	Indénombrable
	Mur	Indénombrable	Indénombrable
	Sol	122	162
	Robinet	153	178
37°C	Porte	Indénombrable	Indénombrable
	Mur	Indénombrable	Indénombrable
	Sol	255	273
	Robinet	288	292



**Figure 12** : Photo présentant les résultats d'isolement sur le milieu TGEA

Selon le tableau 9, les portes et les murs des deux Hammams ont un nombre indénombrable, c'est-à-dire qu'ils contiennent le plus grand nombre de germes totaux. Suivi par des robinets où le nombre total de germes totaux varie de 288 à 292 UFC/ml pour les

germes revivifiables à 37° C, et entre 153 et 178 pour les germes revivifiables à 22° C. Comme un plus bas niveau de germes, nous trouvons le plancher (Sol) de la salle de bain, où le nombre varie de 255 à 273 UFC/ml pour les germes revivifiables à 37° C et de 122 à 162 UFC/ml pour les germes revivifiables à 22° C. (fig. 13)



**Figure 13 :** Variations du nombre des germes revivifiables à 22 et à 37 °C dans les deux Hammams

On peut dire que le nombre élevé de germes dans les portes et les murs était dû au fait qu'ils n'étaient pas bien nettoyés, et le contact fréquent de portes par les utilisateurs. Et la raison du faible nombre de ces bactéries dans les planchers et les robinets est due au nettoyage des planchers après chaque utilisation et les robinets ne sont pas exposés à beaucoup de contact.

Nous notons également que le taux de germes revivifiables à 37° C est supérieure au taux de revivifiables à 22° C, ce qui indique que ces bactéries proviennent de l'Homme, et que le plus grand nombre de germes est enregistré au niveau du Hammam Kharchiche.

## **2. Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes**

### **2.1. Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes totaux**

La figure 13 montre que le nombre des coliformes totaux varie un minimum de 200 CT/100ml enregistré dans le robinet de bain de Kharchiche et un maximum de 1400 CT/100ml enregistré au niveau des portes et des murs des deux Hammams.

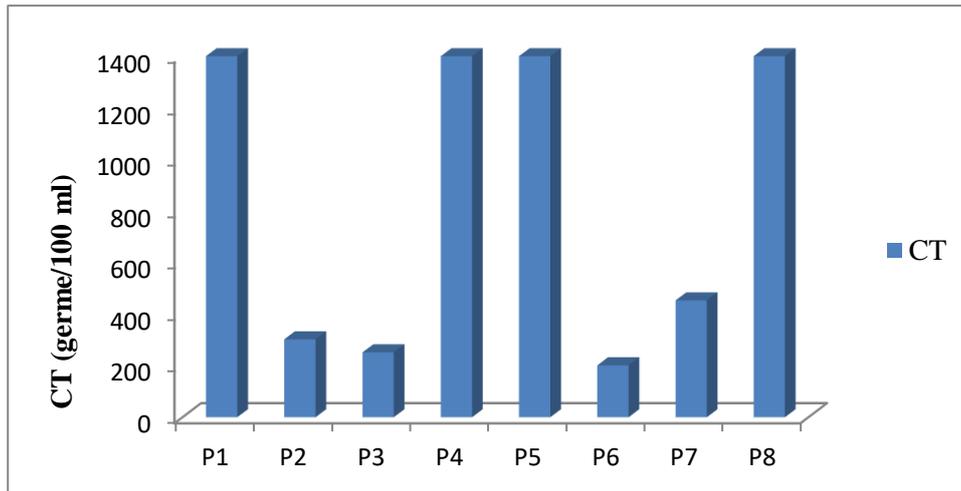


Figure 14 : Variations du nombre des coliformes totaux dans les points du prélèvement



Figure 15: Photo présentant les résultats du test de présomption des CT.

### 2.2.Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les résultats des coliformes fécaux montrent que son nombre est varié de 15 à 150 CF/100ml, le nombre le plus élevé pour ses germes est enregistré au niveau de robinet et le sol de hammam Ben Nadji. (fig.16).

