N° 31

52ème ANNEE

Dimanche 7 Chaâbane 1434

Correspondant au 16 juin 2013

الجمهورية الجزائرية
الديمقراطية الشعبية

# الجريدة الرسمية

اتفاقات دولية ، قوانين ، ومراسيم
قرارات وآراء ، مقررات ، مناشير ، إعلانات وبلاغات

# JOURNAL OFFICIEL

## DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

CONVENTIONS ET ACCORDS INTERNATIONAUX - LOIS ET DECRETS
ARRETES, DECISIONS, AVIS, COMMUNICATIONS ET ANNONCES

**(TRADUCTION FRANÇAISE)**


| ABONNEMENT ANNUEL | Algérie<br>Tunisie<br>Maroc<br>Libye<br>Mauritanie | ETRANGER<br>(Pays autres que le Maghreb) |
|---|---|---|
| | **1 An** | **1 An** |
| **Edition originale**…….....…….....…… | **1070,00 D.A** | **2675,00 D.A** |
| **Edition originale et sa traduction**..... | **2140,00 D.A** | **5350,00 D.A**<br>(Frais d'expédition en sus) |

DIRECTION ET REDACTION
SECRETARIAT GENERAL
DU GOUVERNEMENT
WWW. JORADP. DZ
Abonnement et publicité:
IMPRIMERIE OFFICIELLE
Les Vergers, Bir-Mourad Raïs, BP 376
ALGER-GARE
Tél : 021.54.35..06 à 09
021.65.64.63
Fax : 021.54.35.12
C.C.P. 3200-50 ALGER
TELEX : 65 180 IMPOF DZ
BADR: 060.300.0007 68/KG
ETRANGER: (Compte devises)
BADR: 060.320.0600 12

Edition originale, le numéro : 13,50 dinars. Edition originale et sa traduction, le numéro : 27,00 dinars.
Numéros des années antérieures : suivant barème. Les tables sont fournies gratuitement aux abonnés.
*Prière de joindre la dernière bande pour renouvellement, réclamation, et changement d'adresse.*
Tarif des insertions : 60,00 dinars la ligne

## MINISTERE DU COMMERCE

**Arrêté du 18 Safar 1434 correspondant au 31 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau.**

— — — —

Le ministre du commerce,

Vu la loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05-465 du 4 Dhou EL Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

**Arrête :**

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau.

Art. 2. — Pour la recherche et le dénombrement des organismes coliformes, organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés dans l'eau, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 18 Safar 1434 correspondant au 31 décembre 2012.

Mustapha BENBADA.

— — — — — — — —

ANNEXE

METHODE DE RECHERCHE ET DE DENOMBREMENT DES ORGANISMES COLIFORMES, ORGANISMES COLIFORMES THERMOTOLERANTS ET DES *ESCHERICHIA COLI* PRESUMES.

(Méthode du nombre le plus probable)

La présente méthode prescrit une technique de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *escherichia coli* présumés par culture dans un milieu liquide dans des tubes multiples et calcul de leur nombre le plus probable dans l'échantillon.

Cette méthode peut être appliquée à tous les types d'eau, même ceux contenant une quantité appréciable de particules en suspension.

Le choix des essais utilisés pour la recherche et la confirmation des organismes du groupe coliforme, y compris *escherichia coli*, peut être considéré comme faisant partie d'une séquence continue. L'importance de la confirmation pour un échantillon donné dépend en partie, de la nature de l'eau et en partiel des raisons ayant conduit à cet examen. Dans la pratique, la recherche d'*escherichia coli* présumés dans l'eau comme indiqué en (1.3) fournit généralement une indication sur la pollution fécale récente.

### 1. DÉFINITIONS

Pour les besoins de la présente méthode, les définitions suivantes s'appliquent.

**1.1 Organismes coliformes :**

Organismes capables de former des colonies en aérobiose à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C sur un milieu lactosé sélectif et différentiel, avec production d'acide (et d'aldéhyde) dans les 24 h.

