

## Méthodes microbiologiques d'analyse des eaux minérales

J. R. MERINO (\*)

*Escuela Nacional de Sanidad, Madrid*

Les commentaires que nous allons faire sur les méthodes microbiologiques servant à l'analyse des eaux minérales, ont déjà été exposés dans mon Pays lors des premières journées de qualité des eaux minérales, en juin 1973. Ils furent ensuite publiés dans une Revue de Santé et d'Hygiène Publique, Revue Officielle de la Santé Espagnole, en Février 1973.

La réalité de ces publications et le fait que le Service de Microbiologie de l'Eaux est presque tout entier sous ma direction, car je suis professeur du Département de Microbiologie, ont certainement influencé sur la récente Législation Espagnole du mois de mars 1975 et dans laquelle tous les aspects microbiologiques des eaux minérales et les critères adoptés à ce sujet ont été recueillis.

En écartant la possibilité que n'importe quel autre Pays ait légiféré ce problème entre le 31 mars et le moment présent, nous pouvons affirmer qu'il s'agit de la législation la plus moderne qui jusqu'à présent traite de ce sujet.

Permettez-moi que je fasse un petit préambule qui servira à expliquer la philosophie suivie pour établir les critères et fixer les méthodes microbiologiques.

L'Espagne est très riche en sources d'eau minérale et beaucoup d'entre elles s'appellent eaux minéro-médicinales depuis les temps les plus reculés. Avant, ces eaux se buvaient normalement sur les lieux d'origine. Lors de la dernière décade, ces eaux sont mises en bouteilles et atteignent une grande consommation simplement comme eaux de table.

A partir de 1971, à cause de la petite apparition de coléra que nous avons soufferte, nous avons fait des recherches intenses sur les caractéristiques microbiologiques des sources à leur origine et les curieux aspects microbiologiques de quelques-unes de ces eaux après leur mise en bouteilles.

---

(\*) Directeur du « Centro Nacional de Salmonellosis », Escuela Nacional de Sanidad, Ciudad Universitaria, Madrid.

En ce qui concerne ces aspects microbiologiques en relation avec la flore autotrophe spécifique de chaque source d'eau minérale, représentée par des familles appartenant aux types Pseudomonas et Xantomones, nous sommes fondamentalement arrivés à la conclusion que nous devons absolument respecter l'éco-biologie de ces eaux profondes avec leur contenu microbien autotrophe, non pathogène et très possiblement jouant un grand rôle sur la reconstruction de la flore microbienne intestinale à une époque où les antibiotiques, les insecticides et les antiseptiques, sont à la mode. D'un autre côté, le fait d'éliminer la flore autotrophe spécifique, signifie sans aucun doute que l'on admet un processus de stérilisation, qui peut devenir beaucoup plus dangereux.

C'est la raison pour laquelle dans notre législation il n'y a aucune limitation au nombre de colonies par millilitre bien qu'il faille dénombrer les colonies.

Dans notre législation on introduit l'absence de Pseudomone aérugineuse dans 100 ml d'eau analysée.

Nous considérons opportun inclure ce test, car il s'agit d'eaux qui, renfermant normalement dans leur flore autotrophe *P. Fluorescens*, peut induire en erreur.

Pour nous, la présence de Pseudomone aérugineuse suppose une déficience technique dans le lavage des bouteilles, une installation impropre de mise en bouteilles en ce qui concerne les conditions sanitaires ou la présence de manipulateurs d'eau porteurs de Pseudomone aérugineuse.

Dans notre législation on recueille des essais présumé et des essais confirmatifs, cette dernière qui est réservée au Laboratoire National de Référence, étant donné que de son rapport peut s'en suivre une sanction administrative. Parmi les essais confirmatifs figure la piocianotipie; ce test, comme vous le comprenez, est orienté vers l'étude comparative de Pseudomone aérugineuse en cas de porteurs dans les installations d'embouteillage d'eau minérale.

### *Méthodes microbiologiques*

Il n'y a aucun doute que nous aurions pu choisir n'importe quelle méthode parmi les innombrables qui figurent sur les nombreuses oeuvres de méthodes analytiques des eaux européennes ou internationales. Pour nous, ce qui est important c'est que dans tous les laboratoires de la Nation on travaille avec la même méthode analytique pour que les résultats soient toujours comparables, et non seulement elles ont été rédigées comme norme technique, mais aussi tous les responsables de Laboratoires suivent les cours correspondants d'analyse microbiologique des eaux, dans le but d'uniformiser les méthodes de travail et les critères d'interprétation.

Nous avons préféré les méthodes analytiques réalisées dans des tubes, même si en colimétrie on décrit un procédé de filtration à travers une membrane. Dans la pratique, nous conseillons que la filtration par membrane soit réservée pour les analyses de champ. Dans les laboratoires locaux provinciaux et nationaux on doit utiliser toujours les méthodes en tube.

- 1) Dénombrement total des colonies.
- 2) Colimétrie dans des milieux liquides (Lactose bouillon).
  - a) Méthode indicative.
  - b) Analyse de confirmation.
- 3) Colimétrie par filtration sur membrane.
- 4) Streptométrie.
  - a) Essai présumé.
  - b) Essai confirmatif.
- 5) Clostridiométrie.
- 6) Pseudomone aërugineuse.
  - a) Essais présumés.
  - b) Essais de confirmation.
- 7) Dénombrement total de moisissures.
- 8) Contrôle microbiologique de bouteilles.
- 9) Contrôle microbiologique de fermetures.

Je pense que la description de toutes ces méthodes microbiologiques que vous connaissez à la perfection et que je détaille dans mon rapport, serait de ma part vouloir vous torturer, ce que je ne désire pas.

#### MINISTERE DE L'INTERIEUR

6408 - DECRET 607/1975, DU 13 MARS, selon lequel on règle les spécifications microbiologiques auxquelles les eaux minéro-médicinales en bouteille doivent se conformer.

Le Décret 3069/1972, du 26 octobre, selon lequel on règle les eaux de boisson en bouteille, bien qu'il soit partiellement d'application pour les eaux minéro-médicinales, en vertu de ce qui est stipulé dans la disposition provisoire première, n'est pas applicable dans son article troisième, qui règle les caractéristiques de l'eau potable de source, parmi lesquelles on compte les microbiologiques.

Pour cette raison, des études analytiques opportunes ayant été réalisées par la Direction Générale de Santé, ont considéré nécessaire d'établir les exigences microbiologiques auxquelles doivent se conformer les eaux

minéro-médicinales mises en bouteilles, réglées par le Décret-Loi du 25 avril 1928.

En sa vertu, à la demande du Ministre de l'Intérieur, entendue l'Organisation Syndicale, avec le rapport favorable de la Commission Interministérielle pour l'Ordonnance Alimentaire et moyennant la délibération du Conseil des Ministres dans sa réunion du 7 mars 1975.

