

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 50 (1959)

Heft: 3

Artikel: A propos de l'analyse colimétrique des eaux par la méthode des membranes filtrantes

Autor: Novel, E. / Burkard, P.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-983423>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 25.12.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

A propos de l'analyse colimétrique des eaux par la méthode des membranes filtrantes

Par *E. Novel* et *P. Burkard*

(Laboratoire cantonal d'analyses bactériologiques, Institut d'Hygiène, Genève)

Introduction

Nous nous sommes proposé de mettre en évidence, dans une série de travaux que nous publierons dans cette revue, les différents aspects des nombreux problèmes soulevés en colimétrie par l'emploi des membranes filtrantes.

La littérature concernant la technique, la valeur et la précision de la méthode est, à partir de 1952, extrêmement abondante. Nombre d'auteurs se sont occupés de l'un ou l'autre des points particuliers de la question. Les conclusions qu'ils apportent sont des plus variées, mais différent grandement selon les expérimentateurs.

C'est pourquoi, il nous a paru utile de faire – autant qu'il se pouvait – le tour du problème en analysant chaque chef pour son propre compte, en conduisant méticuleusement les expériences sur le moindre détail technique si ce dernier paraissait avoir une incidence quelconque sur l'exactitude des résultats.

Nous allons donc étudier successivement, dans divers chapitres particuliers, la méthode elle-même, puis les limites de sa précision, sa valeur enfin dans l'analyse générale quantitative ou colimétrique des eaux.

Description de la méthode

Nous avons employé la méthode des membranes filtrantes décrite en particulier par *Buttiaux, Muchemble et Leurs* ¹⁾, *Taylor, Burmann et Oliver* ²⁾, *Thomann* ³⁾⁴⁾, *Clark et Kabler* ⁵⁾, et enfin, du point de vue des détails techniques, par *Ljutov* ⁶⁾.

1.1. Appareil et technique de filtration

L'appareil est semblable à un appareil à filtrer sous le vide. Seul le filtre en verre fritté est remplacé par une membrane filtrante, à caractéristiques bactériologiques, disposée sur une plaque en métal poreux. L'appareil est muni de deux entonnoirs de capacités différentes: le premier, cylindrique, permet de filtrer des volumes inférieurs à 50 cm³; le second, en forme de cône tronqué, permet de filtrer des volumes atteignant 750 cm³. Ces deux entonnoirs sont facilement interchangeables et reposent sur la périphérie de la membrane filtrante. L'étanchéité est assurée par une baque de serrage.

Tout l'appareil est en métal; l'action inhibitrice de ce dernier sur les bactéries, pendant toute la durée de la filtration, est négligeable, bien que *Ljutov* ⁶⁾,

étudiant ce phénomène pendant des temps de contact qui excèdent de beaucoup la durée d'une filtration, ait mis en évidence une action bactéricide. Nos expériences, comme nous le verrons plus loin, démontrent que l'action inhibitrice du métal, à condition que le temps de contact n'excède pas environ une à deux minutes (temps nécessaire à la filtration d'un litre d'eau) est négligeable.

Il est indispensable à notre avis de recouvrir le haut des entonnoirs soit avec un couvercle de boîte de Pétri de diamètre approprié, soit avec un couvercle de papier d'étain, pour éviter autant qu'il se peut les contaminations aériennes en cours de filtration.

La technique de filtration est des plus simples: pour des volumes compris entre 10 et 50 cm³, on se sert de l'entonnoir cylindrique, de petite dimension; pour des volumes supérieurs, de l'entonnoir conique. Le volume d'eau à filtrer est introduit, dans ces conditions, directement dans l'entonnoir, par exemple au moyen d'une pipette dont la partie effilée est appliquée contre la paroi verticale de l'entonnoir.

Pour des volumes d'eau à analyser inférieurs à 10 cm³, il convient d'introduire préalablement dans l'entonnoir 20 cm³ d'eau distillée stérile, si l'on utilise le petit entonnoir, ou 500 cm³ si l'on emploie le grand entonnoir. On verse ensuite la quantité exacte d'eau à analyser. Il est inutile d'agiter l'appareil afin d'obtenir une meilleure répartition, celle-ci s'opérant d'elle-même, comme le démontre la dispersion uniforme des colonies sur le milieu après filtration et incubation.

Dans toutes nos expériences concernant des suspensions pures d'*Escherichia coli* ou d'*Aerobacter aerogenes*, nous avons travaillé dans les conditions décrites ci-dessus et ceci avec des volumes généralement inférieurs à 10 cm³. Lors de chaque prélèvement, la pipette stérile (ou la seringue automatique) est rincée 3 fois avec la suspension microbienne, elle-même agitée, avant de prélever le volume désiré.

C'est en prenant ces précautions que nous sommes arrivés aux résultats les plus reproductibles.

Stabilité de la concentration en germes d'une suspension monomicrobienne

Ayant l'intention, dès le début de nos expériences, de travailler avec une même suspension monomicrobienne pendant une durée pouvant atteindre 3 à 4 heures, il était indispensable de prouver, comme il est généralement admis, que la concentration en germes ne varie pratiquement pas durant ce temps, à condition de conserver la suspension à des températures de 3 à 4° C.

Partant d'une suspension titrant environ de 50 à 100 germes par cm³ (dans de l'eau physiologique), nous avons filtré sur membrane des volumes déterminés, immédiatement après la mise en suspension des germes, puis après deux, trois et enfin quatre heures d'écart. Les résultats sont consignés dans le tableau 1:

Tableau 1

Variation de la concentration en germes d'une suspension monomicrobienne maintenue à 4° C, en fonction du temps

Suspension	Temps entre chaque filtration	volume filtré	Nombre de colonies par membranes filtrantes, sur milieu Endo Difco				
			I	II	III	IV	Moyenne
I	heures	cm ³					
	0 — 0	0,5	24	27	38	32	30
	0 — 2	0,5	26	33	29	35	31
	0 — 3	0,5	35	20	40	45	35
II	0 — 0	1,0	50	59	52	64	55
	0 — 2	1,0	60	50	41	61	53
	0 — 4	1,0	50	57	48	52	52
III	0 — 0	1,5	116	127	118	122	121
	0 — 3	1,5	121	125	115	101	116

Remarques: Les suspensions I, II, III sont différentes quant à leur teneur en germes. Les colonies sur les membranes filtrantes ont un aspect typique (reflet métallique): voir paragraphes suivants.