**1.2 Organismes coliformes thermotolérants :**

Organismes coliformes répondant à la définition donnée en (1.1), présentant les mêmes propriétés de fermentation dans les 24 h, à 44 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

**1.3 *Escherichia coli* présumés :**

Organismes coliformes thermotolérants répondant à la définition donnée en (1.1) qui produisent, en plus, du gaz à partir du lactose (et du mannitol) ainsi que de l'indole à partir du tryptophane dans les 24 h, soit à 44 °C ± 0,25 °C, soit à 44,5 °C ± 0,25 °C.

**2. PRINCIPE**

Ensemencement d'une série de tubes à essai contenant un milieu de culture sélectif lactosé avec des prises d'essai de l'échantillon dilué ou non.

Examen des tubes à essai après une incubation de 24 h et de 48 h à 35 °C ou 37 °C ; repiquage à partir de chaque tube à essai montrant une turbidité avec une production de gaz dans un milieu de confirmation plus sélectif et, si l'on recherche les *escherichia coli* présumés, sur un milieu sur lequel peut être prouvée la formation d'indole.

Incubation de ces milieux de confirmation pendant 48 h au plus à 35 °C ou à 37 °C pour la recherche d'organismes coliformes, et à 44 °C pendant 24 h au plus pour les organismes coliformes thermotolérants et les *escherichia coli* présumés.

Au moyen de tables statistiques, calcul du nombre le plus probable (NPP) d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et de *escherichia coli* présumés, susceptibles d'être présents dans 100 ml de l'échantillon, à partir du nombre de tubes donnant des résultats de confirmation positifs.

**3. DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS**

**3.1 Produits de base**

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, utiliser des ingrédients de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique ; suivre les instructions données dans "le tableau B" ( Pour des informations sur la conservation, voir la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture). Il est possible également d'utiliser des milieux complets déshydratés, suivre alors à la lettre les instructions les concernant.

Pour la préparation des milieux, utiliser de l'eau distillée ou de l'eau désionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance bactérienne dans les conditions de l'essai.

**3.2 Diluant**

Pour préparer les dilutions de l'échantillon, utiliser l'un des diluants recommandés dans le "tableau "B." Préparer le diluant conformément aux instructions données dans" le tableau «B».

**3.3 Milieux d'isolement**

Utiliser un ou plusieurs des milieux de culture suivants :

Les instructions pour la préparation sont données dans "le tableau B".

**3.3.1 Bouillon lactosé**

**3.3.2 Bouillon de Mac Conkey**

**3.3.3 Milieu lactosé amélioré au glutamate et au formiate**

**3.3.4 Bouillon au lauryltryptose (lactose)**

**3.4 Milieux de confirmation**

Utiliser un ou plusieurs des milieux suivants :

**3.4.1 Milieux pour la production de gaz**

**3.4.1.1 Bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant**

**3.4.1.2 Milieu (EC)**

**3.4.2 Milieu pour la production d'indole ( Eau tryptonée.)**

**3.4.3 Milieu pour tube à essai unique pour production de gaz et d'indole**

Bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane.

**3.5 Réactifs**

**3.5.1 Réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole**

**3.5.2 Réactif à l'oxydase pour la recherche de l'oxydase**

**4. APPAREILLAGE**

Matériel courant de laboratoire microbiologique, y compris :

**4.1 Four à air chaud pour stérilisation en chaleur sèche et autoclave**

Outre l'appareillage livré stérile, la verrerie et tout autre matériel doivent être stérilisés conformément aux instructions données dans la méthode de dénombrement des microorganismes sur milieu de culture.

**4.2 Incubateur ou bain d'eau, réglable** à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C.

**4.3 Incubateur ou bain d'eau, réglable** à 44 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

**4.4 pH-mètre.**

**5. ÉCHANTILLONNAGE**

Prélever les échantillons et les transmettre au laboratoire conformément à la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.

**6. MODE OPÉRATOIRE**

**6.1 Préparation de l'échantillon et ensemencement des milieux**

Pour la préparation de l'échantillon et des dilutions et l'ensemencement des milieux d'isolement avec les prises d'essai, suivre les instructions données dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture. Ensemencer des tubes à essai contenant un milieu d'isolement double concentration avec des prises d'essai de 5 ml ou plus.