#### JE DISPOSE

*Article 1.* – Les eaux minéro-médicinales, mises en bouteilles devront remplir les spécifications microbiologiques suivantes:

1. Parasites et microorganismes pathogènes . Absence totale.
2. Dénombrement total de moisissures . . . Absence dans 100 ml.
3. Dénombrement de coliformes . . . . . Absence dans 100 ml.
4. *Escherichia coli* . . . . . Absence dans 100 ml.
5. Dénombrement de Streptocoques (Streptocoque D de Lancefield) . . . . . Absence dans 100 ml.
6. Dénombrement de *Clostridium* sulfite réducteurs . . . . . Absence dans 100 ml.

*Article 2.* – a) A partir de l'entrée en vigueur du présent Décret toutes les entreprises qui commercialisent les eaux minéro-médicinales devront étudier la dynamique et la distribution de la flore autotrophe des sources, à son point de jaillissement, pendant un an complet, pour déterminer dans ladite période de temps, les variations saisonnières et climatologiques ou de n'importe quel autre type qui puisse les intéresser.

b) L'étude réalisée devra être présentée, une fois terminée, à la Direction Générale de la Santé, aux effets de preuve dans le dossier d'enregistrement et comme base de futures vérifications.

*Article 3.* – En tenant compte que la multiplication de la flore autotrophe est un fait normal, les contrôles qui se feront sur des échantillons mis en bouteilles ne feront pas référence au nombre de germes, présentés au moment de l'analyse, mais à la qualité de la flore trouvée.

Les recherches qui se feront dans ce but prouveront qu'uniquement il existe la flore qui correspond d'une manière spécifique au type de minéralisation de l'eau étudiée et que celle-ci manque, en conséquence, de n'importe quelle autre, dont la présence se devrait à une contamination provenant des bouteilles ou des opérations d'embouteillage.

*Article 4.* – Les méthodes analytiques applicables à l'évaluation des spécifications contenues dans l'article premier, seront celles qui sont citées dans l'annexe I.

*Article 5.* – Les différences qui se produiront dans l'interprétation des analyses microbiologiques, effectuées par des laboratoires différents, seront résolues en prenant comme base le rapport des services analytiques centraux de la Direction Générale de la Santé (Centre National d'Alimentation et Nutrition et Ecole Nationale de Santé).

#### ORDONNANCE FINALE

Le présent Décret entrera en vigueur le jour suivant à sa publication dans le « Bulletin Officiel de l'Etat ».

#### ORDONNANCE DEROGATOIRE

Le présent Décret déroge à toutes les ordonnances de catégorie égale ou inférieure et qui s'opposent à celui-ci.

Je l'ordonne ainsi par le présent Décret, donné à Madrid le 13 mars 1975

*Le Ministre de l'Intérieur*  
JOSE GARCIA HERNANDEZ

FRANCISCO FRANCO

#### ANNEXE I

#### NORMES TECHNIQUES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE D'EAUX DE BOISSON

##### 1. Soins techniques sur le prélèvement d'échantillons et caractères du même.

Il est indispensable d'effectuer le prélèvement de façon à éviter des contaminations étrangères à l'eau. Les récipients qui vont contenir l'échantillon doivent être stérilisés par l'action de la chaleur en autoclave à 120 °C, pendant trente minutes comme minimum.

L'eau possède une action autodépuratrice plus accusée lorsque sa teneur en sels est moindre. L'échantillon doit se placer dans une ambiance froide, + 2 °C + 4 °C, et l'on procède ensuite à l'analyse bactériologique.

Si on se doute que l'eau contient du chlore, on doit contrecarrer son action en plaçant dans les flacons prélèvement-échantillons de l'hyposulfite sodique au moment de les stériliser (0,25 ml de la solution au 10 pour 100 pour des flacons de 250 ml). Les flacons doivent avoir une capacité de 250 ml.

Les échantillons d'eaux de consommation en bouteille seront toujours des bouteilles fermées du commerce.

##### 1.1. Matériel.

Le matériel en verre doit être stérilisé au four Pasteur 180 °C pendant 1 h, sans arriver à carboniser le coton gras utilisé dans le conditionnement (bouchons).

Il est nécessaire de disposer de:

- Pipettes d'1 ml bornes, graduées en dixième.
- Pipettes de 5 ml bornes, graduées en ml.
- Pipettes de 10 ml bornes, graduées en ml.
- Tubes à essai de 16 mm de large par 16 cm de haut.
- Tubes à essai de 22 mm de large par 22 cm de haut.
- Plaques Petri d'un diamètre utile de 9 cm.
- Plaques Petri d'un diamètre utile de 6 cm.

Les plaques Petri s'enveloppent dans une feuille de papier de filtre ou de papier aluminium.

Les pipettes se montent dans les tubes.

Si le papier de filtre et le coton employé dans le conditionnement du matériel présentent des signes de carbonisation, on ne doit pas employer ce matériel, car les produits résultants de la carbonisation ont un fort pouvoir antiseptique.

On doit contrôler la stérilisation du matériel avec l'inclusion du papier indicateur.

## 2. Dénombrement total de colonies

### 2.1. Milieu de culture.

Peptone bactériologique . . . . .	6	g
Extrait de levure . . . . .	3	g
Gélose . . . . .	15	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

On dissout le peptone et l'extrait de levure dans le l'eau distillée, par chauffage doux. On ajoute la gélose. On met le tout dans l'autoclave pendant 20 min à 120 °C. Lorsque le mélange est retiré de l'autoclave et a atteint une température approximative de 50 °C, on adapte le pH à 7,2. On le distribue dans des tubes de 220 par 22, à raison de 15 ml. On les met dans l'autoclave 15 min à 115 °C. Le pH final du mélange doit se rapprocher de 7. On le conservera de préférence dans un réfrigérateur (+ 4 °C à + 8 °C), en préparant la quantité suffisante pour un mois.

Ce milieu est fondamental pour le dénombrement de colonies et, bien que l'on puisse employer la gélose nourrissante deshydratée, que livrent les différentes maisons commerciales, il faut la préparer toujours dans le laboratoire pour contrôler la qualité des milieux commerciaux qui s'utilisent.

### 2.2. Techniques.

- a) On utilise des plaques Petri de 90 mm de diamètre, lavées et stériles.
- b) Deux plaques reçoivent chacune 1 ml d'eau à analyser. Deux autres, 1 ml d'eau diluée au 1/10 et accidentellement, d'autres séries de deux, avec 1 ml de dilutions au 1/100 et 1/1.000.

Le nombre de dilutions dépend de la richesse du peuplement microbien découvert dans les analyses antérieures.

On emploiera uniquement deux plaques de Petri inoculées d'1 ml pour les eaux traitées avec des antiseptiques et pour celles qui n'ont pas été traitées et qui contiennent un peuplement microbien rare.

c) Les plaques à utiliser pour le dénombrement sont celles qui ont, après l'incubation, au moment de la lecture, entre 0 et 300 colonies comme maximum.