Conditions techniques: Suspension de départ: nous diluons au 1/10 dans de l'eau physiologique, 4 fois successivement une culture de 16 heures d'E. coli 20994 (souche collection) (à 37°). Nous portons ensuite 0,8 cm³ de cette suspension dans 800 cm³ d'eau physiologique stérile. Cette suspension est maintenue à la température de la glace fondante (température effective contrôlée: de 3 à 4° C) et agitée avant chaque prélèvement effectué, soit au moyen d'une pipette stérile rincée 3 fois, soit au moyen d'une seringue automatique, également rincée 3 fois. Pour chaque expérience, nous faisons 4 filtrations sur membranes filtrantes et prenons la moyenne des 4 résultats obtenus comme chiffre caractéristique de l'expérience.

Il ressort de l'examen du tableau 1 que les suspensions microbiennes peuvent être stockées au frigorifique à une température de 3 à 4° C, ou à la température de la glace fondante (pratiquement la température de la suspension est également de 3 à 4° C), sans qu'il y ait une variation quelconque, quant au nombre des germes contenus dans un volume déterminé, et ce pour une durée de 3 heures, voire de 4 heures.

Cette constatation nous a permis d'entreprendre des expériences d'une durée assez longue allant jusqu'à 3 heures, parfois jusqu'à 4 heures, mais ne dépassant jamais ce laps de temps.

Stérilisation de l'appareil

Nous stérilisons l'appareil à l'autoclave avant chaque série de filtrations. Entre chaque filtration l'appareil, en particulier les parois internes de l'entonnoir et la plaque poreuse, est stérilisé soit par flambage soit par rinçage à l'eau stérile.

Dans le but d'étudier d'une façon aussi précise que possible l'influence du mode de stérilisation de l'appareil au cours d'une série de filtrations, nous avons fait les expériences suivantes, dont les résultats sont collationnés dans le tableau 2:

a) en partant d'une même suspension microbienne pour chaque série d'expérience, nous filtrons un volume donné suivant la méthode précédemment décrite. Après chaque filtration l'appareil, en particulier l'entonnoir et la plaque poreuse, est stérilisé soit par flambage au moyen d'un tampon de gaze hydrophile imbibé d'alcool et enflammé (méthode préconisée par *Butiaux* et al.¹⁾ et par *Ljutov*⁶⁾, soit par rinçage avec 100 cm³ d'eau distillée stérile. Dans la méthode utilisant le flambage, nous ne pouvons que déconseiller l'emploi de coton hydrophile imbibé d'alcool: il se dépose en effet de nombreux fragments de fibres sur les parois de l'entonnoir. Ces fibres, lors de la filtration, sont entraînées sur la surface de la membrane filtrante. Elle rendent la lecture malaisée après incubation: en effet les colonies atteignant les fragments de fibres ont tendance à se développer le long de celles-ci; de ce fait elles confluent rapidement entre elles.

En établissant la moyenne du nombre des colonies lors des filtrations effectuées dans ces conditions, il est possible de juger de l'identité des résultats des séries comportant des modes de stérilisation différents (tableau 2, suspension I et II).

b) Nous avons ensuite essayé de mettre en évidence les bactéries qui pourraient éventuellement être encore présentes à la surface des parois de l'entonnoir après filtration. A cet effet, nous introduisons après filtration de la suspension monomicrobienne et après avoir enlevé la membrane sur laquelle sont déposées les bactéries de cette suspension, une nouvelle membrane stérilisée. Nous rinçons l'appareil avec 50 cm³ d'eau stérile (petit entonnoir: tableau 2, suspension II, III et IV) dans le cas de filtration de volumes inférieurs à 50 cm³ et avec 500 cm³ d'eau distillée stérile pour le grand entonnoir (tableau 2, suspension V).

c) Enfin, devant les résultats inattendus constatés déjà avec la suspension II, résultats prouvant que la quantité de germes restant sur les parois de l'entonnoir était infime, nous avons, pour les suspensions III et IV, essayé de filtrer des séries de suspensions de même concentration sans stériliser l'appareil entre chaque filtration, et ceci pour des séries de 8 filtrations.

Les résultats obtenus au cours de ces différentes expériences sont transcrits dans le tableau 2. Nous indiquons (brièvement) ci-dessous les données techniques concernant ces expériences:

Suspension de départ: culture de 16 heures à 37° d'*E. coli* 20994 en bouillon Difco, diluée au $\frac{1}{10}$ quatre fois de suite. 0,8 cm³ de la dernière dilution (soit 10⁻⁴) sont portés dans 800 cm³ d'eau physiologique stérile. Cette suspension, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, est maintenue à environ 4°; elle est agitée avant chaque prélèvement. Après filtration, les membranes sont déposées sur de la gélose Endo Difco répartie en boîtes de Pétri de 14 et 21 cm de diamètre. Elles permettent d'incuber respectivement 4 ou 8 filtres par Pétri.

Incubation: 20 heures à 37°.

Les suspensions de I à V sont différentes les unes des autres, ce qui explique leurs diverses teneurs en germes par cm³.

Remarquons encore que le volume de la suspension (1 ou 2 cm³) est réparti dans 20 cm³ pour le petit entonnoir et 500 cm³ pour le grand entonnoir (eau physiologique stérile). Nous avons décrit plus haut la méthode en détail.

Voir tableau 2 (page 193)

Conclusions

Il résulte des expériences collationnées dans le tableau 2 que:

a) le mode de stérilisation de l'appareil en cours de filtration (flambage ou rinçage) n'a pas d'influence sur les résultats.

b) le nombre de bactéries pouvant rester adhérentes sur la surface de l'entonnoir de filtration est *infime* (2 au maximum), tout au moins pour des suspensions microbiennes à filtrer ne comportant par filtration que 50 à 150 germes. Même si l'on ne stérilise pas l'appareil entre chaque filtration, la concordance est parfaite pour des séries de 8 filtrations faites l'une à la suite de l'autre (pratiquement environ en 20 minutes).

Remarquons enfin que nous stérilisons tout l'appareil à l'autoclave (20 minutes à 120°) avant chaque série de filtrations.

Malgré la quantité infime de bactéries restant sur les parois de l'entonnoir après filtration, particularité imprévue et inattendue permettant peut-être d'envisager des séries de filtrations sans stérilisation entre chaque filtration, nous avons toujours stérilisé l'appareil (parois intérieures de l'entonnoir, couvercle et plaque poreuse) en le flambant au moyen d'un tampon de gaze hydrophile imbibé d'alcool.

