UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACCULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES – SAISS

Projet de fin d'étude

LST Biotechnologie Hygiène et Sécurité des Aliments

Analyse Bactériologique et Physico-chimique des Eaux Embouteillées

PRÉPARÉ PAR : Mrouj Abdelkrim

ENCADRÉ PAR :

- FSTF : Mr. ANANOU S.
- LRDEHM: Mr. EL OUALI LALAMI A.

DEVANT LE JURY :

- Mr. EL OUALI LALAMI A.
- Mr. ANANOU S.
- Mme. GUISSI S.

Soutenu le : 17/06/2011

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier tout le personnel du Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène de Milieu de la Direction Régionale de la Santé de Fès pour leur accueil chaleureux afin d'accomplir mon stage de fin d'étude avec en tête Mr. EL OUALI LALAMI Abdelhakim le docteur chef du laboratoires de m'avoir accepté en tant que stagiaire, merci pour les nombreuses discussions que nous avons eu et les conseils toujours plein de bon.

Je remercie également mon Professeur Mr. ANANOU S. mon tuteur de stage, d'avoir accepté d'encadrer ce travail, de m'avoir aidé à développer un esprit critique et analytique, ainsi que pour son soutien, son aide, ses conseils et sa disponibilité, afin de concrétiser ce rapport.

Je tiens à dire un immense merci à Mr. ELOUALTI. A de m'avoir accueilli et pour la liberté et la confiance qu'il a su m'accorder tout au long de mon stage, sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Je présente également mes vifs remercîments aux membres de jury composés de :

-Mr. LALAMI OUALI A.
-Mr. ANANOU S.
-Mme. GUISSI S.

Résumé

Le but de ce présent travail est une analyse bactériologique et physico-chimique de 28 échantillons d'eaux embouteillées de 7 marques nationales collectées sur différents points de la chaine de distribution (usine, supermarché et épiciers) au niveau de la ville de Fès. La technique de la membrane filtrante a été utilisée pour la recherche et le dénombrement des coliformes, entérocoques intestinaux et *Pseudomonas aeruginosa*, à cotés de ces germes on a procédé également à la recherche et le dénombrement des germes revivifiables à 22 °C et à 37 °C, ainsi que les anaérobies sporulés sulfito-réducteurs (*Clostridia*). L'analyse physico-chimique a porté sur un dosage qualitatif de 3 ions ; cuivre, nitrates et nitrites par l'utilisation du Kit Lovibond 2000, ainsi qu'une mesure de la conductivité électrique et du pH.

Les résultats des analyses bactériologiques ont montrés que les eaux analysées étaient **exemptes** de coliformes totaux et fécaux, entérocoques intestinaux, *Pseudomonas aeruginosa* et anaérobies sporulés sulfito-réducteurs et donc conformes aux normes nationales fixées. Par contre le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) a montré que **43%** des échantillons analysées dépassaient la limite fixée par les normes nationales pour les germes revivifiables incubés à 37 ºC et **53%** pour la les germes revivifiables incubés à 37 °C.

Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré que les valeurs trouvées étaient **conformes** aux normes nationales ainsi que l'étiquetage mentionné sur la bouteille, ainsi Le pH mesuré a été entre **7.701** et **8.175, l**a conductivité électrique a été comprise entre **193** et **1184** µS/cm, et les proportions du cuivre, nitrite et nitrate mesurées étaient respectivement: **‹0.5 mg/l, ‹0.05 mg/l** et **‹10 mg/l**.

Présentation du Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès :

- **HISTORIQUE :**

En 1977 Le Ministère de la Santé a créé des laboratoires ‘’à visée préventive’’: les Laboratoires de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LDEHM). Ils constituent une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministère de la Santé dans le cadre de l'Hygiène de l'environnement. Actuellement il existe 42 LDEHM, Le laboratoire de Fès fait partie des11 laboratoires régionaux qui ont vu le jour à partir des années 80. Il est implanté à l'Hôpital ELGHASSANI et est individualisé des Laboratoires d'analyses cliniques et de transfusion.

- **Organisation fonctionnelle du LRDEHM :**

- **Laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu de Fès :**

➢ **Unité d'Hygiène :**
- ❖ Analyses microbiologiques des eaux et des aliments,
- ❖ Analyses microbiologiques de l'environnement hospitalier.

➢ **Unité de toxicologie :**
- ❖ Analyses physicochimiques des eaux,
- ❖ Toxicologie des aliments (Recherches aflatoxines par CCM).

➢ **Unité des maladies parasitaires :**
- ❖ Microscopie du paludisme, de leishmaniose cutanée et de bilharziose,
- ❖ Diagnostic Immunologique du paludisme.

➢ **Unité d'Entomologie :**
- ❖ Identification de moustiques,
- ❖ Suivi de la sensibilité OMS des insectes aux pesticides.

- **Mission du LRDEHM :**

- Soutien au programme de prévention et de lutte contre les maladies infectieuses et transmissibles.
- Appui technique (Diagnostic et confirmation des maladies) pour les structures de soins de santé de base (RSSB).

- **Assurance qualité au LRDEHM :**

- Une politique d'assurance qualité est mise en œuvre par le LRDEHM pour obtenir et garantir la qualité des analyses (NM ISO/CEI 17025, ISO9001).
- Un système statistique informatisé est mis en place par le LRDEHM pour le traitement des résultats d'analyse.

Rattachement du LRDEHM :

Le LRDEHM est rattaché au SIAAP et à la Direction Régionale de la Santé de Fès. Il est également en étroite relation avec l'Institut National d'Hygiène et la Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies de Rabat.

Clients du LRDEHM :

Le LRDEHM couvre les besoins des délégations médicales des provinces et préfectures de la région Fès- Boulomane (centres de santé, Hôpitaux provinciaux, Services Préfectoraux d'Hygiène du Milieu, Contrôle Sanitaire aux frontières) ainsi que ceux des Bureaux Communaux d'Hygiène, CHU HassanII…

Sommaire

I-Introduction générale: 6

1- Eaux de consommation..... 7

1.1- Eau embouteillée 7

1.2- Eau minérale naturelle : 9

1.3- Eau conditionnées : 9

1.3.1- Eaux définies par leur origine : 10

1.3.2- Eaux préparées : 10

1.4- Eau de source : 10

1.5- Eau de table : 10

2- Salubrité des eaux embouteillées :..... 11

3- Impact Environnemental des eaux embouteillées: 11

II- Evaluation de la qualité de l'eau embouteillée : 12

1- Introduction : 12

1 .1 Qualité des eaux embouteillées : 13

1.2- Objectif : 15

2- Matériels et Méthodes : 15

2.1- Echantillonnage 15

2.2- Dispositifs 15

2.3- Milieux de culture : 17

2.4- Analyse bactériologique des eaux embouteillées : 18

2.5- Analyse physico-chimique des eaux embouteillées : 20

3- Résultats et Discussion : 22

3.1- Résultats d'analyse Bactériologique : 22

3.2- Résultats d'analyse physico-chimique : 29

III- Conclusion et Recommandations : 32

IV-Références bibliographiques : 33

I-Introduction générale

L'histoire de l'eau embouteillée, commence avec celle des eaux minérales, déjà connues du temps des Celtes et des Gaulois pour leurs vertus thérapeutiques et transportées à travers l'empire européen dans des amphores (vase ancien à deux anses, haut et à col étroit). Tout au long du XVIe jusqu'au XVIIIe siècle, les porteurs d'eau se multiplient et approvisionnent l'élite en lui livrant l'eau dans des jarres en terre cuite, lui permettant ainsi de poursuivre sa cure thermale à domicile. Pour les moins riches, le filtre domestique au sable et gravier ou au charbon demeure plus accessible pour bénéficier d'une meilleure eau. Son utilisation fut très répandue dans la seconde moitié du XIXe siècle à Paris. Parallèlement, des épidémies dévastatrices de typhoïde et de choléra, causées par la contamination des puits, amenèrent plusieurs citoyens à se tourner vers l'eau minérale embouteillée, d'autant plus que le très respecté Pasteur avait affirmé: "Nous buvons 90% de nos maladies."
Vers 1900, grâce aux progrès de la microbiologie, la purification de l'eau par l'ozone mit fin à l'utilisation des filtres de même qu'au métier de porteur d'eau, en Europe. Les porteurs d'eau existent toujours en Afrique. Il faudra cependant attendre la fin de la Seconde guerre mondiale pour que l'eau minérale se débarrasse de son image de "remède". L'explosion de la consommation d'eau embouteillée principalement en Europe se fait immédiatement après la guerre 39-45. Suite à d'intenses bombardements, les canalisations et aqueducs furent mis à dure épreuve, il fallait donc livrer l'eau dans des contenants. En général, l'augmentation de la consommation d'eau embouteillée est intimement liée au développement rapide de la société occidentale, à l'urbanisation, à la dégradation de l'environnement, au progrès technique et à l'élévation du niveau de vie.
Les besoins individuels en eau de boisson sont estimés à environ 2 litres par jour pour un adulte. Un nombre croissant de personnes se tourne vers les eaux de bouteille pour répondre à une partie ou à l'intégralité de ces besoins individuels quotidiens. Les eaux en bouteille sont perçues comme étant plus sûres et de meilleure qualité. Dans les pays industrialisés, les consommateurs cherchent à retrouver la sécurité alimentaire perdue suite aux nombreux scandales de l'agro-industrie et dans les pays en développement, ils cherchent à se protéger contre les maladies hydriques. Même dans les pays bénéficiant d'un accès à une eau de boisson sûre, les consommateurs préfèrent parfois dépenser jusqu'à 1000 fois plus pour boire de l'eau en bouteille. La consommation d'eau en bouteille progresse régulièrement dans le monde, aussi au Maroc, depuis une trentaine d'années. Au sein de l'industrie de l'alimentation et des boissons, le secteur des eaux en bouteille est le plus dynamique: la consommation dans le monde augmente, en moyenne, de 12% par an, en dépit du prix excessivement élevé de l'eau en bouteille par rapport à l'eau du robinet (TOUFIK ALAMI, 2008).

1- Eaux de consommation

1.1- Eau embouteillée

L'eau embouteillée est de l'eau qui a été emballée dans des contenants scellés pour la consommation humaine. Il peut s'agir d'eau provenant de diverses sources (Fig. 1), incluant des sources, des aquifères ou des réseaux municipaux, qui peut être traitée pour la rendre propre à la consommation humaine (SANTE CANADA).

La consommation mondiale d'eaux embouteillées a atteint 154 milliards de litres (41milliards de gallons) en 2004, en hausse de 57 pour cent des 98 milliards de litres consommés cinq ans plus tôt. Même dans les zones où l'eau du robinet est potable, la demande pour l'eau embouteillée est en augmentation produisant ainsi des déchets inutiles et en consommant de grandes quantités d'énergie. Bien que dans le monde industriel l'eau embouteillée n'est souvent plus saine que l'eau du robinet, il peut coûter jusqu'à10.000 fois plus. À moins de $ 2,50 par litre (10 $ le gallon), l'eau embouteillée coûte plus que l'essence. Les Etats-Unis est le premier consommateur mondial de l'eau avec 26 milliards de litres en 2004, soit environ un verre de 8 onces par personne chaque jour (EARTH POLICY INSTITUTE, 2006).