La dilution des eaux pour dénombrement, lorsqu'il sera utile de l'employer, se fera de la façon suivante. Il n'est pas conseillé l'utilisation d'eau distillée, dans des circonstances précises elle peut avoir un pouvoir stérilisant; pour cette raison, il faut employer la solution de Ringer comme liquide diluant et dont la composition est la suivante:

Chlorure de sodium . . . . .	9	g
Chlorure de potassium . . . . .	0,42	g
Chlorure de calcium . . . . .	0,48	g
Bicarbonate de sodium . . . . .	0,2	g
Eau distillée (sur cristal) . . . . .	1.000	ml

Un volume de cette solution s'ajoute à 3 volumes d'eau distillée. La solution ainsi obtenue se distribue dans des matras et se stérilise en autoclave pendant 25 min à 120 °C.

d) On fait fondre au bain Marie bouillant le nombre de tubes de gélose commune suffisant (décrit dans 2.1.). On laisse refroidir à 45 °C. On les sort du récipient et on les sèche extérieurement à l'aide d'un chiffon approprié. On verse aseptiquement le contenu d'un tube sur chaque plaque. On agite doucement par des mouvements circulaires pour assurer un mélange homogène de l'eau et de la gélose, sans faire de bulles et sans mouiller les bords de la plaque. Le milieu doit être incorporé dans les 10 minutes qui suivent la mise de l'eau sur les plaques de Petri.

On laisse refroidir le milieu sur une surface horizontale. On incube les plaques Petri, une de chaque série (eau pure ou diluée), dans une étuve à 37 °C. Le reste, dans une étuve à 20-22 °C. Les plaques en incubation doivent rester avec le couvercle vers en bas et dans l'obscurité.

e) Le dénombrement de colonies se fait dans les 24 h ( $\pm$  1 h) sur les plaques incubées à 37 °C; 5 jours après, pour celles qui ont été incubées à 20-22 °C. On utilisera pour le dénombrement les plaques qui auront comme maximum jusqu'à 300 colonies.

### 2.3. Expression des résultats.

On notera:

Nombre de colonies, après 24 h, à 37 °C, par ml.

Nombre de colonies, après 5 jours, à 20-22 °C, par ml.

Les procédés de dénombrement de colonies par culture dans un milieu solide, ne permettent pas d'affirmer qu'une colonie provient de la multiplication d'une seule cellule bactérienne; une homogénéisation déficiente pendant les semailles, ou la présence de germes réunis au même point (staphylocoques), ou le hasard, donneront une seule colonie, les chiffres réels étant supérieurs. Les anaérobies strictes ne sont pas capables de se développer dans ce milieu, ainsi que quelques aérobies saprophytes des eaux.

Le dénombrement total de bactéries au point de jaillissement, n'atteint pas l'importance qu'on lui donnait anciennement, bien qu'il fournisse des indications utiles sur le degré de protection des taux souterraines. Un seul dénombrement a peu de valeur; les examens doivent être répartis pendant plusieurs époques de l'année. Une quantité de colonies sensiblement constante nous indiquera l'existence d'un bon périmètre de protection.

### 3. Colimétrie

La colimétrie comprend deux processus techniques:

- a) Dénombrement de coliformes.
- b) Identification de *Escherichia coli*.

On entend par coliformes, ces germes dans lesquels, *a priori*, on tient compte d'une seule propriété biochimique importante, mais pas caractéristique, comme l'est la fermentation du lactose.

La taxonomie des entérobactériacées souffre des modifications d'après les découvertes scientifiques; dans l'actualité, il est impossible de maintenir ce critère, car il faut tenir compte de l'existence des coliformes incapables de fermenter dans le lactose.

La colimétrie d'une eau tend à découvrir et dénombrer le *Escherichia coli* et les autres germes appartenant aux espèces *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Enterobacter*. Ceux qui appartiennent à ces trois espèces, se classent comme coliformes.

#### 3.1. Colimétrie dans des milieux liquides.

#### 3.2. Méthode indicative.

On décrit dans ces normes uniquement la technique indicative, qui utilise un milieu de culture lactosé avec cloche de fermentation « Durham » comme détecteur de fermentation du lactose et un indicateur de pH, pourpre de bromocrésol. On rejette les méthodes sélectives qui contiennent des substances inhibitrices qui peuvent inhiber et rendre difficile la colimétrie.



3.3. *Méthode de culture.*

Bouillon lactosé:

## a) Concentré.

Extrait de viande de boeuf . . . . .	6	g
Peptone bactériologique . . . . .	10	g
Lactose . . . . .	10	g
Pourpre de bromocrésol au 0,5 pour 100 . . . . .	4	ml
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

On fait dissoudre les composants par chauffage. On adapte le pH à 6,7. On distribue en quantité de 10 ml dans des tubes de 220/22 mm munis de cloche à gaz. On stérilise en autoclave 20 min à 120 °C.

## b) Simple.

Extrait de viande de boeuf . . . . .	3	g
Peptone bactériologique . . . . .	5	g
Lactose . . . . .	5	g
Pourpre de bromocrésol au 0,5 pour 100 . . . . .	4	ml
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chauffage. Adapter le pH à 6,7, distribuer à 10 ml dans des tubes de 160/16 mm, munis de cloche de fermentation. Si on ne dispose pas de ces ingrédients de base on peut utiliser des milieux deshidratés que l'on trouve dans le commerce, conformément aux spécifications suivantes:

Inocul. ml	Vol. du milieu dans le tube. ml	Vol. du milieu avec inocul. ml	Quantité de milieu deshidraté par 1.000 ml g.
1	10	11	13
10	10	20	26
50	50	100	26

3.4. *Technique.*

Analyse présumée.

On sèmera pour chaque échantillon d'eau:

- 1 tube avec 50 ml d'eau dans 50 ml de milieu concentré.
- 5 tubes avec 10 ml d'eau dans 10 ml de milieu concentré.
- 5 tubes avec 1 ml d'eau dans 10 ml de milieu simple.

Pour chaque semaille en emploiera des pipettes différentes.

Les milieux semés se placeront dans une étuve à 30 °C ( $\pm 1$  °C) pendant 48 h. Tous ces tubes dans lesquels le lactose a fermenté avec une production de gaz appréciable, seront considérés comme porteurs de coliformes.

Pour évaluer leur nombre, se rapporter au Tableau 1, dans lequel on effectue le calcul de l'indice NPP (nombre plus probable) dans 100 ml d'eau.

Les résultats des cultures antérieures sont uniquement présumés. Il existe des réactions fausses dues aux germes des espèces *Bacillus* et *Clostridium*, qui peuvent fermenter le lactose avec production de gaz. Dans les tubes positifs il faut identifier la présence de *Escherichia coli* ou de coliformes.

### 3.5. Analyse de confirmation.

L'isolement et l'identification constituent la technique la plus irréprochable pour obtenir des résultats nets.

Milieu Gélose (Gélose, de Teague Levine).