Notons enfin que nous avons essayé de mettre en évidence les germes éventuellement présents sur les parois internes de l'entonnoir et sur la plaque poreuse en coulant de la gélose nutritive fondue et refroidie aux environs de 50° à l'intérieur même de l'entonnoir. L'incubation a été conduite à 20° afin de déceler également les germes saprophytes. Cette expérience répétée à deux reprises a démontré qu'aucun microorganisme quelconque n'avait pu se développer. Nous ne pensons cependant pas que cette méthode soit appropriée, car le métal avec lequel est conditionné l'appareil exerce très probablement un effet inhibiteur sur la croissance des germes éventuellement présents, effet d'autant plus marqué que la période d'incubation a été de 10 jours.

Tableau 2
Influence du mode de stérilisation de l'appareil

Sus- pension	Filtration	Stérilisation par flambage			Stérilisation par rinçage			Pas de stérilisation	
		Nomb. colon.	Moyenne	A	Nomb. colon.	Moyenne	A	Nomb. colon.	Moyenne
I (1 cm ³) par fil- tration	1	92			94				
	2	107			91				
	3	100			92				
	4	84			93				
	5	89			102				
	6	84	92		94	96			
	7	88			91				
	8	87			97				
	9	105			99				
	10	99			99				
	11	81			106				
	12	95			96				
II (2 cm ³)	1	150		0	157		1		
	2	167		0	172		0		
	3	153		0	157		0		
	4	161	161	0	165	160	0		
	5	162		1	151		1		
	6	153		0	152		0		
	7	168		0	155		0		
	8	173		2	165		0		
	9	164		0	168		0		
III (2 cm ³)	1	152		0	136		0	135	
	2	136		0	153		0	134	
	3	152		0	144		0	140	
	4	137	145	0	141	142	0	141	140
	5	153		0	156		0	141	
	6	144		0	138		0	137	
	7	149		0	131		0	133	
	8	136		0	136		0	156	
IV (1 cm ³)	1	52		2	62		2	51	
	2	48		0	56		1	50	
	3	52		0	57		1	55	
	4	60	54	0	65	58	0	65	55
	5	68		0	59		1	68	
	6	51		0	54		0	47	
	7	53		1	55		0	51	
	8	51		0	56		0	55	
Expériences avec grand entonnoir									
V (1 cm ³)	1	100		0					
	2	98		0					
	3	104		1					
	4	95	99	0					
	5	98		0					
	6	103		0					
	7	88		1					
	8	107		0					

Remarque: A: Rinçage de l'entonnoir en présence d'une nouvelle membrane stérile (nombre de germes adhérent aux parois)
a) suspensions de I à IV: petit entonnoir, rinçage avec 50 cm³
b) suspension V: grand entonnoir, rinçage avec 500 cm³.

Membranes filtrantes

Type employé

Nous employons exclusivement des membranes filtrantes du type suivant: M.F. Co 5 Göttingen de 48 mm de diamètre.

D'après *Helmcke* ⁷⁾, les membranes filtrantes ont une texture irrégulière: présence de bulles, en particulier. Cependant cet auteur a constaté que ces irrégularités sont sans influence sur la filtration d'une suspension d'E. coli.

Stérilisation des membranes filtrantes

Clark et *Kabler* ⁵⁾ recommandent de stériliser les membranes filtrantes dans un courant d'oxyde d'éthylène et d'en enlever l'excès par un courant d'air filtré. *Kabler* ⁸⁾ stérilise les filtres à l'autoclave, alors que *Ljutov* ⁶⁾ assure que la température de 120° détériore les membranes filtrantes, ou tout au moins, modifie leurs caractéristiques: le temps de filtration d'un volume donné d'eau sous une pression constante augmente sensiblement avec des membranes stérilisées à l'autoclave. Cet auteur, ainsi que *Buttiaux* et al. ¹⁾ stérilisent les membranes filtrantes dans de l'eau distillée portée à ébullition pendant 15 à 20 minutes.

Nous avons fait les expériences suivantes en vue de déterminer une méthode de stérilisation qui, d'une part, ne détériore pas les membranes, qui d'autre part, soit satisfaisante du point de vue bactériologique et qui enfin ne puisse gêner en rien la lecture des résultats:

- a) *stérilisation de la membrane insérée dans l'appareil à l'autoclave*: L'aspect du filtre n'est pas modifié à l'examen direct, mais il se produit une réoxydation de la fuchsine presque immédiatement sur toute la surface de la membrane, lorsque celle-ci est appliquée à même la surface du milieu d'Endo. La couleur rouge résultant de cette réoxydation rend malaisée, sinon impossible, la différenciation des colonies microbiennes.
- b) *stérilisation des membranes séparément à l'autoclave dans des boîtes de Pétri sèches*. Pour éviter que les membranes ne collent entre elles, il est nécessaire de placer une seule membrane par boîte de Pétri. Cette méthode, comme nous l'avons déjà vu, est condamnée par *Ljutov* ⁶⁾.
- c) *stérilisation dans de l'eau distillée à ébullition pendant 15 minutes*.

Nous avons adopté ce dernier procédé car il est employé par la plupart des auteurs, il est simple, et nous n'avons jamais constaté de contaminations lors des essais avec des souches pures (par exemple E. coli).

Les membranes filtrantes sont disposées à la surface de l'eau de stérilisation contenue dans un récipient assez large (par exemple becher de 12 cm de diamètre et de 10 cm de profondeur). On les enfonce dans l'eau en prenant garde que la surface entière de la membrane soit d'un seul coup recouverte d'eau. Ce procédé évite d'avoir des membranes pliées et racornies, impropres à être appliquées facilement à la surface du milieu nutritif.

Le temps apporté à la stérilisation des membranes est sans influence sur les résultats quantitatifs, comme le démontrent les séries de filtrations suivantes (tableau 3).

Tableau 3
Influence du temps de stérilisation
(eau distillée à ébullition)

Durée de la stérilisation	5'	7'	9'	11'	13'	15'	17'	19'
Suspension I								
Nombre de col. par M.F.	152	136	152	137	153	144	149	136
Suspension II								
Nombre de col. par M.F.	136	153	144	141	156	138	131	136

Suspension de départ: Culture d'E. coli de 16 heures à 37° en bouillon Difco, diluée au 1/10 4 fois de suite dans de l'eau physiologique stérile. 0,8 cm³ de la dernière dilution sont portés dans 800 cm³ d'eau physiologique stérile maintenue à 4°. Filtration de 2 cm³ à chaque essai. Les filtres sont introduits dans de l'eau distillée à ébullition. Après 5 minutes, on effectue la première filtration, 2 minutes plus tard la deuxième et ainsi de suite. Incubation: sur milieu Endo Difco 20 heures à 37°.