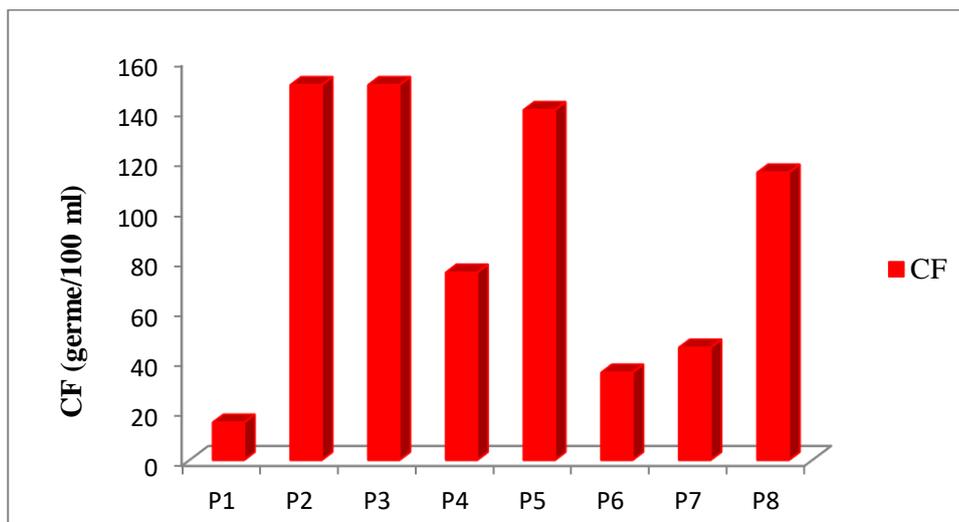
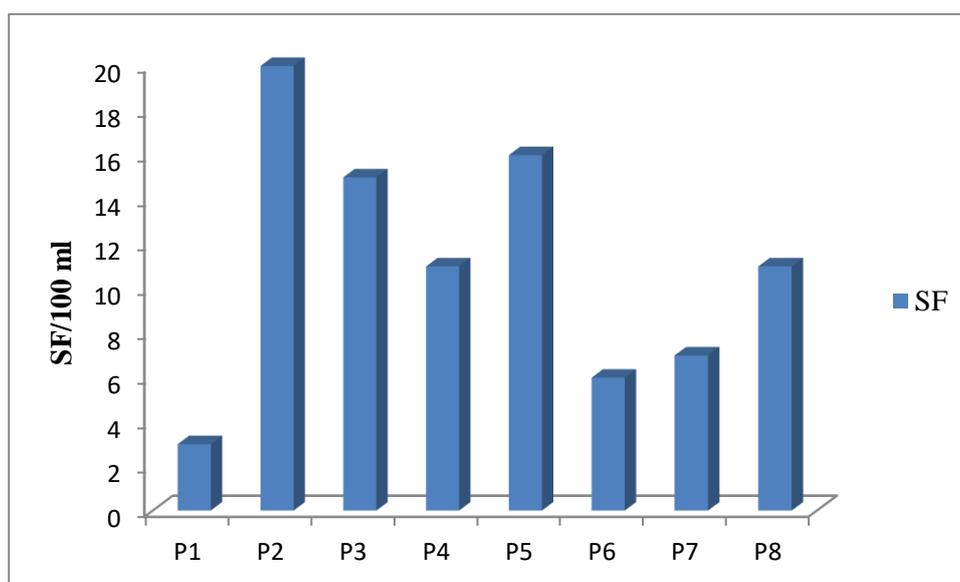


Figure 16: Variations du nombre des coliformes fécaux dans les points du prélèvement

### 3. Résultats de recherche des Streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont des excellents indicateurs de contamination récentes par la matière fécale des animaux (Rodier *et al.*, 2009). Le graphe dans la Figure 18 nous a montré que le nombre des germes appartenant à ce groupe bactérien varie entre 3 et 20 SF/100 ml.

La valeur minimale a été notée dans la porte du hammam Ben Nadji, et la valeur maximale a été enregistrée au niveau de robinet du même hammam.



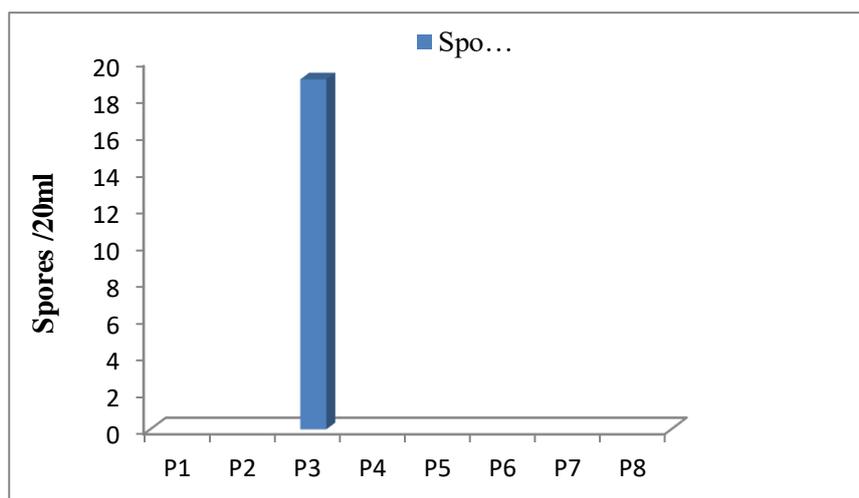
**Figure 18 :** Variations du nombre des Streptocoques fécaux dans les points du prélèvement

Les fortes concentrations en Streptocoques fécaux sont enregistrées au hammam Ben Nadji.

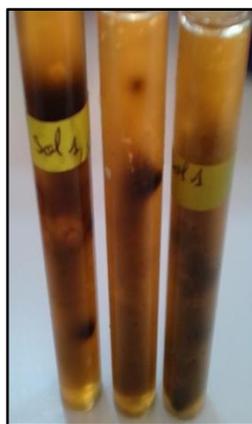
### 4. Résultats de recherche et dénombrement des spores des anaérobies-sulfite-réducteurs (ASR)

La détermination des spores des bactéries anaérobies sulfite réducteurs est un indice de pollution ancienne à cause de la résistance de leurs spores contrairement aux formes végétatives.

Les résultats (fig.19), montrent l'absence totale des spores anaérobies sulfites réductrices dans tous les points du prélèvement sauf ce qui enregistré dans le sol du hammam Ben Nadji par 19 spores/20ml. Cette présence (fig. 19) est due probablement à la contamination les spores telluriques apportées par les chaussures des utilisateurs.