Peptone bactériologique . . . . .	10	g
Lactose . . . . .	10	g
Phosphate bipotassique . . . . .	2	g
Gélose . . . . .	15	g
Eosine jaunâtre . . . . .	0,4	g
Bleu de méthylène . . . . .	0,065	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre les ingrédients par chauffage doux dans de l'eau. Adapter le pH à 7,2; distribuer 20 ml dans des tubes de 220 par 22 mm. Porter à l'autoclave 20 min à 120 °C.

### 3.6. Technique.

On fait fondre au bain Marie bouillant. On agite jusqu'à l'apparition d'une coloration pourpre foncée. On verse dans une boîte de Petri de 9 cm. On fait sécher en étuve à 37 °C avec couvercle ouvert.

Les tubes de bouillon lactosé suspects s'agitent pour homogénéiser. On prend une poignée de culture que l'on dissémine sur le milieu de Teague Levine. On incube à 30 °C pendant 24 à 48 h.

Le *Escherichia coli* et quelques *Citrobacter* donnent dans ce milieu des colonies plates colorées en violet foncé, avec un reflet métallique caractéristique. *Klebsiella* et *Enterobacter* donnent en général des colonies rosées avec un petit centre bleuté, muqueuses et convexes.

Celles qui ne fermentent pas donnent des colonies incolores.

### 3.7. Identification des colonies.

a) Ensemencer à nouveau les colonies d'aspects différents dans milieu de Kligler strie et piqûre, incuber à 37 °C 24 h.

b) Vérifier la pureté de la souche obtenue dans Kligler, par teinture de Gram. Observation de mobilité en microscopie.

TABLEAU I

## Colimétrie

Nombre de tubes qui donnent réaction positive entre			Index NPP	Limites de confiance du 95 %	
1 tube de 50 ml	5 tubes de 10 ml	5 tubes de 1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	1	0,5	4
0	0	2	2	0,5	6
0	1	0	1	0,5	4
0	1	1	2	0,5	6
0	1	2	3	0,5	8
0	2	0	2	0,5	6
0	2	1	3	0,5	8
0	2	2	4	0,5	11
0	3	0	3	0,5	8
0	3	1	5	0,5	13
0	4	0	5	0,5	13
1	0	0	1	0,5	4
1	0	1	3	0,5	8
1	0	2	4	0,5	11
1	0	3	6	0,5	15
1	1	0	3	0,5	8
1	1	1	5	0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	—	3	9	2	21
1	2	0	5	0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	2	54	13	138
1	5	1	35	12	101
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	39	450

c) Ensemencer dans le milieu de Ferguson Stuar pour vérifier indole et uréas, à partir du milieu de Kligler.

d) Ensemencer dans le milieu de Simmons pour rendre évidente l'utilisation du citrate de sodium à partir du milieu de Kligler.

Semer dans le milieu de Ferguson Stuar:

Composition du milieu Ferguson Stuar:

L-Tryptophane . . . . .	0,3	g
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> . . . . .	0,1	g
PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> H . . . . .	0,1	g
ClNa . . . . .	0,5	g
Urée . . . . .	2	g
Alcool 95° . . . . .	2	g
Rouge de phénol au 1 pour 100 . . . . .	0,25	ml
Eau distillée . . . . .	100	ml

Après la dissolution, on filtre à travers une bougie stérilisante. Ce milieu se conserve dans des tubes indéfiniment, lorsqu'il se maintient congelé (congélateur du frigorifique). Faire fondre au bain Marie à 60 °C, dans le but de dissoudre correctement leurs composants.

Sur 1 ml de ce milieu mis en tube d'hémolyse, on émulsionne le contenu de culture d'une poignée de platine recueillie du milieu de Kligler. On incube à 37 °C 24 h.

L'apparition d'une couleur rouge cerise démontre la présence d'uréase positive.

On incorpore à ce tube 6 gouttes de réactif de Kovacs; la présence d'indole se traduit par une coloration rouge cerise dans l'anneau supérieur.

Réactif de Kovacs:

Paradiméthyl amino-benzaldehyde . . . . .	5	g
Alcool amylique . . . . .	75	ml
Acide chlorhydrique pur . . . . .	25	ml

Milieu de Simmons (citrate):

Sulfate de magnésium . . . . .	0,2	g
Phosphate monoammonique . . . . .	1	g
Phosphate bipotassique . . . . .	1	g
Citrate de sodium . . . . .	2	g
ClNa . . . . .	5	g
Bleu de bromotimol . . . . .	0,08	g
Gélose en poudre . . . . .	15	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chauffage. Adapter le pH à 6,8. Distribuer environ 3 ml de milieu dans des tubes de 16 cm. Stériliser à 120 °C 20 min. Laisser refroidir en position légèrement inclinée pour obtenir une petite surface de semaille.

Il est nécessaire l'utilisation de tubes en verre neufs; si ils ont servis pour d'autres milieux de culture, ils doivent être traités avec un mélange de sulfochromique et ensuite être lavés avec de l'eau distillée. Des petites traces de nourrissants dans des tubes usagés peuvent fausser les résultats de cet essai. Ce milieu, Difco et Oxoid le fournissent, deshydraté.

A partir d'une culture en milieu solide de Kligler, on sème en milieu de Simmons. La culture utilisée pour la semaille doit être de la partie supérieure de la strie, sans toucher le milieu où il est, pour ne pas retirer avec la poignée des nourrissants qui puissent fausser le résultat dans le milieu de Simmons.

La semaille s'incube 24 h à 37 °C.

Un résultat négatif apparaît car il n'y a pas d'altération dans la coloration verte du milieu de culture à l'endroit de semaille. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur bleue plus ou moins intense à l'endroit de la semaille du milieu.

### 3.8. Critère d'identification de *Escherichia coli fécal*.

Fermentation de lactose avec acide et gaz.

SH <sub>2</sub> . . . . .	Négative
Indole . . . . .	Positive

Colonies de Teague Levine au reflet métallique.

Milieu de Simmons (citrato), absence de croisement.

Microscopie, bacilles Gram négatifs mobiles.

Sur le Tableau 2 vous pouvez consulter d'autres réactions caractéristiques en entérobactériacées.

### 3.9. Colimétrie par filtration sur membrane.

Actuellement, la technique de filtration sur membrane est recommandée pour les examens routiniers des eaux. Son emploi possède des avantages et des limitations que vous devez connaître.

Avantages:

- Elle a un degré plus élevé de précision.
- Elle permet l'examen de volumes plus grands d'échantillons.
- On obtient des résultats définitifs en moins de temps qu'avec le procédé des tubes.
- Elle permet la filtration d'échantillons dans le champ et le transfert des membranes au laboratoire, dans des milieux de conservation.
- Elle est utile pour des situations d'urgence, pour informer en peu de temps.
- Elle est utile pour les eaux habituellement peu contaminées.
- Elle est très indiquée pour les eaux fortement minéralisées, qui provoquent des réactions fortes en colimétrie dans les milieux liquides.