Influence des membranes filtrantes sur l'aspect macroscopique des colonies microbiennes

Les membranes filtrantes ne sont certainement pas sans influence sur l'aspect macroscopique des colonies microbiennes. Les colonies sont en effet généralement plus petites sur M.F. que sur le milieu lui-même. D'autre part, sur le milieu E.M.B. par exemple, l'aspect colonial est nettement différent. Le milieu E.M.B. perd, par interposition d'une membrane filtrante, ses propriétés de différenciation sélective des coliformes.

Sur le milieu Endo Difco, nous avons constaté que certaines membranes, après une incubation de 20 heures à 37°, présentaient une coloration rouge assez foncée, nettement différente de la coloration mauve-violacé clair habituelle. Cet aspect différent n'a pas de répercussion sensible sur les résultats quantitatifs (avec une suspension d'E. coli) mais par contre *l'aspect macroscopique des colonies d'Escherichia coli n'est plus caractéristique: le reflet métallique typique n'existe plus.*

Nous avons pensé que, pour des raisons inconnues, les membranes filtrantes elles-mêmes pouvaient réoxyder la fuchsine réduite. Pour éviter cet inconvénient, qui oblige à rejeter dans la pratique courante de l'analyse colimétrique tout filtre présentant une coloration foncée, nous avons stérilisé les membranes filtrantes dans une solution aqueuse comportant 0,1 % de sulfite de Na.

Cette adjonction ne supprime pas l'apparition de membranes filtrantes foncées, comme le montrent les résultats suivants (tableau 4).

Remarquons encore que ce phénomène ne se produit pas toujours: il semble être en rapport avec certains lots de fabrication des membranes.

Tableau 4

Suppression éventuelle des membranes filtrantes foncées sur milieu d'Endo Difco par adjonction de sulfite de soude à l'eau de stérilisation

Eau de stérilisation avec sulfite		Eau de stérilisation sans sulfite	
Nombre de colonies par M.F.	Aspect des M.F.	Nombre de colonies par M.F.	Aspect des M.F.
152	foncé	153	foncé
136	clair	144	clair
142	foncé	141	foncé
137	foncé	136	clair
156	clair	136	foncé
138	foncé	153	foncé
131	foncé	144	clair
136	foncé	141	clair

Même suspension pour toute l'expérience, E. coli 20994, filtration de 2 cm³ par M.F. Incubation 20 heures à 37° sur milieu Endo Difco, réparti en boîte de Pétri de 21 cm de Ø (8 M.F. par boîte.)

Filtration des échantillons à analyser

Technique

L'appareil étant stérilisé par flambage (ou à l'autoclave au début d'une série de filtrations), nous portons aseptiquement la membrane filtrante (elle-même stérilisée par un séjour de 15 minutes dans de l'eau bouillante) sur la plaque poreuse de l'appareil à filtrer, l'entonnoir supérieur étant légèrement soulevé. On ajuste ensuite ce dernier en prenant garde que la membrane ne soit pas repliée sur ses bords. Dans ce cas, en effet, l'étanchéité n'est pas absolument garantie et il est possible qu'une partie de l'eau à analyser s'écoule ailleurs qu'au travers de la membrane filtrante. On serre ensuite la bague et l'on introduit dans l'entonnoir, en prenant soin de fermer le robinet situé sous la plaque poreuse, la quantité d'eau à analyser, quantité qui sera fonction de la concentration présumée en germes (soit de 10 à 1000 cm³). Pour des quantités inférieures, on introduit au préalable de l'eau distillée stérile dans l'entonnoir.

On ouvre ensuite le robinet. On filtre sous un vide peu poussé. Après filtration on dispose la membrane, qui ne doit pas être trop humide, sans la retourner, sur le milieu nutritif. Il ne doit pas y avoir de bulles d'air incluses entre le filtre et le substratum nutritif. Le milieu solide – il s'agissait toujours dans nos expériences de milieu gélosé – atteint les bactéries par capillarité au travers de la membrane filtrante.

La température d'incubation varie suivant les auteurs et suivant le but que ces derniers cherchent à atteindre: *Buttiaux*, *Muchemle* et *Leurs* ¹⁾ incubent à deux températures: 37° pour la totalité des coliformes et 44° pour le seul E. coli.

Les auteurs américains incubent à une seule température: 37°. *Henriksen* ⁹⁾¹⁰⁾ utilise pour les coliformes en général la température de 30° et pour le seul *E. coli* la température de 39°.

Les temps d'incubation varient de 18 à 24 heures suivant les auteurs. Remarquons d'ores et déjà que temps d'incubation et température d'incubation doivent être en rapport étroit.

Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur différents milieux et temps d'incubation choisis

Travaillant généralement dans cette première partie de nos essais avec une souche pure d'*E. coli*, soit éventuellement avec une souche pure d'*A. aerogenes*, également, nous avons choisi la température de 37°. Les temps d'incubation ainsi que l'aspect macroscopique des colonies d'*E. coli* sont les suivants sur M.F.:

<i>Milieu Endo Difco:</i> 20 heures	colonies rondes, lisses, régulières, humides, légèrement bombées, pourpre foncé avec reflet métallique très net en lumière rasante. Diamètre variant suivant la richesse en germes de la suspension microbienne: de 1 à 3 mm.
<i>Milieu E.M.B. Difco:</i> 24 à 30 heures	petites colonies rose, violacé, rondes, régulières, humides, bombées. Centre souvent dépressé. Pas de reflet métallique: colonies donc atypiques, comparées à celles obtenues sur milieu E.M.B. sans M.F. (<i>Buttiaux et al.</i> ¹⁾).
<i>Milieu McConkey:</i> 18 à 20 heures	colonies rondes, 2 mm ϕ , régulières, humides, plus ou moins bombées, jaune-rose sur fond rose. Les colonies ont tendance à confluer.
<i>Milieu Désoxycholate:</i> Difco 20 heures	colonies rondes, de 1 à 2 mm ϕ , légèrement bombées, opaques, jaunâtres, centre souvent plus foncé.
<i>Gélose lactosée au pourpre de bromo-crésol:</i> 18 à 20 heures	colonies rondes, de 1 à 2 mm ϕ , humides, jaune citron sur un fond presque blanc, centre parfois vert olive.
<i>Gélose simple:</i> 18 à 20 heures	colonies rondes, de 1 à 2 mm ϕ , bombées, translucides, régulières.
<i>Gélose lactosée au chlorure de triphényl-tétrazolium:</i> 18 à 20 heures	colonies rondes, de 1 à 2 mm ϕ , peu bombées, humides, régulières, rose pâle.
<i>Gélose lactosée au chlorure de triphényl-tétrazolium + tergitol 7:</i> 18 à 20 heures	même aspect colonial que pour le milieu ci-dessus, mais colonies jaune pâle. L'adjonction de tergitol a donc une influence sur la couleur et, d'autre part, souvent sur la grandeur des colonies qui atteignent jusqu'à 3 mm ϕ .