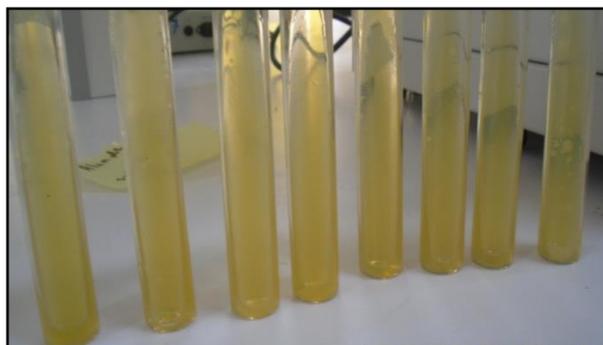
**Figure 19 :** Variations du nombre des spores des anaérobies-sulfite-réducteurs (ASR) dans les points de prélèvement



**Figure:20** Photo présentant les résultats de recherche des ASR.

### 5. Résultat de recherche des *pseudomonas*

Notre résultat de recherche des *pseudomonas* (recherche des pigments spécifiques des deux espèces *P. aeruginosa* et *P. fluorescent*) a été négatif (fig. 19), c'est-à-dire l'absence d'apparition virage de couleur dans les tubes d'isolement qui indique la présence de ces espèces.

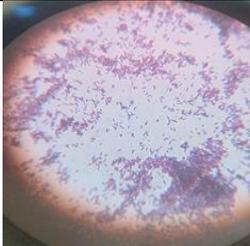
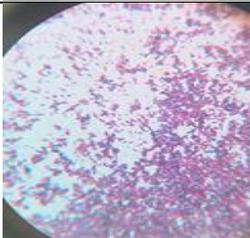
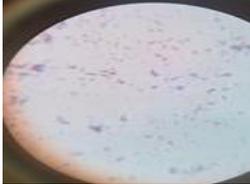
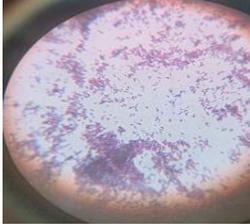


**Figure 21:** Photo présentant les résultats d'isolement des *pseudomonas* à partir des milieux King A et King B

### 6. Résultat de recherche des Staphylocoques

Résultats des bactéries isolées dans le milieu Chapman est représenté dans le tableau 11, qui montre la présence de l'espèce *Staphylococcus aureus* et d'autres espèces du genre Staphylocoques au niveau des robinets, murs et les sols des deux hammams.

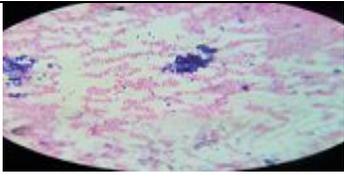
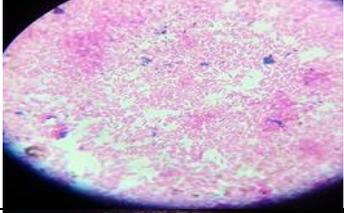
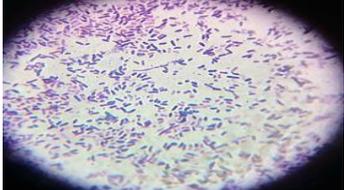
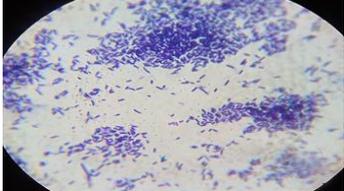
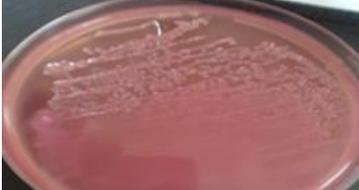
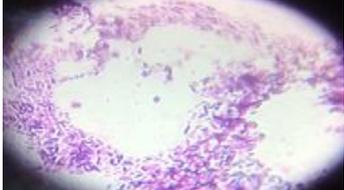
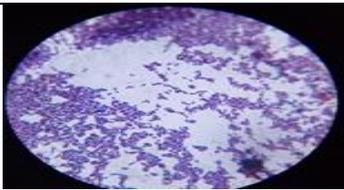
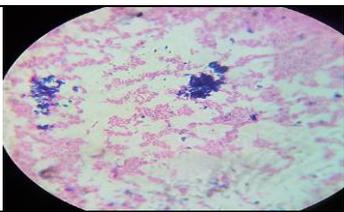
**Tableau 12 :** Résultats d'isolement sur le milieu Chapman

	Forme des colonies	Résultats	Coloration de Gram	résultats	Teste catalase	Mannitol mobilité
Mure	Colonie très petites jaunes bombées lisses.		Bacille Gram+		Négatif(-)	Positif (+)
sol	Des colonies jaunes, bombées.		Cocci Gram +		Positif(+)	Positif (+)
port	Des Colonies bombées, jaunes, blanchâtres.		Cocci Gram+		Positif(+)	Positif (+)
robinet	Petites colonie jaune et des colonies moyennes blanchâtres.		Bacille Gram+		Négatif(-)	Positif (+)

### 7. Résultat de recherche des Salmonelles

Après l'isolement des bactéries sur le milieu SS et les tests complémentaires, les résultats sont montrés dans le tableau 12, qui montre la présence des espèces du genre *Salmonella* dans le mur de hammam Ben Nadji et également au niveau de la porte et le robinet du hammam Kharchiche.