TABLEAU 2

## Schéma biochimique de diagnostic générique

Oxydase —	Lactose — β Galactoxydase —	Uréase + Proteus	Indole — L.D.C. + Salmonella
		Uréase —	Indole + { L.D.C. — T.D.A. + Providencia L.D.C. + SH <sub>2</sub> + Edwardsiella
			Indole ± { L.D.C. — T.D.A. — Shigella SH <sub>2</sub> +
Oxydase —	Lactose ± β Galactoxydase +	Uréase + Yersinia	Indole — SH <sub>2</sub> + Arizona
		Uréase —	L.D.C. + SH <sub>2</sub> — { Gelatinase — Arab + Hafnia Gelatinase + Arab — Serratia
			Uréase + Klebsiella
Oxydase + Aeromonas	Lactose + β Galactoxydase +	Uréase — Indole ±	{ Escherichia SH <sub>2</sub> + L.D.C. — Citrobacter SH <sub>2</sub> — Rafinose + Enterobacter

## Limitations:

- Dans les eaux troubles, contenant des algues ou du plancton, les filtres s'obstruent rapidement, empêchant la filtration de volumes représentatifs.
- Ces mêmes substances, retenues par la membrane, interfèrent dans le développement des colonies caractéristiques, de coliformes. Des défauts dans les membranes, des petites fissures, donnent des résultats faux.
- Une technique incorrecte donne des mauvais résultats.
- Elle ne détecte pas la formation de gaz du lactose.

On peut utiliser des unités de filtration correspondant aux différents types de Galenkap, Millipore, etc. Le fondement de la méthode consiste à faire passer une quantité déterminée d'eau à travers une membrane dont la grandeur des pores est inférieure à celle des microorganismes sur lesquels on essaie de faire des recherches, restants, en conséquence, retenus à la surface de ladite membrane. La membrane est ensuite déposée sur un milieu de culture approprié.

### 3.10. *Matériel.*

Les flacons qui servent au prélèvement des échantillons d'eau, ne sont pas différents de ceux employés pour effectuer la colimétrie en tube.

#### Plaques Petri:

Elles peuvent être en verre (bore-silicate ou degré équivalent), en plastique ou en aluminium. Les plaques de Petri en verre ou en aluminium sont susceptibles de stérilisation à l'autoclave. Les plaques Petri en plastique doivent être stérilisées par oxyde d'éthylène, radiations ultraviolettes ou alcool éthylique. Il faut vérifier que les plaques Petri restent libres d'effet résiduel de la méthode de stérilisation.

### 3.11. *Membranes.*

On doit employer les membranes qui offrent des garanties en ce qui concerne leur capacité de retenue de bactéries, stabilité, absence de substances inhibitrices de croissance et vitesse de filtration satisfaisante; les plus recommandées sont les réticulaires, avec un diamètre de pores de 0,45-0,50 microns.

Millipore HA: Sartorius C° 5: Gelman AMG.

On doit stériliser dans l'autoclave pendant 10 min à 120 °C, accompagnées de leurs correspondants disques absorbants de support. Pour cela, on les introduit en groupes de 10 unités dans des boîtes Petri normales de 10 cm, ou bien on les enveloppe dans un papier d'emballage fort.

### 3.12. *Milieu de culture.*

#### Chapman T.T.C.

#### Gélose base:

Extrait de viande . . . . .	5 g
Peptone bactériologique . . . . .	10 g
Lactose . . . . .	20 g
Extrait de levure . . . . .	6 g
Bleu de bromotimol (sol. à 1 pour 100). . . . .	5 ml
Gélose . . . . .	20 ml
Eau distillée . . . . .	1.000 ml

On dissout les ingrédients par chauffage. On adapte le pH à 7,2. On le distribue dans des matras à raison de 100 ml. On stérilise en autoclave pendant 20 min à 120 °C.

Au moment de son emploi on fait fondre au bain Marie bouillant et on ajoute à chaque matras 5 ml de trifenil-tétrazolium et 5 ml de tergitol (3.13 et 3.14).

On mélange bien la gélose base avec ces solutions, sans faire de bulles. On verse ce mélange sur des plaques Petri de 60 mm. L'épaisseur du milieu sur les plaques doit être de 5 mm. Les plaques avec milieu peuvent se conserver à  $+ 4^{\circ}\text{C} + 6^{\circ}\text{C}$ , pendant huit jours. Au moment de leur emploi on sèche les plaques en étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ , suivant la méthode habituelle.

### 3.13. *Solution de trifenil-tétrazolium.*

Chlorure ou bromure de 2, 3, 5 trifenil-tétrazolium . . . . .	0,05 g
Eau distillée . . . . .	100 ml

On stérilise en autoclave pendant 20 minutes à  $120^{\circ}\text{C}$ .

### 3.14. *Solution de tergitol.*

Tergitol 7 . . . . .	0,2 g
Eau distillée . . . . .	100 ml

### 3.15. *Unité de filtration.*

Il s'agit d'un entonnoir sans coutures qui se fixe sur un réceptacle muni d'une couche poreuse, qui portera le filtre membrane. L'entonnoir peut se fixer sur le réceptacle à l'aide d'un dispositif de fermeture en baionnette ou à l'aide de vis ou de pinces, suivant les modèles. Le matériel de construction peut être en verre, en aluminium ou en acier inoxydable ou en n'importe quel autre matériel. La stérilisation de l'entonnoir et du réceptacle doit se faire à part, en les enveloppant dans un gros papier, et en adaptant les pinces au moment de la filtration et en même temps, avec des pinces stériles, on place la membrane de filtration avec le quadrillage vers en haut.

Tout le dispositif se monte sur un matras Kitasato à la tubulure latérale, qui puisse permettre la réalisation du vide. La capacité du matras doit être de 1 l, approximativement. La tubulure latérale se branche à un dispositif de vide (pompe électrique, trompe de vide, aspirateur manuel, etc.), pour obtenir une pression différentielle.

#### Observations:

Il n'est pas correct de placer la membrane de filtration à sec, il convient de la faire tremper brièvement dans de l'eau distillée stérile, contenue dans une boîte de Petri, stérile, en verre. Le vide de filtration est très important; il ne doit pas dépasser 30 à 40 cm. Des vides supérieurs provoquent une distribution impropre des germes à la surface de la membrane.



### 3.16. *Quantité d'échantillon à filtrer.*

On conseille pour les eaux potables ou qui peuvent être potables, de filtrer 100 ml, par membrane filtrante, en effectuant deux essais. Le volume le plus petit, que l'on doit filtrer, est celui de 20 ml.

Si les eaux sont très contaminées, on les dilue convenablement avec de l'eau stérile tamponnée.

Eau distillée . . . . .	1	l
Tampon phosphate à pH 7,2 . . . . .	1,25	ml

On stérilise 20 min à 120 °C.

Préparation du tampon phosphate:

Phosphate monobasique de potassium $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	34	g
Eau distillée c.S.P. . . . .	500	ml

On adapte le pH à 7,2 avec NaOH 1 N.