L'aspect macroscopique d'*Aerobacter aerogenes* est le suivant sur les milieux que nous avons étudiés:

<i>Gélose Endo Difco:</i> 18 à 20 heures	grosses colonies, fortement bombées, muqueuses, de 3 à 4 mm ϕ , pourpre foncé, sans reflet métallique.
---	---

Gélose lactosée au chlorure de triphényl-tétrazolium + *tergitol 7*:
grosses colonies, fortement bombées, muqueuses, de 3 à 4 mm ϕ , jaune-orangé avec centre orangé assez foncé.
18 à 20 heures

Les colonies d'*Aerobacter*, pour autant qu'elles soient assez rapprochées l'une de l'autre, ont tendance à confluer.

Milieux employés

1. *Gélose simple* (Nutrient Agar Difco)

Les colonies microbiennes sont relativement peu visibles sur ce milieu, après incubation sur membranes filtrantes. Nous colorons donc ces dernières par une solution de vert malachite à 1 % dans de l'eau. Les membranes filtrantes sont disposées sur une plaque d'amiante assez épaisse, dont la base baigne dans la solution de colorant: la matière colorante atteint les colonies par capillarité. Lorsque les colonies sont vert foncé sur un fond plus clair, les membranes sont successivement placées sur plusieurs plaques d'amiante imbibées d'eau distillée. L'excès de colorant est ainsi facilement éliminé. Après séchage, les colonies apparaissent en vert foncé, voire en noir sur un fond vert clair. La lecture des membranes filtrantes est ainsi facilitée.

Nous avons employé ce milieu uniquement comme milieu de référence, c'est-à-dire comme milieu non inhibiteur, avec des souches pures (par exemple *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*). Il semble en effet que, théoriquement, chaque bactérie vivante déposée sur une membrane filtrante soit capable de donner une colonie visible, à condition évidemment que la survie de cette bactérie dépasse le temps nécessaire au milieu pour l'atteindre par capillarité et à condition que le milieu convienne à la croissance du germe. Cette dernière condition nous a semblé remplie par un milieu riche, non inhibiteur, tel par exemple la gélose simple.

Nous tenterons, dans un prochain article, de démontrer que les résultats sur M.F. sont comparables aux résultats obtenus par les méthodes classiques d'ensemencement sur plaques de Pétri en milieux non inhibiteurs.

2. *Gélose simple lactosée* (Nutrient Agar Difco + lactose 1 %)

Milieu employé dans le même but que le précédent d'une part et d'autre part pour étudier l'influence éventuelle du lactose comme facteur de départ.

3. *Gélose lactosée au pourpre de bromo-crésol* (Nutrient Agar Difco + lactose 1 % + pourpre de bromocrésol 0,025 %)

Ce milieu, employé d'une façon générale en vue de l'analyse coprologique, permet de mettre facilement en évidence les bactéries lactose positives, mais a certainement l'inconvénient, dans l'analyse colimétrique, de ne pas être suffisamment sélectif, en particulier lorsque la température d'incubation est inférieure à 37°. Dans ce cas la plupart des microbes saprophytes peuvent se développer et rendent la lecture des filtres membranes difficile.

4. Milieu d'Endo (Bacto Endo Agar Difco)

*Endo*¹¹⁾ décrit le premier un milieu contenant de la fuchsine décolorée par du sulfite de sodium, milieu permettant de mettre en évidence les bactéries fermentant le lactose. Les coliformes en effet donnent des colonies violet foncé à reflet métallique, les germes ne fermentant pas ce sucre, des colonies rose clair. *Endo* admettait un virage alcali-acidimétrique. Comme l'ont montré *Margolena* et *Hansen*¹²⁾, *Neuberg* et *Nord*¹³⁾, la réaction n'est pas due à un virage alcali-acidimétrique, mais à une réoxydation de la fuchsine réduite, réoxydation imputable à l'acétaldéhyde, terme intermédiaire de la fermentation du lactose. *Kruse*¹⁴⁾ recommande l'emploi du milieu d'*Endo* pour la colimétrie sur membranes filtrantes. *Clark* et *Kabler*⁵⁾ préconisent le dosage biologique exact de la quantité de sulfite rajouté pour obtenir une décoloration qui permette, par des essais successifs avec une souche typique d'*E. coli*, la croissance de colonies caractéristiques à reflet métallique. *Papavassiliou*¹⁵⁾ admet que le milieu d'*Endo* présente de inconvénients. *Uüllers*¹⁶⁾ en identifiant 239 colonies qui présentaient sur milieu d'*Endo* un aspect caractéristique, en a trouvé seulement 128 qui étaient réellement des *E. coli* typiques; 48 étaient des *E. intermedium*, 18 des *E. freundii*, 5 des *Aerobacter aerogenes* et 21 même n'appartenaient pas au groupe des *Enterobacteriaceae*. *Kabler* et *Klark*¹⁷⁾ recommandent le milieu d'*Endo* pour la mise en évidence des *Escherichia* et *Aerobacter*, tous ces germes donnant, d'après ces auteurs, des colonies à reflet métallique. *Braune*¹⁸⁾ enfin, trouve que 88 % seulement des colonies typiques isolées sur ce milieu possédaient les caractères d'*E. coli* authentique.

Il ressort de cette courte bibliographie que les avis diffèrent d'un auteur à l'autre: certains n'isolent que les *E. coli*, d'autres tous les coliformes. Ces différences doivent probablement provenir des méthodes de préparation de la gélose d'*Endo*. Pour notre part nous avons isolé sur milieu *Endo* Difco des *E. coli* typiques au point de vue des réactions microchimiques, mais qui ne présentaient pas, sur ce milieu, de colonies à reflet métallique. Pourtant en repiquant ces souches, sur un milieu préparé suivant les indications mêmes d'*Endo*¹¹⁾, l'on obtenait des colonies typiques à reflet métallique.

