

*Proposition d'un protocole
d'analyses microbiologiques
de substrats thermaux utilisés
dans le cadre d'application cutanée*

Rédigé dans le cadre du projet de recherche en collaboration entre

AFRETH

(Association Française pour la REcherche Thermale)

-

Les établissements thermaux de Balaruc-les-bains

-

l'Université Paul Sabatier, ToulouseIII

(Laboratoire de microbiologie industrielle, UFR des Sciences Pharmaceutiques)

Christel PIGASSE
Responsable d'Étude
Université Paul Sabatier, UFR des Sciences Pharmaceutiques
Laboratoire de microbiologie industrielle
35 chemin des maraîchers 31062 Toulouse cedex9



Sommaire :

Introduction

1. Domaine d'application
 2. Références normatives/support pour l'étude et la constitution de ce protocole
 3. Points évalués au cours de cette étude
 4. Termes et définitions
 - 3.1 Définitions
 - 3.2 Micro-organismes d'intérêt:
 5. Principe
 6. Appareillage et matériel spécifique
 7. Milieux de culture
 - 7.1. Généralités
 - 7.2. Milieu de culture
 8. Mode opératoire
 - 8.1. Préparation de l'échantillon
 - 8.2. Ensemencement/ Méthode de dénombrement/Incubation sur milieu présomptif
 - 8.3. Lecture
 - 8.4. Détection et identification des germes indicateurs
 - 8.5. Milieux confirmatifs et Lecture
 9. Expression de résultats/ Mode de calcul
 10. Références bibliographiques
 11. Annexes
- Annexe 1:Composition des milieux de culture
- Annexe 2: Recommandations/circulaires sur l'eau permettant d'établir des seuils de détection des flores dans les substrats thermaux:

Sommaire :

Introduction

L'intérêt de la conception de ce protocole est de permettre à l'établissement thermal d'assurer la qualité de la boue thermale initiale ainsi que de la boue thermale recyclée.

De par le mode conception du péloïde de la station d'intérêt, une phase de recyclage du substrat (à hauteur d'environ 90%) au cours de la saison d'exercice (mars à novembre). Cette étape impose l'établissement d'un protocole d'analyse microbiologique rigoureux et reflétant de façon optimale l'état sanitaire de la boue thermale. Cette dernière étant appliquée au niveau cutanée, une attention particulière sera portée sur les micro-organismes potentiellement pathogènes, à transmission interhumaine.

1. Domaine d'application

Le protocole s'applique à l'analyse microbiologique de la boue thermale, ainsi qu'à l'analyse de sédiments dont elle est constituée.

L'eau thermale entrant dans la composition de la boue thermale répond à une réglementation, répondant à la circulaire relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux.

2. Références normatives/support pour l'étude et la constitution de ce protocole

Cosmétique

NF ISO 21148 : Cosmétiques –Microbiologie - Instructions générales pour les examens microbiologiques

NF ISO 21149 : Cosmétiques –Microbiologie – Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles

NF ISO 21150 : Cosmétiques –Microbiologie – Détection d'*Escherichia coli*

ISO 22717:2006 : Cosmetics –Microbiology – Detection of *Pseudomonas aeruginosa*

NF ISO 22718: Cosmétiques –Microbiologie – Détection de *Staphylococcus aureus*

Norme sur l'eau

Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux

EN ISO 12 780: Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane.

NF T 90-413: Essais des eaux -Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants- Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

NF T 90-414: Essais des eaux- Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants- Méthode générale par filtration sur membrane.

NF T 90-420: Examens bactériologiques des eaux destinées à la consommation humaine.

NT T 90-415: Essais des eaux- Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices et de *Clostridium* sulfite-réducteurs- Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.

NF T 90-421: Examens bactériologiques des eaux de piscines

XP T 90-416: Essais des eaux- Recherche et dénombrements de entérocoques- Méthode générale par filtration sur membrane.

NF EN ISO 5667-3: Qualité de l'eau- Echantillonnage

XP T 90-401: Essais des eaux- Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 37°C.

XP T 90-402: Essais des eaux- Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22°C.