On complète avec de l'eau distillée à 1.000 ml.

Chaque fois que l'on filtre un mélange d'eau il faut laver le réceptacle trois fois consécutives avec 30 ml d'eau stérile tamponnée qui se fait passer à travers la membrane filtrante.

Une fois que la filtration est terminée, on démonte le dispositif, on retire avec des pinces stériles la membrane, que l'on dépose sur la surface d'une plaque de Petri avec milieu de T.T.C.

La membrane se place sur l'envers du quadrillage, en prenant soin qu'il n'y ait pas de bulles ni de poches d'air qui empêcheraient le contact intime avec le milieu de culture.

### 3.17. *Incubation.*

On incube en position inverse pendant 24 h. Une membrane à 37 °C et l'autre à 44 °C.

L'atmosphère de ces étuves d'incubation doit contenir un 70 pour 100 d'humidité. On doit placer un récipient avec de l'eau et du sulfate de cuivre.

### 3.18. *Interprétation des résultats.*

A) Membranes incubées à 37 °C 24 h; les caractéristiques des colonies sont:

*Klebsiella*: colonies rouge brique ou orange.

*Enterobacter*: colonie rouge brique ou jaunes, avec centre orange.

*Escherichia* ou *Citrobacter*: colonies jaunes, avec centre orange.

A la surface de la gélose sous-jacente à la membrane, toutes forment un halo jaune. Les germes qui n'ont pas fermenté avec le lactose, donnent des colonies violettes sur fond bleu.

B) Membranes incubées à 44 °C pendant 24 h. A cette température d'incubation, la plus grande partie des coliformes ne se développe pratiquement pas et il n'en est pas ainsi des colonies d'*Escherichia coli*, qui conservent leur aspect caractéristique de couleur jaune avec centre orange et halo jaune.

#### Evaluation des résultats:

On peut évaluer comme chiffre total de coliformes, les colonies qui ont poussé à 37 °C. On peut évaluer comme chiffre total d'*Escherichia coli*, les colonies caractéristiques qui ont poussé à 44 °C. L'évaluation du nombre se rapporte à 100 ml d'échantillon.

Le calcul s'effectue ainsi:

$$\text{Colonies de coliformes/100 ml} = \frac{\text{Colonies de coliformes/100}}{\text{ml d'échantillon filtré}}$$

Bien que la sélectivité de la méthode soit bonne, l'identification des coliformes par les méthodes que nous venons d'exposer, est obligatoire dans toute analyse formelle. On suivra la technique décrite dans 3.7.

### 4. Streptométrie

La détermination de Streptocoques fécaux (enterocoques), comprend une première étape d'analyse présumée et une seconde étape de confirmation.

Milieu de culture.

#### a) Milieu concentré (Rothe):

Peptone . . . . .	40	g
Glucose . . . . .	10	g
ClNa . . . . .	10	g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> . . . . .	5,4	g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K . . . . .	5,4	g
Azothydrate de sodium . . . . .	0,4	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chaleur douce. Distribuer 10 ml, par tube de 220 par 22 mm. Porter à l'autoclave 20 min à 120 °C.

#### b) Milieu simple (Rothe):

Peptone . . . . .	20	g
ClNa . . . . .	5	g
Glucose . . . . .	5	g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> . . . . .	2,7	g

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K . . . . .	2,7	g
Azohydrate de sodium . . . . .	0,2	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chaleur douce. Distribuer 10 ml environ par tube de 160 par 16 mm. Porter à l'autoclave 20 min à 120 °C.

#### 4.1. *Essai présumé.*

Inoculer 3 tubes du milieu concentré avec 10 ml, chacun de l'eau que l'on va analyser. Trois tubes du milieu simple de 10 ml chacun avec 1 ml, de l'eau que l'on va analyser et 3 autres milieux simples, avec 0,1 ml d'eau.

On incube à 37 °C et on examine 24 et 48 h après.

Tous ceux qui montrent des troubles microbiens après la période d'incubation sont considérés suspects de contenir Streptocoque fécal. Ils seront soumis à l'essai confirmatif.

#### 4.2. *Essai confirmatif.*

On utilise l'éthyl-violet comme sélectif pour les Streptocoques.

Milieu de culture (Litsky):

Peptone . . . . .	20	g
Glucose . . . . .	5	g
ClNa . . . . .	5	g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> . . . . .	2,7	g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K . . . . .	2,7	g
Azohydrate de sodium . . . . .	0,3	g
Solution d'éthyl-violet à 0,01 pour 100 dans eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chaleur douce. Distribuer 10 ml par tube de 160 par 16 mm. Porter à l'autoclave 20 min à 120 °C. L'éthyl-violet que nous recommandons soit des marques Gurr (42 Upper Richmond, Londres) ou le violet d'héxaméthyle de Kullman.

On prend des tubes suspects de l'essai présumé, bien agités, une poignée de culture et on sème en milieu avec éthyl-violet. On incube à 37 °C, pendant 24 à 48 h.

L'apparition de trouble microbien confirme la présence de streptocoques fécaux. On doit l'identifier définitivement par semaille en milieu solide et étude de caractères morphologiques et couleurs. Les streptocoques fécaux appartiennent au groupe D de Lancefield.

Le NPP (nombre le plus probable) de Streptocoques sera déterminé suivant le Tableau 3.

TABLEAU 3

## Streptométrie

Nombre de tubes qui donnent réaction positive entre			Index NPP	Limites de confiance du 95 %	
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	0	—	0	—
0	0	1	3	—	9
0	0	2	6	—	—
0	0	3	9	—	—
0	1	0	3	0,085	13
0	1	1	6,1	—	—
0	1	2	9,2	—	—
0	1	3	12	—	—
0	2	0	6,2	—	—
0	2	1	9,3	—	—
0	2	2	12	—	—
0	2	3	16	—	—
0	3	0	9,4	—	—
0	3	1	13	—	—
0	3	2	16	—	—
0	3	3	19	—	—
1	0	0	3,6	0,085	20
1	0	1	7,2	0,87	21
1	0	2	11	—	—
1	0	3	15	—	—
1	1	0	7,3	0,88	23
1	1	1	11	—	—
1	1	2	15	—	—
1	1	3	19	—	—
1	2	0	11	—	—
1	2	1	15	2,7	36
1	2	2	20	—	—
1	2	3	24	—	—
1	3	0	16	—	—
1	3	1	20	—	—
1	3	2	24	—	—
1	3	3	29	—	—

Nombre de tubes qui donnent réaction positive entre			Index NPP	Limites de confiance du 95 %	
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
2	0	0	9,1	1,0	36
2	0	1	14	2,7	37
2	0	2	20	—	—
2	0	3	26	—	—
2	1	0	15	2,8	44
2	1	1	20	—	—
2	1	2	27	—	—
2	1	3	34	—	—
2	2	0	21	3,5	47
2	2	1	28	—	—
2	2	2	35	—	—
2	2	3	42	—	—
2	3	0	29	—	—
2	3	1	36	—	—
2	3	2	44	—	—
2	3	3	53	—	—
3	0	0	23	3,5	120
3	0	1	39	6,9	130
3	0	2	64	—	—
3	0	3	95	—	—
3	1	0	43	7,1	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	1	3	160	—	—
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	2	3	290	—	—
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800
3	3	3	—	460	—

## 5. Clostridiométrie

Il s'agit de la recherche et du dénombrement de *Clostridium* sulfite-réducteurs (*Cl. perfringens*).