Tableau 13: Résultats d'isolement sur le milieu SS

	Forme de des colonies		Coloration de Gram	
Porte 1	Des colonies très petites, rouge bombée		Cocci en chaine Gram -	
Mur 1	Des colonies, petite, moyenne, rondes roses.		bacilles Gram -	
SOL 1	Des Colonies jaunes et violet		Bacille Gram+	
Robinet 1	Des Colonies rondes colorées en rose		Bacille Gram+	
Porte 2	Des colonies moyennes,		Bacille Gram-	
Mur 2	Des colonies bombées, petites, circulaire.		Bacille Gram+	
Sol 2	Des colonies petites jaune et rose		Bacille Gram+	
Robinet 2	Des colonies petite et moyenne colorée en rose		Bacille Gram-	

## 8. Origine de la pollution fécale

Le tableau 11 montre que le rapport CF/SF est toujours supérieur à 4, indiquant que la source de cette pollution est principalement humaine.

**Tableau 14 :** Rapport CF/SF des sites du prélèvement.

Points du prélèvement	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
CF/SF	5	7,5	10	6,81	8,75	5,83	6,42	10,45

# *Conclusion*

### Conclusion

Le risque de contamination des eaux, du corps humain et des locaux par des microorganismes d'origine fécale existe depuis très longtemps, dès que l'eau a été utilisée comme un facteur d'hygiène et d'élimination des déchets. Les problèmes d'hygiène et de santé publique liés à la contamination bactérienne sont devenus de plus en plus critiques et constituent un problème environnemental croissant.

Notre travail consiste à déterminer la qualité bactériologique des hammams Ben Nadji et Kharchiche par l'isolement des microorganismes indicateurs de contamination fécale à partir de plusieurs endroits dans les chambres de bain.

Du point de vue bactériologique, les analyses ont porté principalement sur la recherche et la quantification des bactéries indicatrices de contamination fécale, à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les spores des bactéries anaérobies sulfite-réducteurs. Les résultats obtenus nous permettent de conclure qu'il y a une contamination fécale récente dans les deux hammams par la présence des coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, et une faible contamination fécale ancienne au niveau du sol du hammam Ben Nadji.

Nous notons également que le taux de germes revivifiables à 37° C est supérieur au taux de revivifiables à 22° C, ce qui indique que ces bactéries proviennent de l'Homme, et que le plus grand nombre de germes est enregistré au niveau du Hammam Kharchiche.

Par ailleurs, les tests d'identification des souches bactériennes isolées ont permis d'identifier *E. coli* et *Staphylococcus aureus* et des espèces rapprochées aux genres *Salmonella*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. Le rapport (CF/SF) indique que cette pollution est généralement d'origine humaine.

Pour résoudre le problème de la pollution fécale au niveau de ces endroits il faut :

- Il faut contrôler et assurer la propreté de ces endroits d'une manière continue et annuelle
- Les détergents et les antiseptiques doivent être bien utilisés et continuellement après chaque utilisation individuelle des salles de bains.
- Des précautions doivent être prises lors de l'utilisation des hammams publics.

## Références bibliographiques

**-Ait Hamlet S. (1998).** contribution à l'étude de la qualité de huiles oueds de la Wilaya d'el teref ; aspect microbiologique et écologique. mémoire de magister en microbiologie appliquée, Université de Annaba, 150p.

**-AVRIL J. L., DABERNAT H., DENIS F. et MONTEIL H.** Bactériologie clinique. Edition Marketing, collection Ellipses, Paris, 1988, pp. (271-282).

**-BEKKOUCHE Mohamed Faouzi. (2016).** Caractéristiques Hydrochimiques des Sources thermales de l'extrême nord-est algérien, THESE de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba.

**-Ben Moussa A., Chahlaoui A., Rour E.H., Chahboune M., Aboukacem A., Larhyss J.** 11 (2012) 17-36.

**-Boughalali M. (2003).** "Thermalisme et thalassothérapie en Algérie", communication, Revue la Presse thermique et climatique 2003, pp 140,165. Société française d'hydrologie et de climatologie médicale, 2003.

**-Bricha S., Ounene Oulkheir S., El Haloui N. et Attarassi B. (2007).** Etude de la qualité physicochimique et bactériologique de la nappe phréatique M'nasra (Maroc), Afrique Sciences. (3) .391-404.

**-Camille D. (2010).** Surveillance Sanitaire et Microbiologique Des Eaux. 2eme Edition/2012 2004 2005P.).

**-Chaouch R. (2007).** Identification et quantification des déchets solides encombrant les plages d'Annaba: aspect physico-chimique et bactériologique des eaux. Mémoire de Magister. Université Badji-Mokhtar Annaba. 105p).

**-Characklis W G. (1990).** 2. Characklis W.G. (1990). Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. Dans « Biofilms » (Characklis WG, Marshall KC eds), John Wiley and Sons, New York, ISBN: 0471826634, p. 3-15.