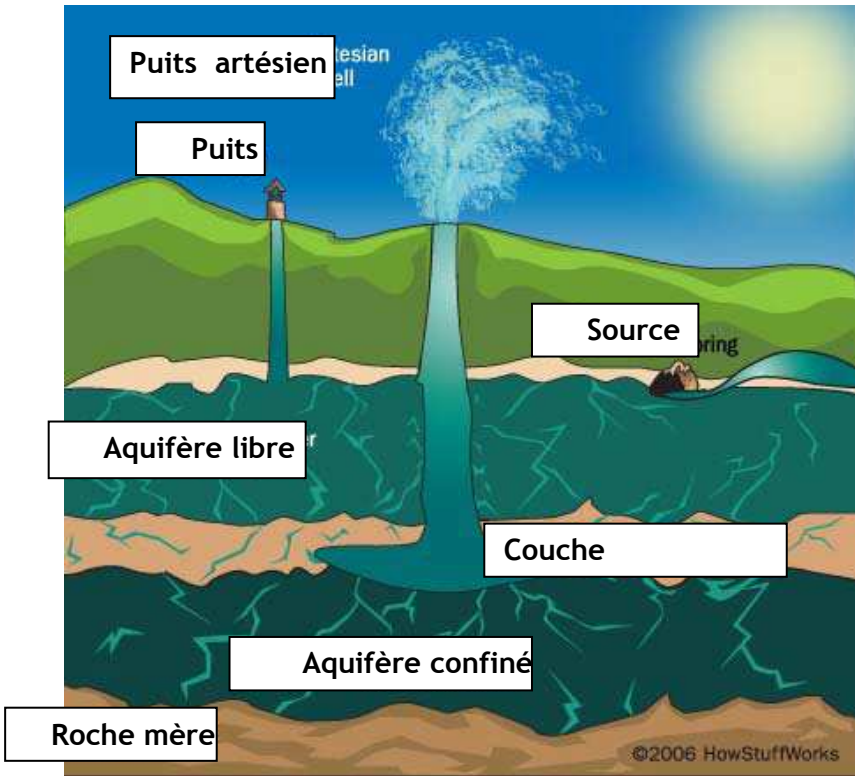


Figure 1 : Les sources d'eau souterraine (http://home.howstuffworks.com/bottled-water1.htm)

Au Maroc, un individu boit en moyenne 11 litres d'eau en bouteille par an, ce qui est faible en comparaison avec les pays européens qui consomment parfois jusqu'à 189 litres par an et par habitant. Même au sein des pays du Maghreb, le Royaume accuse un retard, la consommation tunisienne étant de 22 litres par an et par habitant (ce qui représente le double de la consommation marocaine). Ce marché connaît cependant une croissance annuelle de l'ordre de 6%. L'eau en bouteille est encore perçue comme un produit cher. Elle est d'ailleurs considérée fiscalement comme un produit de luxe, les taxes représentant 33 à 35% du prix de vente, qui se situe aux alentours de 5.5 DH la bouteille d'un litre et demie (TOUFIK ALAMI, 2008).

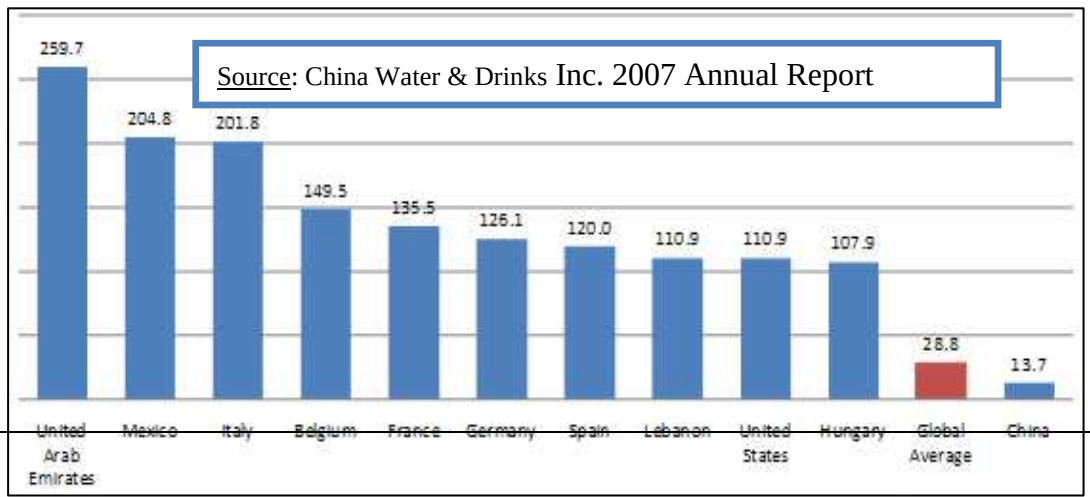


Figure 2 :

Consommation de l’eau embouteillée en 2007 (Litres par habitant)

N.B\ L’objectif des nations unies du millénaire pour le développement durable appelle à réduire de moitié la proportion des personnes n’ayant pas accès de façon durable à l’eau potable d’ici 2015. Atteindre cet objectif exigerait de doubler le montant de 15 milliards de dollars par année que le monde dépense actuellement pour l’approvisionnement en eau ainsi que les systèmes d’assainissements. Bien que cette somme puisse paraître importante, elle n’est rien en comparaison des **100 milliards de dollars** dépensés chaque année sur l’eau embouteillée (Earth policy institute).

1.2- Eau minérale naturelle

L’eau minérale naturelle est une eau qui se distingue nettement de l’eau de boisson ordinaire (CODEX STANDARD108-1981) du fait que:

a) Elle est caractérisée par sa teneur en certains sels minéraux, les proportions relatives de ces sels et la présence d’oligo-éléments ou d’autres constituants;

b) Elle provient directement de nappes souterraines par des émergences naturelles ou forées pour lesquelles toutes les précautions devraient être prises afin d’éviter toute pollution ou influence extérieure sur les propriétés physiques et chimiques de l’eau minérale naturelle;

c) Elle est constante dans sa composition et stable dans son débit et sa température, compte dûment tenu des cycles de fluctuations naturelles mineures;

d) Elle est captée dans des conditions qui garantissent la pureté microbiologique et la composition chimique de ses constituants essentiels;

e) Elle est conditionnée à proximité de l’émergence de la source avec des précautions d’hygiène particulières;

f) Elle n’est soumise à aucun traitement autre que ceux autorisés par la présente norme.

Une eau minérale naturelle ne peut être que d'origine souterraine, et s'être constituée à l'abri de tout risque de pollution. Microbiologiquement saine dès l'origine, elle n'est perturbée par aucune contamination d'origine humaine. La principale caractéristique de l'eau minérale naturelle réside dans sa pureté originelle qui est une exigence de la réglementation. Les eaux minérales naturelles ont une composition physico-chimique stable qui peut leur permettre de se voir reconnaître des propriétés favorables à la santé. Elle est donc définie règlementairement par trois critères majeurs :

- •Absence de tout traitement ou d'addition de produits chimiques,
- •Sa pureté originelle à la source et donc l'absence de tout polluant d’origine humaine,
- •Une composition minérale définie, parfaitement stable et garantie. (Union fédérale des consommateurs française).

1.3- Eau conditionnées

Les eaux conditionnées autres que les eaux minérales naturelles sont des eaux destinées à la consommation humaine qui peuvent contenir des sels minéraux, présents à l’état naturel ou ajoutés intentionnellement; elles peuvent également contenir du gaz carbonique, présent à l’état naturel ou ajouté intentionnellement; mais elles ne doivent pas contenir des sucres, des édulcorants, des aromatisants ou autres aliments. (CODEX STANDARD 227-2001) On distingue :

1.3.1- Eaux définies par leur origine

Les eaux définies par leur origine, qu'elles soient d'origine souterraine ou de surface, visées par la présente norme. Elles présentent les caractéristiques suivantes (CODEX STANDARD 227-2001):

a) Elles proviennent d'une ressource environnementale spécifique sans passer par un système communautaire d'alimentation en eau;

b) Des précautions ont été prises à l'intérieur de périmètres de protection ceinturant les zones de vulnérabilité afin d'éviter toute pollution ou influence extérieure sur les caractéristiques microbiologiques, chimiques et physiques de l'eau à l'origine;

c) Des conditions de captage qui garantissent leur pureté microbiologique d'origine et les éléments essentiels relatifs à leur composition chimique d'origine;

d) Sur le plan microbiologique, elles conviennent en permanence à la consommation humaine dès leur captage et elles sont conservées dans cet état par l'adoption de mesures particulières d'hygiène jusqu'à leur conditionnement et au cours de celui-ci.

e) Elles ne sont sujettes à aucune modification ni traitement autres que ceux qui sont autorisés.

1.3.2- Eaux préparées

Les eaux préparées sont des eaux qui ne répondent pas à toutes les dispositions établies pour les eaux définies par leur origine. Elles peuvent provenir de tout type de source d'approvisionnement (CODEX STANDARD 227-2001).

1.4- Eau de source

Les eaux de source sont comme les eaux minérales naturelles, exclusivement d'origine souterraine, microbiologiquement saines, préservées de la pollution d'origine humaine, et aptes à la consommation humaine sans traitement ni adjonction autres que ceux qui sont autorisés. Contrairement aux eaux minérales naturelles, leur composition n'est pas systématiquement stable. Les eaux de sources répondent aux mêmes critères de potabilité que l'eau du robinet. Par ailleurs, leur nom commercial n'est souvent pas spécifique à une source. Tout en restant conforme aux règles de l'étiquetage, une même marque peut parfois recouvrir plusieurs sources et donc avoir des compositions minérales différentes (Union fédérale des consommateurs française).

1.5- Eau de table

L'eau de table (ou l'eau purifiée) provient soit d'une source protégée souterraine ou à partir d'un réseau municipal d'eau potable (eau du robinet). Elle a été déminéralisée et traitée par un ou plusieurs procédés (comme la filtration, la distillation, l'ozonisation, l'osmose inverse et le traitement par lumière UV) pour éliminer les solides dissous. Si l'eau provient d'une source d'eau municipale qui utilise du chlore comme désinfectant, le fabricant peut également traiter l'eau pour éliminer le chlore.

2- Salubrité des eaux embouteillées

Bien que l'on utilise couramment l'expression « eaux en bouteille », il serait plus exact de parler d'eaux conditionnées. Le terme « eaux en bouteille » peut manquer de précision. En effet, l'eau destinée à la consommation est aussi vendue dans des canettes, des boîtes métalliques ou même des sacs en plastique. D'une manière générale, cependant, elle est conditionnée dans des bouteilles en verre ou en plastique jetables. On trouve des bouteilles de diverses tailles, qui vont des petites bouteilles individuelles aux grosses bonbonnes de 80 litres.
L'eau de boisson peut être contaminée par toutes sortes d'agents chimiques, microbiens ou physiques qui, à de fortes concentrations, peuvent nuire à la santé. Parmi les agents chimiques, on peut citer le plomb, l'arsenic et le benzène. Les agents microbiens peuvent être des bactéries, (*Vibrio cholerae, Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi ; Legionella pneumophila ; Campylobacter jejuni* ou *E. coli…)* des virus (le virus de l'hépatite A ; *Chlamydia trachomatis…)* et des parasites *(Crytosporidium parvum ; Schistosoma haematobium…).* Au nombre des risques physiques figurent les éclats de verre et les fragments de métal (Organisation Mondiale de Santé).