**6.2 Incubation des tubes**

Faire incuber les tubes ensemencés à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C pendant 48 h.

**6.3 Examen des tubes à essai**

Examiner les cultures en tubes à essai après incubation pendant 18 h à 24 h et considérer comme réactions positives, les tubes présentant une turbidité due à une croissance bactérienne et à la formation de gaz dans les cloches de Durham, ainsi qu'une production d'acide si le milieu d'isolement contient un indicateur de pH. Faire incuber à nouveau les tubes à essai qui ne présentent aucun de ces changements et les examiner à nouveau après 48 h pour rechercher une réaction positive.

**6.4 Essais de confirmation**

Il convient de noter que les réactions positives dans les tubes à essai contenant un milieu d'isolement n'indiquent que la présence d'organismes coliformes présumés. Il est donc important de procéder à des essais de confirmation.

**6.4.1 Repiquage, incubation et examen**

Faire un repiquage à partir de chaque tube de milieu d'isolement présentant un résultat positif dans un ou plusieurs tubes contenant des milieux de confirmation (3.4) pour la production de gaz et d'indole.

**Note 1 :** Si on utilise le bouillon lactosé le moins inhibiteur pour l'isolement, il est recommandé de repiquer sur l'un des deux milieux de confirmation les plus sélectifs [bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant ou bouillon EC] pour confirmation.

**6.4.1.1 Organismes coliformes**

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes, faire incuber un tube à essai de bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant (3.4,1.1) à 35 °C ou à 37 °C et rechercher la production de gaz dans les 48 h.

**6.4.1.2 Organismes coliformes thermotolérants et *escherichia coli* présumés**

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes thermotolérants, faire incuber un autre tube à essai de milieu EC (3.4.1.2) à 44 °C pendant 24 h et rechercher la production de gaz.

Pour confirmer la présence d'*escherichia coli* présumés, faire incuber un tube à essai d'eau tryptonée (3.4.2) pour la recherche d'indole à 44 °C pendant 24 h. Puis ajouter 0,2 ml à 0,3 ml de réactif de Kovacs (3.5.1) dans le tube contenant de l'eau tryptonée : l'apparition d'une coloration rouge après l'avoir mélangé avec précaution indique la présence d'indole.

**Note 2 :** L'utilisation d'un bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane permet de montrer la production de gaz et d'indole par les *escherichia coli.*

**Note 3 :** La détection d'*escherichia coli* présumés est considérée comme une preuve suffisante de pollution fécale. Toutefois, des essais complémentaires des *escherichia coli* peuvent être effectués, si nécessaire (6.5).

**Note 4 :** Lorsqu'on procède à des repiquages de colonies sur membranes dans des tubes de milieux de confirmation, il est préférable de repiquer également sur boîte de milieu nutritif gélosé pour l'essai à l'oxydase.

**6.5 Essai à l'oxydase**

Certaines bactéries présentes dans l'eau peuvent, à de nombreux égards, être conformes à la définition des organismes coliformes, mais elles ne peuvent produire de gaz à partir du lactose qu'à des températures inférieures à 37 °C. Elles donnent donc des résultats négatifs lors des essais de confirmation normalisés pour les organismes coliformes et leur présence dans l'eau n'est donc pas considérée comme significative. Parce que les espèces d'aéromones qui se présentent naturellement dans l'eau interfèrent seulement à une température de 37 °C et en dessous, il est seulement nécessaire d'effectuer l'essai à l'oxydase en déterminant des coliformes.

**6.5.1 Effectuer l'essai à l'oxydase avec des cultures pures d'organismes en faisant fermenter le lactose, cultivés sur un milieu nutritif à la gélose**, comme suit :

— placer 2 ou 3 gouttes de réactif à l'oxydase nouvellement préparé (3.5.2) sur un papier filtre dans une boite de pétri ;

— avec une tige de verre, un coton-tige ou une boucle en platine (non en nickel-chrome), étaler une partie de la culture sur le papier filtre préparé (voir note 4) ;

— considérer l'apparition d'une coloration bleu violet foncé dans les 10 s comme une réaction positive.