*Escherichia coli* et streptocoques sont témoins de contamination fécale récente. *Clostridium perfringens* lorsqu'il se trouve seul indique une contamination ancienne. Les spores ont une résistance considérable aux milieux naturels.

Milieu de Wilson-Blair:

Bouillon commun . . . . .	1.000	ml
Glucose . . . . .	20	g
Gélose . . . . .	30	g

Dissoudre par chaleur. Adapter le pH à 7,6. Distribuer en quantité de 20 ml dans tubes de 220 par 22 mm. Porter à l'autoclave 30 min à 115 °C.

## 5.1. Technique.

a) Placer 25 ml d'eau à analyser dans un tube de 220 par 22 mm. Placer au bain Marie à 80 °C pendant 5 min. Refroidir rapidement, on détruit ainsi les formes végétatives.

b) Quatre tubes en milieu de Wilson-Blair se placent au bain Marie bouillant pendant dix minutes. Après la fusion du milieu et l'élimination du gaz dissout, on refroidit à 55 °C. A de moment-là, on ajoute au contenu de chaque tube 1 ml de la solution suivante:

Solution sulfite-ferrique:

Sulfite de sodium pur cristallisé . . . . .	1	g
Eau distillée et stérile par ébullition . . . . .	9	ml
Solution d'alun de fer . . . . .	4	gouttes

Solution d'alun de fer:

Alun de fer . . . . .	1	g
Eau distillée stérile . . . . .	19	ml

Cette solution ne doit pas être stérilisée dans l'autoclave. Le mélange de gélose fondu avec la solution sulfite-ferrique doit se faire sans provoquer de bulles d'air dans les tubes.

c) Dans quatre tubes stériles de 220 par 22 mm on distribue 5 ml d'eau traitée au préalable, comme on indique dans a).

On verse dans chaque tube le contenu d'un tube de milieu. On mélange doucement sans faire rentrer de l'air. On refroidit avec de l'eau du robinet. On incube à 37 °C pendant 24 à 48 h.

Si on suppose que les eaux sont très contaminées, on peut semer des quantités plus petites, 1 ml, ou 1 ml des dilutions au 1/10, 1/100, 1/1.000.

## 5.2. Lecture.

Après l'incubation les colonies apparaissent entourées d'une auréole noire, qui en facilite ainsi le dénombrement.

### Interprétation:

D'autres *Clostridium* peuvent donner des colonies au même aspect. L'essai confirmatif exige l'isolement du germe et l'étude biochimique différentielle, surtout sur les colonies qui apparaissent après 48 h. Dans la pratique, il suffit d'évaluer le nombre de colonies noires du clostridium sulfite-réducteurs, mis en évidence dans les délais d'incubation indiqués.

### Expression des résultats:

Spores de *Clostridium*-sulfite-réducteurs dans ml.

## 6. Détermination de *Pseudomonas productrices de pigments fluorescents*

Dans l'actualité, on connaît sept familles de *Pseudomonas productrices de pigmentation* dans les milieux de culture de préférence exempts de fer: *P. aërugineuse*, *P. putide*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. auréofacitens*, *P. syringas* et *P. cichorii*.

Les cinq premières familles sont considérées comme saprophytes et les deux restantes comme phyto-pathogènes, manquant toutes d'intérêt pathogène pour l'homme et les animaux. La présence de *P. aërugineuse* dans les eaux mises en bouteilles est indésirable, c'est à dire, une contamination pendant la manipulation de la même (chaines d'embouteillage mal installées, bouteilles pas assez propres, etc.).

Dans la recherche de colonies autotrophes on doit tenir compte de l'identification de ces colonies qui produisent une pigmentation fluorescente, pour pouvoir déterminer la famille microbienne en question.

### 6.1. Identification présumée.

Ensemencer des colonies suspectes dans des milieu de culture type King A et King B, ou similaires, avec incubation postérieure à 42 °C, pendant 24 h.

#### 6.1.1. Extraction du pigment produit avec du chlorophorme.

6.1.2. La croissance positive à la température de 42 °C et l'incorporation du pigment au chlorophorme impliquent un essai présumé de *P. aërugineuse* mais pas un diagnostic confirmatif. Dans des circonstances indéterminées, n'importe quelle *Pseudomone productrice de pigmentation* peut donner un tableau similaire.

## 6.2. Diagnostic de confirmation.

La souche suspecte sera remise au Centre National de Référence de la Direction Générale de la Santé, où seront réalisées les essais diagnostiques suivants:

- a) Etude de l'anatomie Flagelar.
- b) Action sur la tréhalose.
- c) Action sur le géraniol.
- d) Action sur le 2-ketogluconate.
- e) Pilocianotipie.

Avec ces essais déterminatifs, on peut différencier les différentes familles de *Pseudomonas* pigmentées et arriver au diagnostic de confirmation de *Pseudomone* aërugineuse.

## 7. Denombrement total de moisissure

### 7.1. Milieu de culture (Saboureau Dextrose Gélose).

Dextrose . . . . .	20	g
Extrait de levure . . . . .	5	g
Gélose . . . . .	20	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Humecter les ingrédients en les laissant reposer 15 min. Dissoudre en chauffant doucement. Adapter le pH à  $7,2 \pm 0,1$  et stériliser dans l'autoclave 20 min à 121 °C.

### 7.2. Technique.

Mettre en double, 1 ml de la série de dilutions décimales de l'échantillon sur des plaques de Petri de 9 cm de diamètre. Ajouter environ 15 ml du milieu de Saboureau fondu et maintenu à une température approximative de 47 °C. Mélanger doucement en faisant tourner les plaques trois fois dans le sens des aiguilles d'une montre et trois autres fois en sens contraire.

Incuber pendant cinq jours à  $22 \pm 2$  °C, en position inverse. Compter le nombre de colonies de moisissures sur les plaques qui ont  $75 \pm 25$  colonies cinq jours après. Calculer le nombre de moisissures, en multipliant le nombre de colonies par le facteur de dilution.

## 8. Contrôle microbiologique des bouteilles

Les bouteilles qui vont contenir les eaux minéro-médicinales doivent atteindre un degré de stérilité qui les rendent acceptable pour leur emploi.



8.1. *Denombrement microbiologique.*

Milieu de culture:

Triptone (Difco) . . . . .	20	g
Extrait de levure . . . . .	3	g
Glucose . . . . .	1	g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> . . . . .	1	g
Hyposulfite sodique . . . . .	1	g
Chlorure de sodium . . . . .	5	g
Gélose . . . . .	25	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

On dissout les ingrédients par chauffage, le pH s'élève à 7. On distribue en tubes de 220 par 20, en quantité de 25 ml par tube. On stérilise en autoclave 20 min à 120 °C.