3- Impact Environnemental des eaux embouteillées

La majorité des bouteilles en plastique ne sont pas recyclables, du coup ces bouteilles vont s'accumuler et participeront au remplissage intensif des décharges à travers le monde. Ajoutons à cela le fait que la biodégradation du plastique se fait à un rythme très lent, donc ces déchets vont rester dans nos sites d'enfouissement des centaines d'années à venir. Selon un rapport de 2001 du Fond mondial pour la nature (WWF), environ 1.5 millions de tonnes de plastique sont dépensés dans la mise en bouteille de 89 milliards de litres d'eau embouteillée consommée chaque année. L'incinération des bouteilles utilisées produit des sous produits toxiques tels que le gaz du chlore et des cendres contenant des métaux lourds qui peuvent donc poser un risque sanitaire. Outre le grand nombre de bouteilles en plastique produites chaque année, l'énergie requise pour fabriquer et transporter ces bouteilles sur le marché peut causer l'épuisement des combustibles fossiles. Ainsi l'institut de recherche 'Pacific Institute' estime qu'en 2006 :

- La production des bouteilles pour la consommation américaine a nécessité l'équivalent de plus 17 millions de barils de pétrole, ne comprenant pas l'énergie pour le transport.
- La mise en bouteille de l'eau produit plus de 2.5 millions de tonnes de CO_2.
- Il a fallu 3 litres d'eau pour produire un litre d'eau embouteillée.

Les compagnies des eaux embouteillées, en raison de leur utilisation anarchique des ressources précieuses et leur production de milliards de bouteilles en plastique ont présenté une forte pression sur l'environnement.

II- Evaluation de la qualité de l'eau embouteillée

1- Introduction

L'augmentation spectaculaire de la consommation de l'eau en bouteille dans le monde entier a été attribuée à des consommateurs préoccupés par la pollution croissante de l'eau et leur opposition aux goûts et des odeurs offensives vis-à-vis de l'eau d'approvisionnement municipale, ainsi que le fluorure, le chlore et d'autres additifs. La promotion très réussie des industriels de l'eau en bouteille en tant que produit pure et impeccablement propre, sans danger pour la consommation humaine a grandement contribué à l'observation de l'augmentation de ce produit alimentaire. En outre l'eau embouteillée a été commercialisé comme idéal pour les nourrissons (préparation du lait maternisé ou d'eau de boisson), pour l'eau de la reconstitution des aliments, et en particulier pour les personnes immunodéprimées. Ces personnes à risque élevé doivent consommer l'eau embouteillée, qui est libre de potentiels agents pathogènes, afin d'éviter un danger mortel en conséquence. (**Bharath et al., 2003**).
Il est bien connu que l'eau minérale naturelle se caractérise par sa flore bactérienne, sa composition chimique et physique. La quantité de la flore microbienne de l'eau de source est généralement élevée. L'eau de source contient une microflore naturelle caractérisée par une prédominance des bactéries Gram-négatives, composée principalement des genres *Achromobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter, Cytophaga, Moraxella* et *Pseudomonas*. Autres contaminations microbiennes supplémentaires (*Staphylococcus* et *Enterococcus*) peuvent survenir à tout moment pendant et après le traitement. La présence de ces microorganismes est attribuée à une mauvaise hygiène au cours du traitement. Si ces micro-organismes ne sont pas adéquatement éliminés, pendant le traitement et la mise en bouteilles, ils peuvent se retrouver dans l'eau de boisson commerciale. Un autre facteur qui contribue au degré de contamination est la facilité avec laquelle les bactéries se multiplient dans les conteneurs en chlorure de polyvinyle (PVC). Lorsque l'eau est fortement contaminée, elle dégage une mauvaise odeur et elle peut causer des troubles gastro-intestinaux (**Nsanze et Babarinde, 1999**).
Il a été démontré aussi que les sources de contamination de l'eau embouteillée (autres que l'eau), incluent des équipements servant à la pompe (Fig.3) ou le transport de l'eau depuis sa source jusqu'à l'usine d'embouteillage, les équipements utilisés dans la transformation et la mise en bouteille (Fig.4), ainsi que les bouchons, les bouteilles et les facteurs environnementaux (**Warburton et al., 1992**).

Figure 3 : Pompage de l'eau depuis la source

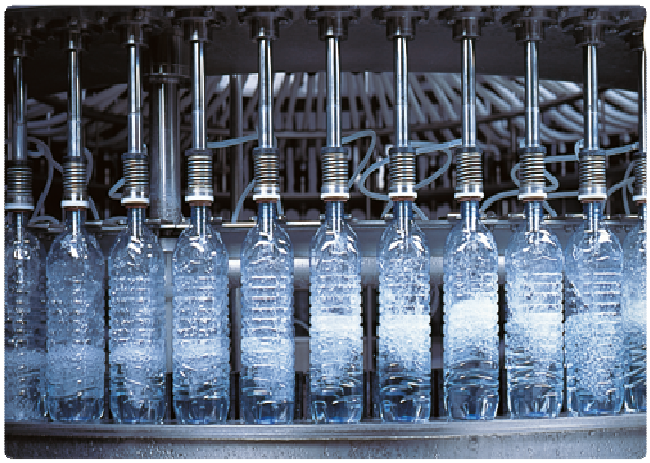


Figure 4 : Mise en bouteille de l'eau

La croissance rapide de bactéries après l'eau minérale est embouteillée peut être due à une oxygénation de l'eau pendant le processus d'embouteillage, l'augmentation de la surface prévue par la bouteille, l'augmentation de la température et la quantité de nutriments provenant de la bouteille. Il convient également de mentionner que les bactéries autochtones dans les eaux minérales sont capables de se multiplier et même bien avec un nombre très limité d'éléments nutritifs (**Laszlo Varga, 2011**).

1 .1 Qualité des eaux embouteillées

- **Qualité microbiologique :**

La qualité microbiologique de l'eau se définit comme étant l'état de l'eau caractérisé par un niveau de présence de micro-organismes (virus, bactéries, protozoaires...) pouvant induire un risque sanitaire plus ou moins grand. Sa maîtrise repose sur des mesures de contrôle et de surveillance de paramètres microbiologiques et la mise en place d'une maintenance préventive. En général, l'eau embouteillée qui se vend est jugée de bonne qualité et n'est pas considérée comme présentant un quelconque danger pour la santé. Toutefois, si l'eau embouteillée est manipulée ou entreposée de façon inadéquate (fig. 5 et 6), elle peut poser un risque. Ainsi à l'instar d'autres aliments, l'eau embouteillée contient un faible taux de bactéries inoffensives. Cependant, ces bactéries peuvent proliférer à la température ambiante en absence de réfrigération.

Figure 5: Transport des eaux embouteillées

Figure 6 : Entreposage des eaux embouteillées chez un épicier.

- Qualité physico-chimique :

Une eau naturelle d'origine souterraine ou de surface (rivière, lac, …) n'est en effet pas uniquement composée de molécules d'eau. Il est normal d'y trouver des minéraux (Calcium, Magnésium, Chlorure…), des composés ioniques (Nitrates, Phosphates, Hydrogénocarbonates…) et des oligoéléments (Fer, Manganèse, Zinc…). C'est ce l'on appelle la structure naturelle de l'eau. Cette structure dépend de la nature géologique du sol avec lequel l'eau a été en contact. En fonction de ce dernier, le niveau de minéralisation (concentration des substances) et la composition (nature des substances) sont différentes.
La minéralisation de la plupart des eaux est dominée par huit ions appelés couramment les ions majeurs. On distingue les cations : calcium, magnésium, sodium et potassium, et les anions : chlorure, sulfate, nitrate et bicarbonate. Les substances chimiques autres que les sels minéraux font l'objet de normes très sévères. On distingue : a) les substances indésirables, leur présence est tolérée tant qu'elle reste inférieure à un certain seuil (le fluor et les nitrates par exemple) ; et b) les substances aux effets toxiques, le plomb et le chrome, l'arsenic, le cadmium en font partie. Les teneurs tolérées sont extrêmement faibles, parfois de l'ordre du millionième de gramme par litre.
Donc pour la qualité physico-chimique, l'eau ne doit pas contenir d'éléments chimiques indésirables (Fe, Mn) ou toxiques (Pb, Hg) qui entraîneraient des risques sanitaires à court, moyen, et long terme. Le risque chimique est le plus souvent un risque de toxicité chronique par une ingestion répétée. Un dépassement ponctuel n'a pas de conséquence sur la santé, mais les dépassements quotidiens peuvent être préjudiciables, en particulier pour les personnes fragiles (nourrissons, personnes âgées, malades).
Pour garantir la qualité des ces produits au près des consommateurs, les eaux embouteillées font l'objet de réglementations internationales :
Ainsi il existe une norme du Codex Alimentarius pour les eaux minérales naturelles qui date de 1981 (Norme codex pour les eaux minérales naturelles : codex standard 108-1981): celle-ci a fait l'objet d'une révision en 1997 et en 2001. Les autres eaux embouteillées font l'objet d'une norme internationale depuis 2001**[**Norme générale pour les eaux potables en bouteille/conditionnées (autres que les eaux minérales naturelles) : codex standard 227-2001). Ces deux normes sont complétées par un code d'hygiène adopté en 1985 pour les eaux minérales naturelles (*Code* d'usages en matière *d'hygiène pour* le captage, l'exploitation et la commercialisation des *eaux minérales naturelles* (référence CAC/RCP, numéro 33- *1985*,

Codex Alimentarius, Volume 11)] et en 2001 pour les autres eaux embouteillées (Code d'Usages en matière d'hygiène pour les eaux potables en bouteille/ conditionnées (autres que les eaux minérales naturelles, référence CAC/RCP, numéro 48- 2001, codex Alimentarius).
Au Maroc la législation, la réglementation et les spécifications bactériologiques ainsi que d'autres spécifications des eaux minérales naturelles sont régies par la circulaire conjointe numéro 1 du 1983 (Circulaire conjointe N°l du 9 mai 1983 du ministre de l'agriculture et de la reforme agraire et du ministre de la sante relative aux critères bactériologiques d'usage pour les eaux minérales naturelles).

1.2- Objectif

L'objectif de ce stage est une analyse Bactériologique et physico-chimique des échantillons d'eaux embouteillées de 7 marques nationaux, (y compris des eaux minérales naturelles, des eaux de source naturelles et des eaux de table) collectées sur différents stades de la chaine de distribution (super marchés, épiciers, usine).

❖ La qualité bactériologique des eaux a été appréciée par la recherche et le dénombrement de bactéries faisant l'objet de régulation marocaine : les germes aérobies mésophiles, les coliformes, les streptocoques fécaux, les bactéries anaérobies sulfito-réductrices et *Pseudomonas aeruginosa*.
Le but de l'analyse bactériologique d'une eau n'est pas d'effectuer un inventaire de toutes les espèces présentes, mais de rechercher soit celles qui sont susceptibles d'être pathogènes soit, ce qui est souvent plus aisé, celles qui les accompagnent et qui sont en plus grand nombre souvent présentes dans l'intestin des mammifères et sont par leur présence indicatrices d'une contamination fécale et donc des maladies associées à la contamination fécale.
❖ La qualité physico-chimique a été estimée par des mesures de conductivité, pH et le dosage du taux de cuivre, nitrites et nitrates dans les échantillons.

2- Matériel et Méthodes

2.1- Echantillonnage

Des eaux embouteillées (non gazeuses) de 7 marques nationales différentes nommées (A, B, C, D, E, F et G) : ont été collectées d'épiciers, de grandes surfaces et d'usine. 3 échantillons sont d'eaux minérales naturelles (B, E et G), 3 d'eaux de source naturelle (A, C et D) et un échantillon d'eau de table (F).
L'acheminement des échantillons depuis les différents points de la collecte jusqu'au laboratoire a été réalisé d'une manière conforme, dans des glacières maintenues entre 4 et 8 °C.