**-CHIGBU P., SOBOLEV D. (2007).** Bacteriological Analysis of Water; Handbook of water analysis, 2nd edition, 769p.

- Clutterbuck A. L., E. J., Woods. (2007).** "Biofilms and their relevance to veterinary medicine." *Vet Microbiol* 121(1-2): 1-17.
- Costerton J. W. (2001).** "Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in Persistent infection." *Trends Microbiol* 9(2): 50-52.
- Costerton J. W. (1999).** "Introduction to biofilm." *Int J Antimicrob Agents* 11(3-4): 217-221; discussion 237-219.
- Dryden M. S. (1994).** key Worth N,Stein K :asymptomatic food handier as the source of nosocomial salmonellosis .J.Hosop .Infect ;page :195,208.
- El Haissoufi H., Berrada S., Merzouki M., Abbouch M., Bennani L., Benlemlih M., Idir M., Zanibou A., Bennis Y., El OualiLalami A.** *Rev. Microbiol. Ind. San. Environ.* 5(2011):37-68.
- Gauthier F. (2002).**Biofilms et qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution,Mémoire de DESS en Qualité et Gestion de l'Eau, Université de Picardie.
- Guillaume P. Y. (2004).** Les milieux de cultures.
- Guiraud J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod .615P.
- Hakam O. K., Choukri A., Reyss L. L., Lferde M. (2000).** *Rev. Sci. Eau.* 13 185-192.
- Harould C. N. (1992).** The crisis in antibiotic resistance. *Science*, page : 257 ,1064 ,1073.
- HARDALO C. et EDBERG S.C.** *Pseudomonas aeruginosa : Assessment of risk from drinking water. (Review). Critical Reviews in Microbiology, 1997, 23(1), pp. 47-75.*
- Hassoune E., El Kettani S., Koulali Y., Bouzidi A.** *Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.* 4 (2010) .1-21.
- Institut Pasteur Production.** Edition : Avril 1981.Milieux et réactifs de laboratoire pasteur.
- Jacques N. (2008).** Prévention et lutte contre des *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux d'eau sanitaire à l'Assistance Publique-Hôpitaux de paris société Isugua CONCEPT 1;page : 29.

- Joffin J.N.** Microbiologie technique, dictionnaire des techniques.
- Joffin J.N. et Leyrol G. (2001).** Microbiologie Technique 1 : dictionnaire des techniques. 3<sup>ième</sup> éditions ; CRDP d'Aquitaine ; page : 230. des aliments. Paris: T 1, Tec et doc Lavoisier.
- Labres E. (2002).** Cours national d'hygiène et des microbiologies des aliments Microbiologie des eaux des boissons et des produits de la mer». Institut Pasteur d'Algérie.34p.).
- Labres E. (2006).** Manuel des travaux pratique: Analyse des eaux, institut Pasteur d'Algérie.60p.).
- Labres E., Aziz D.et Boudjellab B.(2006).** Cours d'hygiène et de Microbiologie des Eaux : Microbiologie des eaux et des boissons, Institut Pasteur d'Algérie.
- Labres E. et Mouffok F. (2008).**le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algerie.53p.
- Leclerc H. (1996).** Eaux de consommation, Microbiologie alimentaire; aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité.
- Lehtola M.J., Laxander M., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T.et Martikainen P.J. (2006).**The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. Water Res. Jun; 40(11): 2151-60. Epub 2006 May 24.
- Lesene J. (1998).**Hygiène publique, microbiologie et gestion de l'eau, école nationale de la santé publique, Rennes, France, page 7.
- Lewis K. (2008).** "Multidrug tolerance of biofilms and persister cells." Curr Top Microbiol Immunol 322: 107-131.
- Marchal N., Bourdon J.I. et Richard C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Biologie appliquée. Editions Douin, Paris pp 50-364.



- [3]:[http://www.wikipediia.org/wiki/douche#pratique\\_de\\_la\\_douche](http://www.wikipediia.org/wiki/douche#pratique_de_la_douche) (Date de consultation : 12/4/2018).
- [4]:<http://www.atlantico.fr/decryptage/dangers-pomme-et-autres-risques-meconnus-douches-mal-entretenees-bacteries-jean-michel-klein-1684473.html> (date de consultation : 9/5/2018).
- [5]:<http://www.perroquet-perroquets.com/chauffe-eau.php>.(Date de consultation : 10/5/2018).
- [6]:[file:///C:/Users/h/Desktop/sara%20x/thermal/Que%20risqueon%20avec%20les%20mois%20issures%20\\_%20\\_%20E-Sant%C3%A9.html](file:///C:/Users/h/Desktop/sara%20x/thermal/Que%20risqueon%20avec%20les%20mois%20issures%20_%20_%20E-Sant%C3%A9.html)(Date de consultation : 10/5/218).
- [7]:<file:///C:/Users/h/Desktop/sara%20x/flachh/sara/legionellose/Les%20serviettes%20de%20bains%20sont%20de%20vrais%20nids%20%C3%A0%20bact%C3%A9ries.htm>.(Date de consultation : 1/5/2018).
- [8]:<http://www.manuelagherghel.com/2009/11/11/danger-invisibles-les-bacteries-autour-de-nous> (date de consultation : 9/5/2018).
- [9]:[http://thesesups.ups-tlse.fr/1056/1/Pecastaings\\_Sophie.pdf](http://thesesups.ups-tlse.fr/1056/1/Pecastaings_Sophie.pdf).(Date de consultation : 9/4/2018).
- [10]:<file:///C:/Users/h/Desktop/,mimo%2023%20mai/debagh/DESCRIP%20REFEREN/Memoire%20Online>
- [11]:<http://www.microbe-edu.org/glossaire/detail.cfm?cle=235> (Date de consultation 12/04/2018).
- [12]:[http://www.2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www.2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm)(date de consultation 12/04/2018).
- [13] : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.3.html>(date de consultation : 15/4/2018).
- [14] :[https://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus#Pouvoir\\_pathog%C3%A8ne](https://fr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus#Pouvoir_pathog%C3%A8ne)  
(Date de consultation : 10/5/2018).