3. Points évalués au cours de cette étude:

Les points ayant fait l'objet d'une mise au point et d'une validation sont les suivants:

- 3.1 Détermination de la vitesse d'agitation lors de l'échantillonnage
200à 350 rpm
- 3.2 Détermination des conditions optimales de dénombrement des microflores aérobie et aéro-anaérobie facultative (37°C):
 - Milieux de culture (TS, R2A, PCA)
 - Temps d'incubation (1-6j)
 - Technique d'ensemencement
 - Etalement
 - Inclusion
- 3.3 Evaluation de l'impact de la sédimentation sur le dénombrement des microflores aérobie et aéro-anaérobie facultative
 - Boue thermale
 - Sédiments
- 3.4 Essai de dissociation des agrégats, impact sur le dénombrement total
 - Agents chimiques
 - EDTA 0.01-0.5%
 - Tween 3-20%
 - Diluant
 - Agents physiques
 - Broyage :2500-6500rpm, de 1 à 3min
 - Ultrasons: Bain à ultrasons ou sonicateur, courant continu ou discontinu
- 3.5 Validation de la sélectivité de milieux pour des pathogènes cutanés en présence de substrats thermaux
 - Choix de milieux sélectifs de culture
 - Technique de dénombrement
 - Etalement
 - Filtration
 - Interférences des substrats sur:
 - Sélectivité du milieu
 - Croissance des pathogènes
 - Temps d'incubation avant le dénombrement

4. Termes et définitions

4.1 Définitions

Sédiments lacunaires

Les sédiments sont prélevés au niveau du bassin de Thau et résultent de l'érosion de la croûte terrestre. Ils sont constitués d'argile, limon, sable fin et matières humiques.

Eau thermale

L'eau thermale entrant dans la constitution de la boue thermale utilisée pour l'établissement de ce protocole est très minéralisée. Elle contient des oligo-éléments et est riche en chlorure et sodium (dans une moindre mesure en sulfate, calcium et magnésium).

Proposition d'un protocole d'analyses bactériologiques de substrats thermaux utilisés dans le cadre d'application cutanée

Boue thermale (Balaruc-les-Bains):

L'amalgame de sédiments lacunaires et d'eau thermale (à hauteur d'environ 29% en eau) constitue la boue thermale, substrat thermal reconnu pour ces effets bénéfiques en terme de rhumatologie.

Microorganisme:

Organisme vivant monocellulaire dont la taille se situe dans le domaine du microscopique.

Pathogène:

Un microorganisme est dit pathogène lorsque qu'il engendre ou peut engendrer une pathologie ou maladie, et ce de façon stricte ou opportuniste.

Contamination inter-patient:

La boue thermale étant appliquée au niveau cutané, une contamination entre patients via la boue est envisagée du fait de l'étape de recyclage.

4.2 Micro-organismes d'intérêt:

Afin d'assurer la qualité "marchande" et "hygiène" des produits, l'analyse inclut une évaluation quantitative globale ou spécifique sur la base d'une sélection d'indicateurs.

D'un point de vue global, la caractérisation de l'écosystème de substrat thermaux passe par le dénombrement des flores viables et cultivables aérobies, aéro-anaérobies facultatives et anaérobies stricts.

Sur le plan spécifique, divers pathogènes sont recherchés. L'attention est portée sur les microorganismes potentiellement pathogènes au niveau cutané, en particulier *P.aeruginosa*, *S.aureus*, les coliformes et les Clostridium sulfito-réducteurs.

L'importance de la recherche de ces micro-organismes réside dans leur pathogénie au niveau cutané et des muqueuses (*P.aeruginosa* ou les coliformes). De plus, ils permettent d'indiquer une contamination d'origine humaine (*Clostridium* sulfito-réducteurs, coliformes) ou une dégradation de la qualité de la boue thermale.

5. Principe

L'analyse des substrats thermaux, sédiments ou boues thermales, s'articule en 2 étapes.

La première consiste en l'échantillonnage, passant par l'hydratation du substrat, un vortexage de manière à dissoudre les amas terreux, et l'agitation de l'échantillon pour affiner la dissolution des particules les plus grossières.