2.2- Dispositifs

- Membrane d'ester de cellulose stérile ayant une grandeur de pore (0,45µm) suffisante pour retenir les bactéries.
- Boites de pétri stériles.
- Pince stérile.

- Etuves capables de maintenir des températures de (20°C, 37°C, 44°C) et qui sont sujettes à un contrôle de température régulier.
- Autoclave pour stérilisation, faisant l'objet d'un contrôle de qualité approprié.
- Un bec Bunsen.
- Bain-marie pouvant maintenir une température de 80 °C.
- Appareil de filtration sous vide.

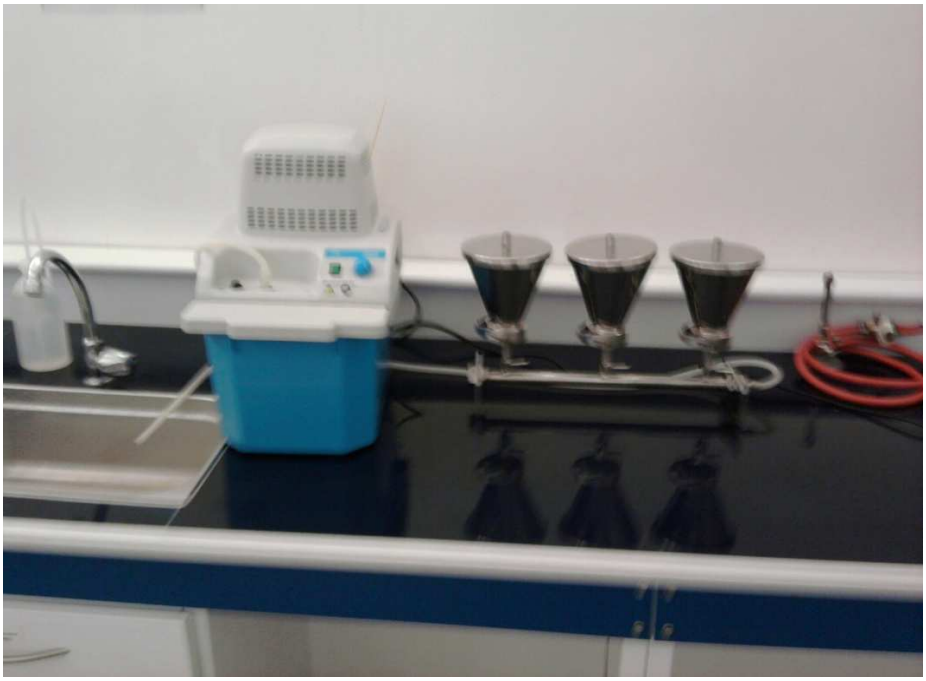


Figure 7 : Appareil de filtration sous vide

- Disques de papiers filtre imprégnés d'une solution aqueuse à 1 % de di-chlorure de tétraméthyl-p-phénilène-diamine pour le test oxydase.
- Réactif de Kovacs pour le test de la production de l'indole.
- Conductimètre portable étalonné.
- pH-mètre de paillasse étalonné.
- Kit LOVIBOND pour le dosage du cuivre, nitrates et nitrites

Figure 8 : Kit LOVIBOND 2000 pour dosage des ions dans l'eau

2.3- Milieux de culture

- **Gélose lactosée au tergitol et TTC :**

Le tergitol inhibe la croissance des microorganismes Gram+, limite l'envahissement par *proteus* et favorise la récupération des coliformes. L'acidification du lactose en présence de l'indicateur coloré (le bleu de bromothymol) permet d'énumérer et d'identifier les colonies caractéristiques de couleur jaune et d'un halo jaune. Tandis que, les germes qui ne fermentent pas le lactose présentent des colonies entourées d'un halo bleu. Les microorganismes présentant des colonies dont la coloration est rouge (due à la réduction du TTC) sont TTC+.

- **milieu urée tryptophane (urée indole) :**

Le milieu Urée-tryptophane, improprement appelé urée-indole est un milieu de culture synthétique utilisé en bactériologie permettant la mise en évidence de la production d'indole (par l'hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase), ce milieu est utilisé aussi pour d'autres tests.

- **Gélose Slanetz et Bartley (M-entérococcus) :**

L'azoture de sodium inhibe la croissance des bactéries Gram-négatives et le chlorure de 2, 3,5-triphényl tétrazolium (TTC), un colorant incolore qui est réduit en formazan rouge par les entérocoques intestinaux.

- **La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) :**

L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif. La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif. Les entérocoques hydrolysent

l'esculine en glucose et en esculétine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

- **Milieu SPS (Sulfite de sodium-Polymyxine-Sulfite de cystéine)** :

Le sulfite est réduit par les bactéries anaérobies sulfito-réductrices en sulfure qui réagit avec le fer du milieu pour former un précipité ferreux qui donne une teinte noire aux colonies.

- **Gélose à l'extrait de levure :**

Les substances nutritives apportées par la tryptone et les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

- **Gélose au cétrimide**:

Milieu d'isolement du bacille pyocyanique. Le cétrimide (bromure de cétyl-triméthyl-ammonium), composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*. La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium. Le milieu favorise également la production de pigments fluorescents (pyoverdines) par certaines souches de Pseudomonas aeruginosa. La plupart des *Pseudomonas aeruginosa* sont identifiables à leur odeur d'aminoacétophénone.

- **Milieu King A**

La production de pyocanine, due spécifiquement à Pseudomonas aeruginosa, est favorisée par la présence d'ions inorganiques.

N.B\ Les milieux de culture préparés on fait l'objet d'un contrôle de qualité portant sur l'efficacité de la stérilisation grâce à l'utilisation de rubans indicateurs ainsi que des bio-indicateurs.
Les réactifs, les boites de pétri ainsi que les autres dispositifs utilisés font également l'objet d'un contrôle de qualité approprié.
Il faut noter que le LRDEHM est doté d'une accréditation ISO/CEI 17025:2005.

2.4- Analyse bactériologique des eaux embouteillées

►Recherche et dénombrement des micro-organismes revivifiables :

La méthode utilisée est le dénombrement par incorporation à la gélose qui consiste à dénombrer les microorganismes viables présents dans une portion d'échantillon d'eau. Elle s'effectue en déposant une portion d'un échantillon d'eau (1 ml) dans une boîte de Pétri à laquelle est ajoutée de la gélose nutritive, (extrait de levure) maintenue liquéfiée à environ 45 °C. Les boîtes de Pétri sont ensuite agitées doucement afin de répartir uniformément les bactéries dans tout le volume de milieu disponible. Le milieu de culture étant non sélectif, toutes les espèces de bactéries supportant les conditions du test pourront croître et ainsi être dénombrées.
L'incubation des boites est effectuée à 37 °C pendant 48 h et à 22 ºC pendant 72 h pour dénombrer les micro-organismes revivifiables à 37 ºC et 22 °C respectivement. Les résultats sont exprimés en UFC/ml (unités formant colonie).

►Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux :

La méthode utilisée est le dénombrement par filtration sur membrane. Le dénombrement est fondé sur la filtration d'un volume spécifié d'un échantillon d'eau à travers une membrane filtrante ayant une grandeur de pore (0,45 µm) suffisante pour retenir les bactéries. La procédure est la suivante :

100 ml de l'échantillon à analyser (bien homogénéisée) sont filtrées aseptiquement sur une membrane d'ester de cellulose de porosité 0,45 µm. A l'aide d'une pince stérile cette membrane est mise à incuber sur un milieu sélectif des coliformes, tout en veillant à ne pas emprisonner de bulles d'air dessous. Le milieu de culture utilisé est la gélose lactosée au TTC et tergitol.

Pour les coliformes fécaux, l'incubation se fait à une température de 44 ^{o}C pendant 24h. Contrairement, aux coliformes totaux qui sont incubées à 37 ^{o}C pendant 48h. Les résultats sont exprimés en UFC/100 ml (unités formant colonie).

Les colonies observées subissent des tests de confirmation :

a) Épreuve de la cytochrome-oxydase :

Le test oxydase est utilisé pour déterminer la présence des enzymes oxydases associées aux cytochromes de la chaine respiratoire. Il est basé sur le principe que certains dérivés phényl-diamine sont oxydés en présence de cytochrome C en produisant l'indophénol de couleur bleue. Ce test est réalisé en utilisant des disques de papiers filtre imprégnés d'une solution aqueuse à 1 % de di-chlorure de tétraméthyl-p-phénilène-diamine. Les disques sont inoculés à la surface avec quelques colonies des isolats à tester et la réaction est dite positive dans le cas de l'apparition d'une couleur bleue au bout de 30 secondes.

Les coliformes totaux ne possèdent pas l'enzyme appelé oxydase et produisent une réaction négative (oxydase-).

b) Test de la production de l'indole :

On utilise le milieu urée tryptophane, après addition du réactif de kovacs (diméthyl-amino-4-benzaldéhyde), pour mettre en évidence la présence de l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, en formant un composé coloré en rouge à la surface du bouillon.

Les *E. coli* ont des colonies oxydase- et indole+ (Norme marocaine : PNM ISO 9308-1, 2005 Indice de classement NM 03.7.003).

►Recherche et Dénombrement des Streptocoques fécaux (Entérocoques intestinaux) :

La méthode utilisée est le dénombrement par filtration sur membrane. La procédure est la suivante : (NORME MAROCAINE : PNM ISO 7899-2, 2006, INDICE DE CLASSEMENT NM 03.7.006)

100 ml de l'échantillon à analyser (bien homogénéisée) sont filtrées aseptiquement sur une membrane d'ester de cellulose de porosité 0,45 µm. A l'aide d'une pince stérile cette membrane est mise à incuber sur un milieu sélectif solide, la gélose de Slanetz et Bartley, contenant de l'azide de sodium (pour supprimer la croissance des bactéries Gram-négatives) et le TTC. L'incubation se fait à une température de 37 ^{o}C pendant 24h.

Les colonies typiques sont bombées, avec une couleur rouge, marron ou rose (TTC+), soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

Pour les colonies typiques, une étape de confirmation est nécessaire, par transfert de la membrane, avec toutes les colonies, sur une gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide (BEA), préchauffée à 44 °C. Les entérocoques intestinaux hydrolysent l'esculine sur ce milieu en 2 h. Le produit de la réaction, la 6,7 dihydroxycoumarine, se combine aux ions ferriques pour donner un composé noir qui diffuse dans le milieu.

Les résultats sont exprimés en UFC/100 ml (unités formant colonie).

►Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* :

La méthode utilisée est le dénombrement par filtration sur membrane. La procédure est la suivante :

100 ml de l'échantillon à analyser (bien homogénéisée) sont filtrées aseptiquement sur une membrane d'ester de cellulose de porosité 0,45 µm. A l'aide d'une pince stérile cette membrane est mise à incuber, pendant 48 h à 42 °C, sur un milieu sélectif solide, la gélose au cértimide. Étant donné la température élevée et la présence d'inhibiteurs, il en résulte une croissance sélective des *P. aeruginosa* caractérisée par des colonies présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu vert et une fluorescence sous ultra-violets à 254 nm.