[15] : <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA700STA10.pdf> (date de consultation : 29/4/2018).

[16] : [http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/legionellose\\_fiche\\_1\\_hcsp-2.pdf](http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/legionellose_fiche_1_hcsp-2.pdf).(date de consultation : 14/5/2018)

[17] :

<http://extranet.santemonteregie.qc.ca/depot/document/3322/Guideinterventionscolaire-maj-082012.pdf>. (Date de consultation: 20/5/2018).

[18] : <http://fr.wikihow.com/nettoyer-une-cabine-de-douche>. (Date de consultation: 1/3/2018).

## Résumé

**H**ammam Debagh- wilaya de Guelma un des lieux destinés au traitement par de nombreuses personnes de différents villes pour les caractéristiques de l'eau minérales chaudes et thérapeutiques, mais parfois c'est un grand nombre d'arrivées, aurait pu causer une baisse du niveau de hygiène dans les salles de douche qui sont considèrent comme des milieux favorables de croissance et développement des micro-organismes, comme les bactéries, les champignons, les parasites, et les virus. Ces derniers peuvent causer aux utilisateurs de salles de bains des infections: cutanées, respiratoires et gastro-entérites. Le but de notre étude est de contribuer à l'isolement et l'identification des bactéries dans les salles de douche dans deux salles de bains de hammams Kharchiche et Ben Nadji, où nous avons analysé les échantillons prélevés sur le sol, le mur, la porte et le robinet. Les analyses ont portées principalement sur la recherche et la quantification des bactéries indicatrices de contamination fécale. Les résultats obtenus nous permettent de conclure qu'il y a une contamination fécale récente dans les deux hammams par la présence des coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, et une faible contamination fécale ancienne au niveau du sol du hammam Ben Nadji. Les portes et les murs des deux Hammams contiennent le plus grand nombre de germes totaux. Suivi par des robinets où le nombre total de germes totaux varie de 288 à 292 UFC/ml pour les germes revivifiables à 37° C, et entre 153 et 178 pour les germes revivifiables à 22° C. Nous notons également que le taux de germes revivifiables à 37° C est supérieure au taux de revivifiables à 22° C, ce qui indique que ces bactéries proviennent de l'Homme, et que le plus grand nombre de germes est enregistré au niveau du Hammam Kharchiche. Le rapport (CF/SF) indique que cette pollution est généralement d'origine humaine. Ces résultats doivent tenir compte de la mesure dans laquelle ils sont dangereux pour la santé publique et, par conséquent, de la nécessité d'instaurer un système efficace de prévention et de réduction de ce phénomène.

**Mots clés :** Contamination fécale, Isolement, Bactérie pathogène, Hammam Kharchiche, Hammam Ben Nadji, Guelma.

## الملخص

حمام دباغ بقالمة واحدة من الأماكن لتلقي العلاج من قبل العديد من الناس من مختلف المدن لخصائص المياه المعدنية الدافئة، والعلاجية، ولكن في بعض الأحيان كثرة الوافدين، تتسبب في انخفاض مستوى النظافة في غرف الاستحمام التي تعتبر بيئات مواتية لنمو وتطور الكائنات الحية الدقيقة، مثل البكتيريا والفطريات والطفيليات والفيروسات. هذه الأخيرة يمكن أن تسبب عدوى لمستخدمي الحمام: كالإصابات الجلدية، الجهاز التنفسي والتهاب المعدة والأمعاء. الغرض من دراستنا هو المساهمة في عزل وتحديد البكتيريا في غرف الاستحمام في حمام خرشيش وحمام بن ناجي، حيث قمنا بتحليل العينات المأخوذة من أرضية الغرف، الجدار، الباب والحنفية. وركزت التحليلات على البحث والتحديد الكمي للبكتيريا المؤشرة على التلوث البرازي. النتائج التي تم التوصل إليها تسمح لنا أن نستنتج وجود تلوث برازي حديث في كلا الحمامين بسبب وجود القولونيات البرازية والمكورات العقدية البرازية، ووجود تلوث برازي قديم ضعيف على مستوى أرضية حمام بن ناجي. تحتوي أبواب وجدران الحمامين على أكبر عدد من الجراثيم. في المرتبة الثانية نجد الحنفيات حيث يختلف العدد الإجمالي للجراثيم الكلية من 288 إلى 292 وحدة مشكلة لخلية / مل بالنسبة للجراثيم القابلة للعيش في  $37^{\circ}\text{C}$  وبين 153 و 178 وحدة مشكلة لخلية / مل بالنسبة للجراثيم القابلة للعيش في  $22^{\circ}\text{C}$ . كما أن عدد الجراثيم قابلة للحياة في  $37^{\circ}\text{C}$  هو أكبر من معدل قابلة للحياة في  $22^{\circ}\text{C}$  ما على أن هذه البكتيريا مصدرها الإنسان، أكبر عدد من الجراثيم تم تسجيله في حمام خرشيش. تشير النسبة (CF / SF) إلى أن هذا التلوث مصدره الإنسان بشكل عام. يجب أن تأخذ هذه النتائج في الحسبان لمدى خطورتها على الصحة العامة، وبالتالي الحاجة إلى نظام فعال للوقاية والحد من هذه الظاهرة.