Nous étudierons ce problème plus en détail, dans un chapitre ultérieur.

5. Milieu E.M.B. (Levine Eosine Methylene Blue Agar Difco)

Ce milieu, recommandé par *Buttiaux*¹⁹⁾ pour différencier les coliformes dans l'analyse colimétrique courante, est rejeté par ce même auteur (*Buttiaux*, *Mu-chemble* et *Leurs*¹⁾) lorsque l'analyse est faite selon la méthode des membranes filtrantes. *Kabler* et *Clark*¹⁷⁾ admettent que l'éosinate de bleu de méthylène ne diffuse pas au travers des membranes filtrantes.

6. Milieu E.M.B. + Tween 80 à la concentration de 1 ‰

L'adjonction d'un mouillant au milieu E.M.B. améliorerait, selon *Buttiaux* et ses coll.¹⁾ l'aspect macroscopique des colonies d'*E. coli* sur membranes fil-

trantes. Etant donné que ce milieu donne de mauvais résultats quantitatifs, comme nous le verrons dans un prochain chapitre, nous n'avons pas poussé nos recherches en vue d'améliorer ce milieu. L'adjonction de Tween ne semble pas avoir un résultat très concluant: sur 4 membranes filtrantes supportant une suspension d'E. coli et disposées sur ce milieu, une seule présentait des colonies ayant un aspect macroscopique colonial typique.

7. Milieu au désoxycholate (Bacto désoxycholate Agar Difco)

Ce milieu est recommandé par les «Standard Methods for the examination of Dairy Products» pour la recherche des coliformes. Nous nous en sommes servis également dans la méthode utilisant les membranes filtrantes. Précisons toutefois qu'il est nécessaire, pour obtenir des colonies bien séparées, de sécher préalablement le milieu après sa répartition en boîtes de Pétri durant 4 heures à 37°, le couvercle des boîtes étant enlevé.

*Kabler et Clark*¹⁷⁾ rejettent ce milieu, les résultats, tant quantitatifs que qualitatifs, n'étant pas encourageants.

8. Milieu de McConkey

Ce milieu, employé en Angleterre, est préparé de la façon suivante:

Peptone Siegfried	20 g
Taurocholate de sodium	5 g
Lactose	10 g
Eau distillée	1000 cm ³
Agar	20 g
Sol. aq. rouge neutre 1 0/0	5 cm ³

On dissout à chaud au bain-marie, et l'on ajuste le pH à 7,2 avant de stériliser à 115° pendant 20 minutes.

9. Milieu au TTC et au Tergitol 7 (Gélose lactosée au chlorure de triphényl-tétrazolium (TTC) + Tergitol 7)

La composition de ce milieu est basée sur les travaux de *Chapmann*²⁰⁻²¹⁾ qui ont prouvé que seul E. coli de toutes les entérobactériacées ne réduisait pas le chlorure de triphényl-tétrazolium. Le milieu original de *Chapmann* a été modifié par *Buttiaux, Muchemle et Leurs*¹⁾. *Chapmann* ajoute du Tergitol 7, préconisé par *Pollard*²²⁾ dans le but d'inhiber l'envahissement des différentes espèces de *Bacillus*, envahissement assez sensible sur ce milieu.

Le milieu complet contient encore du lactose et un indicateur de virage alcali-acidimétrique, le bleu de bromo-thymol. Les références bibliographiques sur ce milieu sont nombreuses et souvent d'avis opposé.

Le milieu original de *Chapmann* donne d'après *Selenka*²³⁻²⁴⁾ de mauvais résultats. Cet auteur a étudié les moyens de remédier à ces inconvénients et a proposé une formule légèrement modifiée du milieu original.

Pour notre étude nous avons utilisé la formule modifiée de *Buttiaux* et al.¹⁾:

Peptone trypsique de <i>Witte</i>	10 g
Extrait de viande	6 g
Extrait de levures	6 g
Lactose	20 g
Agar	20 g

On dissout dans 1000 cm³ d'eau distillée puis on ajoute 5 cm³ d'une solution aqueuse de bleu de bromothymol, on ajuste le pH à 7,2 et on stérilise à l'autoclave rendant 20 minutes à 120°.

Après stérilisation et refroidissement de la base gélosée, on ajoute le TTC à raison de 0,025 ‰ et le tergitol 7, à raison de 0,1 ‰. On coule ensuite en boîte de Pétri et l'on sèche à l'étuve pendant 2 à 3 heures, couvercle retiré.

Ce milieu permet pour *E. coli* la croissance de colonies jaunes à centre plus au moins orangé. Avec un milieu sans tergitol 7 (*Schonberg*²⁵⁾, de même que *Buchsteeg* et *Thiele*²⁶⁾, obtiennent des colonies rose rouge – comme nous l'avons obtenu également lors de nos précédentes expériences – alors qu'*Agnese*²⁷⁾ décrit des colonies d'*E. coli* de couleur orangée.

Citons enfin *Bekker* et *Mossel*²⁸⁾ qui, comparant la sélectivité respective des milieux d'*Endo* et de *Chapmann*, concluent en faveur de ce dernier lorsque la température d'incubation est de 44° alors qu'à 37° ces deux milieux sont aussi peu sélectifs l'un que l'autre, par rapport au seul *E. coli* typique.

Pour notre étude nous avons encore préparé les milieux suivants:

- 9 a) milieu de *Buttiaux*, *Muchemble* et *Leurs*
- 9 b) idem, mais sans tergitol
- 9 c) idem, mais sans extrait de levure
- 9 d) idem, mais sans tergitol 7 et sans extrait de levure.

Effet inhibiteur des différents milieux étudiés

Il nous a paru important d'étudier les différents milieux cités plus haut du point de vue quantitatif. Il est en effet indispensable de savoir si, pour une même suspension monomicrobienne, le nombre des colonies décelables sur les différents milieux sera exactement semblable ou non.