Pour les colonies typiques, une étape de confirmation est nécessaire :

Épreuve de la cytochrome-oxydase : les *P. aeruginosa* sont Oxydase+ ; et production de pyocyanine sur milieu de King A.

►Recherche et dénombrement des spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*) :

Pour sélectionner les spores de *Clostridia*, l'échantillon d'eau (20 ml) doit être chauffé dans un bain d'eau à 75-80 °C pendant 15 min (à partir du moment où cette température a été atteinte), pour détruire les bactéries végétatives.

L'échantillon est additionné ensuite par 20 ml du milieu de culture sulfite polymyxine sulfadiazine (SPS) relativement chaud. L'incubation est réalisée à 37 ºC pendant 24 h en anaérobie (après une homogénéisation du milieu avec l'échantillon d'eau et refroidissement). Les colonies typiques sont noires, entourés d'une précipitation noire (le sulfite est réduit en sulfure qui réagit avec le fer du milieu pour former un précipité ferreux noir).

N.B\ Les méthodes analytiques utilisées pour l'analyse bactériologique ont été sujettes à un contrôle de qualité incluant, le contrôle de porosité des membranes, l'utilisation de solution de rinçage d'eau distillée stérile avec mise en incubation des membranes correspondantes (contrôle de stérilité de l'appareil de filtration), ainsi que l'utilisation des témoins pour chaque réactif ou milieu de culture utilisés.

2.5- Analyse physico-chimique des eaux embouteillées

►Mesure de conductivité :

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La conductivité est également fonction de la température de l'eau : elle est plus importante lorsque la température augmente. Les résultats de mesure doivent donc être présentés en termes de conductivité équivalente à 20°C en µS/cm. La mesure est effectuée par un conductimètre portable étalonné, en entrant l'électrode de l'appareil au bécher remplie d'eau, la lecture du résultat affiché doit correspondre à la température 20°C.

►Mesure du pH :

Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions H+ de l'eau. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14. Ce paramètre caractérise un grand nombre d'équilibre physico-chimique et dépend de facteurs multiples, dont l'origine de l'eau. Le pH est mesuré par un pH-mètre de paillasse étalonné, lequel on fait plonger sa sonde qui est constituée d'une électrode de verre et d'une électrode de référence dans le bécher remplie d'eau, et on note ensuite la valeur de la mesure.

►Mesure des nitrites et nitrates :

Les nitrates (NO^-_3) et les nitrites (NO^-_2) sont des ions présents de façon naturelle dans l'environnement. Ils sont tous les deux le produit de l'oxydation de l'azote (qui représente environ 78 pour cent de l'atmosphère) par les microorganismes dans les plantes, le sol ou l'eau.

►Mesure du cuivre :

Le cuivre est présent dans la nature sous forme de métal et sous forme de minéraux, surtout de cuprite (Cu_2O) et de malachite ($Cu_2CO_3(OH)_2$).

LE DOSAGE DE CES 3 IONS EST REALISE PAR LE KIT LOVIBOND 2000. Le comparateur Lovibond® 2000+ est un système d'analyse colorimétrique de l'eau. Il s'agit d'un instrument pour une comparaison visuelle de l'intensité de la couleur de l'échantillon avec celle des filtres de verre (couleur stable et résistante à la lumière) des disques de test Lovibond, grâce au prisme intégré qui rassemble les étalons de verre de ces disques et l'échantillon coloré dans le même champ de vision. Il possède un compartiment de format ajustable pour accueillir des cuves avec un trajet optique de 40 mm maximum.

Dans une cuve de verre optique (ayant un trajet optique de 1 – 40 mm) appropriée le réactif nécessaire (pastille) à l'analyse visée est ajouté à l'échantillon d'eau, tout en veillant à bien dissoudre la pastille dans l'échantillon ensuite cette cuve est inséré dans le comparateur et tourné jusqu'à ce que la couleur correspond à l'échantillon d'eau colorée. Le résultat peut être lu sur le disque de test.

FIGURE 9 : LE COMPARATEUR LOVIBOND AVEC LES DISQUES DE TEST ET LES PASTILLES (REACTIFS) UTILISEES.

3-Résultats et Discussion

Les eaux, quelle que soit leur nature, contiennent une multitude de micro-organismes de sources diverses telles que le sol et la végétation, dont l'estimation globale fournit une information utile pour l'évaluation et la surveillance de la qualité de l'eau.
Dans le monde, les ventes d'eau en bouteille augmente chaque année en raison de la croyance générale selon laquelle l'eau embouteillée est sûr et libre de toutes les impuretés. L'eau minérale naturelle ne peut pas être soumise à aucune désinfection qui modifie ou élimine ses composantes biologiques, par conséquent, cette eau doit provenir d'une source pure, protégée adhérer aux règlementations strictes aussi bien quantitative que qualitative. Néanmoins plusieurs études ont montré que l'eau embouteillée n'est pas stérile car, elle peut contenir différents agents pathogènes comme les coliformes**,** *Pseudomonas spp*, *E. coli*, *Campylobacter* ou même des mycobactéries (**Venieri et al, 2006**).

3.1- Résultats d'analyse Bactériologique

Un total de 28 échantillons d'eaux embouteillées ont été analysées pour la présence et l'énumération des coliformes totaux et fécaux (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, entérocoques intestinaux**,** spores des anaérobies sulfito-réducteurs et les germes revivifiables (à 22°C et à 37°C).
Les résultats d'analyse bactériologique ont montrés que les eaux analysées étaient exemptes de :

- Coliformes totaux et fécaux (*E .coli*) dans 100 ml,
- Entérocoques intestinaux dans 100 ml,
- *Pseudomonas aeruginosa* dans 100 ml et
- Anaérobies sporulés sulfito-réducteurs dans 50 ml.

Ces résultats sont donc compatibles avec :
La Circulaire conjointe Numéro 1 du 9 mai 1983 relative aux critères bactériologiques d'usage pour les eaux minérales naturelles.
Les Normes Marocaines (NM 03.7.001) fixées pour la qualité des eaux d'alimentation humaine.
Les coliformes sont des bactéries à Gram négatif, en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores, présentant une réaction négative à l'oxydase, pouvant croître en aérobiose et éventuellement en anaérobiose en présence de sels biliaires (ou autre dérivé tensioactif présentant des propriétés d'inhibition de croissance similaires), et normalement capables de faire fermenter le lactose avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 h lorsqu'on les fait incuber à une température de 37 °C. Ils possèdent également l'enzyme β-galactosidase (Norme marocaine : (PNM ISO 9308-1, Indice de classement NM 03.7.003) 2005).
Les coliformes totaux regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des Entérobactéries. Les coliformes totaux sont des microorganismes indicateurs dont le dénombrement permet de déceler le niveau de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable. Parmi les coliformes totaux, on distingue les coliformes thermo-tolérants (fécaux) capables de fermenter le lactose à une température de 45 ^{o}C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (*E. coli*).

Les *E. coli* sont des bactéries coliformes qui sont capables de produire de l'indole à partir du tryptophane dans les 24 h à 44 °C. Ils possèdent également l'enzyme β-glucuronidase, réagissent positivement à l'essai au rouge de méthyle et peuvent décarboxyler l'acide L-glutamique, mais ne sont pas capables 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). Les entérocoques intestinaux sont des bactéries en forme de cocci ou ovoïdes, à Gram positif, formant généralement des chaînes, catalase-négatives, possédant l'antigène D. Ce sont des bactéries capables de réduire le chlorure de 2, 3,5-triphényl-tétrazolium (TTC) en formazan et d'hydrolyser l'esculine à 44 °C sur des milieux correspondants (NORME MAROCAINE : PNM ISO 7899-2, 2006, INDICE DE CLASSEMENT NM 03.7.006).

La classification générale des streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 80 par la création d'un nouveau genre, *Enterococcus*. Dans ce contexte, plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* ont été transférées vers le genre *Enterococcus*, ce dernier correspondant, généralement, aux streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield. Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (Institut national de santé publique du Québec, 2002).

La présence et l'étendue de la pollution fécale est un facteur important dans l'évaluation de la qualité d'une masse d'eau ainsi que du risque infectieux représenté pour la santé humaine. L'examen d'échantillons d'eau pour y rechercher des *E. coli*, normalement présents dans les intestins de l'homme et des animaux homéothermes, fournit une indication sur ce type de pollution. La présence de bactéries coliformes peut donc, bien que ce ne soit pas la preuve d'une contamination d'origine fécale, indiquer une défaillance du traitement ou de la distribution de l'eau. L'identification des souches isolées permet quelquefois d'apporter une indication quant à leur origine (Norme marocaine : (PNM ISO 9308-1, Indice de classement NM 03.7.003) 2005).

L'absence des coliformes totaux, fécaux (*E. coli*) et des entérocoques intestinaux dans les échantillons analysées prouve que ces eaux embouteillées ne présentent pas de contamination fécale et donc des maladies associées à la contamination fécale. Ces micro-organismes sont des indicateurs de présence potentielle de microorganismes pathogènes entériques (comme *Vibrio cholerae* et *Salmonella* spp.). Il faut noter que l'absence de contamination fécale ne laisse en rien présager l'absence d'espèce potentiellement pathogène (exemple : *Legionella*, *Pseudomonas*…). Cependant d'autres études dans la littérature ont enregistrées la présence des coliformes totaux, *E. coli* et les entérocoques intestinaux dans les eaux embouteillées ; ainsi **László Varga**, (**2011**) a trouvé que : 6,3% des 492 échantillons testés d'eaux minérales naturelles étaient non conformes; pour les coliformes totaux, 1,4% contenaient des *E. coli*, et 1,2% étaient contaminés par des Entérocoques spp. Ces résultats s'ajoutent à la non-conformité constaté dans une étude grecque, où la prévalence des coliformes totaux, *E. coli* et *Enterococcus* spp. dans les eaux embouteillées évaluées étaient de 11%, 1% et 1,2%, respectivement (**Venieri et al. 2006**), et correspondent également à ce qui était rapportée par **Bharath et al.,** (**2003**) que 5,2% de 344 échantillons d'eaux embouteillées commercialisées à la Trinité et Tobago contenues des coliformes et 1,5% étaient positifs pour E. coli. Par opposition à ces résultats **Tsai et Yu** (**1997**) n'ont détecté aucune présence de coliformes totaux

ou d'entérocoques dans 136 échantillons d'eaux minérales non gazeuses commercialisées au Taiwan et, de même, **Kokkinakis et al., (2008)** n'ont rapporté aucune présence de coliformes, *E. coli* ou d'entérocoques dans 240 échantillons d'eaux embouteillées commercialisées en Grèce.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae* en forme de bâtonnet, aérobie stricte, Gram négatif, non sporogène, cytochrome-oxydase positive, mobile par cils polaires produisant les pigments de fluorescéine et de pyocyanine. L'absence de *P. aeruginosa* est importante non seulement du point de vue de son rôle en tant qu'indicateur, mais également parce qu'elle est un pathogène opportunisme dont la transmission est souvent associée à l'eau (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec).