**الكلمات المفتاحية:** التلوث البرازي، العزل، البكتيريا الممرضة، حمام خرشيش، حمام بن ناجي، قالمة.

**Abstract**

**D**ebagh Hamam of Guelma a place intended for treatment by many people from different cities for the hot and therapeutic mineral water characteristics, but sometimes it is a large number of arrivals, could have caused a lowering of the level hygiene in shower rooms that are considered favorable environments for growth and development of microorganisms, such as bacteria, fungi, parasites, and viruses. These can cause bathroom users infections: cutaneous, respiratory and gastroenteritis. The purpose of our study is to contribute to the isolation and identification of bacteria in the shower rooms in two baths of Kharchiche and Ben Nadji steam rooms, where we analyzed the samples taken from the floor, the wall, door and tap. The analyses focused on the research and quantification of indicator bacteria for faecal contamination. The results obtained allow us to conclude that there is recent faecal contamination in the two hammams by the presence of faecal coliforms and faecal streptococci, and a low former faecal contamination at the floor of the hammam Ben Nadji. The doors and walls of the two Hammams contain the largest number of total germs. Followed by taps where the total number of total germs varies from 288 to 292 CFU / ml for germs revivable at 37 ° C, and between 153 and 178 for germs revivable at 22 ° C. We also note that the rate of germs revivable at 37 ° C is higher than the rate of revivifiables a 22 ° C, indicating that these bacteria come from humans, and that the largest number of germs is recorded at the Hammam Kharchiche. The report (CF / SF) indicates that this pollution is generally of human origin. These results must take into account the extent to which they are dangerous to public health and, consequently, the need for an effective system of prevention and reduction of this phenomenon.

**Key words:** Fecal contamination, Isolation, Pathogenic bacteria, Hammam Kharchiche, Hammam Ben Nadji, Guelma.

**Annexe 01**

La table de Mac-Gradypour trois(03) tubes par dilution.

<b>Nombre caractéristique</b>	Nombre de cellules	<b>Nombre caractéristique</b>	Nombre de cellules	<b>Nombre caractéristique</b>	Nombre de cellules
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

## Annexe 02

## Composition des milieux de culture :

- **BCPL : D/C, S/C (bouillon lactose au bromocresole-pourpre).**

Peptone .....	5g
Extrait de levure.....	2g
Lactose .....	5g
Pourpre de bromocresole .....	0,025g
Agar .....	15g
Eau distillée.....	1000ml

- **Milieu de Chapman :**

Peptone .....	10g.
Extrait de viande de bœuf .....	1g.
Chlorure de sodium .....	75g.
Mannitol .....	10g.
Rouge de phénol .....	0,025g.
Agar .....	15g.
Eau distillé .....	1000ml.

Ph =7,5, autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

- **Milieu TGEA (gélose numération :gélostryptone-glucose-Extrait de levure).**

Tryptone .....	5g.
Glucose .....	1g.
Extrait de levure .....	2,5g.
Gélose .....	15g.
Eau distillée.....	1000ml.

pH=7, autoclavage 20 minutes à 120°C.

- **Milieu Viande foie(VF) :**

Base viande foie.....	30g.
Glucose .....	2g.
Amidon.....	2g.
Agar .....	1g.
Eau distillée .....	1000ml.

- **Milieu Salmonella-Schigella(SS):**

Peptone pancréatique de viande .....	5g
Extraitdeviande .....	5g
Lactose.....	10g
Citrate de sodium.....	8,5g
Thiosulfatedesodium.....	8,5g

Citrate ferriqueammoniacal.....	1g
Rouge neutre.....	25mg
Vert brillant.....	0, 33mg
Agaragarbactériologique.....	15g

- **Milieu Rothe (bouillon glucose l'acide de sodium) :**

Peptone .....	20g.
Glucose .....	5g.
Chlorure de sodium .....	5g
Monohydrogénophosphate de potassium.....	2, 7g
Dihydrogénophosphate de potassium .....	2,7g
Azide de sodium.....	0,2g
Eau distillée.....	1000ml.

pH=6,8, autoclavage 15 minutes à 121°C.

- **Milieu Eva-litsky :**

Peptone .....	20g.
Glucose .....	5g.
Chlorure de soduim .....	5g.
Phosphate bi potassique .....	2,7g.
Azosphate de sodium .....	0,3g.
Ethyle-vliote .....	5g.
Eau distillée.....	1000ml.

pH=7, autoclavage 20 minute à 121°C.