Dans cette étude nous partons, pour chaque série de milieu et pour chaque expérience (cf. tableau 5, suspension I, II, etc.) d'une même suspension monomicrobienne (*E. coli* 20994). Nous filtrons un volume identique, soit de 1 à 3 cm³ suivant les séries d'expériences, volume prélevé au moyen d'une seringue automatique stérilisée, rincée trois fois lors de chaque prélèvement. Etant donné que les détails techniques sont pratiquement les mêmes pour chacun des essais, nous renvoyons le lecteur, à ce propos, aux expériences précédentes.

Nous effectuons 4 filtrations pour chaque expérience et nous prenons la moyenne comme chiffre caractéristique de celle-ci.

Les résultats sont transcrits dans le tableau 5:

Tableau 5
Effet inhibiteur de différents milieux
 filtration sur membranes filtrantes

Gélose simple	214	258	191	159				
	203 206	258 256	223 203	150 152				
	224	265	182	141				
	196	242	216	158				
Gélose lactosée 1 ‰	213	256		152				
	196 208	262 258		149 156				
	203	266		158				
	219	248		166				
Gélose lact. 1 ‰ pourpre bromocrésol	220	264	213	150				
	207 211	246 254	188 205	167 154				
	197	251	208	155				
	221	256	209	145				
Endo Difco	210	250	191	160	58	173	67	125
	217 212	255 255	223 203	171 149	62 61	167 167	70 66	112 117
	227	248	182	140	59	161	67	101
	197	267	216	122	65	166	60	132
E.M.B. Difco	145	176	175	93				
	176 156	156 163	188 180	132 119				
	138	157	201	109				
	166	163	155	142				
E.M.B. + Tween 1 ‰			178					
			154					
			165	170				
			182					
McConkey	130	172	196	135				
	166 157	200 185	184 187	125 135				
	175	186	184	141				
	158	181	186	138				
Désoxycholate Difco	105	141	183	177				
	125 119	170 161	178 182	124 149				
	120	176	168	150				
	125	158	199	145				
TTC + Tergitol (Butiaux)			166				59	95
			180				60	118
			167 171				51 57	110 108
			171				57	108
TTC + Tergitol Extrait levure					40	145	44	91
					55 47	139 143	63 54	99 106
					41	127	61	117
					50	160	47	116
TTC-Tergitol							66	111
							55	120
							61 60	117 117
							58	119
TTC + Tergitol Extrait levure							52	105
							53	106
							53 56	117 112
							65	118
Suspension cm ³	I 2 cm ³	II 3 cm ³	III 2 cm ³	IV 2 cm ³	V 1 cm ³	VI 3 cm ³	VII 1 cm ³	VIII 2 cm ³

Voire suite tableau page 203

Il ressort clairement de la lecture du tableau 5 que le nombre de colonies d'E. coli obtenu sur le milieu d'*Endo*, sur la gélose simple, sur la gélose lactosée, sur la gélose lactosée au pourpre de bromocrésol, de même que sur les différents milieux à base de TTC et Tergitol (sauf séries V et VI) est comparable, alors que le milieu de *McConkey*, l'E.M.B. ainsi que celui au désoxycholate fournissent des résultats nettement plus faibles.

Or, comme ces milieux ne semblent pas permettre une différenciation aisée des coliformes sur membranes filtrantes, nous ne les avons pas utilisés pour l'analyse colimétrique.

De plus devant les résultats généralement inférieurs quant au nombre des colonies obtenu sur les milieux *McConkey*, désoxycholate ou sur E.M.B. nous avons essayé d'incuber tout d'abord les microorganismes retenus par les membranes filtrantes sur un milieu riche, non sélectif en soi, mais comportant comme facteur de départ du lactose: la gélose lactosée à 1 %. Cette incubation préalable a été de durée variable: 2 heures, 4 heures, voire 20 heures. Après cette incubation de départ, les membranes sont portées sur les différents milieux sélectifs.

Cette méthode certainement a le désavantage d'être moins sélective, puisqu'elle permet la croissance de presque tous les germes, particulièrement lorsque la température d'incubation est de 20 à 22°, peut-être même à 30°. A 37° la sélectivité due à la température est déjà assez prononcée.

Après 2 à 4 heures d'incubation préalable sur gélose lactosée les résultats restent trop faibles; après 6 heures, les milieux E.M.B. et au désoxycholate donnent des résultats comparables à ceux obtenus sur gélose simple et sur milieu d'*Endo*; enfin après 20 heures les résultats sont comparables et les colonies, parfaitement visibles, se différencient en 2 heures sur les milieux spéciaux.

Tableau 5 (suite)

	Suspension IX 1 cm ³	Suspension X 3 cm ³
Endo Difco	72	271
	80	302
	91 81	245 275
	82	281
TTC + Tergitol (Buttiaux)	88	259
	77	254
	78 80	277 266
	85	276
TTC + Tergitol Extrait levure	77	261
	88	265
	94 88	294 268
	91	250
TTC + Tergitol	79	271
	68	259
	96 83	278 272
	90	281
TTC + Tergitol Extrait levure	77	285
	88	277
	94 83	271 276
	72	273

Résumé

Après avoir rappelé le dispositif employé et la technique de filtration au moyen de membranes filtrantes, les auteurs étudient, d'une façon aussi précise que possible, les différentes données du problème même de la filtration.

Ils démontrent que la stabilité de la concentration en germes d'une suspension monomicrobienne est réalisable sans qu'il y ait une variation quelconque (durant une période de 3 à 4 heures) pour autant que les suspensions soient stockées au frigorifique (3° à 4°).

Dans une seconde série d'expériences, ils prouvent que le mode de stérilisation de l'appareil n'a aucune influence sur l'exactitude des résultats.

Abordant la question des membranes filtrantes ils examinent les divers procédés de leur stérilisation ainsi que les modifications que peut présenter l'aspect macroscopique des colonies microbiennes d'*Escherichia coli* en particulier en fonction du milieu choisi et du temps d'incubation.

Ils montrent enfin, qu'au point de vue quantitatif, le nombre d'*Escherichia coli* sur milieu d'*Endo*, sur gélose simple, sur gélose lactosée additionnée ou non de pourpre de bromocrésol de même que sur les différents milieux à base de TTC et de Tergitol, est comparable alors que les milieux de *Mac Conkey*, E.M.B. ainsi que celui au désoxycholate donnent des résultats nettement plus faibles.

Zusammenfassung

Nach einer Uebersicht über Anordnung und Technik der Membranfiltration werden die verschiedenen Aspekte des Filtrationsproblems behandelt.

Es gelingt, die Keimkonzentration einer einheitlichen Bakterienaufschlammung während 3 bis 4 Stunden konstant zu halten, wobei die Suspensionen bei einer Kühlschranktemperatur von 3 bis 4° C gelagert werden müssen.