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* n'a été enregistrée dans aucun échantillon testé. En Norvège une observation similaire a été rapportée par **Eli et Colin (2011)**. Par opposition à ces résultats ; 2.4% des eaux minérales naturelles non gazeuses, 3.6% des eaux embouteillées et 2.9% des eaux minérales naturelles non gazeuses examinées respectivement par **László-Varga (2011)**, **Venieri et al., (2006)** et **Tsai et Yu (1997)** ont été trouvées contaminées par *P. aeruginosa.*

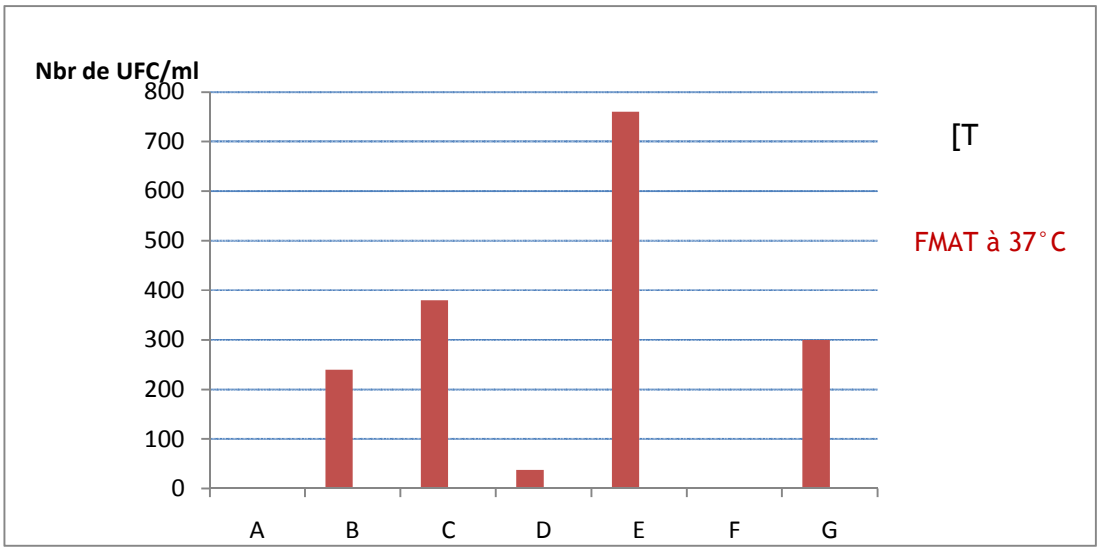
En effet il existe un risque minimal d'infection à *P. aeruginosa* chez la population générale si l'agent pathogène est présent dans l'eau embouteillée, elle doit être ingérée à un taux de 5.10^3 à 1.10^4 UFC/ml dans 2L d'apport quotidien pour avoir une chance de 1 sur 10000 de colonisation de l'intestin (**Rusin et al., 1997**). Malgré ce fait, la présence de *P. aeruginosa* dans l'eau minérale est considérée comme inacceptable, car elle est un pathogène opportuniste capable de provoquer des infections chez les consommateurs immunodéprimés (**Hunter, 1993**). La présence de *P. aeruginosa* signifie une contamination pendant le processus de mise en bouteille montrant ainsi un non-respect aux bonnes pratiques de fabrication ou que la source est devenue polluée par des matières organiques (**Venieri et al. 2006**).

Les anaérobies sporulés sulfito-réducteurs (clostridia) sont des micro-organismes qui font partie de la flore intestinale des humains et autres mammifères et, par conséquent, leur présence ou leur absence est largement utilisée pour évaluer la qualité sanitaire de l'eau. Donc leur absence au niveau des eaux embouteillé analysées indique que le risque de contamination fécale est très faible. Relativement peu d'auteurs ont examiné la présence de ces germes dans les eaux embouteillées ; ainsi **László Varga (2011)** n'a détecté aucune présence d'anaérobies sporulés sulfito-réducteurs (clostridia) sur 246 d'échantillons analysées d'eaux minérales non gazeuses commercialisées en Hongrie. Des observations similaires ont été rapportées par **Eli Otterholt et Charnock (2011)** concernant ces micro-organismes dans une récente étude portant sur la qualité microbiologique de 5 marques connues d'eaux embouteillées en Norvège.

Les micro-organismes revivifiables sont toute bactérie aérobie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans le milieu spécifié et dans les conditions d'essai décrites ci-dessus (Norme marocaine : PNM ISO 6222- 2006, Indice de classement NM 03.7.005). Ainsi ce qui concerne les germes revivifiables (à 22 et 37°C), l'évaluation des échantillons analysées a enregistré des non-conformités vis-à-vis des normes citées au dessus. On a constaté aussi une certaine proportionnalité entre les germes de 22°C et les germes de 37°C pour une même eau analysée. Le tableau 1 présente les différentes proportions trouvées pour chaque eau :

Tableau 1 : Proportions trouvées des germes revivifiables à 22 °C et à 37 °C dans les échantillons analysées

A : Eau de source naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
A1	0	0
A2	40	8
A3	0	0
A4	120	O
Moyenne	40	2
B : Eau minérale naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
B1	28	0
B2	$1.6\ 10^3$	568
B3	$2.4\ 10^2$	332
B4	66	60
Moyenne	$4.83\ 10^2$	$2.4\ 10^2$
C : Eau de source naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
C1	$1.6\ 10^2$	100
C2	-	560
C3	$8\ 10^2$	500
C4	103	75
Moyenne	$6.53\ 10^2$	$3.08\ 10^2$
D : Eau de source naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
D1	38	28
D2	0	0
D3	0	42
D4	3	81
Moyenne	10	38
E : Eau minérale naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
E1	$9\ .6\ 10^2$	880
E2	$6\ 10^2$	960
E3	40	0
E4	$1.6\ 10^3$	$1.2\ 10^3$
Moyenne	$8.\ 10^2$	$7.60\ 10^2$
F : Eau de Table	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
F1	0	0
F2	21	0
F3	0	0
F4	4	0
Moyenne	6	0
G : Eau minérale naturelle	**G.R à 22°C (UFC/ml**	**G.R à 37°C (UFC/ml**
G1	0	0
G2	$1\ .6\ 10^3$	0
G3	$8.\ 10^2$	$8.\ 10^2$
G4	$1.6\ 10^2$	$4.\ 10^2$
Moyenne	$6.4\ 10^2$	$3.\ 10^2$



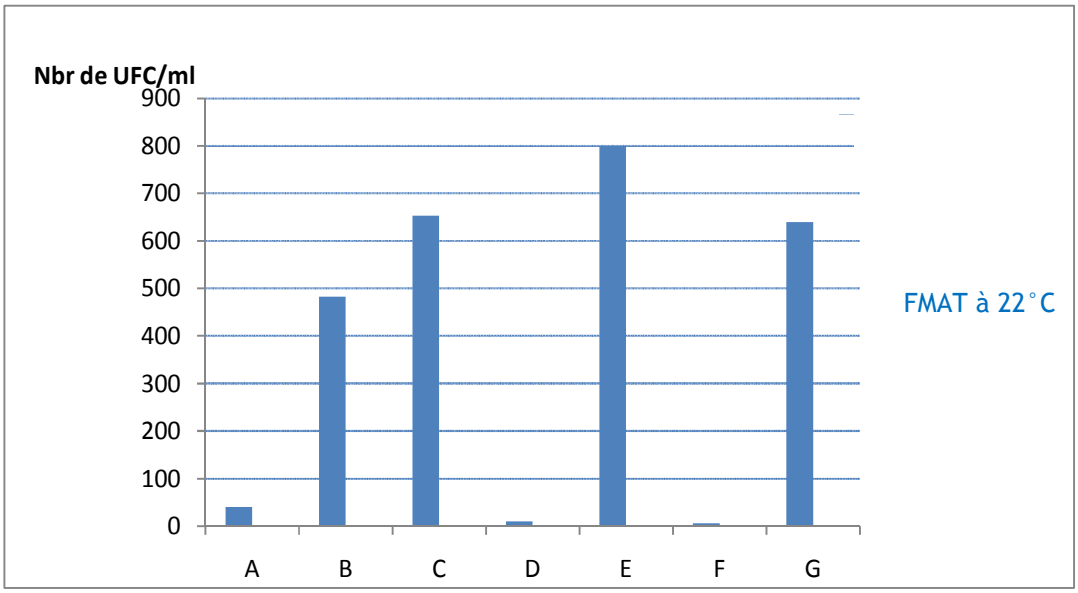


Figure 10 : Moyenne des germes revivifiables en fonction des eaux embouteillées analysées

Dans notre présente étude **43%** des eaux analysées pour la présence des germes aérobies mésophiles de 22°C dépassaient la limite fixée de 100 UFC/ml ; pour les germes de 37°C **53%** des eaux évaluées dépassaient la limite fixée de 20 UFC/ml. Cependant, un taux allant jusqu'à 10 fois le niveau ci-dessus fixé pourra être toléré. D'autres études ont examiné l'occurrence de ces germes dans les eaux embouteillées. Ainsi **Tsai et Yu (1997**) ont évalué 88 échantillons et 44 autres importées d'eaux minérales naturelles non gazeuses vendues à Taiwan et ont constaté que 45 échantillons nationaux (51.1%) et 29 échantillons de produits importés (60.4%) ont été supérieurs à la limite de 200 UFC/ml établie pour ce type de produit dans ce pays.
Zeenat et al. (**2009**) ont examiné la qualité microbiologique de 75 échantillons d'eaux minérales appartenant à 3 marques domestiques dans les iles de Fidji, et selon leurs résultats entre 28% et 68% des échantillons n'étaient pas conformes aux normes.
Les résultats de cette étude devraient être évalués en tenant compte que les échantillons testés étaient vendues dans des contenants en plastique (en PVC) (qui ont tendance à être plus perméables à l'oxygène et les vapeurs externes étrangères en comparaison avec les bouteilles en verre), entreposés dans des endroits (grandes surfaces et épiciers) ayant des températures voisinant les 20°C ainsi que l'effet potentiel du transport, ces différents paramètres cités

peuvent contribuer à une croissance bactérienne accrue de la flore autochtone (bactéries hétérotrophes) de l'eau. (fig. 11)

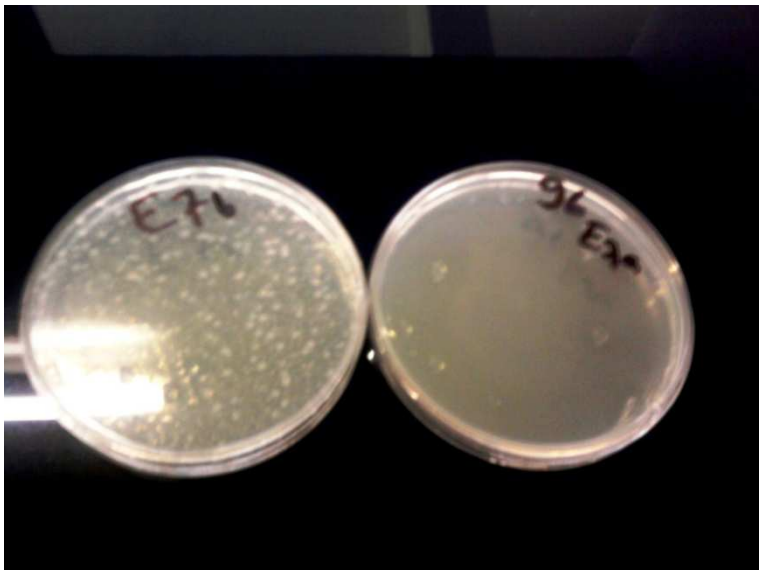


Figure 11 : Germes revivifiables dans la gélose à l'extrait de levure

La figure 11 illustre la différence relevée concernant la teneur en germes revivifiables entre 2 échantillons d'eau embouteillée appartenant à la même marque mais de provenance différente : Eau prélevée de l'épicier, (la boite de pétri à gauche de la figure) tandis que l'autre Eau venait directement de l'usine.