**Note 5** : Chaque fois qu'est employé le réactif à l'oxydase, effectuer des essais de contrôle avec des cultures d'organismes connues pour donner une réaction positive (Pseudomonas aeruginosa) ainsi qu'avec une culture donnant une réaction négative (*escherichia coli*).

**7. EXPRESSION DES RÉSULTATS**

A partir du nombre de tubes de milieu d'isolement ayant donné des réactions positives aux essais confirmatifs, calculer, par référence aux tables statistiques de la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, le nombre le plus probable d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et d'*escherichia coli* présumés présents dans 100 ml d'échantillon.

Tableau A

**Informations microbiologiques complémentaires liées à l'examen de l'eau et à la recherche d'organismes du groupe coliforme**

Pour l'examen de routine de l'eau, le groupe coliforme peut être décrit généralement en termes microbiologiques quoique non taxonomiques comme suit :

les organismes coliformes sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatif, ne formant pas de spores, présentant une réaction négative à l'oxydase, pouvant croître en aérobiose, et éventuellement en anaérobiose en présence de sels biliés (ou autre dérivé tensio-actif présentant des propriétés d'inhibition de croissance similaires), et également capables de faire fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide, de gaz et d'aldéhyde dans les 48 h lorsqu'on les fait incuber à une température comprise entre 35 °C et 37 °C.

Les organismes coliformes thermotolérants sont des organismes coliformes qui présentent les mêmes propriétés biologiques et de fermentation lorsqu'on les fait incuber à une température de 44 °C à 44,5 °C.

les *escherichia coli* présumés sont des organismes coliformes thermotolérants qui sont également capables de produire de l'indole à partir du tryptophane.

On peut considérer comme un *escherichia coli* présumé, un *escherichia coli* qui donne également un résultat positif lors de l'essai au rouge de méthyle et peut décarboxyler de l'acide L-glutamique, mais qui n'est pas capable de produire de l'acétylméthylcarbinol, d'utiliser le citrate comme seule source de carbone ou de croître dans un bouillon au cyanure de potassium (KCN).

Tableau B

**Milieux de culture, réactifs et diluants**

**MILIEU D'ISOLEMENT**

**Bouillon lactosé**

*Milieu double concentration*

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Lactose | 10 g |
| Extrait de viande | 6 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre les ingrédients dans de l'eau bouillante.

— ajuster le pH si nécessaire de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,9 ± 0,2. Préparer un milieu simple concentration par dilution du milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée.

**Bouillon de MacConkey**

*Milieu double concentration.*

| | |
|---|---|
| Sels Biliés | 10 g |
| Peptone | 40 g |
| Lactose | 20 g |
| Chlorure de sodium | 10 g |
| Pourpre de bromocrésol [solution éthanolique à 1% (V/V)] | 2 ml |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre la peptone, le chlorure de sodium et les sels biliés dans l'eau en chauffant et conserver à 4 °C pendant toute une nuit. Filtrer alors que le mélange est froid, ajouter le lactose et dissoudre.

— ajuster le pH à 7,4 ± 0,2 et ajouter le pourpre de bromocréso1. Obligatoire

*Milieu simple concentration*

— Préparer le milieu simple concentration par dilution du milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée ou le préparer directement en divisant par deux la concentration des ingrédients.

— Répartir le milieu simple concentration par volumes de 5 ml et le milieu double concentration par volumes de 10 ml ou 50 ml dans des tubes à essai ou des flacons contenant une cloche de Durham. Placer en autoclave à 115 °C pendant 10 min.