L'analyse a proprement parlé permet une évaluation de la population présente au sein de l'échantillon. Ainsi, les flores totales aérobies ou anaérobies, ou bien les flores spécifiques peuvent faire l'objet de ces analyses. Pour se faire, nous réaliserons un échantillonnage poursuivi de dénombrements sur milieu solide simple, ou bien spécifiques et sélectifs selon le cas. Suite à une incubation dans un délai suffisant, un dénombrement permettra de quantifier et de caractériser l'échantillon.

6. Appareillage et matériels spécifiques

Agitateur mécanique permettant de contrôler la vitesse d'agitation du plateau.

7. Milieux de culture

7.1. Généralités

Pour l'analyse de la flore totale, le milieu de culture préconisé est la gélose Trypcase-soja (composition Annexe 1). Ce milieu nutritif permet une croissance des micro-organismes revivifiables et cultivables sans exercer de pression de sélection.

La recherche des flores spécifiques passe par l'ensemencement de l'échantillon sur 2 types de milieux. Le premier, appelé milieu présomptif, va restreindre le développement de certains micro-organismes pour ainsi mettre en évidence la croissance du micro-organisme recherché. La présence d'un germe donné est affirmée dans un second temps, sur milieu ou par test confirmatif (compositions en Annexe 1).

7.2. Milieux de culture

Trypcase-soja:

La base nutritive relativement riche de ce milieu convient à la culture d'un grand nombre de micro-organismes.

Des milieux moins nutritifs sont classiquement considérés pour ce type d'analyse. *Cependant, nos travaux ont démontrés l'avantage du milieu Trypcase-soja.*

Chapman:

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif. La culture sur ce milieu met en évidence uniquement les bactéries qui cultivent en milieu hypersalé. En effet, sa forte concentration en chlorure de sodium (75g.L-1) ralentit la croissance de la majorité des bactéries, à l'exception des halophiles (organismes qui ont un besoin et/ou résistent de fortes concentrations en sel). Parmi ces germes, on retrouve les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

La croissance sur ce milieu permet d'étudier la fermentation du mannitol par virage de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies. Ainsi des colonies utilisant le mannitol laisse suspecter l'appartenance du germe à l'espèce de *S. aureus*. De par la charge saline de l'eau thermale, de nombreux autres micro-organismes sont susceptibles de croître sur ce milieu, d'où la nécessité d'un test confirmatif.

TTC Tergitol 7:

Le milieu TTC tergitol est un milieu sélectif, utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes.

Sa sélectivité est donnée par la présence d'heptadécylsulfate de sodium (Tergitol[®] 7) et du 2, 3,5-triphenylterazoliumchloride (TTC) qui inhibe la plupart des bactéries à Gram positif.

Le tergitol 7 permet de sélectionner les coliformes et inhibe également l'envahissement par *Proteus*. Le TTC montre le pouvoir réducteur des bactéries, il se manifeste par la pigmentation des colonies. On peut ainsi discriminer *E.coli* et *Enterobacter aerogenes* des autres coliformes, qui réduisent le TTC.

De plus, ce milieu donne une indication sur la capacité d'utiliser le lactose, par la présence d'un indicateur coloré de pH, le bleu de bromothymol.

Cétrimide:

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P.aeruginosa*. Ce milieu gélosé est relativement pauvre, et contient un antiseptique : le cétrimide (bromure de N-acétyl-N, N, N-triméthylammonium).

L'utilisation de ce dérivé d'ammonium quaternaire comme agent sélectif produit une large inhibition des micro-organismes contaminants. La concentration de 0,3 g/l inhibe suffisamment la flore d'accompagnement et permet une meilleure croissance des *Pseudomonas*.

La présence d'acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif) permet de compléter la sélectivité.

Ce milieu favorise la production de pigments par *P.aeruginosa* (pyoverdine et pyocyanine).