8.2. *Technique.*

On utilisera celle du flacon roulé. Au moment de son emploi on fait fondre le milieu de culture au bain Marie bouillant, en laissant refroidir ensuite jusqu'à 60 °C. On verse dans la bouteille à examiner (de 1 l de capacité), en la bouchant avec un bouchon en coton gras stérile. On fait rouler sous l'eau froide jusqu'à ce que l'on obtienne dans l'intérieur de la bouteille une pellicule solide régulière de gélose. L'utilisation d'un appareil mécanique de roulement donne une distribution plus régulière.

La bouteille s'incube à 20-22 °C, pendant cinq jours, en position horizontale et dans l'obscurité; pendant cette période, elle ne doit pas être changée de position, pour éviter les déplacements de l'eau de condensation. Effectuer dénombrement de colonies de bactéries et de champignons. Pour des bouteilles de capacité moindre, 20 ml de milieu de culture sont suffisants.

Sur certain type de bouteilles on peut effectuer une distribution uniforme de milieu de culture. Le contrôle microbiologique doit alors s'effectuer en rinçant l'intérieur de la bouteille avec un liquide déterminé qui se sème ensuite.

8.3. *Liquide de rinçage.*

Phosphate monopotassique . . . . .	0,0425	g
Hyposulfite de sodium . . . . .	0,15	g
Tamol N (Difco) . . . . .	5	g
Soude . . . . .	0,008	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Distribuer dans des récipients fermés à vis et stériliser en autoclave pendant 20 min, à 120 °C.

**Technique:**

On incorpore dans chaque bouteille, objet de contrôle, 10 ml de liquide de rinçage. On fait des mouvements circulaires sur la surface intérieure et on agite énergiquement.

Recueillir le liquide de rinçage dans un tube stérile. Placer 1 ml sur chacune des cinq plaques de Petri. Verser le milieu de culture que nous décrivons à la suite, fondu au bain Marie bouillant et refroidit à 50 °C.

**Milieu de culture:**

Triptose (Difco) . . . . .	20	g
Extrait de levure . . . . .	3	g
Chlorure de sodium . . . . .	5	g
Gélose . . . . .	15	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

Dissoudre par chauffage. Adapter le pH à 7-7,2. Verser 20 ml en tubes de 220 par 22 et stériliser 20 min à 120 °C.

**Lecture de résultats:**

Le dénombrement de colonies se fait cinq jours après l'incubation à 20-22 °C, le nombre total concentré dans les cinq plaques de Petri représente la moitié des organismes contaminants du flacon.

## 9. Contrôle microbiologique des fermetures

### 9.1. Bouchons couronne.

On frotte la partie du bouchon couronne, qui sera en contact avec l'eau, avec un petit balai construit avec du coton hydrophile sur filament d'aluminium.

Le petit balai se stérilise au préalable en autoclave pendant 20 min à 125 °C.

Avant son emploi, pour faciliter la récupération des microorganismes, de la surface à examiner, on l'imbibe dans la solution suivante:

Triptone (Difco) . . . . .	1	g
Chlorure sodique . . . . .	8,5	g
Tween 80 . . . . .	1	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

pH à 7-7,2, stérilisation 20 minutes à 120 °C. Dans ces conditions de travail le 50 % des microorganismes de la zone frottée se fixent sur le petit balai.

Après avoir frotté le bouchon couronne avec le petit balai, ce dernier se trempe dans un tube qui contient 10 ml de la solution suivante:

Triptone (Difco) . . . . .	1	g
Chlorure sodique . . . . .	8,5	g
Eau distillée . . . . .	1.000	ml

pH à 7-7,2, on stérilise 20 min à 120 °C.

On égoutte plusieurs fois le petit balai contre la paroi du tube. Le liquide égoutté se sème à raison de 1 ml sur chacune des cinq plaques de Petri. Ensuite on verse sur les plaques le même milieu de culture que celui qui a été utilisé pour le contrôle des bouteilles, à l'aide de la technique de rinçage.

Ce milieu doit être fondu au préalable et refroidi ensuite à 50 °C.

Le dénombrement des colonies s'effectue cinq jours après l'incubation à 20-22 °C.

## 9.2. Capsules en plastique.

*Milieu de culture* — On utilise le même milieu que celui que l'on recommande pour le contrôle des bouteilles, à l'aide de la technique de rinçage.

*Technique* — Sur une plaque de Petri on verse une mince couche de 3 mm de milieu et on laisse refroidir. On dépose sur une surface deux ou trois capsules coupées aseptiquement en fragments.

Distribuer une couche du même milieu à 50 °C, en quantité suffisante pour remplir et recouvrir les morceaux de capsule. On laisse refroidir et on incube pendant cinq jours à 20-22 °C. Ensuite on passe au dénombrement des colonies.

**Résumé.** — La législation espagnole expose les requisitions microbiologiques d'eaux minéro-médicinales embouteillés. Ces requisitions on a été réglé par Décret 607/13 mars 1975, et sont les suivants:

- Parasites et microorganismes pathogènes, absence complete.
- Numération totale de *Fungus*, absence en 100 ml.
- Numération totale de coliformes, absence en 100 ml.
- *E. coli*, absence en 100 ml.
- Numération de Streptocoques, absence en 100 ml.
- Numération de *Clostridium* sulfite reducteurs, absence en 100 ml.

On détaille les méthodes techniques qui se adoptent en Espagne pour l'investigation microbiologique d'eaux minérales.

Nous trouvons par la première fois dans la législation espagnole, l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux minérales de boisson.

On détaille les techniques de différentiation entre *Pseudomonas aeruginosa* et des autres *Pseudomonas* qui produisent pigments fluorescents.

On détermine que la diagnostique de confirmation doit être toujours réalisé par le « Centre de Reference » qui concerne au Directeur General de la Santé.

**Summary** (*Microbiological methods for the analysis of mineral waters*). — The Spanish legislature has announced the required microbiological standards for bottled mineral waters. These requirements were the subject of « Decree 607/13th March 1975 » and they are the following:

- A total absence of parasites and pathogen microorganisms.
- A total account of *Fungus*: absence in 100 ml.
- A total account of coliforms: absence in 100 ml.
- *E. coli*: entire absence in 100 ml.
- A total account of *Streptococcus*, absence in 100 ml.
- A total account of *Clostridium* sulphite reducing: absence in 100 ml.
- A total absence of *Pseudomonas aeruginosa* in 100 ml.

Several technical methods which have been adopted in Spain for the microbiological investigation of mineral waters have been described.

For the first time the Spanish legislation has specified the total absence of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral waters and techniques which reveal the differentiation between *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* by fluorescent pigments.

The confirmation of diagnosis must be to carry out by the Director of National Reference Centre of Health.