**Milieu lactosé amélioré au glutamate et au formiate**

*Milieu double concentration*

| | |
|---|---|
| Lactose | 20 g |
| Sel de sodium de l'acide L( +) glutamique | 12,7 g |
| Monochlorhydrate de L(+) arginine | 0,048 g |
| Acide L( -) aspartique | 0,04 g |
| L(-) Cystine | 0,04 g |
| Formiate de sodium | 0,5 g |
| Monohydrogénophosphate de potassium | 1,8 g |
| Chorure d'armmonium | 5 g |
| Sulfate de magnésium ($MgS0_4$, $7H_20$) | 0,02 g |
| Chlorure de calcium ($CaCI_2$, $2H_20$) | 0,02 g |
| Cristaux de citrate de fer (III) | 0,02 g |
| Thiamine (hydrochlorure d'aneurine) | 0,002 g |
| Acide nicotinique | 0,002 g |
| Acide pantothénique | 0,002 g |
| Pourpre de bromocrésol [ solution à 1 % (m/m) dans l'éthanol] | 2 ml |
| Eau distillée, compléter à | 1000 ml |

Le milieu est préparé de préférence par quantités de 10 litres ou plus, s'il n'est pas réparti dans des tubes à essai immédiatement, il convient de ne pas incorporer le lactose et la thiamine et de les ajouter uniquement avant l'utilisation. Il est plus facile d'ajouter certains ingrédients sous forme de solutions séparées préparées comme suit :

Solution 1

| | |
|---|---|
| Monochlorate de L(+) arginine | 0,4 g |
| Acide L(-) aspartique | 0,48 g |
| Eau distillée | 50 ml |

Chauffer pour dissoudre.

Solution 2

| | |
|---|---|
| L(-) cystine | 0,4 g |
| hydroxyde de sodium (5 mol/l) | 10 ml |
| Eau distillée | 90 ml |

Chauffer pour dissoudre.

Solution 3

| | |
|---|---|
| Acide nicotinique | 0,02 g |
| Acide pantothénique | 0,02 g |
| Eau distillée | 5 ml |

Chauffer à froid.

Solution 4

| | |
|---|---|
| Cristaux de citrate de fer | 0,2 g |
| Eau distillée | 10 ml |

Chauffer pour dissoudre.

Solution 5

| | |
|---|---|
| Chlorure de calcium ($CaCl_2$, $2H_20$) | 5g |
| Eau distillée | 100 ml |
| Acide chlorhydrique concentré | 0,1 ml |

Dissoudre à froid et stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver comme solution mère.

Solution 6

Solution de thiamine à 0,1 % stérile dans de l'eau distillée.

Il est préférable de préparer cette solution en ajoutant le contenu d'une ampoule (100 mg) de façon aseptique à 99 ml d'eau distillée stérile. Cette solution doit être conservée à 4 °C et ce qui reste de cette solution éliminé après un délai de 6 semaines.

Afin de préparer 10 l de milieu double concentration, dissoudre les quantités appropriées de sel de sodium, acide L( +) glutamique, de formiate de sodium, monohydrogénophosphate de potassium, de chlorure d'ammonium et de sulfate de magnésium dans 9 l d'eau distillée chaude. Puis ajouter la totalité des solutions 1, 2, 3 et 4 et 4 ml de la solution 5. Ajuster le pH à 6,8 ou plus, si nécessaire, de sorte que le pH final après stérilisation soit de 6,7. Si le même matériel et les mêmes méthodes de stérilisation sont utilisés, il devrait toujours se produire la même variation de pH au cours de la stérilisation. Des essais préliminaires peuvent être nécessaires pour établir le pH correct avant stérilisation.

Après ajustement du pH, ajouter 20 ml d'une solution éthanolique à 1% de pourpre de bromocrésol. Compléter pour obtenir un volume final de 10 l. Ceci devrait nécessiter environ 810 ml d'eau distillée. Si le milieu entier n'est pas utilisé immédiatement, le mettre en bouteille de 500 ml et le placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min. Pour l'emploi, ajouter si nécessaire, une quantité de lactose et de solution de thiamine (solution 6), laisser dissoudre, puis répartir en prises de 10 ml et 50 ml. Chaque tube à essai ou flacon doit contenir une cloche de Durham. Il est important de s'assurer, qu'après passage à l'autoclave et avant l'emploi, la cloche de Durham soit complètement remplie de milieu. Sinon, on risque d'obtenir un résultat positif erroné pour la production de gaz. Stériliser à 115 °C pendant 10 min ou placer dans une étuve à 100 °C durant 30 min pendant trois jours consécutifs.