Les germes revivifiables identifiés (à 22 et 37°C) présentaient différentes formes, tailles et couleurs, ainsi on a constaté la présence de colonies rondes, dentelées, irrégulières, et incurvées. Les colonies énumérées présentaient des couleurs blanches et jaune, à noter aussi l'observation de quelques colonies au bord blanc et au fond jaune. Les colonies identifiées montraient 3 tailles différentes : Petites colonies : Colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm, Colonies moyennes : Colonies dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm et Grosses colonies : Colonies dont le diamètre est supérieur à 5 mm.

La coloration de Gram réalisée pour les colonies trouvées a montré la présence de bacilles Gram positifs, bacilles Gram négatifs et de cocci Gram positifs. Tous les bacilles Gram identifiés étaient fermentaires (Oxydase négative), tandis que les cocci Gram positifs étaient catalase positive.

Le test HPC (Heterotrophic Plate Count Bacteria : micro-organismes qui ont besoin de carbone organique pour leur croissance) ou numération des micro-organismes aérobies revivifiables est un test mondialement reconnu et utilisé pour mesurer la population bactérienne hétérotrophe dans les eaux destinées à la consommation humaine**.** L'eau en bouteille comme produit final contient rarement de micro-organismes pathogènes, mais elle peut contenir des bactéries hétérotrophes, qui peuvent proliférer au cours de l'embouteillage et de stockage à température ambiante.

Il existe un volume important d'informations dans la littérature sur les genres qui composent les populations des bactéries hétérotrophes énumérés dans l'eau potable.

Le tableau ci-dessous indique les genres souvent rapportés dans la littérature :

Tableau 2 : Genres des bactéries hétérotrophes couramment trouvées dans l'eau de consommation (Selon : **Martin et al., 2004**).

Acinetobacter	***Methylomonas***

Actinomycetesa	***Micrococcus***
Alcaligenes	***Mycobacteriuma***
Aeromonasa	***Morexella***
Aeromonas hydrophilaa	***Nitrobacter***
Arthrobacter	***Nitrosomonas***
Bacillus	***Nocardiaa***
Beggiatoa	***Proteus***
Citrobacter freundi	***Pseudomonas***
Corynebacterium	***P. cepacia***
Crenothrix	***P. fluorescens***
Desulfovibrio	***P. maltophilia***
Enterobacter agglomerans	***Serratia liquefaciens***
Enterobacter cloacae	***Sphaerotilus***
Escherichia coli	***Sphingomonas***
Flavobacterium	***Staphylococcus***
Flavobacterium meningosepticum	***Streptococcus***
Gallionella	***Streptomyces***
Hafnia alvei	***Yersinia enterocolitica***
Klebsiella pneumonia	

En plus des genres ci-dessus, les populations des bactéries hétérotrophes (HPC) de l'eau comprennent aussi de nombreux organismes pigmentés (orange, jaune, rose) qui sont difficiles à spécifier.

Bien que différentes études aient utilisé différentes techniques, en ce qui concerne l'identification des bactéries hétérotrophes, le spectre des espèces isolées et de leurs concentrations dans les eaux embouteillées a été généralement similaire à ceux présentés dans le tableau ci-dessous (**Edberg et Martin-Allen, 2004**) :

Tableau 3 : Analyse microbiologique de l'eau embouteillée : (Selon : **Edberg et Martin-Allen, 2004**)

Species name	**%Samples with species (concentration range CFU/ml)** **Botlled water (n=150)** [a]
Acinetobacter sp.	5 (2– 30)
Achromobacter sp.	5 (8– 31)
Agrobacterium sp.	2 (7– 12)
Bacillus brevis	0
Bacillus cereus	0
Bacillus licheniformis	0
Bacillus circulans	50 (1900–21,000)
Bacillus firmus	35 (600 –39,000)
Bacillus megaterium	15 (21– 4500)
Bacillus polymyxa	15 (18– 1700)
Bacillus pumilus	0
Bacillus sphericus	0
Bacillus macerans	25 (660 –68,000)
CEC Group IV (GRN) [d]	1 (45)
Corynebacterium sp.	10 (8– 40)

Coryneform sp.	0
Methanococcus	85 (30– 76,000)
Moraxella sp.	10 (3– 38)
Comamonas acidovorans	6 (1– 28)
Pseudomonas aeruginosa	3 (2– 26)
Burkholderia cepacia	3 (1– 15)
Pseudomonas fluorescens	12 (1– 65)
Comamonas testosteroni	2 (3– 10)
Staphylococcus sp.	2 (25– 600)
Streptomyces sp.	0
Xanthomonas maltophilia	2 (2– 22)
Total coliforms	2 samples 'Supermarket'[e] (2, TNTC[f])

(Source: From Edberg with permission.)
a : Échantillons d'eau embouteillée provenant des supermarchés.
d: Groupe non identifié de bacilles Gram négatif regroupés selon les caractéristiques biochimiques.
e : «Supermarché» se réfère à une eau en bouteille fabriquée et vendue par un supermarché.
f : TNTC (Too numerous to count) = Trop nombreuses pour être comptées.

Il est maintenant généralement admis que les bactéries hétérotrophes ne sont pas directement liées à des risques sanitaires pour la population en générale. Toutefois leur implication comme source potentielle d'infections chez les patients immunodéprimés reste non claire suite d'insuffisance de données pour cette évaluation. (**Eli Otterholt et Colin Charnock**, **2011**). Des souches spécifiques d'espèce microbiennes (*Aeromonas, Klebsiella, Pseudomonas*…) faisant partir des bactéries hétérotrophes de l'eau peuvent causer des infections chez certaines personnes vulnérables à savoir, les très jeunes enfants, les personnes âgées, la population immunodéprimés et les femmes enceintes. En outre, une présence importante de bactéries hétérotrophes peut indiquer des changements dans la qualité de l'eau et elle devrait être évaluée comme un élément déclencheur pour plus d'investigation (**EMG, 2003**).

3.2- Résultats d'analyse physico-chimique

L'analyse physico-chimique des 28 échantillons d'eaux embouteillées a porté sur 5 paramètres : la mesure des pH et conductivités ainsi qu'une évaluation qualitative de la teneur en cuivre, nitrate et nitrites. Le tableau ci-dessous présente les proportions trouvées pour chaque eau testée :

Eau embouteillée	pH	Conductivité (µS/cm)	Cuivre (mg/l)	Nitrite (mg/l)	Nitrate (mg/l)
A : Eau de source naturelle	7.930 – 7.973	518 - 520	‹0.5	‹0.05	‹10
B : Eau minérale naturelle	7 .973 – 7.848	235 - 238	‹0.5	‹0.05	‹10

C : Eau de source naturelle	7.723 – 7.801	620 - 620	‹0.5	‹0.05	‹10
D : Eau de source naturelle	8.158 – 8.175	354 - 355	‹0.5	‹0.05	‹10
E : Eau minérale naturelle	7.701 – 8.017	586 - 590	‹0.5	‹0.05	‹10
F : Eau de Table	7.760 – 7.803	193 - 194	‹0.5	‹0.05	‹10
G : Eau minérale naturelle	7 .702 – 7.813	1183 - 1184	‹0.5	‹0.05	‹10

Table au 4 : Résultats d'analyse physico chimique :

La mesure des paramètres physico-chimique révèle une concordance avec les normes nationales fixées (NM 03.7.001) pour la qualité de l'eau d'alimentation humaine.

Le pH (potentiel Hydrogène) mesure la concentration en ions H+ de l'eau. Il traduit ainsi la balance entre acide et base sur une échelle de 0 à 14. Ce paramètre caractérise un grand nombre d'équilibre physico-chimique et dépend de facteurs multiples, dont l'origine de l'eau. Selon la norme marocaine : NM 03.7.001(Qualité des eaux d'alimentation humaine) la valeur maximale admissible est 6,5<pH<8,5.

Ainsi pour la majorité des eaux analysées le pH était compris entre 7 et 8 (eaux souterraines et eaux de surface), en ce qui concerne la conductivité les mesures effectuées à 20°C nous ont permis d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau, les résultats de ces mesures montraient des différences suivant l'eau analysée ; les valeurs enregistrées pour les eaux minérales naturelles étaient relativement plus grandes que celles des eaux de sources naturelles et des eaux de tables, ce qui peut être expliqué par la teneur élevée des eaux minérales en matières dissoutes, à noter aussi que les valeurs enregistrées étaient inférieurs à 2700 µS/cm fixée par la norme nationale (NM 03.7.001) pour la qualité des eaux d'alimentation humaine.

Les nitrates (NO^-_3) et les nitrites (NO^-_2) sont des ions présents de façon naturelle dans l'environnement. Ils sont le résultat d'une nitrification de l'ion ammonium (NH_4^+), présent dans l'eau et le sol, qui est oxydé en nitrites par les bactéries du genre *Nitrosomonas*, puis en nitrates par les bactéries du genre *Nitrobacter*. Les nitrates sont très solubles dans l'eau; ils migrent donc aisément dans la nappe phréatique lorsque les niveaux excèdent les besoins de la végétation. La toxicité des nitrates résulte de leur réduction en nitrites et de la formation de méthémoglobine d'une part et de leur contribution possible à la synthèse endogène de composés N-nitrosés d'autre part. Le nitrate (NO3-) est la principale forme d'azote combiné trouvée dans les eaux naturelles. Il constitue le stade final de l'oxydation de l'azote. Le nitrite (NO2-) s'oxyde facilement en ion nitrate et, pour cette raison, il est rarement présent en concentration importante dans les eaux naturelles.

Les principales sources de rejet du nitrate sont les effluents industriels et municipaux ainsi que le lessivage des engrais inorganiques azotés utilisés pour fertiliser les terres agricoles. L'utilisation de fertilisants synthétiques et de fumiers, associée aux cultures et à l'élevage intensifs, favorise l'apparition de nitrates dans l'eau. Les installations septiques déficientes, de même que la décomposition de la matière végétale et animale, peuvent aussi être une source de

nitrates dans l’eau. Le risque de contamination est plus important si le sol recouvrant la nappe d’eau est vulnérable et si la nappe est peu profonde (puits de surface).
La concentration de nitrates dans l’eau potable peut être classée selon quatre catégories : inférieure à 0,2 mg-N/l (aucune influence humaine), entre 0,21 et 3,0 mg-N/l, (influence possible des activités humaines), entre 3,1 et 10 mg-N/l, (influence très nette des activités humaines mais sans impact apparent sur la santé), supérieure à 10 mg-N/l (impact majeur des activités humaines et effets possibles sur la santé) (Institut national de santé publique du Québec, Groupe scientifique sur l’eau, Fiche Nitrates/Nitrites, 2003).
Le cuivre est présent dans la nature sous forme de métal et sous forme de minéraux, surtout de cuprite (Cu_2O) et de malachite ($Cu_2CO_3(OH)_2$). Le cuivre peut se présenter sous forme de métal, sous deux états d'oxydation : le cuivre (I) et le cuivre (II). Il existe également une forme instable du cuivre(III). En solution aqueuse, le cuivre se trouve surtout sous la forme de l'ion cuivre(II), selon le pH, la température, la présence de bicarbonate et de sulfure et la possibilité de former des ligands avec des espèces organiques. Le cuivre et ses composés sont largement répandus dans la nature et l'on retrouve fréquemment du cuivre dans les eaux superficielles et dans certaines eaux souterraines. (Santé Canada, 1992)
Les mesures qualitatives des 3 ions cuivre, nitrites et nitrates étaient conformes aux informations mentionnées au niveau de l’étiquetage de la bouteille, et à la norme (NM 03.7.001) régulant les concentrations de ces substances dans une eau destinée à l’alimentation humaine. Pour le cuivre, nitrite et nitrate les valeurs maximales admises sont respectivement: 2 mg/l, 0.5 mg/l et 50 mg/l.

III- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les résultats des analyses bactériologiques ont montrés que les eaux analysées étaient **conformes** vis-à-vis de coliformes totaux et fécaux, entérocoques intestinaux, *Pseudomonas aeruginosa* et anaérobies sporulés sulfito-réducteurs.
Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) a montré que **43%** des eaux analysées dépassent la limite fixée par les normes nationales pour les germes revivifiables incubés à 37 ºC et **53%** pour la les germes revivifiables incubés à 37 °C.
Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré que les valeurs trouvées étaient **conformes** aux normes nationales ainsi que l'étiquetage mentionné sur la bouteille :

- ❖ Le pH mesuré a été entre **7.701** et **8.175.**
- ❖ La conductivité électrique a été comprise entre **193** et **1184** µS/cm.
- ❖ Les proportions du cuivre, nitrite et nitrate mesurées étaient respectivement: **‹0.5 mg/l, ‹0.05 mg/l** et **‹10 mg/l**.

Parmi les critères de qualité de l'eau de boisson en l'occurrence les eaux embouteillées, le paramètre bactériologique mérite la plus grande vigilance car il reflète le risque immédiat pour la santé du consommateur. Contrairement à ce beaucoup de gens croient, l'eau embouteillée n'est pas exempte de micro-organismes. La plupart de ces microbes proviennent de la source elle-même (bactéries autochtones, hétérotrophes, flore d'origine). Ces micro-organismes peuvent se proliférer au cours de la mise en bouteille et pendant le stockage à des températures ambiantes. Ils ne sont pas problématiques pour les consommateurs en bonne santé et ne conduisent pas à une contamination microbienne ou une altération de la saveur de ces produits. En revanche la présence de germes potentiellement pathogène (*Pseudomonas aeruginosa*) indique typiquement une contamination dans la source ou pendant le processus d'embouteillage ; cette présence souligne l'importance de la prudence quant à l'innocuité de ces produits, surtout pour les personnes vulnérables de la population. Toutefois, les risques devraient en aucun cas être exagérés.

Donc, pour assurer une bonne qualité de ces produits au près des consommateurs, nous proposons quelques recommandations à adopter afin de garantir cette qualité :

- ➢ La nécessité de la maitrise de la qualité au niveau des usines d'embouteillage par les producteurs et ceci par la mise en place, l'application et le maintien d'une ou des procédures permanentes fondées sur les principes d'HACCP ainsi que les lignes directrices de l'ISO, mieux que les normes rigoureuses de fabrication, afin de contrôler le processus de production et d'établir la qualité du produit final.
- ➢ La nécessité d'une surveillance plus systématique des eaux embouteillées par les autorités officielle chargées du contrôle des denrées alimentaires.

- Sensibilisation des vendeurs des eaux embouteillées au niveau des points de vente vis-à-vis des conditions d'entreposage. L'eau embouteillée devrait être entreposée dans un endroit propre, frais et sec qui se trouve à l'écart des sources de lumière.

VI- Références bibliographique :

- Articles scientifiques :

- Bharath, J., Mosodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, T., Thomas, K., Umamaheswaran, M., Simeon, D., Adesiyun, A.A., 2003. Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. International Journal of Food Microbiology, 81, 53– 62.
- Eli, O., Colin, C., 2011. Microbial quality and nutritional aspects of Norwegian brand waters. International Journal of Food Microbiology, 144, 455–463.
- Expert Meeting Group (EMG), 2003. Expert consensus. In: Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A. (Eds.), Heterotrophic Plate Counts and Drinking Water Safety. IWA Publishing, London, pp. 1–11.
- Hunter, P. R., 1993. The microbiology of bottled natural mineral waters. Journal of Applied Bacteriology, 74, 345-352.
- Kokkinakis, E. N., Fragkiadakis, G. A., & Kokkinaki, A. N; 2008. Monitoring microbiological quality of bottled water as suggested by HACCP methodology. Food Control, 19, 957-961.
- Laszlo, V., 2011. Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary. Food Control, 22, 591-595.
- Martin, J.A; Stephen, C.E; Donald, J.R; 2004. Heterotrophic plate count bacteria-what is their significance in drinking water?. International Journal of Food Microbiology, 92, 265– 274.

- Nsanze, H., Babarinde, Z., 1999; MICROBIOLOGICAL QUALITY OF BOTTLED DRINKING WATER IN THE UAE AND THE EFFECT OF STORAGE AT DIFFERNT TEMPERATURES. Environment International, 25, 53-57.
- RUSIN, P. A., ROSE, J. B., HAAS, C. N., & GERBA, C. P., 1997. RISK ASSESSMENT OF OPPORTUNISTIC BACTERIAL PATHOGENS IN DRINKING WATER. REVIEWS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, 152, 57-83.
- Stephen, C., Edberg., Martin, J.A., 2004. Virulence and risk from drinking water of heterotrophic plate count bacteria in human population groups. International Journal of Food Microbiology 92, 255– 263.
- Tsai, G.J., Yu, S.C., 1997. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. International Journal of Food Microbiology, 37, 137– 143.
- Venieri, D., Vantarakis, A., Komninou, G., Papapetropoulou, M., 2006. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated ("still") water from domestic brands in Greece. International Journal of Food Microbiology, 107 (1), 68–72.
- Warburton, D.W., Dodds, K.L., Burke, R., Johnston, M.A., Laffey, P.J., 1992. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. Canadian Journal of *Microbiology*, 38, 12– 19.
- ZEENAT, A., HATHA, A. A. M., VIOLA, L., VIPRA, K., 2009. BACTERIOLOGICAL QUALITY AND RISK ASSESSMENT OF THE IMPORTED AND DOMESTIC BOTTLED MINERAL WATER SOLD IN FIJI. JOURNAL OF WATER AND HEALTH, 7, 642-649.
- ALAMI T. LA MISE EN PLACE DE SYSTEME HACCP POUR L'EAU DE TABLE, ET PREPARATION DE L'ISO 22000. INGENIEURE QUALITE. ECOLE SUPERIEURE D'AGRO-ALIMENTAIRE 2008.

- Normes et circulaire :

- Circulaire conjointe numéro l du 9 mai 1983 du ministre de l'agriculture et de la reforme agraire et du ministre de la sante relative aux critères bactériologiques d'usage pour les eaux minérales naturelles.
- Norme Codex Alimentarius pour les eaux minérales naturelles : codex standard 108-1981.
- Norme générale (Codex Alimentarius) pour les eaux potables en bouteille/conditionnées (autres que les eaux minérales naturelles) : codex standard 227-2001.

- Norme marocaine (NM 03.7.001) : Qualité des eaux d'alimentation humaine.
- NORME MAROCAINE (PNM ISO 7899-2, 2006, INDICE DE CLASSEMENT NM 03.7.006) : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux.
- Norme marocaine (PNM ISO 6222- 2006, Indice de classement NM 03.7.005) : Qualité de l'eau - Dénombrement des microorganismes revivifiable Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé.
- Norme Marocaine (PNM ISO 6461-2, 2006 Indice de classement NM 03.7.004) : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia).
- Norme marocaine : (PNM ISO 9308-1-2005, Indice de classement NM 03.7.003) : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes.

- Sites web :

- EARTH POLICY INSTITUTE, 2006, Bottled Water: Pouring Resources Down the Drain, disponible sur:
  <http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2006/update51>

❖ Union fédérale des consommateurs française, Eau du robinet, eau de source, eau minérale, disponible sur :
<http://www.ufc-aix.org/textes/Dossier_Eaux.pdf>
❖ Institut national de santé publique du Québec (2002), Groupe scientifique sur l'eau, Fiche Entérocoques et streptocoques fécaux, disponible sur :
<http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/198CartableEau/Enterocoques.pdf>

❖ Santé Canada, 1992, Santé de l'environnement et du milieu de travail ; le cuivre, disponible sur : <
http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/copper-cuivre/index-fra.php>

Annexe

Composition des milieux de culture :

- **Gélose lactosée au tergitol et TTC :**

- Peptone pancréatique de viande	10,0 g/l
- Extrait de viande	5,0 g/l
- Extrait autolytique de levure	6,0 g/l
- Lactose	20,0 g/l
- Tergitol 7	0,1 g/l
- Bleu de bromothymol	50,0 mg/l
- Chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolium	25,0 mg/l
- Agar agar bactériologique	10,0 g/l

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

- **milieu urée tryptophane (urée indole) :**

- L-tryptophane	3 g/l
- Urée	20 g/l
- Monophydrogénophosphate de potassium	1 g/l
- Dihydrogénophosphate de potassium	1 g/l
- Chlorure de sodium	5 g/l
- Éthanol à 95 °GL	10 m/l
- Rouge de phénol	25 mg/l
- Eau distillée (qsp)	1 l

- **Gélose Slanetz et Bartley (M-entérococcus) :**

Tryptose	20,0 g/l
Extrait de levure	5,0 g/l
Glucose	2,0 g/l
Hydrogénophosphate dipotassique (K2HPO4)	4,0g/l

Azoture de sodium (NaN3)	0,4 g/l
Agar-agar	8 g à 18 g/l
Eau	1 000 ml

Une fois le milieu est stérilisé, refroidi jusqu'à une température de 50-60 °C, il est additionné par 10 ml d'une solution de TTC (1% de chlorure de 2, 3,5-triphényl tétrazolium 1g)

- **La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) :**

- Tryptone	17,00 g/l
- Peptone pepsique de viande	3,00 g/l
- Extrait autolytique de levure.	5,00 g/l
- Bile de bœuf bactériologique	10,00 g/l
- Chlorure de sodium.	5,00 g/l
- Esculine	1,00 g/l
- Citrate ferrique ammoniacal	0,50 g/l
- Azide de sodium	0,15 g/l
- Agar agar bactériologique	13,00 g/l

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,1.

- **Milieu SPS (Sulfite de sodium-Polymyxine-Sulfite de cystéine)** :

Caseine Peptone	15.50 g/l
Sulfadiazine	0.12 g/l
Yeast Extract	10.00 g/l
Polymyxin B Sulfate	0.01 g/l
Ferric Citrate	0.50 g/l
Sodium Sulfite	0.50 g/l
Bacteriological Agar	13.00 g/l

Final pH 7.0 ± 0.2 at 25ºC

- **Gélose à l'extrait de levure :**

- Tryptone	6,0 g/l
- Extrait autolytique de levure	3,0 g/l
- Agar agar bactériologique	10,0 g/l

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2

- **Gélose au cétrimide**:

- Peptone pancréatique de gélatine	20,0 g/l
- Cétrimide	0,3 g/l
- Chlorure de magnésium	1,4 g/l
- Sulfate de potassium	10,0 g/l
- Agar agar bactériologique	15,0 g/l

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

- **Milieu King A**

-peptone dite "A"	20,0 g/l
-glycérol	10,0 g/l
-sulfate de potassium	10,0 g/l
-chlorure de magnésium	1,4 g/l
-agar purifié	12,0 g/l

pH= 7.2, Ajouter 10 cm^3 de glycérol après autoclavage.