- **Milieu king A :**

Bacto-peptone .....	20g.
Agar .....	15g.
Glycérol C.P.....	10g.
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhydre .....	15g.
Mg Cl 2 anhydre .....	1, 4g.
Eau distillé.....	1000ml.

- **Milieu king B :**

Protéose peptone (Difco).....	20g.
Agar .....	15g.
Glycérol C.P.....	10g.
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhydre .....	15g.
Mg Cl 2 anhydre .....	1,4g.
Eau distillé.....	1000ml.

- **Milieu TSI :**

Agar.....	12 g/l.
Extrait de l'œuf .....	3 g/l.
Extrait de levure .....	3 g/l.
Peptone .....	20 g/l.
Lactose .....	10 g/l.
Saccharose.....	10 g/l.
Na Cl.....	5 g/l
Glucose.....	1 g/l.
Citrate ferrique .....	3 g /l.
Thiosulfate de sodium .....	3 g /l.
Rouge de phénol.....	0 ,025 g /l.
Eau distillé.....	1000 ml.
Ajuster le PH à 7 ,4	

- **Milieu citrate de Simmons :**

Chlorure de sodium.....	5 g.
Sulfate de magnésium.....	0 ,2 g.
Phosphate d'ammonium POH .....	1 g.
Phosphate di potassique POHK.....	2 g.
Citrate tri sodique .....	2 g.
Solution de bleu bromothymol 1%.....	8 ml.
Agar .....	15 g.
Eau distillée .....	1000 ml.
Ajuster le PH à 7-7,2	

- **Milieu mannitol mobilité :**

Peptone pancréatique de viande .....	20 g /l.
Agar Agar .....	4 g/l.
Mannitol.....	2 g/l.
Nitrate de potassium.....	1 g /l.
Rouge de phénol solution à 1%.....	4 g /l.
Eau distillée.....	1000 ml.
Ajuster le PH à 7,2	

- **Milieu urée indole :**

L-tryptophane .....	3 g
Phosphate monopotassique .....	1 g
Phosphate di potassique.....	1 g.
Chlorure de sodium.....	5 g.
Urée .....	20 g.
Solution rouge de phénol à 1%.....	2,5 ml.
Alcool à 95°.....	10 ml.
Eau distillée.....	1000 ml.

## Les réactifs

- **Réactif TDA** : pour la recherche de tryptophane désaminase :
  - Perchlorure de fer .....3, 4g.
  - Eau distillée .....1000ml.
- **Réactif de VogesProskawer (VP).**
  - **VP 1 :**
    - Hydroxyde de potassium.....40g.
    - Eau distillée.....100ml.
  - **VP 2 :**
    - Alpha naphтол.....6g.
    - Ethanol .....100ml.
    - Acide chlorhydrique concentré.....20ml.

**3-Colorants :**

- **Lugol** : elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant.
  - Iode .....1g.
  - Iodure de potassium .....2g.
  - Eau distillée.....3g.
- **Violet de gentiane** :elle est utilisée pour colorerles bactéries.
  - Violet de gentiane.....1g.
  - Ethanol à 90.....1ml.
  - Phénol.....2g.
  - Eau distillée .....100ml.
- **Fuchsine de ziehl** :
  - Fuchsine basique .....1g.
  - Alcool éthylique .....100ml.
  - Phénol .....5g.
  - Eau distille.....100ml.

## Annexe 03

Tableau de lecture est interprétation des résultats d'API 20E.

Test	Groupements active	Réactions /Enzymes	résultats	
			Négative	Positive
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Béta-galactosidase	Incolore	jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine déshydrolase	Jaune	Rouge
<b>LDC</b>	Lysine	lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge /orange
<b>CIT</b>	Sodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Thiosulfate de sodium	Production de H <sub>2</sub> S	Incolore	Noir
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+VP2	
			Incolore	Rose /rouge
<b>GEL</b>	Gélatine emprisonnant de charbon	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir.	Diffusion de pigment noir.
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune

<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	Sucrose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	Mlebiose	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu /bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation /oxydat ion	.Bleu /bleu vert	Jaune
<b>NO<sub>3</sub>- NO<sub>2</sub></b>	GLU tube	Production de NO <sub>2</sub> réduction au stade N <sub>2</sub> .	Jaune	Rouge
			NIT 1+NIT 2, 2-3 min.	

## Annexe 04

Tableau de Lecture et interprétation des résultats de l'API Staph.

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>0</b>	Aucun	Témoin négatif	Rouge	Jaune
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin positif		
<b>FRU</b>	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
<b>MNE</b>	D-mannose			
<b>MAL</b>	Maltose			
<b>LAC</b>	Lactose			
<b>TRE</b>	D-tréhalose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>XLT</b>	xylitol			
<b>MEL</b>	D-melibiose			
<b>NIT</b>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1+NIT 2/10 min	
<b>PAL</b>	$\beta$ – naphtylac .phosphate	Phosphate alcaline	ZYM A+ZYM B/10min	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acéthyl méthyl-carbonyl	VP 1+VP 2/10 min	
			Incolore /Rose	Violet /Rose
<b>RAF</b>	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	Xylose			
<b>SAC</b>	Saccharose			
<b>MDG</b>	$\alpha$ -méthyl-D-glucosaminase			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge /Violet