*Milieu simple concentration*

— préparer un milieu simple concentration en diluant le milieu double concentration avec un égal volume d'eau distillée et répartir, en volume de 5 ml, dans des tubes contenant une cloche de Durham ;

— stériliser à 115 °C pendant 10 min ou placer dans une étuve à 100 °C durant 30 min pendant trois jours consécutifs

**Note 6** : L'addition d'hydrolysat de caséine à 0,1% (m/m) exempt de vitamine peut donner des résultats plus rapides.

**Bouillon tryptosé au laurylsulfate**

*Milieu double concentration*

| | |
|---|---|
| Tryptose | 40 g |
| Lactose | 10 g |
| Chlorure de sodium | 10 g |
| Monohydrogénophosphate de potassium | 5,5 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium | 5,5 g |
| Laurylsulfate de sodium de haute pureté | 0,2 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— ajouter le tryptose, le chlorure de sodium, le lactose et les phosphates à l'eau et chauffer pour dissoudre ;

— ajouter le laurylsulfate de sodium et mélanger doucement pour éviter la formation de mousse ;

— ajuster le pH à 6,8 ± 0,2 ;

— préparer un milieu simple concentration en diluant le milieu double concentration avec un volume égal d'eau distillée ;

— répartir le milieu simple concentration en volumes de 5 ml et le milieu double concentration en volumes de 10 ml et de 50 ml. Chaque tube à essai ou flacon doit contenir une cloche de Durham ;

— placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min ;

MILIEUX DE CONFIRMATION

Bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant (pour production de gaz)

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Lactose | 10 g |
| Bile de bœuf déshydratée | 20 g |
| Vert-brillant [solution à 0,1 %( m/m)] | 13 ml |
| Eau distillée, compléter à | 1000 ml |

— dissoudre la peptone dans 500 ml d'eau distillée ;

— ajouter 20g de bile de bœuf déshydratée dissoute dans 200 ml d'eau distillée. Cette solution devrait avoir un pH compris entre 7,0 et 7,5 ;

— compléter avec de l'eau distillée à environ 975 ml ;

— ajouter le lactose et ajuster le pH à 7,4 ;

— ajouter la solution de vert-brillant et compléter avec de l'eau distillée à 1000 ml ;

— répartir en prises de 5 ml dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham renversées et placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min.

**Milieu (EC)** (pour production de gaz)

| | |
|---|---|
| Tryptose ou trypticase | 20 g |
| Lactose | 5 g |
| Mélange de sels biliés ou sels biliés n° 3 | 1,5 g |
| Monohydrogénophosphate de potassium | 4 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium | 1,5 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

Avant stérilisation, répartir dans des tubes à essai de sorte que le milieu recouvre au moins partiellement la cloche de Durham après stérilisation.

Le pH devrait être de 6,9 après stérilisation.

**Eau tryptonée (pour réaction à l'indole)**

Certaines peptones donnant des résultats satisfaisants dans les essais à 35 °C ou 37 °C ne sont pas satisfaisantes pour l'essai à l'indole à 44 °C. La tryptone s'est avérée satisfaisante et est recommandée.

| | |
|---|---|
| Tryptone | 20 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre les ingrédients dans l'eau et ajuster le pH à 7,5 ;

— Répartir en volume de 5 ml et placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min ;

Note 7 : L'addition de tryptophane D ou DL à 0,1% (m/m) peut améliorer la performance du milieu.

**Bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane**

(Flacon unique pour production de gaz et d'indole)

| | |
|---|---|
| Tryptose | 20 g |
| Manitol | 5 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Monohydrogénophosphate de potassium | 2, 75 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium | 2,75 g |
| Laurylsulfate de sodium | 0,1 g |
| Tryptophane L(-) | 0,2 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— ajouter à l'eau le tryptose, le chlorure de sodium, le mannitol, les phosphates et le tryptophane et chauffer pour dissoudre ;

— ajouter le laurylsulfate de sodium et mélanger doucement pour éviter la formation de mousse ;

— ajuster le pH à pH 6,8 ± 0,2 ;

— répartir par volumes de 5 ml dans des tubes contenant une cloche de Durham ;

— placer à l'autoclave à 115 °C pendant 10 min.

**RÉACTIFS**

**Réactif de Kovacs pour l'indole**

| | |
|---|---|
| *p*-Diméthylaminobenzaldéhyde | 5 g |
| Alcool amylique | 75 ml |
| Acide chlorhydrique (p = 1,18 g/ml) | 25 ml |

— dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool amylique ;

— ajouter l'acide concentré avec soin. Mettre à l'abri de la lumière et conserver à 4 °C.

**Note 8** : La coloration du réactif doit aller du jaune clair au brun clair; certains échantillons d'alcool amylique s'avèrent insatisfaisants et donnent une coloration foncée avec l'aldéhyde.

**Réactif à l'oxydase**

| | |
|---|---|
| Dichlorate de *p*-phénylène diamine | 0,1 g |
| Eau distillée | 10 ml |

Ce réactif ne se conserve pas et doit donc être préparé en petites quantités avant chaque utilisation.

**DILUANTS**

**Diluant à la peptone (0,1 %)**

| | |
|---|---|
| Peptone | 1 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre la peptone dans environ 950 ml d'eau ;

— ajuster le pH avec la solution d'hydroxyde de sodium ou une solution d'acide chlorhydrique (l mol/l) de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 ± 0,1 ;

— compléter avec de l'eau pour obtenir 1000 ml, répartir en volumes utilisables et placer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

*Solution saline peptonée*

| | |
|---|---|
| Peptone | 1 g |
| Chlorure de sodium | 8,5 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre les constituants dans environ 950 ml d'eau portée à ébullition ;

— ajuster le pH avec l'hydroxyde de sodium ou la solution d'acide chlorhydrique (l mol/l) de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 ± 0,1 ;

— compléter avec de l'eau pour obtenir 1000 ml, répartir en volumes utilisables et placer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

*Solution de Ringer (diluée au quart)*

| | |
|---|---|
| Chlorure de sodium | 2,25 g |
| Chlorure de potassium | 0, 1 05 g |
| Chlorure de calcium (anhydre) | 0,12 g |
| Hydrogénocarbonate de sodium | 0,05 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

— dissoudre les ingrédients et répartir en volumes utilisables ;

— stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Le pH final devrait être de 7,0 ± 0,1.

*Solution tampon au phosphate*

| | |
|---|---|
| Dihydrogénophosphate de potassium | 42,5 mg |
| Chlorure de magnésium | 190 mg |
| Eau distillée | 1000 ml |

**Préparation**

a) *Solution de phosphate*

— dissoudre 34 g de phosphate dans 500 ml d'eau distillée ;

— ajuster le pH à 7,2 ± 0,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

b) *Solution de chlorure de magnésium*

dissoudre 38 g de chlorure de magnésium dans 1000 ml d'eau distillée.

*Solution finale*

Pour l'utilisation, ajouter 1,25 ml de la solution de phosphate (a) et 5,0 ml de solution de chlorure de magnésium (b) à 1000 ml d'eau distillée. Répartir en volumes utilisables et stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min. Le pH final doit être de 7,0 ± 0,1.

**Gélose nutritive**

| | |
|---|---|
| Extrait de viande | 1,0 g |
| Peptone | 1,0 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Gélose | 15 g |

— verser les ingrédients dans l'eau et chauffer pour dissoudre ;

— ajuster le pH à environ 8,2 au moyen d'hydroxyde de sodium (l mol/l) et faire bouillir pendant 10 min ;

— clarifier par filtration et régler le pH à 7,2 ±7,4 ;

— répartir dans des flacons de 100 ml de capacité et passer à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.