TSC:

Le TSC est un milieu sélectif pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* ou des *Clostridium* sulfito-réducteurs. Le tryptose, la peptone de farine de soja et l'extrait de levure assurent aux clostridies les meilleures possibilités de développement. Le citrate de fer ammoniacal et le sulfite de sodium permettent de mettre en évidence les colonies productrices d'H₂S (apparition de pigments noirs). La présence d'un antibiotique, la D-cyclosérine, donne au milieu une sélectivité vis-à-vis de *Clostridium perfringens* et en même temps, diminue la taille des halos noirs diffus et gênants autour des colonies de *Clostridium perfringens*. Les colonies noires cultivant en profondeur peuvent être des *Clostridium* sulfito-réducteurs. La croissance à 46°C indique *Clostridium perfringens*.

8. Mode opératoire

8.1. Préparation de l'échantillon

Pour les essais réalisés, et afin de comparer les résultats entre les sédiments et la boue thermale, l'échantillon est hydraté à hauteur de 90% avec de l'eau physiologique stérile. En considérant une hydratation de 29% pour la boue thermale et 0% pour des sédiments, sont rajoutés, respectivement, 6.10mL ou 9mL d'eau physiologique stérile à 1g de substrat.

Suite à un vortexage pendant 30sec, une agitation mécanique permet de finaliser l'échantillonnage de 30min à 300rpm. *Cette condition a été déterminé comme étant optimale pour l'obtention de l'échantillon à analyser. Aucun agent chimique ou physique n'a permis d'optimiser la récupération de flores.*

8.2. Ensemencement/ Méthode de dénombrement/Incubation sur milieu présomptif

La technique choisie pour réaliser l'ensemencement est l'étalement au râteau. *Ce mode d'ensemencement est une condition définie, en comparaison à un ensemencement après filtration ou par inclusion. Il est également important de réaliser l'ensemencement dès la fin de la préparation, une sédimentation de l'échantillon montre une diminution d'un facteur 10 du nombre d'UFC dénombré.*

Après incubation, le dénombrement de 100µL d'échantillon se fait en UFC (Unité Formant Colonie) ramené par gramme de substrat.

Flore totale:

Afin d'évaluer la quantité totale de microorganismes cultivables présente dans le substrat, des dilutions sériées de raison 10 en eau physiologique sont nécessaires avant

l'ensemencement sur gélose, de manière à obtenir des entre 30 et 300 UFC dans les 100µL déposés. Il est préconisé de réaliser des ensemencements en triplicata pour palier à un éventuel envahissement de la surface gélosée. *L'étude d'une cinétique de croissance permet d'établir un dénombrement maximal de la flore à 6j d'incubation mais dès 4j 90% des UFC sont mise en évidence*

Flore spécifique:

En fonction du seuil de détection du microorganisme retrouvé par gramme de sédiments que le laboratoire veut s'imposer, la dilution de l'échantillon à ensemenecer sur la gélose peut être variable.

Différents essais ont permis d'établir les conditions suivantes:

Les milieux de Chapman et TTC ensemencés sont incubés à 37°C pendant 48h, la croissance est présente en 24h mais les pigmentations ne sont détectables qu'à partir de 48h d'incubation.

P.aeruginosa donne des colonies qui s'étalent; le dénombrement est donc facilité pour une lecture après 24h d'incubation à 37°C, puis contrôlée à 48h.

Une atmosphère anaérobie est nécessaire pour la culture des clostridies, à 37°C pendant 3j.

8.3. Lecture

Chapman:

Observations	Résultat
Colonie jaune/Halo jaune	Mannitol+
Colonie rouge	Mannitol-

Considérer comme suspectes les colonies qui présentent, après incubation à 37°C, sur gélose de Chapman, une coloration jaune cernée d'un halo jaune.

TTC:

Observations	Résultat	Interprétations
Colonie jaunes orangé/halo jaune	TTC+/- Lactose+	Suspicion pour <i>Escherichia coli</i> ou <i>Enterobacter aerogenes</i>
Colonie rose-rouge/halo jaune	TTC+/Lactose+:	Coliformes (autre que <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i>)
Colonie rouge foncée	TTC+ Lactose -	Flore diverse

Considérer comme suspectes les colonies qui présentent, après incubation à 44°C, sur gélose lactosée au TTC et au tergitol 7, une coloration jaune ou orange avec un halo jaune plus ou moins net.