Es wird bewiesen, dass die Art der Sterilisierung von Apparaten auf die Genauigkeit der Resultate keinen Einfluss hat.

Schliesslich werden verschiedene Sterilisationsverfahren geprüft und im Zusammenhang damit die Abhängigkeit des makroskopischen Bildes der Kolonien, speziell desjenigen von *Escherichia coli*, vom gewählten Nährmedium und von der Inkubationszeit studiert; ebenso wird der Einfluss des Nährmediums auf die quantitative Auswertung von *Escherichia coli* anhand einiger bekannter Nährböden geprüft: Dabei ergibt sich, dass die Werte von Endoagar sowohl mit einfachem als auch mit Milchzuckeragar ohne oder mit Bromkresolpurpur und von verschiedenen andern Nährböden auf Basis von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und Tergitol 7 untereinander vergleichbar sind, während die Nährböden nach Mac Conkey, E.M.B. (Levine Eosine Methylen Blue, Difco) und Desoxycholat deutlich schwächere Werte ergeben.

Summary

Discussion of the membrane filter technique applied to *Escherichia coli* and comparison of the various quantitative methods for counting the latter. The Mac Conkey, E.M.B. and desoxycholate-containing media give smaller counts than the other media: Endo, gelose, gelose with lactose (with or without bromocresol purpur), TTC- and Tergitol-containing media), which give comparative results. The various sterilization techniques for membrane filters are discussed and the modifications of *E. coli* in relation to the medium and the incubation time are examined.

Bibliographie (première partie)

- 1) *Buttiaux R., Muchemble G. et Leurs Th.*, La colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes, *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 1010–1025 (1953).
- 2) *Taylor E. W., Burmann N. P. et Oliver C. W.*, Use of the membrane filter in the bacteriological examination of Water, *J. appl. Chem.* **3**, 233–240 (1953).
- 3) *Thomann O.*, Das Membranfilter in der Wasserbakteriologie, *Mitt.* **45**, 62 (1954).
- 4) *Thomann O.*, *ibid.*, diese *Mitt.* **48**, 477 (1957).
- 5) *Clark H. F. et Kabler P. W.*, The Membrane Filter in Water Quality Test. *Am. J. of Publ. Health* **42**, 385–388 (1952).
- 6) *Ljutov U.*, The application of membrane filters for demonstration of the presence of coliform bacteria in Water. I: some technical details. *Vattenhygien* p. 53 (1957). Tiré-à-part dans *Comm. Lab. Bact. Etat Suédois XXII* (1956–57).
- 7) *Helmcke J. G.*, Unregelmässige Strukturen im Feinbau von Membran. *Kolloid. Z.* **135**, 101–105 (1954).
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Membranfiltern nach Filtrationen, *ibid.* 106–107.
- 8) *Kabler P. W.*, Water Examinations by membrane filter and most probable number procedures. *Am. J. Publ. Health* **44**, 379–386 (1954).
- 9) *Henriksen S. D.*, A study of some modifications of methods for detection of coliforme bacteria in Water. *Act. Path. et Microbiol. scandin.* **37**, 267–278 (1955).
- 10) *Henriksen S. D.*, Further Studies on coliform tests on Water carried out at 30° and at 39° C. *Ibid.* **38**, 101–106 (1956).
- 11) *Endo S.*, Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen. *Zent. für Bakt. I Abt. Originale* **35**, 109–110 (1904).
- 12) *Margolena et Hansen*, *Stain Techn.* **8**, 131 (1933).
- 13) *Neuberg et Nord*, *Biochem. Zeit.* **96**, 133 (1919).
- 14) *Kruse H.*, *Gesundheits-Ingenieur* **70**, 154 (1949).
- 15) *Papavassiliou J.*, Verwendung von Endo-Nährkartonscheiben in Kombination mit Membranfiltern mit grünem Netzaufdruck zur Wasseruntersuchung auf coliforme Bakterien. *Zent. Bakt. I Abt. Orig.* **170**, 538–542 (1958).
- 16) *Üüllers R.*, Ueber die Zuverlässigkeit der Colidiagnose auf Endo-Agar. *Zb. Bakt. I Abt. Orig.* **163**, 85–86 (1955).
- 17) *Kabler P. W. et Clark H. F.*, The use of Differential Media with the Membran Filter. *Am. J. Publ. Health* **42**, 390–392 (1952).
- 18) *Braune J. F.*, Ueber die Bedeutung der Untersuchungstechnik bei der bakteriologischen Trinkwasseruntersuchung auf *E. coli*. *Arch. Hyg. (Berlin)* **140**, 28–37 (1956).
- 19) *Buttiaux R.*, Analyse bactériologique des eaux de consommation (1951).
- 20) *Chapmann G. H.*, *Americ. J. of Publ. Health* **41**, 1381 (1951).
- 21) *Chapmann G. H.*, *J. Bact.* **53**, 504 (1947).
- 22) *Pollard A. L.*, *Science* **103**, 758 (1946).
- 23) *Selenka F.*, Ueber die Brauchbarkeit von TTC-Nährböden für die Bestimmung der Coli-Zahl in Wasser. *Arch. Hyg. (Berlin)* **142**, 81–92 (1958).
- 24) *Selenka F.*, Ueber die Ursachen des Versagens von TTC-Nährböden in der Wasserbakteriologie nebst Vorschlägen zu ihrer Beseitigung. *Arch. Hyg. (Berlin)* **142**, 241–260 (1958).

- ²⁵⁾ *Schonberg L.*, Zum möglichst genauen Nachweis coliformer Bakterien in Milch, Wasser und Speiseeis auf TTC-Lactose-Agar. Arch. Hyg. (Berlin) **138**, 583–585 (1954).
- ²⁶⁾ *Bucksteeg W.* et *Thiele H.*, Verbesserung der Keimzählungstechnik in der Wasserbakteriologie durch Anwendung von 2-3-5-Triphenyl-tetrazolium-chlorid.
- ²⁷⁾ *Agnese G.*, Igiene Moderna **50**, 609–619 (1957).
- ²⁸⁾ *Becker J. H.* et *Mossel D. A. A.*, Evaluation of a medium containing tergitol 7 and triphenyl-tetrazolium chloride for the differentiation of coliform bacteria from drinking Water and Food. *Antonie v. Leeuwenhoek* **21**, 252–256 (1955).