Cétrimide:

Observations	Résultat
Croissance	Positif
Absence de croissance	Négatif
Virage du milieu au bleu	Production du pigment pyocyanine
Virage du milieu au jaune-vert	Production du pigment pyoverdine

Considérer comme suspectes toutes les colonies présentent, après incubation à 37°C, sur gélose cétrimide, et noter également leur pigmentation .

TSC:

Observations	Résultat
Colonie noire/ halo noir	Réduction des sulfites
Pas de coloration noire	Pas de réduction des sulfites

Considérer comme *Clostridium* sulfito-réducteur, toute colonie noire entourée d'un halo noir. Il est nécessaire de s'assurer que la souche corresponde à un bacille à Gram positif.

8.4. Détection et identification des germes indicateurs

A partir de colonies suspectes obtenues sur milieu présomptif, un isolement est réalisé sur ce même milieu afin de pouvoir poursuivre avec un test confirmatif

8.5. Milieux confirmatifs et Lecture

Afin de confirmer l'appartenance de l'isolat à un genre bactérien donné, il y a nécessité de passer par un test confirmatif.

Pour valider la présence *S.aureus*, il faut rechercher la présence de l'activité catalase (NF ISO 22148) et la présence d'un coagulase A (NF ISO 22718).

En tout premier lieu, s'assurer que la souche présente une morphologie en coque à Gram positif.

Recherche de la catalase:

A partir d'un isolement, faire réagir une colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène. L'apparition de dégagement de dioxygène (sous forme de bulle) atteste de la présence de la catalase au sein de la souche.

Recherche de la coagulase:

Transférer les colonies suspectes isolées dans des tubes stériles contenant chacun du plasma de lapin. Après incubation de 6h à 37°C±2°C, constater ou non la coagulation du plasma.

Pour valider la présence de coliformes, il faut rechercher la tryptophanase. Cette enzyme permet de produire de l'indole à partir de tryptophane. La réaction enzymatique entre le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde (contenu dans le réactif de Kovacs) et l'indole produit un composé rouge.

En tout premier lieu, s'assurer que la souche présente une morphologie en bacille à Gram négatif et oxydase négative (cf. Test confirmatif de *P.aeruginosa*).

Recherche de la tryptophanase:

Transférer les colonies suspectes isolées dans des tubes stériles contenant chacun du milieu urée-tryptophane. Après incubation de 24h à 37°C±2°C, ajouter du réactif de Kovacs dans le tube et observer si une coloration rouge en anneau apparaît.

Pour valider la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, s'assurer en tout premier lieu que la souche présente une morphologie en bacille à Gram négatif et oxydase positive.

Dans un second temps, il faut vérifier que la souche produise la nitrate réductase.

Recherche de l'oxydase:

L'oxydase, appelée aussi la phénylène diamine oxydase, est une enzyme permettant d'oxyder les dérivés méthylés du paraphénylène diamine (famille des cytochromes). De coloration incolore, le N diméthyl paraphénylène diamine prend une coloration rose une fois oxydé, entre 5 et 10 sec.

Recherche de l'oxydase:

Humecter un papier filtre avec le réactif (contenant le N diméthyl paraphénylène diamine). Prélever une colonie isolée et l'écraser sur le support contenant le réactif. L'apparition d'une coloration rose sur le papier filtre atteste de la présence de l'oxydase.

Recherche de la nitrate réductase:

Réaliser une suspension de la souche à identifier dans du bouillon acétamide (contenant des nitrates) et incuber 24h à 37°C+/-2°C avant d'ajouter quelques gouttes de réactif de Nessler. Ce dernier permet de mettre en évidence la présence de cations ammonium (NH₄⁺) issu de la dégradation des nitrates en nitrites. Une coloration rouge-brique est observée pour un résultat positif en cas de présence de la nitrate réductase. Selon la norme ISO 22717 :2006, il est également possible de valider l'identification de *P.aeruginosa* si la souche sur milieu présomptif fluoresce sous une lampe à ultraviolets.

La présence de colonies typiques de *Clostridium* n'est pas soumise à une confirmation d'identification, notamment par leur croissance en anaérobiose.

9. Expression de résultats/ Mode de calcul

Il est préconisé d'uniformiser les résultats en les exprimant par gramme de sédiments. En fonction du niveau de qualité sanitaire que le laboratoire s'imposera en contrôle interne, des niveaux cibles sont à mettre en place. Ils doivent prendre en compte les limites de détection liées à la complexité du traitement du substrat. La réglementation sur l'eau est une base pour établir les seuils de tolérance sur les analyses bactériologiques (cf. Annexe2)

10. Références bibliographiques

- > Eaux de établissements de santé, qualité de l'eau aux points d'usage, édité par le Groupe Eau santé
- > L'eau dans les établissements de santé, édité par le ministère de la santé et des solidarités
- > Le guide du thermalisme, le guide officiel des stations thermales françaises, édité par le Groupe impact médecine

11. Annexes

Annexe 1

Trypcase-soja

Peptone de caséine :	15,0 g/l
Peptone de farine de soja :	5,0 g/l
Chlorure de sodium :	5,0 g/l
Agar :	15,0 g/l
pH : 7,3 ± 0,2	

Chapman

Peptone	10,0 g/l
Extrait de viande de bœuf	1,0 g/l
Chlorure de sodium	75,0 g/l
Mannitol	10,0 g/l
Rouge de phénol	0,025 g/l
Agar	15,0 g
pH = 7,4	

TTC Tergitol 7

Peptone	10,0 g/l
Extrait de viande	5,0 g/l
Extrait de levure	6,0 g/l
Lactose	20,0 g/l
Tergitol	710 mg/l
TTC	25 mg/l
Bleu de bromothymol	50 mg/l
Agar	13,0 g/l
pH = 7,2	

TSC

Tryptone	20,0 g/l
Citrate de fer III ammoniacal	1,0 g/l
Cyclosérine	0,4 g/l
Disulfite de sodium	1,0 g/l
Agar	5,0 g/l

Cétrimide (Gélose)

Peptone de gélatine	16,0 g/l
Peptone de caséine	10,0 g/l
Bromure de tétradonium (cétrimide)	0,2 g/l
Acide nalidixique	15,0 mg/l
Sulfate de potassium	10,0 g/l
Chlorure de magnésium	1,4 g/l
Agar	10,0 g/l
pH = 7,1	

Urée tryptophane

L-tryptophane	3g
Urée	20g
Hydrogénophosphate de potassium	1g
Dihydrogénophosphate de potassium	1g
NaCl	5g
Alcool à 95°	10mL
Rouge de phénol	25 mg

Annexe 2

Recommandations/circulaires sur l'eau permettant d'établir des seuils de détection des flores dans les substrats thermaux:

> Eau pour soin standard: A des fins alimentaires mais également pour des soins de base sur les patients sans risque et le nettoyage de dispositifs médicaux.

	Niveau cible
Flore aérobique revivifiable à 22°C	≤100UFC/mL
Flore aérobique revivifiable à 36°C	≤10UFC/mL
Coliformes totaux	<1UFC/100mL
<i>P.aeruginosa</i>	<1UFC/100mL

> Eau bactériologiquement maîtrisée: Utilisée pour les soins de patients vulnérables, le nettoyage des muqueuses et rinçage final de certaines dispositifs médicaux

	Niveau cible	Niveau d'action
Flore aérobique revivifiable à 22°C	≤1UFC/100mL	≥10UFC/100mL
<i>P.aeruginosa</i>	<1UFC/100mL	≥1UFC/100mL

> Eau de piscine de rééducation

	Niveau exigé
Flore aérobique revivifiable à 36°C	<100UFC/mL
Coliformes totaux à 36°C	≤1UFC/100mL
<i>P.aeruginosa</i>	≤1UFC/100mL
<i>S.aureus</i>	≤1UFC/100mL

> Eau des bains à remous et des douches à jet

	Niveau exigé
Flore aérobique revivifiable à 36°C	<100UFC/mL
Coliformes totaux à 36°C	≤1UFC/100mL
<i>P.aeruginosa</i>	≤1UFC/100mL
<i>S.aureus</i>	≤1UFC/100mL
<i>L.pneumophila</i>	absence

> Eau purifiée: Utilisée dans la préparation de médicaments

	Niveau exigé
Flore aérobique revivifiable	≤100UFC/mL